



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Engenharia Química
Programa de Pós Graduação em Engenharia Química



**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO PELO USO
DE COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CEPAS SELECIONADAS DO
ECOSSISTEMA DO CERRADO**

Janaína Fischer

Uberlândia - MG

2014



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Engenharia Química
Programa de Pós Graduação em Engenharia Química



**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO PELO USO DE
COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CEPAS SELECIONADAS DO ECOSISTEMA
DO CERRADO**

Janaína Fischer

Orientador: Dra. Vicelma Luiz Cardoso (UFU)

Co-orientador Dr. Ubirajara Coutinho Filho (UFU)

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

Uberlândia - MG

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F529p
2014 Fischer, Janaína, 1982-
 Produção de etanol de segunda geração pelo uso de complexo
 enzimático de cepas selecionadas do ecossistema do cerrado / Janaína
 Fischer. - 2014.
 171 f. : il.

 Orientadora: Vicelma Luiz Cardoso.
 Coorientador: Ubirajara Coutinho Filho.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
 de Pós-Graduação em Engenharia Química.
 Inclui bibliografia.

 1. Engenharia Química - Teses. 2. Alcool - Teses. 3. Bagaço de cana
 - Teses. 4. Fermentação - Teses. I. Cardoso, Vicelma Luiz. II. Coutinho
 Filho, Ubirajara. III. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
 Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

TESE DE DOUTORADO DE JANAÍNA FISCHER SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 24/06/2014.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Viciélma Luiz Cardoso
(Orientadora – PPGEQ/UFU)



Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
(Co-orientador – PPGEQ/UFU)



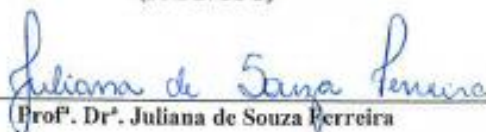
Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz
(PPGEQ/UFSCar)



Prof. Dr. Gislaine Fernandes
(IFTM – Campus Uberaba)



Dr. Carla Zanella Guidini
(PNPD/UFU)



Prof. Dr. Juliana de Souza Ferreira
(FEQ/UFU)



Prof. Dr. Líbia Diniz Santos
(FEQ/UFU)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais Romeu e Celina; aos meus queridos irmãos; e aos meus amados sobrinhos: Anna, Rodrigo e Jordana; pelo apoio, compreensão e amor. E em especial a Professora Vicelma e Professor Ubirajara que me deram as mãos nesta caminhada, me orientando e auxiliando com valiosos ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas alegrias proporcionadas, por iluminar o meu caminho e estender a mão nas horas de dificuldades.

Aos meus pais, Romeu e Celina, que sempre me deram amor, educação e apoio para minha formação pessoal e acadêmica. Aos meus irmãos, Fischer (Fofó) e Marlei, por estarem ao meu lado, e principalmente por agradecerem a minha vida com meus sobrinhos: Anna Betieli, Rodrigo e Jordana, que já se despertam para pesquisa e estudos. Amo vocês!

A meus orientadores, Prof^ª. Vicelma Luiz Cardoso e Prof. Ubirajara Coutinho Filho pela orientação, por toda a dedicação, paciência e confiança, fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada também, pelas palavras amigas, incentivo e carinho. Não tenho palavras para expressar tamanho respeito, admiração e gratidão que sinto por vocês. Os momentos convividos estão eternizados em meu coração. Muito obrigada!

A todos os professores da FEQUI que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação, contribuindo com informações valiosas para a realização deste estudo. Também aos técnicos e funcionários pelo pronto atendimento quando necessário.

Aos colegas e amigos do laboratório, pois juntos trilhamos uma etapa importante em nossas vidas profissionais e também pessoais. Obrigada pelos ensinamentos, ajuda, momentos compartilhados e amizade ímpar *“Quando for pra falar de algo bom...sempre vou lembrar-me de vocês”*.

Aos alunos de iniciação científica. Lina e Belmira, obrigada por toda dedicação e ajuda concedida, pela bonita amizade que construímos no decorrer destes anos.

A UFU e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia da Faculdade de Engenharia Química, pela oportunidade concedida.

Ao CNPq pela confiança depositada e suporte financeiro, fundamentais para desenvolvimento deste trabalho. Serei eternamente grata e feliz pelo apoio!

Aos demais órgãos de fomento, FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro e suporte para participação em eventos científicos.

Ao CTC por gentilmente ter cedido o bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho e estudos conjuntos de etanol celulósico.

Enfim, a todos, que com boa intenção, colaboraram pela realização e finalização deste trabalho. Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE QUADROS	vi
LISTA DE SÍMBOLOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Biomassas de resíduos agroindustriais	4
2.1.1. Biomassas lignocelulósicas.....	4
2.1.1.1. Bagaço de cana-de-açúcar	8
2.1.2. Farelo de arroz e Soro de queijo	10
2.2. Pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas.....	12
2.2.1. Tratamento de explosão a vapor	15
2.3. Hidrólise enzimática.....	17
2.3.1. Enzimas do complexo lignocelulolítico	17
2.3.1.1. Enzimas celulasas.....	18
2.3.2. Tecnologias para produção de celulase	23
2.3.2.1. Fermentação em estado sólido (FES).....	24
2.3.3. Microrganismos produtores de enzimas lignocelulolíticas	25
2.3.3.1. Seleção de microrganismos com potencial para produção de enzimas lignocelulolíticas.....	28
2.3.4. Técnicas de purificação de enzimas	30
2.3.4.1. Sistema aquoso bifásico (SAB).....	32
2.3.4.2. Precipitação com Sulfato de Amônio	34
2.4. Produção de bioetanol de segunda geração	35
2.4.1. Estratégias para produção de bioetanol de segunda geração	38
2.4.1.1. Hidrólise e fermentação separadas (SHF)	38
2.4.2. Leveduras utilizadas na fermentação alcoólica.....	39
2.4.3. Estudos e dados da literatura de produção de etanol 2 G	41

2.5. Perspectivas e importância do desenvolvimento do E2G	42
2.6. Inteligência artificial e métodos heurísticos de busca de soluções	46
2.6.1. Inteligência Artificial.....	46
2.6.2. Redes neurais artificiais (RNAs).....	48
2.6.2.1. Métodos heurísticos de otimização associadas às redes neurais	51
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1. Microrganismos	56
3.2. Biomassas	61
3.3. Metodologia experimental.....	62
3.3.1. Seleção dos microrganismos por avaliação do índice enzimático	62
3.3.2. Fermentações	64
3.3.2.1. Fermentação em estado sólido (FES) para a produção do complexo enzimático bruto	64
3.3.2.2. Processo de fermentação alcoólica (FA) com hidrólise simultânea para produção de etanol	65
3.3.3. Testes de referência para avaliar a produção de etanol	66
3.3.4. Avaliação do tempo e da composição do meio da FES para produção do complexo enzimático bruto	66
3.3.5. Avaliação da composição do substrato na produção de etanol a partir de complexo enzimático obtido da cepa selvagem selecionada.....	67
3.3.6. Comparação da produção de etanol a partir de extrato enzimático produzido por diferentes cepas selvagens coletada no Cerrado Triângulo Mineiro.	68
3.3.7. Produção de etanol a partir do complexo enzimático produzido pela cepa selvagem selecionada (<i>M. racemosus Fresenius</i>) empregando diferentes soluções para extração da enzima.....	68
3.3.8. Fermentações sucessivas utilizando <i>Mucor racemosus Fresenius</i>	69
3.3.9. Fermentações sucessivas de <i>M. racemosus Fresenius</i> e <i>Aspergillus niger</i>	71
3.3.10. Misturas dos complexos enzimáticos produzidos por <i>M. racemosus Fresenius</i> e <i>A. niger</i>	72
3.3.11. Fermentação alcoólica em batelada alimentada.....	72
3.3.12. Uso de inteligência artificial na avaliação dos efeitos de temperatura, tempo e quantidades de extrato enzimático, bagaço de cana e inóculo e na produção de etanol. 73	
3.3.12.1. Ensaios experimentais	73
3.3.12.2. Avaliação das melhores condições associadas à produção de etanol.....	74

3.3.13. Fermentação alcoólica de bagaço de cana tratado por <i>Pichia stipitis</i>	75
3.3.14. Processos Hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica	76
3.3.15. Estudo da Concentração do complexo enzimático.....	77
3.3.15.1. Purificação por Sistema Aquoso Bifásico (SAB)	77
3.3.15.2. Precipitação com Sulfato de Amônio (<i>Salting-out</i>)	79
3.3.15.3. Concentração em Rotaevaporador.....	79
3.3.16. Métodos analíticos.....	80
3.3.16.1. Atividade em celulase.....	80
3.3.16.2. Determinação de açúcares e etanol.....	80
3.3.16.3. Determinação da concentração dos açúcares redutores totais	81
3.3.16.4. Determinação de proteínas.....	81
3.3.16.5. Determinação de concentração celular	82
3.3.17. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar	82
3.3.17.1. Análises imediatas	83
3.3.17.2. Análise de Celulose, hemicelulose, lignina	83
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.1. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar	87
4.2. Capacidade de degradação da celulose	89
4.3. Avaliação do tempo e do meio FES para produção do complexo enzimático empregando o <i>Mucor racemosus Fresenius</i>	91
4.4. Avaliação da composição do meio de produção de etanol.....	95
4.5. Comparação da produção de etanol a partir do complexo enzimático produzido por diferentes cepas selvagens coletadas no Cerrado Brasileiro	96
4.6. Produção de etanol em função do tempo, da solução utilizada para extrair o complexo enzimático e da composição do meio de fermentação alcoólica a partir do complexo enzimático produzido pela cepa selvagem <i>Mucor racemosus Fresenius</i>	97
4.7. Produção de etanol utilizando fermentações sucessivas	100
4.8. Fermentações sucessivas de <i>Mucor racemosus Fresenius</i> e <i>Aspergillus niger</i>	103
4.9. Misturas de complexo enzimático de <i>Mucor racemosus Fresenius</i> e <i>Aspergillus niger</i>	104
4.10. Fermentação alcoólica batelada alimentada	105
4.11. Otimização da produção de etanol por rede neuronal e métodos heurísticos.....	106
4.12. Fermentação alcoólica de bagaço de cana por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pichia stipitis</i>	112

4.13. Processos Hidrólise separada da fermentação alcoólica	114
4.14. Processos de purificação do complexo enzimático produzido por cepa selvagem de <i>A. niger</i>	116
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	122
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	124
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
CAPÍTULO 8 – APÊNDICE.....	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Complexo lignocelulósico: cadeias de celulose envolvidas por hemicelulose e lignina. Fonte (adaptado de CERES, 2013).....	5
Figura 2.2 – Representação da cadeia da celulose (RAMOS, 2003).....	6
Figura 2.3 – Componentes da fração hemicelulose (FENGEL e WEGENER, 1989).....	7
Figura 2.4 – Esquema da parede celular vegetal, constituída por celulose, hemicelulose e lignina (adaptado de RUBIN, 2008).	8
Figura 2.5 – Esquema dos efeitos do pré-tratamento sobre a estrutura lignocelulósica (adaptado de KONDO, 1997).....	13
Figura 2.6 – Formação dos componentes inibitórios (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000b; RABELO, 2010).	15
Figura 2.7 – Estrutura da Endoglucanase (WEIZMANN, 2010).	19
Figura 2.8 – Estrutura da Exoglucanase (WEIZMANN, 2010).	20
Figura 2.9 – Estrutura da β -glucosidase (WEIZMANN, 2010).	20
Figura 2.10 – Representação esquemática da hidrólise enzimática de celulose pelo sistema celulolítico (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).....	21
Figura 2.11 – Mecanismo da degradação da celulose e sinergismo do complexo enzimático (SADDLER, RAMOS e BREUIL, 1993).....	22
Figura 2.12 – Macro e micromorfologia do <i>Aspergillus niger</i> (DOE-JOINT GENOME INSTITUTE, 2010 <i>apud</i> ZÚÑIGA, 2010).....	26
Figura 2.13 – Mapa Biomas brasileiros: abrangência e vegetação do Cerrado (IBAMA, 2013).	29
Figura 2.14 – Fluxograma com as matérias-primas principais e os processos utilizados para a produção de etanol (adaptado de MUSSATTO et al., 2010).	36
Figura 2.15 – Diagrama da bioconversão da biomassa de cana em etanol de segunda geração (adaptado de CANILHA et al., 2012).	37
Figura 2.16 – Moagem de cana-de-açúcar no Brasil em toneladas/safra-ano (MAPA, 2014).	43
Figura 2.17 – Evolução brasileira da produção de açúcar em toneladas/safra-ano e produção de etanol em m ³ /safra-ano (MAPA, 2014).....	44

Figura 2.18 – Desenvolvimento do custo das enzimas aplicadas ao processo hidrolítico (adaptado de NOVOZYMES, 2010).....	45
Figura 2.19 – Ilustração dos três componentes principais de um sistema de IA (adaptado de HAYKIN, 2001).....	47
Figura 2.20 – Função de transferência tangente hiperbólica (BAUGHMAN e LIU, 1995).	49
Figura 2.21 – Função sigmoid (S-shaped function) (BAUGHMAN e LIU, 1995).....	50
Figura 2.22 – Função de transferência Gaussiana (BAUGHMAN e LIU, 1995).	50
Figura 2.23 – Rede neuronal artificial (RNA).....	51
Figura 2.24 – Representação do caminho percorrido pela formiga que fornece $X_1 = P_1$, $X_2 = P_2$, $X_3 = P_3$, $X_4 = P_4$ e $X_5 = P_5$, na qual X_i ($i=1,2,3,4, 5$) representa as variáveis que influencia nas respostas.....	53
Figura 3.1 – Fluxograma ilustrativo das etapas de trabalho.....	55
Figura 3.2 – Imagem ilustrativa do bagaço de cana-de-açúcar não tratado termicamente-BNT; bagaço de cana tratado a explosão a vapor à baixa severidade-BBS e bagaço de cana tratado a explosão a vapor à alta severidade (BAS).	61
Figura 3.3 – Imagem ilustrativa do farelo do beneficiamento de arroz e do soro de queijo.....	62
Figura 3.4 – Inoculação do fungo em estudo em meio contendo celulose como única fonte de carbono.....	63
Figura 3.5 – Fluxograma ilustrativo das fermentações realizadas para produção de enzimas e etanol.....	65
Figura 3.6 – Esquema ilustrativo da fermentação sucessiva com reposição de enzimas.	71
Figura 3.7 – Fluxograma ilustrativo do processo de hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica.....	77
Figura 3.8 – Sistema de evaporação a vácuo (Rotaevaporador) utilizado na concentração de extrato enzimático de <i>A. niger</i>	80
Figura 4.1 – Composição das fibras lignocelulósicas do bagaço de cana tratado a explosão a vapor, na condição de baixa severidade-BBS (12 kgf/cm^2 , 8 min.).....	88
Figura 4.2 – a) Placa de Petri com meio de celulose após 48 h de crescimento do fungo inoculado.	89
Figura 4.3 – Índice enzimático para os diferentes fungos avaliados no teste de produção de celulase em presença de celulose como única fonte de carbono.....	90

Figura 4.4 – Influência do teor de bagaço tratado a explosão a vapor nas características do EEB produzidos por FES com <i>Mucor racemosus Fresenius</i> ..	92
Figura 4.5 – Fermentação em Estado sólido com meio com MPE4 (40% de BBS e 60% de farelo de arroz) e <i>M. racemosus Fresenius</i>	93
Figura 4.6 – Efeito do tempo da fermentação sólida na concentração de proteína, célula e ART do caldo da FES e na produção de etanol por FA.	94
Figura 4.7– Fermentação alcoólica por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de substrato sólido, MFA3 e extrato enzimático bruto.....	96
Figura 4.8 – Produção de etanol (48 h de FA) dos fungos pré-selecionados. Fungo de número C7 (<i>Monilia sitophila</i>), E3 (<i>Monilia sitophila</i>), E6 (<i>Fusarium sp</i>), E8 (<i>Acremonium sp</i>), F2 (<i>Mucor racemosus Fresenius</i>), I1 (<i>Trichoderma asperellum</i>), I2 (<i>Trichoderma reesei</i>), I3 (<i>Trichoderma harzianum</i>), I4 (<i>Aspergillus niger</i>), I5 (<i>Aspergillus niger</i>), I6 (<i>Aspergillus niger</i>) e I7 (<i>Aspergillus niger</i>).....	97
Figura 4.9 – Concentração de etanol em função do tempo de fermentação alcoólica, utilizando para extração das enzimas presentes na FES, as seguintes soluções: <i>Tween 80</i> a 1% em água deionizada - ST (■); <i>Tween 80</i> a 1% em soro de queijo com $36 \pm 1,5$ g/L de lactose (SW) sem utilizar extrato de levedura na fermentação alcoólica (●); <i>Tween 80</i> a 1% em soro de queijo com $36 \pm 1,5$ g/L de lactose (SW) utilizando extrato de levedura na fermentação alcoólica (★); <i>Tween 80</i> a 1% em soro de queijo hidrolisado com H_2SO_4 1% em autoclave a 0,5 atm por 20 min – SWHA (Δ); <i>Tween 80</i> a 1% em soro hidrolisado com β-galactosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>) 3g/L (+) – SWHE.....	98
Figura 4.10 – Concentração de etanol em função do tempo para fermentações alcoólicas com alimentação de substrato sólido a cada 24 horas, com e sem reposição de enzima. Para extração do primeiro extrato enzimático bruto foi utilizado 100 mL de solução com <i>Tween 80</i> a 1% com os seguintes meios: soro de queijo com $36 \pm 1,5$ g/L de lactose, com reposição de enzimas (●); soro de queijo com lactose hidrolisada com H_2SO_4 1% em autoclave a 0,5 atm por 20 min, com reposição de enzimas (Δ); água deionizada sem reposição de enzima (★); e água deionizada com reposição de enzimas (■).....	101
Figura 4.11 – Concentração de etanol em função do tempo de fermentações sucessivas empregando enzimas produzidas de <i>Aspergillus niger</i> e de <i>Mucor racemosus Fresenius</i>	104
Figura 4.12 – Concentração de etanol produzida empregando mistura de complexo enzimático produzido de <i>M. racemosus Fresenius</i> e <i>A. niger</i> em porcentagem volumétrica.	105

Figura 4.13 – Concentração de etanol em função do tempo de fermentações utilizando processo batelada alimentada e fermentação sucessiva, empregando enzimas do extrato enzimático bruto (EEB) produzidas por <i>Aspergillus niger</i> . (■) Fermentações sucessivas; (●) fermentação batelada alimentada.....	106
Figura 4.14 – Rede neuronal artificial na avaliação da produção de etanol de segunda geração de extrato enzimático bruto de <i>Aspergillus niger</i>	108
Figura 4.15 – Distribuição dos resíduos associados à validação e treinamento da RNA.	108
Figura 4.16 – Comportamento da concentração de etanol associadas à condição otimizada para as variáveis, tempo, temperatura de FA, quantidade de enzima, inóculo e bagaço de cana.....	111
Figura 4.17 – Fator de purificação para o sistema PEG/Citrato de sódio.	116
Figura 4.18 – Fator de purificação para o sistema PEG 2000 g/mol e citrato de sódio.	117
Figura 4.19 – Fator de purificação para sulfato de amônio.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Composição dos meios <i>PDA</i> e <i>Czapek</i>	57
Tabela 3.2 – Composição dos meios de FES para produção dos extratos enzimáticos..	66
Tabela 3.3 – Composição dos substratos sólidos na FA na produção de etanol.	68
Tabela 3.4 – Os meios para extração das enzimas após FES.....	69
Tabela 3.5 – Misturas de EEB de <i>M. racemosus Fresenius</i> e <i>A. niger</i>	72
Tabela 3.6 – Descrição das condições dos ensaios de avaliação dos efeitos de tempo temperatura, extrato enzimático, inóculo e bagaço de cana na produção de.....	74
Tabela 3.7 – Preparação dos SABs com PEG/sal citrato de sódio.	78
Tabela 4.1 – Composição das fibras lignocelulósicas e análise dos bagaços de cana	88
Tabela 4.2 – Efeito da composição do substrato sólido da FA na produção de etanol..	95
Tabela 4.3 – Neurônios da primeira camada oculta (N_1), segunda camada oculta (N_2) e R^2 associados à RNA com as quantidades de neurônios N_1 e N_2	107
Tabela 4.4 – Resultado da otimização da produção de etanol.....	109
Tabela 4.5 – Resultado da otimização da produção de etanol para 24h de processo. ..	112
Tabela 4.6 – Produção de etanol para a fermentação alcoólica (FA) utilizando de forma simultânea a <i>Pichia stipitis</i> com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para os tempos de fermentação de 48 e 72 horas utilizando os pHs de 6,5, 5,5 e 4,5.....	112
Tabela 4.7 – Concentrações dos diferentes constituintes de meio para fermentação alcoólica (FA) com a <i>S. cerevisiae</i> por 24 h, seguida pela adição de <i>Pichia stipitis</i> e 48 horas de fermentação.	113
Tabela 4.8 – Concentrações dos diferentes constituintes de meio para fermentação alcoólica com a <i>P. stipitis</i> por 48 h, seguida pela adição de <i>S. cerevisiae</i> e 24 h de fermentação	113
Tabela 4.9 – Hidrólise separada da fermentação alcoólica (mantendo o bagaço de cana após hidrólise, fermentando caldo hidrolisado e substrato).	115
Tabela 4.10 – Hidrólise separada da fermentação alcoólica (retirando o bagaço de cana após hidrólise, fermentando apenas o caldo hidrolisado).	115
Tabela 4.11 – Produção de etanol dos complexos enzimáticos purificados	118
Tabela 4.12 – Concentração de extrato enzimático em Rotaevaporador à 50 e 60°C.	119

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 – Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).....	14
Quadro 2.2 – Comparação entre hidrólise ácida e hidrólise enzimática (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).....	17
Quadro 2.3 – Principais marcos históricos da inteligência artificial (IA).....	46
Quadro 3.1 – Fungos, local de origem e descrição do fungo no momento da coleta	57
Quadro 3.2 – Parâmetros da rede neuronal.	75

LISTA DE SÍMBOLOS

E1G Etanol primeira geração.

E2G Etanol segunda geração.

FES Fermentação em estado sólido.

FA Fermentação alcoólica.

EEB Extrato enzimático bruto.

EEC Extrato enzimático concentrado.

SSF Hidrólise e fermentação simultâneas.

SHF Hidrólise e fermentação separadas.

øc Diâmetro da colônia de fungo.

øh Diâmetro do halo gerado (crescimento do fungo em meio de celulose).

BNT Bagaço de cana-de-açúcar não tratado termicamente.

BBS Bagaço de cana-de-açúcar tratado a explosão a vapor na condição de baixa severidade (12 kgf/cm², 8 minutos).

BAS Bagaço de cana-de-açúcar tratado a explosão a vapor na condição de alta severidade (19 kgf/cm², 4 minutos).

MPE1 Meio de produção de enzima 1 (100% BBS).

MPE2 Meio de produção de enzima 2 (80% BBS, 20% farelo de arroz).

MPE3 Meio de produção de enzima 3 (60% BBS, 40% farelo de arroz).

MPE4 Meio de produção de enzima 4 (40% BBS, 60% farelo de arroz).

MPE5 Meio de produção de enzima 5 (20% BBS, 80% farelo de arroz).

MPE6 Meio de produção de enzima 6 (100% farelo de arroz).

MFA1 Meio de fermentação alcoólica 1 (100% BBS).

MFA2 Meio de fermentação alcoólica 2 (98% BBS, 2% BNT).

MFA3 Meio de fermentação alcoólica 3 (96% BBS, 4% BNT).

MFA4 Meio de fermentação alcoólica 4 (94% BBS, 6% BNT).

MFA5 Meio de fermentação alcoólica 5 (50% BBS, 50% BAS).

MFA6 Meio de fermentação alcoólica 6 (100% BAS).

ST Solução *Tween* 80 a 1% em água deionizada.

SW Solução *Tween* 80 a 1% em soro de queijo (concentração de lactose de $36 \pm 1,5$ g/L).

SWHA solução *Tween* 80 a 1% em soro de queijo hidrolisado com H_2SO_4 (1%).

SWHE *Tween* 80 a 1% em soro hidrolisado com β -galactosidase (comercial de *Aspergillus oryzae*).

SAB Sistema aquoso bifásico.

PEG Polietileno glicol.

IA Inteligência artificial.

RNA Rede neuronal artificial.

ACO Algoritmo de colônia de formigas (*Ant Colony Optimization*).

PSO Algoritmo de enxame de partículas (*Particle Swarm Optimization*).

p_{ij} Função probabilística.

τ_1 Feromônio.

η_i Visibilidade do objeto.

N_1 Primeira camada oculta.

N_2 Segunda camada oculta.

RESUMO

O etanol representa o combustível renovável, alternativo à gasolina, que mais cresce em volume de produção e uso, devido a sua eficiência, sustentabilidade e a necessidade da ampliação da matriz energética mundial. Assim, o estudo da produção de etanol de segunda geração (E2G) se mostra interessante pela possibilidade de se aproveitar resíduos agroindustriais e parte do excedente de bagaço de cana-de-açúcar das usinas na produção de etanol. Os microrganismos que produzem o complexo de celulase podem ser encontrados em vários ecossistemas incluindo o Cerrado brasileiro que detém cerca de 5% da biodiversidade do planeta e é fonte de fungos utilizados na fermentação em estado sólido (FES) de resíduos agroindustriais e subprodutos para produção de enzimas variadas. Na presente tese avaliou-se o uso de 71 amostras de fungos selecionados no Cerrado do Triângulo Mineiro, na produção de extrato enzimático bruto (EEB) por FES de bagaço de cana pré-tratado a explosão a vapor e farelo de arroz destinado a fermentação via *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol de bagaço de cana. Seis formas distintas de produzir E2G com EEB foram estudadas e também foi feita a otimização das condições operacionais de fermentação com hidrólise simultânea a fermentação pelo uso de rede neural. As seis formas estudadas foram: a) o uso de diferentes meios de extração do complexo enzimático (solução de *Tween* 80, soro de queijo na forma hidrolisada e não hidrolisada); b) fermentações sucessivas; c) batelada alimentada; d) fermentação sequenciais com *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis* nesta ordem e na ordem inversa (*Pichia stipitis* e *Saccharomyces cerevisiae*); e) hidrólise em separado da fermentação alcoólica (FA); f) concentração dos extratos enzimáticos. Entre os fungos avaliados, *Mucor racemosus Fresenius* e *Aspergillus niger* se destacaram na produção de complexos enzimáticos capazes de gerar maior produção de etanol, sendo que os melhores resultados associados à produção de etanol com hidrólise simultânea a fermentação foram: 30,1 g/L de etanol em 72h de FA com extrato enzimático de *M. racemosus Fresenius* no uso conjunto de biomassa de soro de queijo hidrolisado e celulose; nas FA sucessivas foi obtido aproximadamente 29,0 g/L e 32,0 g/L de etanol celulósico (120 h de FA) para enzimas produzidas por *M. racemosus Fresenius* e *A. niger*, respectivamente; e 20,6 g/L de etanol celulósico para processo realizado com uma única fermentação alcoólica por extrato enzimático (*A. niger*) concentrado por evaporação a vácuo em Rotaevaporador. O estudo de otimização das condições de FA utilizando rede neuronal mostraram como melhor resultado 12,6 g/L de etanol nas condições: diluição do extrato enzimático de 88,4%, temperatura de 36,6°C, teor de bagaço de 25% e 34,6 g/L de inóculo. Os resultados obtidos para CEC e fungos selecionados são satisfatórios quando comparados com os encontrados na literatura em estudos com enzimas comerciais em condições otimizadas, o que sugere que para a produção de E2G o trabalho de coleta e seleção de microrganismos e o uso de EEB são de grande importância na produção de E2G.

Palavras-chave: etanol de segunda geração, fermentação em estado sólido, bagaço de cana-de-açúcar, *Aspergillus niger*, *Mucor racemosus Fresenius*.

ABSTRACT

Ethanol's sustainable growth, energy supply structure and fuel efficiency have resulted in more worldwide increases for ethanol use than for any other renewable fuel alternative to gasoline. Thus, the study of second generation ethanol (2GE) is one of the most important steps for the valorisation of byproducts that are generated from agro-food industry activities and for promoting better use of surplus sugarcane bagasse in ethanol production. The microorganisms that are able to produce cellulase complex enzyme can be found in various environments including the Brazilian Savanna (Cerrado) ecosystem, which comprises about 5% of the biodiversity in the world. The cerrado has significant potential for producing commercial enzymes by solid state fermentation (SSF) of various agro- industrial wastes and byproducts. In this doctoral thesis, 71 select strains of fungi from the Brazilian Savanna in Minas Gerais State (Triângulo Mineiro-MG) were processed using SSF from sugarcane bagasse and rice bran to produce crude enzyme complex (CEC). The CEC and *Saccharomyces cerevisiae* were used to produce ethanol from sugarcane bagasse. Six strategies to increase ethanol yield from sugarcane bagasse were evaluated and simultaneous saccharification and fermentation were optimised using a neural network. The following strategies were evaluated: a) CEC was extracted after SSF by employing different extractive mediums (cheese whey, Tween 80 and hydrolysed cheese whey); b) successive fermentations; c) fed-batch fermentation; d) co-fermentations using *Saccharomyces cerevisiae* followed by *Pichia stipitis* and reversing the order of fermentation; e) separated hydrolysis and fermentation and f) use of concentrated CEC. The CECs produced by *Mucor racemosus Fresenius* and *Aspergillus niger* showed propensities for producing ethanol. In this study, the combined use of CEC and these fungi resulted in 30.1 g/l of ethanol after 72 h of fermentation using mixed biomass of cheese-whey and sugarcane bagasse and CEC from *Mucor racemosus Fresenius*; 29.0 and 32.0 g/l from CEC produced by *Mucor racemosus Fresenius* and *Aspergillus niger*, respectively, after 120 h of successive fermentations; 20.6 g/l of ethanol using CEC produced by *Aspergillus niger* and concentrated by rotoevaporation. The neural network study showed that a maximum ethanol concentration of 12.6 g/l was achieved under the optimal conditions of 47 h, 88.4% of CEC, 36.6 °C, 34.6 g/l of inoculum and 250 g/L of sugarcane bagasse. Results indicate that ethanol concentrations correspond with studies, reported in the literature, of commercial enzymes produced under optimised conditions, which suggests the importance of screening new strains and using CEC in 2GE production.

Keywords: second generation ethanol, solid-state fermentation, sugarcane bagasse, *Aspergillus niger*, *Mucor racemosus Fresenius*.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O etanol representa o combustível renovável que mais cresce em volume de produção e uso tanto por questões ambientais, questões do esgotamento do petróleo, como pela possibilidade de ampliação de escala de produção sem restrições pelo uso de biomassas alternativas capazes de garantir a sustentabilidade da produção e reduzir a poluição ambiental associada ao acúmulo de resíduos agroindustriais como aqueles ricos em celulose e o próprio soro de queijo, que hoje, pelo volume gerado e custos de tratamento, constitui um importante subproduto já bastante estudado como matéria-prima da produção de etanol (OZMIHCI e KARGI, 2006; DIAS et al., 2013a; THOMAS, LARROCHE, PANDEY, 2013).

O Brasil é um dos maiores produtores de resíduos agroindustriais, com destaque para bagaço e palha de cana-de-açúcar, soro de queijo e resíduos de beneficiamento de arroz (CTC, 2012; CONAB, 2013, ÚNICA, 2014). Sendo o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*), na safra 2013/2014 foram moídas aproximadamente 650 milhões de toneladas (UNICA, 2014). Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados em média 280 kg de bagaço (PANDEY et al., 2000; CTC, 2012). A indústria da cana gera cerca de 186 milhões de toneladas de bagaço por ano no Brasil (SOCCOL et al., 2010), parte desse resíduo é utilizada na cogeração de energia em usinas de açúcar, restando aproximadamente 5-12 milhões de toneladas por ano (CARDONA, QUINTERO e PAZ, 2010).

Assim, o bagaço de cana destaca-se como alternativa promissora na produção de etanol de celulose, pois se encontra prontamente disponível nas destilarias, não apresenta custo adicional, possui elevado teor de carboidratos, o que permitiria ampliar a produção deste combustível no país sem aumentar as áreas de plantio. A produção de etanol de segunda geração (E2G) a partir destas biomassas deverá tornar-se cada vez mais importante (MAIS et al., 2002; VÁSQUEZ, 2007; FERREIRA, et al., 2010; VÁSQUEZ, 2007).

A produção de E2G é, geralmente, realizada em quatro etapas: pré-tratamento da biomassa para abertura das fibras, hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentescíveis, fermentação destes açúcares a etanol, separação e purificação (BINOD et al., 2012; TYEA et al., 2012; SILVA et al., 2012). O custo da hidrólise enzimática de

materiais lignocelulósicos é um problema relevante, que pode ser mitigado pelo desenvolvimento de novos bioprocessos de produção de enzimas celulósicas (CARDONA, QUINTERO e PAZ, 2010; SINGHVI, ADSUL e GOKHALE, 2011).

Celulases são um complexo enzimático, formado por um composto de enzimas, que atuam sinergicamente. São classificadas dependendo do local de ação no polímero de celulose. As endoglucanases (endo 1,4-D-glucanohidrolase) que atuam de forma aleatória, quebrando ligações na molécula de celulose; as exoglucanases/celobiohidrolase (1,4- β -D-glucana-celobiohidrolase), que removem unidades de celobiose das extremidades não redutoras da cadeia de celulose e as β -glucosidases, as quais degradam celobiose e celooligossacarídeos a glicose (FERREIRA et al., 2010; SOCCOL et al., 2010).

As celulases são produzidas por fermentação submersa (FS) ou fermentação em estado sólido (FES). A grande vantagem da FES é que os resíduos lignocelulósicos podem ser utilizados como substrato. Além disso, a FES proporciona condições de crescimento que são similares ao ambiente natural dos fungos filamentosos. Empregando FES, consegue-se maior interação entre o microrganismo e o substrato, resultando em maiores concentrações de enzima (SINGHANIA et al., 2010; FARINAS, 2011).

Aspergillus, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Monillia*, *Mucor* e outros fungos têm sido relatados por vários pesquisadores como produtores de enzimas celulolíticas por FES e a fonte mais promissora de ampliar as enzimas essenciais aos avanços na tecnologia de enzimas, incluindo a produção de etanol (BUZZINI e MARTINI, 2002; EL-SAID e SALEEM, 2008; FISCHER et al., 2013).

Enzimas celulolíticas de fungos têm sido pesquisadas em vários ambientes, incluindo savanas brasileiras (Cerrado), ecossistemas que ocupam 22% do território brasileiro e tem cerca de 2 milhões de quilômetros quadrados (MMA, 2013). O Cerrado é um dos maiores biomas do mundo, rico em biodiversidade e com grande potencial para seleção de microrganismos capazes de produzir complexo enzimático necessário à hidrólise de celulose e que até então tem recebido menos atenção do que outros biomas (RATTER et al., 1997; MARCHANT, 2010; THOMAS, LARROCHE, PANDEY, 2013; FISCHER et al., 2013).

Na fermentação para produção de E2G há diferentes fatores que influenciam na economia do processo. O pré-tratamento físico-químico do material lignocelulósico, a

hidrólise enzimática e a forma como é realizada a fermentação devem ser combinados de forma a reduzir o gasto de energia, reduzir o tempo de processo, aumentar a concentração final de etanol e, também, melhor aproveitar a biomassa no sentido de ampliar a rentabilidade do processo pelo aproveitamento de subprodutos na co-geração de energia elétrica (LEVER, HO e CORD-RUWISCH, 2010; XIN et al., 2013; DIAS et al., 2013a).

A etapa de hidrólise enzimática é a etapa de maior gasto de recursos e uma das formas de buscar a redução de custos nesta etapa, consiste em produzir o extrato enzimático não purificado no mesmo local onde o processo fermentativo será realizado valendo-se da fermentação em estado sólido que traz como economia a redução de custos que incluem a purificação, concentração, adição de tampões, estabilizantes, conservantes, embalagem e transporte de enzima (LEVER, HO e CORD-RUWISCH, 2010; Xin et al., 2013; DIAS et al., 2013a; ROCHA et al., 2013).

Esta tese visa atender ao projeto “Produção de etanol pelo uso de complexo enzimático misto de *Aspergillus niger* e cepas selecionadas do ecossistema do Cerrado” do Edital MCT/CNPq/FNDCT NO 046/2009 - Formação de recursos humano em etanol e biodiesel. O presente estudo iniciou-se em com a dissertação de mestrado defendida em 20/07/2011 pela discente Nattácia Rodrigues de Araújo Felipe Rocha, na qual foi estudada a produção de complexo enzimático gerado a partir de resíduos agroindustriais e *Aspergillus niger* ATCC 16404 (proveniente de coleção de cultura) e na sequência a produção de bioetanol utilizando o mesmo resíduo, com a finalidade de atender a primeira etapa desse projeto, que consiste em comparar a atuação de complexo proveniente de cepas de coleção de cultura e cepas coletas no Cerrado (segunda etapa do projeto). Assim, o objetivo do presente trabalho foi produzir complexos enzimáticos de fungos selecionados no ecossistema do Cerrado destinado a hidrólise de biomassa para produção etanol de segunda. E os objetivos específicos foram:

- ✓ Coletar microrganismos na região do Cerrado do Triângulo Mineiro e selecionar os melhores quanto ao potencial hidrolítico para produção de etanol celulósico;
- ✓ Produzir complexos enzimáticos por fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais e fungos previamente selecionados;

- ✓ Testar uma sequência de experimentos com alterações no processo e em suas variáveis de forma a aumentar a produção de etanol, empregando o extrato enzimático produzido por resíduos agroindustriais;
- ✓ Gerar extratos enzimáticos composto pela mistura de combinações das enzimas geradas nas diferentes fermentações e avaliar seu potencial na produção de etanol;
- ✓ Avaliar técnicas de concentração dos extratos, visando aumentar a capacidade hidrolítica das enzimas obtidas e a produção de etanol.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A busca por fontes de energia renováveis tem aumentado, uma vez que se verifica a necessidade de soluções para problemas relacionados à escassez energética e controle da poluição. A utilização de biomassas lignocelulósicas e de resíduos agroindustriais tem sido apresentada como alternativa a estas problemáticas, visto que podem ser utilizadas na produção de enzimas e etanol celulósico. Devido a sua importância, no contexto social, ambiental e econômico, as tecnologias da cadeia produtiva deste biocombustível ainda necessitam ser melhor estudadas, visando melhoria da produtividade, eficiência e redução dos custos de produção. Assim, neste capítulo serão abordados temas pertinentes ao desenvolvimento do presente trabalho, iniciando a abordagem com as biomassas de resíduos agroindustriais, bem como composição química e pré-tratamentos mais utilizados na abertura das fibras lignocelulósicas. Na sequência, apresenta-se uma revisão sobre produção de enzimas utilizadas na hidrólise destas biomassas, dando ênfase à produção por fermentação em estado sólido por microrganismos. Em seguida, será abordada a fermentação alcoólica dos açúcares hidrolisados e estratégias de condução dessas fermentações. Por fim, uma contextualização sobre inteligência artificial e métodos heurísticos na otimização de processos de produção de etanol de segunda geração.

2.1. Biomassas de resíduos agroindustriais

2.1.1. Biomassas lignocelulósicas

As biomassas lignocelulósicas constituem a maior fonte de carboidratos naturais no planeta, representando mais de 60% da biomassa produzida mundialmente, o que equivale a aproximadamente dois bilhões de toneladas de materiais lignocelulósicos. Normalmente contêm 55-75% em peso seco de carboidratos, provêm dos resíduos agrícolas, alimentícios, industriais, de madeira e de plantas como a cana-de-açúcar e palha de cereais, tornando-se atrativas para produção de biocombustíveis, como o etanol, crescimento microbiano e a produção de enzimas industriais (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008; DASHTBAN, SCHRAFT e QIN, 2009; SOCCOL et al., 2010).

Sua composição depende de diversos fatores como o tipo de vegetal, as condições de crescimento, a parte da planta escolhida, o tempo de colheita, entre outros (SILVA, 2010; RAJEEV, 2010). Basicamente são constituídas por celulose, hemicelulose e lignina, organizadas de maneira que as cadeias de celulose e hemicelulose sejam fixadas pela lignina (Figura 2.1). Paralelamente, as cadeias de celulose se mantêm compactadas por meio de ligações de hidrogênio, enquanto a lignina circundante “gruda” os componentes e age como uma barreira física para o ataque de microrganismos e água. A hemicelulose proporciona a ligação entre a celulose e a lignina formando assim a rede fibrosa (RABELO, 2010).

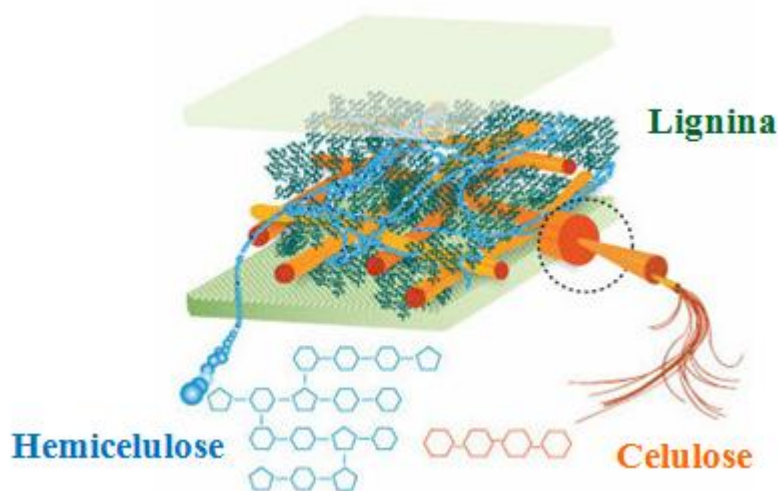


Figura 2.1 – Complexo lignocelulósico: cadeias de celulose envolvidas por hemicelulose e lignina. Fonte (adaptado de CERES, 2013).

A celulose é o principal constituinte dos materiais lignocelulósicos (23-50% em matéria seca). Este polímero natural e renovável é um homopolissacarídeo linear, com alto grau de polimerização (GP). Uma fibra de celulose pode conter cerca de 5.000-10.000 unidades de glicose. Possui elevado peso molecular e fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, consiste em unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1,4), cuja unidade repetitiva é a celobiose (PEREIRA Jr, COUTO e SANTA ANNA, 2008; RABELO, 2010; BORTOLAZZO, 2011). A Figura 2.2 representa a cadeia linear da celulose.

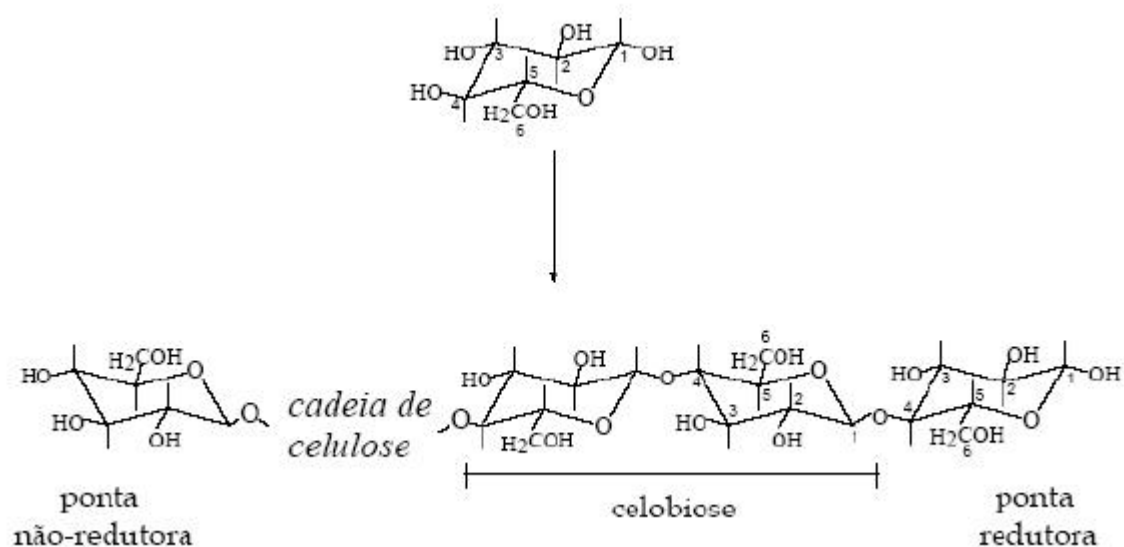


Figura 2.2 – Representação da cadeia da celulose (RAMOS, 2003).

As cadeias de celulose formam as fibrilas elementares, caracterizadas por duas regiões distintas, a cristalina, de configuração mais ordenada formada por cadeias de celulose, unidas por ligações de hidrogênio e por forças de van der Waals, que se traduz na resistência ao ataque hidrolítico, e a amorfa, menos ordenada e mais susceptível a hidrólise enzimática (GOMEZ, 1985; BUCHANAN, GRUISSEM e JONES, 2001). Da hidrólise da celulose obtêm-se polímeros menores, oligossacarídeos, que, após hidrólises, decompõem-se dando origem a celobiose e a glicose (RABELO, 2010).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo (15-45% do material lignocelulósico seco), consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem pentoses, hexose, ácidos hexourônicos e desoxi-hexoses (Figura 2.3). A xilana é o principal polissacarídeo componente da hemicelulose, cuja estrutura corresponde a um polímero de D-xilose unidas por ligações β -1,4 (MORAIS, NASCIMENTO e MELO, 2005; BALAT e BALAT, 2008; SILVA, 2010).

Diferentemente da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molecular, 100-200 unidades glicosídicas, e não contém regiões cristalinas, sendo, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas (PEREIRA Jr, COUTO e SANTA ANNA, 2008).

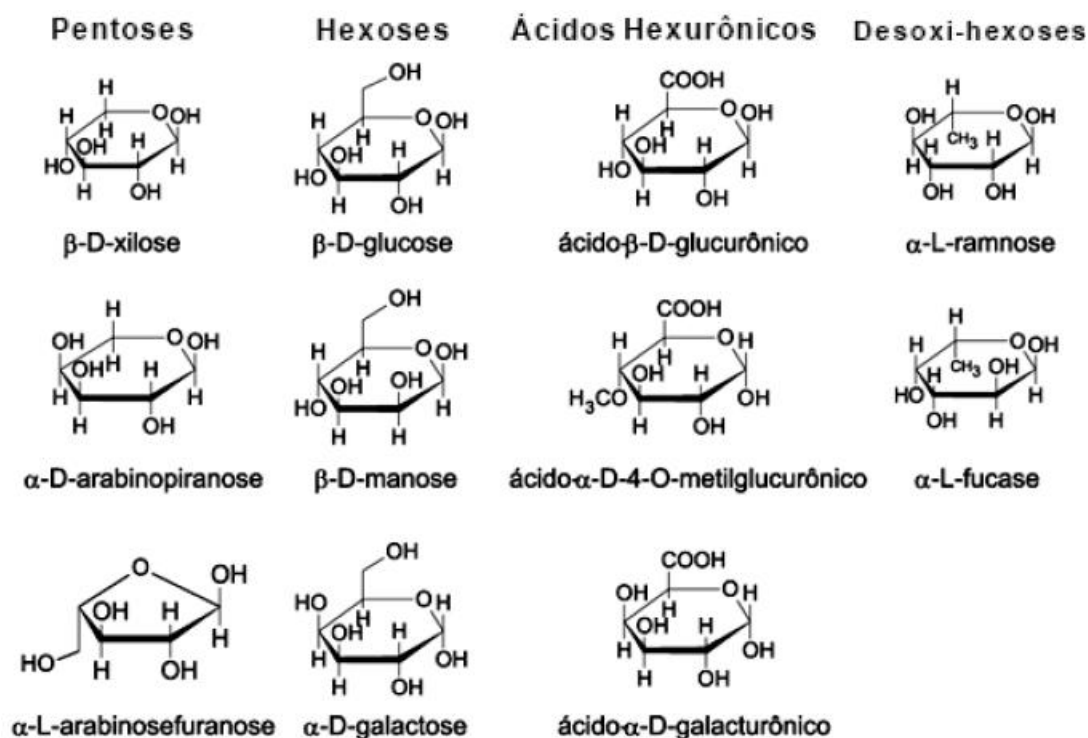


Figura 2.3 – Componentes da fração hemicelulose (FENGEL e WEGENER, 1989).

A lignina é o componente mais abundante de material lignocelulósico, dentre os não carboidratos (10-30% em matéria seca), concentrada em tecidos relacionados com condução de solutos e suporte mecânico e representa um conjunto de polímeros amorfo, de alto peso molecular e muitas ligações cruzadas. A estrutura da lignina apresenta forma tridimensional e amorfa e é formada por unidades de *p*-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. Esta macromolécula é formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; SILVA, 2010).

A presença da lignina é representa um problema importante para o processo de conversão de biomassa, porque a estrutura física intersticial de lignocelulose nativa é resistente ao ataque enzimático, especialmente celulose, que é protegida pela matriz circundante de lignina, hemicelulose e pectina (PINTO e KRAMDEN, 1996; BERLIN et al., 2005).

Na Figura 2.4 pode ser observada a complexidade da estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos.

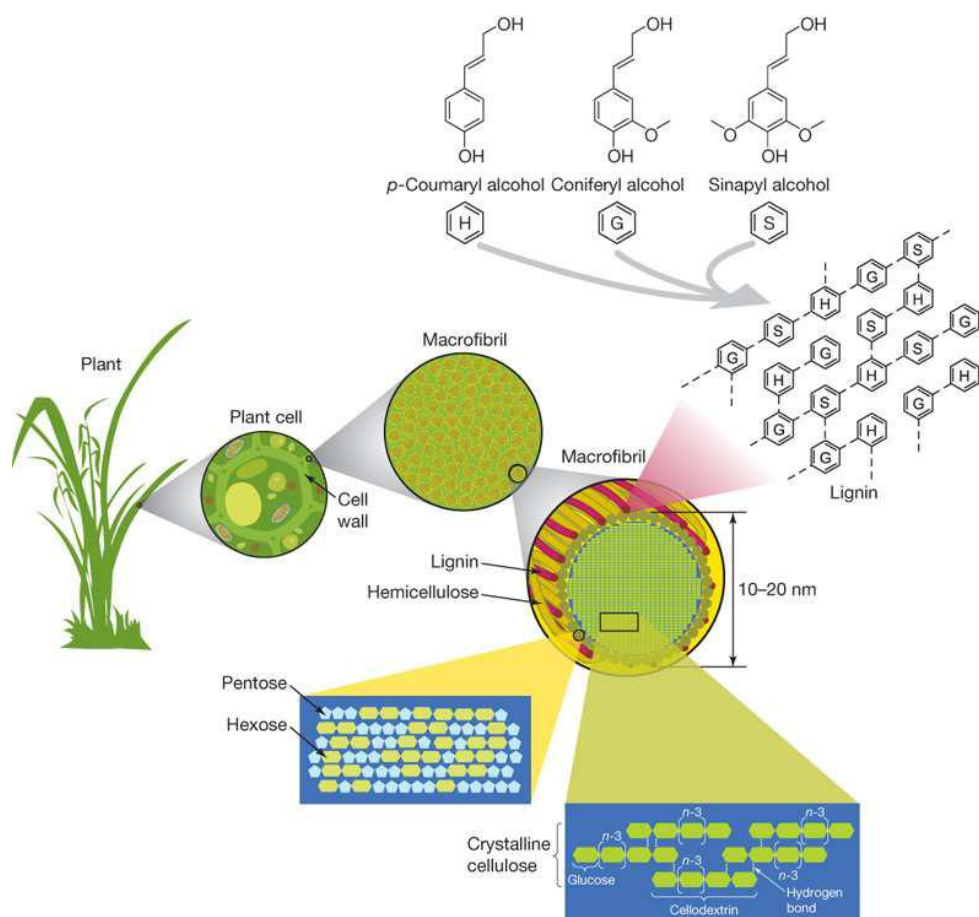


Figura 2.4 – Esquema da parede celular vegetal, constituída por celulose, hemicelulose e lignina (adaptado de RUBIN, 2008).

2.1.1.1. Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma espécie com grande taxa de assimilação fotossintética e, por isso, com enorme capacidade para produzir biomassa contendo açúcar, amido, proteínas e lignocelulose (FIGUEIREDO, 2008). Composta essencialmente por duas partes: líquida e sólida. A fase líquida é uma solução aquosa, contendo uma grande variedade de substâncias orgânicas, entre as quais aproximadamente 90% é sacarose. A fase sólida é um resíduo fibroso, complexo composto de celulose, hemicelulose e lignina (DIAS, 2008).

O bagaço de cana-de-açúcar é obtido pela moagem da cana. Este resíduo contém de 48 a 52% de umidade, 2 a 3% de sólidos solúveis (°Brix), 46 a 48% de sólidos insolúveis (fibra) e características físico-químicas que dependem do sistema de

colheita da cana (cana queimada ou mecânica), do corte e da forma de carregamento. Condições climáticas anteriores e posteriores à colheita e diferentes estágios de desenvolvimento vegetativo podem interferir, também, na composição do bagaço de cana para fins energéticos (CTC, 2012).

A composição química do bagaço de cana é composta por três polímeros: 32-34% de celulose, 27-32% de hemicelulose, 19-24% de lignina, e 4,5-9% cinzas e quantidades menores de minerais, ceras e outros compostos (JACOBSEN e WYMAN, 2002; RAMOS, 2003; FARINAS, 2011; CANILHA et al., 2012). Devido ao seu baixo teor de cinzas, o bagaço oferece numerosas vantagens para utilização em processos de bioconversão em comparação com outros resíduos de colheitas, tais como palha de arroz e palha de trigo (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Na safra de 2013/2014 foram moídas aproximadamente 650 milhões de toneladas (UNICA, 2014) para produção de açúcar e etanol (primeira geração), sendo o bagaço de cana, o principal resíduo lignocelulósico oriundo da indústria sucroalcooleira. Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados em média 280 kg de bagaço (50% de umidade) (PANDEY et al., 2000; CTC, 2012).

A indústria da cana gera cerca de 186 milhões de toneladas de bagaço por ano no Brasil (SOCCOL et al., 2010). Cerca de 60-90% do bagaço gerado a partir de cana-de-açúcar moída no país são utilizadas para produção de vapor e energia e entre 10 e 40% não são utilizadas, o que representa aproximadamente 5-12 milhões de toneladas por ano (CARDORNA, QUINTERO e PAZ, 2010).

Na produção de etanol de segunda geração (E2G), o bagaço de cana representa o principal material lignocelulósico, pois se encontra prontamente disponível nas destilarias, não apresentando custo adicional de transporte, e por possuir elevado teor de carboidratos (MAIS et al., 2002; DIAS et al., 2013a; DIAS et al., 2013b). A implantação da tecnologia de etanol de bagaço de cana-de-açúcar é favorecida no Brasil pelo fato do processo de produção poder ser construído junto as unidades de açúcar/etanol já existentes, o qual exige investimentos menores de infra-estrutura, logística e fornecimento de energia (SOCCOL et al., 2010).

No caso brasileiro, estima-se que o bagaço excedente, se fosse utilizado na produção de etanol, possibilitaria aumentar a produção deste combustível no país sem aumentar as áreas de plantio (VÁSQUEZ et al., 2007; FERREIRA, 2010). Estima-se

que de 1 tonelada de bagaço podem ser produzidos cerca de 300 L de etanol de segunda geração (RABELO et al., 2011; CHANDEL et al., 2011).

Diversos autores têm estudado o bagaço de cana no contexto de biorrefinaria (RABELO, 2010, RABELO et al., 2011; DIAS et al., 2012; DIAS et al., 2013a; DIAS et al., 2013b). Os resíduos das operações de pré-tratamento, hidrólise e fermentação (celulose residual, lignina e, eventualmente, biogás da biodigestão de pentoses) podem ser utilizados na produção de vapor para o processo e, posteriormente, na geração de eletricidade a partir desse vapor.

Outra utilização para esta importante biomassa é como substrato para o cultivo de grande número de microrganismos, inclusive bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Entretanto, esses últimos têm sido os mais utilizados, em razão da quantidade de enzimas e do enriquecimento proteico produzidos por eles. Tem-se comprovado que a bioconversão do bagaço pode ser economicamente vantajosa em casos como o da produção de enzimas (PANDEY et al., 2000).

2.1.2. Farelo de arroz e Soro de queijo

A utilização de matéria-prima proveniente de resíduos agroindustriais tipicamente nacionais vem contribuir também para a redução dos custos de produção de enzimas capazes de converter celulose em açúcares fermentescíveis. A escolha destes materiais deve ser baseada na sua abundância e baixo custo, bem como as suas características físico-químicas (JING, XIONG e WANG, 2007).

O Brasil se destaca como maior produtor mundial de arroz fora do continente Asiático, sendo o 9º maior produtor mundial. Grande parte desta graminácea é comercializada na forma de arroz beneficiado polido. O processamento dos grãos de arroz gera grãos limpos, cascas, farelo e um pó conhecido como pó de arroz. No Brasil são produzidas mais de 10 milhões de toneladas de arroz (CONAB, 2013) que geram 2 milhões de toneladas de casca e metade deste valor em farelo. Estes resíduos são abundantes em todo território nacional, pois embora a maior parte de sua produção ocorra na Região Sul, ele é comercializado com casca e beneficiado regionalmente em toda extensão do território nacional. Os subprodutos farelo, casca e pó são pouco explorados como alimentos: o farelo não é utilizado na alimentação devido ao baixo teor de proteína e o pó de arroz não é agradável ao paladar. O farelo de arroz (mesmo

que seja usado na produção de óleo) apresenta 50% de sua composição constituída por carboidratos e o pó gerado no polimento do arroz contém um elevado teor de lipídios, proteínas, minerais, vitaminas (complexo B e C) e celulose (ANUPAMA e RAVINDRA, 2001; YANG et al., 2003; GALEMBECK, BARBOSA e SOUSA; 2009).

Tais subprodutos são excelentes fontes de nutrientes e suporte para que microrganismos possam crescer e excretar enzimas. O farelo de arroz, por ser boa fonte de nitrogênio, tem sido usado em misturas com o bagaço de cana-de-açúcar para a produção de celulases (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008; SIMÕES, 2011).

O soro de leite ou soro de queijo, subproduto da indústria de laticínios é abundante no cenário nacional, com destaque para o Estado de Minas Gerais. Em 2012, o Brasil produziu segundo a ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijos 890 mil toneladas de queijo, gerando aproximadamente 6,7 milhões de toneladas de soro de queijo (BRASIL, 2012; FORTUNATO, 2012).

O soro representa em torno de 85-95% do volume de leite produzido e retém 55% dos nutrientes do leite (GUIMARÃES, TEIXEIRA e DOMINGUES, 2010), entres os mais abundantes, estão a lactose (44–52 g/L), proteínas (6–8 g/L) e minerais (4–9 g/L). Em face dessa rica composição nutricional, este resíduo permite, por um lado, uma série de aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica, rações e outros derivados. Por outro lado, pode atuar como agente de poluição em cursos d'água devido a sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), capaz de comprometer a vida de seres bióticos neles presentes (GÜVEN, PERENDECI e TANYOLAÇA, 2008; BONNET, BOGAERTS e BOHATIER, 1999). Como é gerado em quantidades maiores que o mercado consegue absorver, o estudo de seu reaproveitamento para produção de enzimas torna-se, então, uma proposta interessante na obtenção de um produto com alto valor no mercado.

Pesquisas mostram a utilização de soro de queijo como meio básico para vários processos fermentativos, como na produção de etanol e como substrato e fonte de carbono para produção de enzimas, como as celulase, contribuindo assim para reutilização deste subproduto industrial (HATZINIKOLAOU et al., 2005; SUKUMARAN, SINGHANIA e PANDEY, 2005; GUIMARÃES, TEIXEIRA e DOMINGUES, 2010; DRAGONE et al., 2011; ROCHA et al., 2013).

Rocha et al. (2013) investigaram a produção de etanol, utilizando complexos enzimáticos produzidos por *Aspergillus niger* (ATCC 16404) e FES com subprodutos

agroindustriais: palha e farelo de arroz, soro de queijo e bagaço de cana. Para estes autores, os resultados obtidos foram muito promissores em termos de reaproveitamento do soro produzido pela fabricação de queijo e outro de processamento de alimentos lácteos, bem com a produção de enzimas celulolíticas.

A fermentação da celulose para produção de etanol pode ser conjugada a outras biomassas como o caso do soro de queijo. Embora diversos autores já tenham estudado a produção de etanol de soro de queijo (SILVEIRA et al., 2005; OZMIHCI e KARGI, 2007), não se tem dada muita atenção ao uso de biomassa de soro de queijo em conjunto com outras biomassas para produção de etanol. Esta carência de discussões do uso conjunto do soro de queijo a outras biomassas precisa ser melhor explorada, pois o soro queijo é um meio importante para fermentações pelo valor nutricional, pela facilidade de obtenção do mesmo durante todo ano e pela necessidade de dar fim ao excedente do mesmo que é capaz de contaminar o ambiente como importante efluente da indústria de alimentos (ROSA et al., 2013).

2.2. Pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas

Devido à sua composição química, a biomassa lignocelulósica é muito diferente das biomassas com grande conteúdo de açúcares ou amido, que habitualmente, são utilizados na indústria de biocombustíveis. A estrutura destes materiais, compostas principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, exige que o processo para a produção de biocombustíveis seja ajustado para cada tipo de biomassa, de acordo com as características de componentes. Portanto, é necessária uma etapa de pré-tratamento para se quebrar a estrutura cristalina da lignocelulose, conforme (Figura 2.5), de modo a aumentar a exposição das moléculas de celulose e hemicelulose à ação de agentes hidrolíticos enzimáticos ou ácidos, e subsequentemente fermentadas a etanol (OGEDA e PETRI, 2010; CARDORNA, QUINTERO e PAZ, 2014).

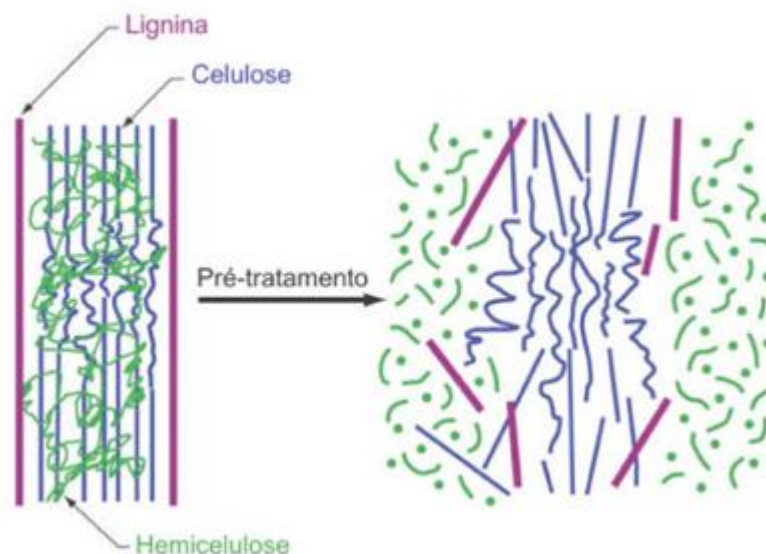


Figura 2.5 – Esquema dos efeitos do pré-tratamento sobre a estrutura lignocelulósica (adaptado de KONDO, 1997).

Os pré-tratamentos disponíveis, atualmente, podem ser físicos, químicos, biológicos ou de fracionamento por solvente. O pré-tratamento físico quebra o tamanho das fibras pela moagem, processamento aquoso ou exposição ao vapor. Os processos químicos de pré-tratamento mais utilizados são com ácido diluído, álcali, solvente orgânico, amônia, dióxido de enxofre, dióxido de carbono, entre outros produtos que geram uma biomassa mais digerível pelas enzimas. Os métodos biológicos são usados, algumas vezes, combinando-se com tratamentos químicos que visam solubilizar a lignina, deixando a celulose mais acessível à hidrólise e à fermentação (MACHADO, 2009). Estes pré-tratamentos são apresentados no Quadro 2.1 (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

A formação de compostos inibitórios da fermentação na etapa de pré-tratamento, como o furfural e hidroximetilfurfural, representa uma das maiores dificuldades inerentes ao processo de produção de etanol. Os inibidores podem estar originalmente presentes na biomassa e podem ser produzidos por condições severas na etapa de pré-tratamento (dependendo do pré-tratamento utilizado).

Os inibidores, como o ácido acético, presentes na biomassa lignocelulósica são facilmente liberados durante a etapa de pré-tratamento. Em contrapartida, os pré-tratamentos que trabalham em condições drásticas, ou seja, presença de reagentes ácidos combinados com altas temperaturas são fortemente passíveis à formação de produtos inibitórios devido à degradação dos açúcares e da lignina, levando assim à produção de

ácidos orgânicos (RABELO, 2010). A Figura 2.6 mostra a procedência de cada um dos inibidores provenientes de diferentes constituintes da biomassa.

O inibidor produzido da degradação das pentoses é o furfural e da degradação das hexoses, o 5-hidroximetilfurfural, os quais são bastante problemáticos para a etapa da fermentação (MUSSATO e ROBERTO, 2004). Quando é promovida a degradação destes inibidores, o ácido fórmico e levulínico são formados. Da decomposição química parcial da lignina podem ser formados compostos fenólicos como o ácido 4-hidroxibenzóico, a vanilina, catecol e siringaldeído (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000b).

Quadro 2.1 – Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

Método	Processo	Mecanismo de alteração da biomassa
Pré-tratamentos físicos	Moinho de bolas; Moinho de rolos; Moinho de martelos; Hidrotérmico; Extrusão; Expansão; Irradiação microondas; Irradiação por raios gamas;	Aumentando a área de contato e o tamanho de poros; Diminuindo a cristalinidade da celulose e seus graus de polimerização; Hidrólise parcial das hemiceluloses; Despolimerização parcial da lignina.
Pré-tratamentos físico-químicos e químicos	Explosão: Explosão a vapor; AFEX (<i>Ammonia Fiber Explosion</i>); CO ₂ ; SO ₂ . Alcalinos: Hidróxido de sódio; Amônia; Sulfato de amônia. Gás: Dióxido clorino; Dióxido de nitrogênio. Ácido: Sulfúrico; Hidroclórico; Fosfórico; Dióxido sulfuroso. Agentes oxidantes: Peróxido de hidrogênio. Solventes de celulose: Cadoxen; CMCS; Solvente de lignina: Etanol-água extração; Benzeno-água extração.	Deslignificação; Diminuição do grau de cristalinidade e grau de polimerização da celulose; Parcial ou completa hidrólise da hemicelulose.
Pré-tratamentos biológicos	Actinomicetos; Fungos	Deslignificação; Redução do grau de polimerização da hemicelulose e celulose.

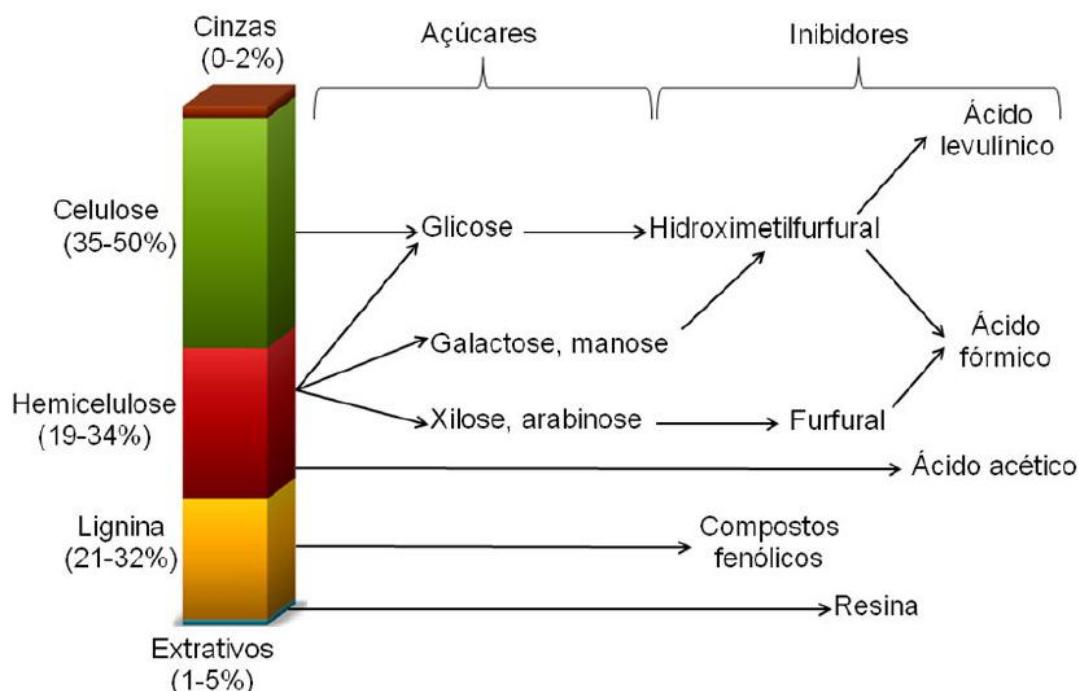


Figura 2.6 – Formação dos componentes inibitórios (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000b; RABELO, 2010).

Assim, os principais objetivos de um pré-tratamento adequado são: produzir a menor quantidade possível de compostos inibitórios ao crescimento e atuação dos microrganismos fermentativos; produzir um material pré-tratado facilmente hidrolisável; não degradar celuloses; requerer nenhuma ou pouca redução do tamanho da biomassa; trabalhar com reatores de custo e tamanhos moderados; utilizar menos energia quando utilizado e reduzir a produção de resíduos sólidos (KRISTENSEN, FELBY e JORGENSEN, 2009; HIMMEL 2008 *apud* CARLI, 2011).

2.2.1. Tratamento de explosão a vapor

Desde que o programa de Bioetanol no Brasil tem sido focado principalmente na utilização de bagaço de cana-de-açúcar, a técnica de pré-tratamento de explosão a vapor tem sido um dos métodos mais utilizados para fracionar os três principais componentes desta biomassa (MARTÍN et al., 2008; BALAT e BALAT, 2008; DIAS et al., 2012; DIAS et al., 2013a).

Também chamado de autohidrólise, este método pode ser realizado em diferentes condições de pressão, temperatura e tempo. O material é aquecido usando

vapor de alta pressão (20-50 bar, 210-290°C) em poucos minutos. Esta reação é, em seguida, parada pela descompressão súbita à pressão atmosférica. Este método usa o processo de compressão, água quente, e nenhum catalisador ácido ou químico é necessário, fazendo com que a explosão a vapor seja um método economicamente interessante e ambientalmente atrativo (HAMELINCK, HOOIJDONK e FAAIJ, 2005; MARTÍN et al., 2008; BALAT e BALAT, 2008; MACHADO, 2009; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

Este método resulta na quebra substancial da estrutura lignocelulósica, com hidrólise da fração hemicelulósica e desarranjo da celulose e lignina, levando a maior susceptibilidade dos polissacarídeos da biomassa para hidrólise enzimática ou ácida (RAMOS et al., 1992; BALAT e BALAT., 2008; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009, SOCCOL et al., 2010).

Após a otimização, a explosão a vapor pode resultar em materiais com propriedades resistivas maiores, estabilidade térmica mais elevada e menor absorção de umidade e menor impacto ambiental devido a menor utilização de processos químicos. Esta tecnologia pode levar a um modelo de emissão zero para as indústrias que trabalham com materiais lignocelulósicos (SATYANARAYANA, 2004; RUIZ et al., 2008, BRUGNAGO et al., 2011). Por outro lado, a explosão a vapor produz um material pré-tratado com baixa densidade, que necessita ser lavado antes da hidrólise e da fermentação para remover inibidores, tais como ácidos fenólicos e formação de subprodutos derivados de pentoses e hexoses, que são furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente (GÁMEZ et al., 2006).

De fato, a versatilidade e ampla aplicação da explosão a vapor, deram a esta tecnologia uma grande compatibilidade com o conceito de biorrefinaria. Para o bagaço de cana-de-açúcar este pré-tratamento foi proposto como um dos mais promissores (MARTÍN et al., 2008; BALAT e BALAT, 2008; ZÚÑIGA, 2010). Segundo Ramos (2000), a explosão a vapor é uma técnica que se mostra versátil e atraente, particularmente em função do processo agroindustrial que se encontra instalado (disponibilidade de vapor no processo nas unidades industriais).

2.3. Hidrólise enzimática

Os materiais lignocelulósicos não contêm monossacarídeos prontos para a bioconversão. Ao invés disso, eles contêm polissacarídeos, como celulose e hemicelulose, os quais devem ser hidrolisados via ácido ou via enzimática até se tornarem açúcares fermentescíveis (CARDONA, QUINTERO e PAZ, 2010). A hidrólise ácida da celulose apresenta o inconveniente de requerer o emprego de elevadas temperatura e pressão, levando à degradação de parte dos carboidratos e à geração de produtos de tóxicos aos microrganismos. A hidrólise enzimática se mostra com um maior potencial para desenvolvimento por ser seletiva e necessitar de equipamentos menos resistentes a corrosão e altas temperaturas como na hidrólise ácida (LYND et al., 2002). Como pode ser observado no Quadro 2.2 (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

Quadro 2.2 – Comparação entre hidrólise ácida e hidrólise enzimática (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

Hidrólise	Enzimática	Ácido diluído
Condições amenas de hidrólise	Sim	Não
Altos rendimentos de hidrólise	Sim	Não
Produção de inibidores durante a hidrólise	Sim	Não
Formação de inibidores como subproduto	Não	Sim
Baixo custo de catalisadores	Não	Sim
Baixo tempo de hidrólise	Não	Sim

Como pode ser observado (Quadro 2.2), a hidrólise enzimática apresenta inúmeras vantagens com relação à ácida. Nos próximos itens será estudada mais profundamente.

2.3.1. Enzimas do complexo lignocelulolítico

Enzimas são macromoléculas de natureza protéica ou glicoprotéica, com atividade intracelular ou extracelular, que atuam de forma a acelerar uma reação bioquímica, reduzindo a energia de ativação necessária para converter o substrato no produto, sem alterar o equilíbrio da reação. Pode, portanto, ser definida como um biocatalisador, cuja natureza protéica determina algumas propriedades, tais como:

especificidade de substrato, dependência da temperatura e pH (CHIBATA, 1978; FABER, 2004).

As enzimas responsáveis pela degradação dos materiais lignocelulósicos são as celulasas, xilanases e pectinases. Segundo GUSAKOV et al. (2007) o complexo celulásico ideal deve consistir de misturas destas enzimas, cujo balanço de utilização está em função da composição do substrato submetido à hidrólise.

As celulasas constituem-se como um complexo enzimático capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise, sendo assim classificadas como hidrolases. Essas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais, a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à fácil conversão à etanol, por ser um processo já fundamentado a nível industrial (CASTRO e PEREIRA Jr, 2010).

Outras enzimas, componentes do complexo celulolítico, são as xilanases, cuja presença é de elevada relevância, tendo em vista que sua principal função é a desestruturação das fortes ligações cruzadas entre a hemicelulose e as microfibrilas da celulose na parede vegetal, através da hidrólise das ligações β -1,4 presentes na xilana vegetal (componente da hemicelulose) (LYND et al., 2002). Além disso, sendo que as hemiceluloses são constituídas de vários polímeros (principalmente, xilana), a sua degradação completa necessita da ação cooperativa de um consórcio de enzimas microbiais específicas como as xilanases (COUGHLAN e HAZLEWOOD, 1993). Depois das proteases e amilases, as celulasas são o terceiro produto de maior valor na indústria biotecnológica (SINGHANIA et al., 2009).

2.3.1.1. Enzimas celulasas

A estrutura da celulose pode ser quebrada por intermédio de um complexo enzimático que reconhece ligações β -1,4 glicosídicas entre moléculas de glicose, denominados celulasas (CAO e TAN, 2002). Essas enzimas, altamente específicas, agem em consórcio e podem ser classificadas dependendo do local de ação no polímero de celulose, como endoglucanases (endo 1,4-D-glucanohidrolase), as exoglucanases/celobiohidrolase (1,4- β -D-glucana-celobiohidrolase) e as β -glucosidases (ZHANG e LYND, 2004; CASTRO, 2006; FERREIRA, 2010; ARANTES e SADDLER, 2010).

2.3.1.1. 1. Endoglucanases (EGase)

As endoglucanases (CE 3.3.1.4) (Figura 2.7) iniciam a hidrólise da celulose através da clivagem randomicamente das ligações internas nas microfibrilas que se encontram nas regiões menos cristalinas (amorfa), diminuindo o comprimento das mesmas e, conseqüentemente, gerando novas extremidades livres, produzindo Cello-oligosacáridos, que são substratos para as enzimas celobiohidrolase (CBH). Estas enzimas são responsáveis pela redução do grau de polimerização (GP) que ocorre através solubilização do polímero celulósico, devido à sua hidrólise em oligossacarídeos.

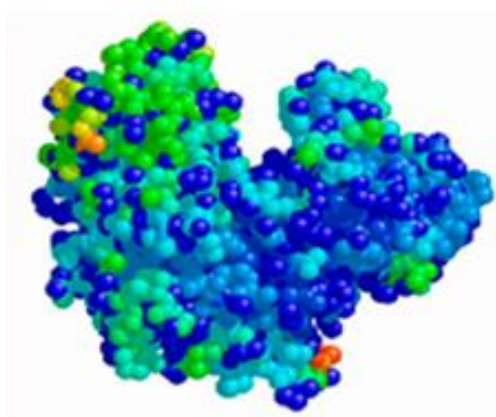


Figura 2.7 – Estrutura da Endoglucanase (WEIZMANN, 2010).

2.3.1.1. 2. Exoglucanases (ExGase)

O grupo das exoglucanases (EC 3.2.1.91), Figura 2.8, é constituído por CBH e glucano hidrolase (GH). As glucano hidrolases, também conhecidas como 1,4- β -D-glucana-glucano-hidrolases, são capazes de liberar glicose diretamente da fibra celulósica. As celobiohidrolases agem de maneira progressiva em extremidades redutoras (CBHI) e não-redutoras (CBHII) da celulose, com maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente, celobiose como produtos. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu próprio produto de hidrólise (celobiose).

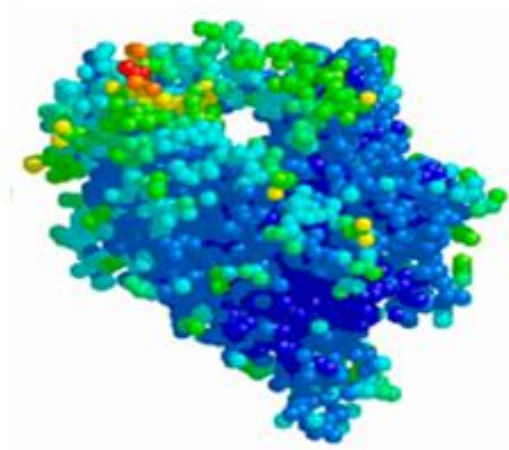


Figura 2.8 – Estrutura da Exoglucanase (WEIZMANN, 2010).

Como pode se observar nas Figuras 2.7 e 2.8, apesar da similaridade da sequência das duas enzimas, a respectiva arquitetura sítio ativo é diferente. A endoglucanase exibe uma fenda profunda para acomodar a cadeia de celulose em qualquer ponto ao longo do seu comprimento, enquanto que o sítio ativo da exoglucanase carrega um *loop* estendido que forma um túnel, através do qual um dos terminais de uma cadeia de celulose pode ser inserido (WEIZMANN, 2010).

2.3.1.1. 3. β -glucosidases (β Gase)

As β -glucosidases (EC 3.2.1.21), Figura 2.9, também conhecidas como celobiases, representam um grupo de grande expressão dentre as enzimas hidrolíticas, atuam nos resíduos de celodextrina (GP<7) e celobiose hidrolisando-os a glicose. Assim como a CBH, também é reportada com a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise.

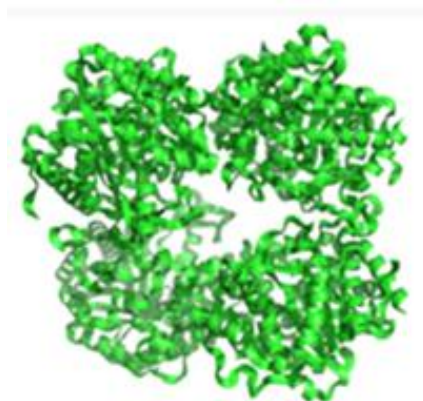


Figura 2.9 – Estrutura da β -glucosidase (WEIZMANN, 2010).

Segundo Soccol et al. (2010), o papel da β -glucosidase é essencial para completar a hidrólise da celulose em glicose, e também para evitar o acúmulo de celobiose, um inibidor de celulases, o nível de atividade celobiase em preparações de celulases é crítica. A representação esquemática da hidrólise de celulose pelo sistema celulolítico pode ser observada na Figura 2.10.

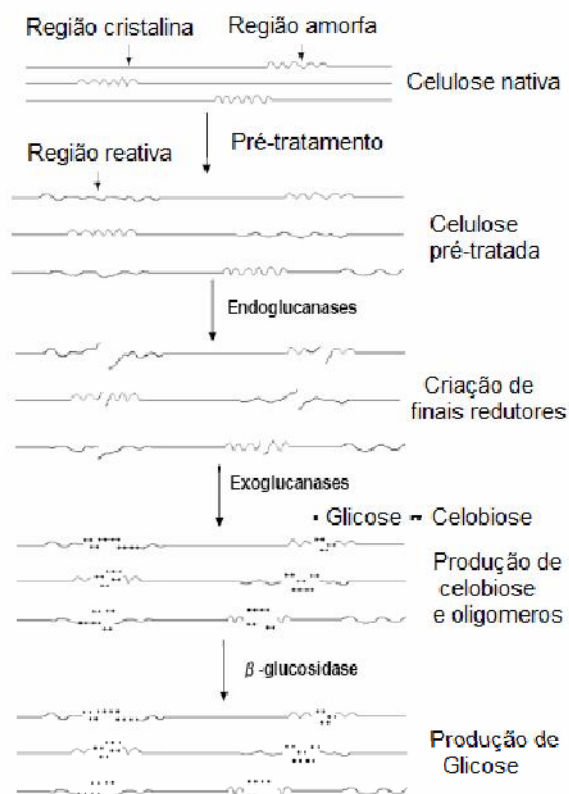


Figura 2.10 – Representação esquemática da hidrólise enzimática de celulose pelo sistema celulolítico (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

As enzimas do complexo celulolítico atacam o substrato de uma forma sinérgica (Figuras 2.10 e 2.11), o que resulta no aumento da eficiência pela ação de dois ou mais componentes de um sistema quando comparado a ação de cada um deles isoladamente. No caso das celulases, esse sinergismo faz com que a velocidade de formação de produtos solúveis aumente significativamente quando comparado à velocidade de ação isolada das enzimas (SANDGREEN, SAHLBERG e MITCHINSON, 2005; FERREIRA, 2010).

Segundo Lynd et al. (2002) a interação sinérgica pode acontecer entre uma endoglucanase de uma espécie de microrganismo e uma celobiohidrolase de outra. As celobiohidrolases são capazes de atuar muito rapidamente em uma extremidade gerada pelas endoglucanases, mostrando que as enzimas ficam distribuídas ao longo da fibra de celulose. O sinérgismo ocorre de três formas de sinergia:

1. Sinergia EG-ExG. As endoglucanases, ao atuar nas regiões amorfas da fibra, disponibilizam terminais redutores e não redutores para atuação das celobiohidrolases;
2. Sinergia ExGases-ExGases. As CBHs atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação das endoglucanases;
3. Sinergias ExGases- β Gases e EGases- β Gases. As celobiohidrolases e endoglucanases liberam respectivamente celobiose e oligossacarídeos para serem substratos das β -glicosidases.

Na Figura 2.11 é representado o mecanismo da degradação da celulose e pode se verificar o sinérgismo das enzimas.

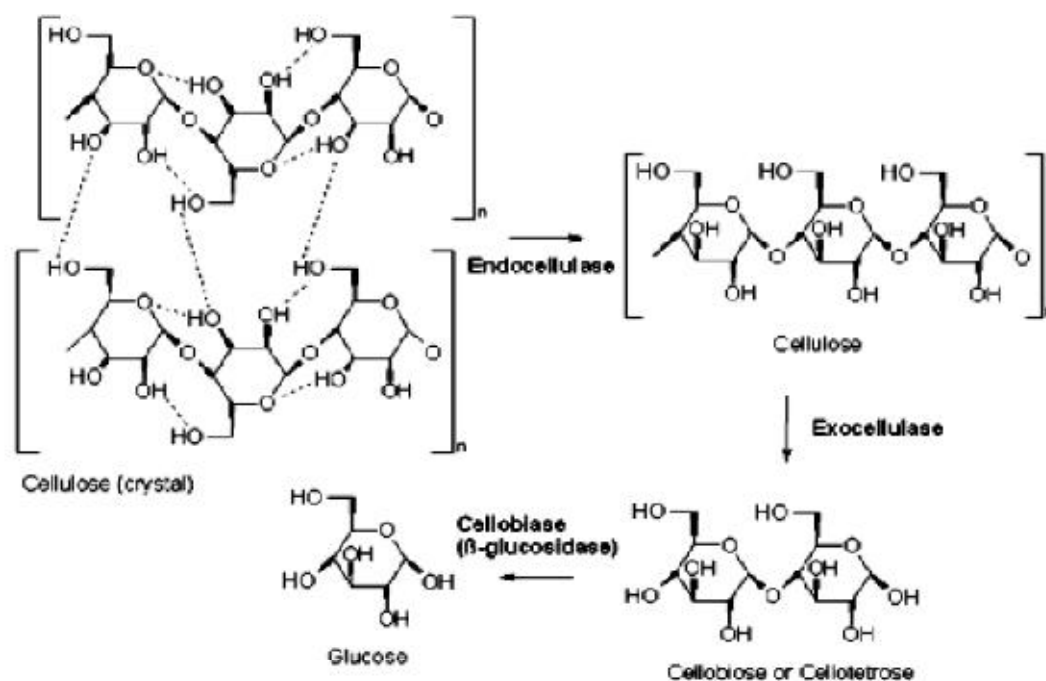


Figura 2.11 – Mecanismo da degradação da celulose e sinérgismo do complexo enzimático (SADDLER, RAMOS e BREUIL, 1993).

2.3.2. Tecnologias para produção de celulase

No âmbito da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, as celulases são insumos que impactam significativamente o processo, podendo representar até 18% do custo operacional de uma planta de hidrólise enzimática (ZHUANG et al., 2007). As tecnologias para produção de celulases e suas aplicações na hidrólise de materiais lignocelulósicos são processos em contínuo desenvolvimento, e chave para o aumento da produtividade e economicidade da rota enzimática (ZÚÑIGA, 2010).

O mecanismo de produção celular das celulases é ainda desconhecido, mas foi explicado por vários pesquisadores como um processo de síntese constitutiva e excreção de enzimas através da parede celular. A produção de pequenos glícidos, pelas celulases constitutivas, promove à indução e a expressão das celulases, tornando o processo de excreção das celulases constitutivas a etapa limitante da taxa de indução da síntese das demais enzimas do complexo. Adicionalmente, sabe-se que a secreção é diretamente proporcional à concentração de indutor no meio ao qual o microrganismo está exposto (VRIES e VISSER, 2001; LYND et al., 2002).

Na produção de celulases microbianas, podem ser usados processos fermentativos como a fermentação submersa (FS) ou a fermentação em estado sólido (FES). Tradicionalmente as celulases de aplicação comercial são produzidas por meio de processos de FS, nos quais os microrganismos são cultivados em um meio aquoso homogêneo e rico em nutrientes. O conteúdo de água nesse processo é superior a 95% (RODRIGUES e SANTANA, 2001). Segundo MATHEW et al. (2008) vantagens como controle, e monitoramento eficientes e maior reprodutibilidade são associadas à FS

No entanto, a FES apresenta algumas vantagens comparativas em relação à FS: menor tamanho de reator, maior produtividade (extratos de 3 a 4 vezes mais concentrados), baixos custos operacionais, menor gasto energético, menor volume de efluentes líquidos gerados, baixo capital de investimento, simplicidade no processo, além de susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas a variações de temperatura e pH (SILVEIRA e FURLOG, 2007; PENG e CHEN, 2008; CASTRO e PEREIRA Jr, 2010; SINGHANIA et al., 2010).

2.3.2.1. Fermentação em estado sólido (FES)

A FES, também chamada por alguns autores de fermentação semi-sólida (FSS), representa uma rota alternativa e promissora na redução dos custos de produção de enzimas e viabilização do etanol lignocelulósico. É um processo de cultura de microrganismos realizado na superfície ou interior de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte) que pode ter sua composição modificada pela adição de conteúdo de líquido destinado a complementar a concentração de nutrientes necessários ou mesmo manter o nível de atividade de água necessário para o crescimento e metabolismo das células (DEL BIANCHI, CAPALBO e MORAES, 2001; SILVEIRA e FURLONG, 2007).

Na FES os fungos representam, embora existam produtos gerados por algas e vários produtos de origem bacteriana, os microrganismos mais promissores, pois o desenvolvimento das hifas permite que os fungos colonizem e penetrem no substrato e a região porosa entre as partículas do substrato. Outra característica que faz os fungos se desenvolverem bem na FES é que muitos destes microrganismos conseguem crescer sem maiores dificuldades em ambientes sólidos que apresentam uma pequena atividade de água (GRAMINHA et al., 2008; SINGHANIA et al., 2009; ZÚÑIGA, 2010).

Os materiais sólidos usados na FES podem ser classificados em duas categorias: materiais inertes, que só agem como um local de fixação para o microrganismo e não inerte, que fornecerá alguns nutrientes para o microrganismo. Resíduos agroindustriais são considerados substratos adequados para a produção comercial de enzimas. A aplicação de resíduos de produtos agrícolas como substratos de fermentação é interessante, pois são produzidos em grandes quantidades, estão disponíveis a custos mais baixos e são ricos em nutrientes (COUTO e SANROMÁN, 2006; DÍAZ et al., 2007).

Dentre os parâmetros operacionais que determinam o rendimento e a produtividade na FES estão, o tipo de substrato e suporte; umidade e atividade da água; temperatura, pH e aeração (ZÚÑIGA, 2010). Tanto os parâmetros que afetam a síntese enzimática quanto a melhora na produtividade devem ser sempre investigados, pois variam e são específicos para cada ecossistema formado pelo microrganismo e o substrato usado (CASTRO, 2006).

O substrato representa o melhor indutor de produção de enzimas, atuando como fonte de carbono e energia para o microrganismo fermentador. A produção de

determinado metabólito pode ser direcionada com a escolha do substrato apropriado. Neste sentido, diversos subprodutos de origem agroindustrial, como bagaço de cana, farelos e cascas de cereais, possuem características estruturais nutricionais adequadas para serem utilizadas como substratos na FES (ZHANG, HIMMEL e MIELENZ, 2006; ZÚÑIGA, 2010).

Também é importante mencionar, o efeito indutor de espécies de menor massa molar e a sua inclusão no meio de suplementação de nutrientes favorece a adaptação das células em matérias-primas insolúveis, conseguindo com isto taxas cinéticas mais rápidas de fermentação (SINGHANIA et al., 2010).

Adicionalmente, as enzimas produzidas a partir da mesma biomassa a ser hidrolisada têm relatado maior eficiência e especificidade no processo (LYND et al., 2002). Celulases e xilanases têm sido produzidas por FES de várias espécies de *Aspergillus*, inclusive *A. niger* e *A. phoenicis* por FES com bagaço de cana como substrato e posteriormente utilizadas na produção de etanol celulósico (PANDEY et al., 2000; SÁNCHEZ, 2009).

2.3.3. Microrganismos produtores de enzimas lignocelulolíticas

O complexo de celulases é produzido a partir de uma grande variedade de microrganismos (bactérias e fungos), mas são os fungos aeróbios os que ostentam as melhores taxas de crescimento e secreção (ZHANG e LYND, 2004; ZÚÑIGA, 2010).

Os fungos são microrganismos amplamente dispersos, podendo ser encontrados em vegetais, animais, em solos e até em ambientes aquáticos, participando do ciclo de elementos na natureza. As colônias filamentosas, características dos bolores, são multicelulares e podem ter aspecto algodinoso ou pulverulento. São heterotróficos e sua nutrição se dá por absorção, processo no qual atuam enzimas específicas que hidrolisam macromoléculas, tornando-as assimiláveis (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 1996; TRABULSI et al., 2002). Estes microrganismos são capazes de degradar a celulose, hemicelulose e lignina em plantas em decomposição por um complexo conjunto de enzimas excretadas, hidrolítica e oxidativa, tais como celulases, hemicelulases e ligninases (ZHANG e LYND, 2004).

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e são os mais utilizados industrialmente para produção de celulases. O *Aspergillus niger*

(Figura 2.12) é apreciado no meio industrial por uma série de características, entre elas, há grande capacidade de fermentação e elevados níveis de secreção de proteína, além da grande variedade de enzimas produzidas para diversas aplicações (ZHANG e LYND, 2004; ZÚÑIGA, 2010; AMORE e FARACO, 2012).



Figura 2.12 – Macro e micromorfologia do *Aspergillus niger* (DOE-JOINT GENOME INSTITUTE, 2010 *apud* ZÚÑIGA, 2010).

Fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Monilia*, *Fusarium* e *Mucor* tem sido relatados por vários pesquisadores como produtores de enzimas celulolíticas (EL-SAID e SALEEM, 2008; QIN et al., 2010; AMORE e FARACO, 2012).

Vários manuscritos tem relatado o potencial de *Aspergillus* spp. na produção de (hemi) celulases em escala industrial. Espécies de *Aspergillus* são os principais agentes da decomposição da (hemi) celulose e, portanto, possuem a capacidade de produzir uma ampla gama de enzimas (hemi) celulolíticas (VRIES; VISSER, 2001). Estudos sobre *Aspergillus*, principalmente *A. niger*, *A. nidulans* e *A. oryzae*, identificaram atividades enzimáticas, tais como celulases, xilanases, hemicelulases e pectinases, atuando em uma gama de polímeros encontrados na parede celular da planta (AMORE e FARACO, 2012).

Xin e Geng (2010) estudaram a produção de celulase por FES de resíduos de horticultura e cavacos de madeira e *Trichoderma reesei* RUT-C30, utilizando como estratégias a otimização de parâmetros operacionais por planejamento estatístico, estes pesquisadores obtiveram como atividade enzimática FPase: 15; CMCase: 90,5; β -glicosidase: 61,6 U/g_{substrato}.

A produção de celulases por *Fusarium spp.* apresentam forte capacidade de degradação da celulose e tem sido intensamente estudada por seu sistema celulolítico, particularmente em conexão com o seu papel fitopatológico. Muitos manuscritos relatam que *Fusaria* são estirpes com potenciais para a produção de celulase em escala industrial, uma vez que, são capazes de produzir celulases que atuam em uma ampla gama de temperatura e pH. A pesquisa está recentemente com foco em caracterização de novas cepas *Fusaria* isoladas de solo ou a partir de vegetais infectados, a fim de otimizar a produção de celulase (RAMANATHAN, BANUPRIYA e ABIRAMI, 2010; AMORE e FARACO, 2012).

cet al., (2010) estudaram a produção de celulase por fungo termoe estável, *Fusarium chlamydosporum* HML 0278, com bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como fonte de carbono. Estes autores comprovaram que FES é um bom sistema para alto rendimento de celulase para o fungo estudado, obtiveram como atividade enzimática: FPase: 95,2; CMCase: 281,8; β -glucosidase: 135,2; Xilanase: 4720 U/g_{substrato}. As enzimas celulolíticas apresentam grande estabilidade dentro da faixa de pH 4-10 e em temperaturas abaixo de 70°C, promovendo o seu uso potencial na bioconversão industrial.

Alam et al. (2009) realizaram um estudo em dois sistemas de FES, frascos e biorreator horizontal rotacional, com resíduo do fruto oleaginoso da palma e *Trichoderma harzianum* T2008. As máximas atividades foram obtidas no 4º e no 2º dia de FES, respectivamente, FPase: 8,2 em frascos e 10,1 U/g_{substrato} em biorretor.

O *Chrysonilia sitophila* é um anemófilo, isto é, fungo dispersado pelo ar atmosférico e que pode ser encontrado como componente da flora microbiana do homem e de animais domésticos, como contaminante de alimentos, como deteriorantes de acervos e madeiras, em água doce e salgada, ou ser responsável pelo emboloramento. Sua dispersão na natureza é ampla; os propágulos fúngicos podem ser encontrados em altas concentrações nos mais variados locais, especialmente em ambientes úmidos (MEZZARI, 2002).

Lopes, (2013) estudaram a produção de etanol 2 G por FES de resíduos agroindustriais (bagaço de cana e farelo de arroz) por cepa selvagem, coletada no Cerrado brasileiro, *Chrysonilia sitophila*, neste estudo, os autores destacaram o fungo como promissor na produção de etanol, obtendo concentração de 6,5 g/L de etanol ao

fim de uma única fermentação e 16,7 g/L ao fim de quatro fermentações sucessivas com extrações sucessivas de complexo enzimático.

2.3.3.1. Seleção de microrganismos com potencial para produção de enzimas lignocelulolíticas

A busca e seleção de novos microrganismos com potencial de degradação de lignocelulósicos pode ser apontada como uma estratégia para diminuir os custos de produção de etanol. O Brasil possui uma imensa biodiversidade que se acredita compreender 10-20% do total de espécies conhecidas na terra. Assim, muitos grupos brasileiros estão realizando programas de triagem, a fim de isolar e identificar os microrganismos capazes de produzir enzimas lignocelulolíticas (SOCCOL et al., 2010).

Segundo Paiva e Sá-Pereira (2008), a descoberta de uma nova enzima significa encontrar uma nova função microbiana, portanto, o maior número possível de microrganismos deve ser investigado.

Em geral, os fungos que decompõem substâncias celulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes (RUEGGER e TAU-K-TORNISIELO, 2004; RAMANATHAN; BANUPRIYA e ABIRAMI, 2010).

Ambientes não convencionais representam importantes fontes de biodiversidade natural, apropriadas ao isolamento e seleção de microrganismos de interesse biotecnológico. Somados a isso, áreas com elevada diversidade microbiana tendem a conservar melhor os bancos genéticos e, conseqüentemente, potencializam a chance de obter inovações (BUZZINI e MARTINI, 2002). Assim, o Cerrado brasileiro, um dos maiores biomas do mundo, destaca-se como uma fonte ainda pouco explorada na obtenção de microrganismos com potencial para produção de enzimas que degradam a celulose (RATTER e RIBEIRO, 1997; MARCHANT, 2010; FISCHER et al., 2013).

2.3.3.1.1. Cerrado brasileiro

O Cerrado brasileiro é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de aproximadamente 2 milhões de km², que representa cerca de 22% do território nacional. Localizado na região central do país, o Cerrado compreende os seguintes estados brasileiros: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Goiás, Tocantins, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, São Paulo e o Distrito Federal, bem

como áreas remanescentes nos Estados do Pará, Roraima e Amapá (Figura 2.13) (MMA, 2013).



Figura 2.13 – Mapa Biomas brasileiros: abrangência e vegetação do Cerrado (IBAMA, 2013).

A palavra “Cerrado” é de origem espanhola e significa fechado, termo utilizado para caracterizar a vegetação arbustivo-herbácea densa que ocorre nesse bioma (FERREIRA, 2008). Neste espaço territorial encontram-se as nascentes das três maiores bacias hidrográficas da América do Sul: Amazônica/Tocantins, São Francisco e Prata, resultando em um elevado potencial aquífero e favorecendo a sua biodiversidade (MMA, 2013).

O Cerrado detém cerca de 5% da biodiversidade do planeta, sendo considerada a Savana mais rica do mundo. A heterogeneidade espacial é um fator determinante para a ocorrência de uma diversidade de espécies: o bioma abriga mais de 11000 espécies vegetais, além de uma grande variedade de vertebrados, terrestres e aquáticos, de invertebrados e de microrganismos, tais como fungos associados às plantas da região (MMA, 2013).

No Estado de Minas Gerais, inseridos no domínio de três biomas brasileiros: o Cerrado, a Mata Atlântica e a Caatinga, o Cerrado é o maior bioma, ocupa cerca de 57% da extensão territorial do Estado (IEF-Instituto Nacional, 2013). Além disso, possui a particularidade de estar geograficamente posicionado em uma zona de transição entre os

dois biomas, fator positivo para a pluralidade de espécies que possivelmente interagem neste ecossistema.

Devido ao fato de abranger uma área muito grande, a vegetação do Cerrado é dividida em onze tipos fitofisionômicos, agrupados em três formações: Florestal (Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão), Savânica (Cerrado sentido restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda) e Campestre (Campo Sujo, Campo Rupestre e Campo Limpo). O clima do Cerrado é caracterizado por duas estações climáticas bem definidas: invernos secos e verões chuvosos. A estação seca ocorre entre os meses de abril e setembro. Nesse período a umidade relativa do ar é baixa, contribuindo para a ocorrência de incêndios e a estação chuvosa ocorre entre os meses de outubro a março, período onde a flora do Cerrado se torna mais exuberante. O solo apresenta características bem marcantes, é bastante antigo, quimicamente ácido (pH 4,3 a 6,2) e profundo. Devido à profundidade do solo e a presença de água nas camadas mais profundas, as árvores e os arbustos possuem complexos sistemas de raízes que os ajudam no período mais seco, garantindo a sobrevivência e proteção contra as queimadas (SANTOS et al., 2011).

Todas estas características fazem do Cerrado, um ambiente propício no estudo investigativo de microrganismos produtores de enzimas destinadas à produção de etanol celulósico. Na Figura 2.13 é possível observar o crescimento de fungos em árvores do Cerrado.

2.3.4. Técnicas de purificação de enzimas

Enzimas lignocelulósicas, como celulase e xilanase, são capazes de biodegradar e bioconverter celulose em açúcares fermentescíveis, como glicose. Essas enzimas podem ser produzidas por vários microrganismos, com destaque aos fungos. A aplicação da celulase é muito ampla, abrangendo setores de indústrias alimentícias, de ração animal, têxtil, de detergente, cervejarias, farmacêutica, de papel e celulose, de gestão de resíduos, etanol celulósico, entre outros. A variedade de utilização industrial torna as enzimas economicamente interessantes, fato que incentiva o desenvolvimento de pesquisas com o intuito de encontrar melhores estratégias de processo, adequação à metodologia, custos mais reduzidos, elevada velocidade de degradação e alto grau de pureza; dependendo da aplicação faz-se necessária uma etapa de recuperação das enzimas, a fim de remover produtos indesejáveis formados durante a fermentação.

A tecnologia enzimática é, atualmente, um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e, sendo altamente específicas, minimizam os efeitos indesejáveis. Além disso, as enzimas podem ser usadas para substituir produtos químicos como compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agredem o meio ambiente e provocam o desgaste de materiais. Muitos tratamentos químicos são realizados em altas temperaturas e pressões, utilizando ácidos fortes ou álcalis que significam perigo ao ambiente de trabalho e ao meio ambiente (BON, 2002; MITIDIERI et al., 2002).

Entretanto, durante o processo fermentativo para obtenção da enzima (FES ou FS), são gerados, além do composto desejado, coprodutos que impedem, muitas vezes, a utilização do caldo bruto da fermentação nos procedimentos industriais. Por esta razão, várias técnicas de purificação foram desenvolvidas e aplicadas na separação de biocompostos. Cerca de 50 a 90% do custo de produção dos produtos biológicos deve-se a estas estratégias de purificação. Desta forma, o uso de uma técnica que permite alto grau de purificação e recuperação associada a baixo custo de operação é de grande interesse. Uma análise econômica sugere que o sistema aquoso bifásico (SAB), utilizado primeiramente na década de 1950 na Suécia para a separação de macromoléculas, células e organelas, pode ser considerado um dos processos de purificação que cumpre com estes critérios (MALPIEDI et al., 2009).

A aplicação das enzimas depende do seu grau de pureza; portanto, a purificação é uma etapa essencial para o estudo das propriedades biológicas e moleculares desses biocatalisadores. A ausência ou o reduzido grau de impurezas contribui para um espectro mais amplo de aplicações da enzima e um alto nível de atividade enzimática, que permite a utilização de pequenas quantidades da enzima. Um problema significativo da purificação é decorrente da complexidade estrutural destas enzimas e a necessidade de manter suas propriedades biológicas após a aplicação da técnica de purificação (BASSANI et al., 2010).

As técnicas de purificação podem ser aplicadas em etapa única (por exemplo, cromatografia de afinidade) ou por uma combinação de várias etapas (por exemplo, precipitação, tecnologia de membranas, troca iônica, filtração em gel). A maioria das preparações enzimáticas é comercializada na forma líquida ou granulada. As etapas

envolvidas para a recuperação final das enzimas, após a purificação do extrato bruto obtido no processo fermentativo, são a secagem (forma granulada) e a estabilização do produto final (forma granulada ou líquida) (BON e FERRARA, 2008).

O método mais utilizado para a secagem de enzimas é o método conhecido como “freeze dying”, no qual a secagem é feita por liofilização. O processo de liofilização possui as seguintes vantagens em comparação aos processos convencionais: a estrutura do material permanece intacta, a umidade é removida a baixa temperatura, a estabilidade do produto durante o armazenamento é mantido, a rápida transição do produto de um estado físico para outro minimiza a degradação da enzima (BOSS, 2004).

Para estabilização do produto final, na forma granulada ou líquida, faz-se necessário o emprego de etapas finais de acabamento para a manutenção da atividade enzimática durante o armazenamento e comercialização. Para a manutenção da atividade enzimática, é fundamental a preservação da conformação nativa, sendo utilizados, para esta finalidade, aditivos, modificação química controlada ou imobilização de enzimas. A metodologia empregada na estabilização dos biocatalisadores somente é revelada aos clientes pelas empresas que produzem enzimas comerciais, com compromisso firmado de confidencialidade (BON e FERRARA, 2008).

Nesse trabalho, serão explicitadas duas metodologias de purificação de enzimas: purificação por sistema aquoso bifásico e purificação por precipitação com sulfato de amônio.

2.3.4.1. Sistema aquoso bifásico (SAB)

De forma geral, a formação do Sistema Aquoso Bifásico (Aqueous Two-Phase - ATPs) ocorre quando dois compostos hidrofílicos como polímeros (polietilenoglicol, dextrano, dentre outros) e sais (como exemplo, fosfatos, sulfatos e citratos) são misturados acima de certa concentração crítica, resultando em duas fases imiscíveis, em que o maior constituinte é a água (GARZA-MADRID, RITO-PALOMARES e SERNA-SALDÍVAR, 2010).

Os SABs formados por PEG e dextrana ou PEG e sais são amplamente utilizados, pela disponibilidade em grandes quantidades no mercado, por não serem

tóxicos, possuem alta seletividade, possibilidade de reciclagem dos reagentes e por manterem a integridade das enzimas (FERREIRA, PADILHA e TAMBOURGI, 2009). Todavia, o elevado custo da dextrana torna inviável a sua aplicação em escala industrial. Assim, o sistema PEG e sais têm sido empregados para a extração de enzimas em larga escala, pelo reduzido custo, baixa viscosidade e elevada seletividade (MALPIEDI et al., 2009). A separação em tais sistemas não requer equipamentos sofisticados e permite a integração de processos (ZIJLSTRA et al., 1998).

O sistema PEG aquoso e fosfatos, no entanto, gera águas residuais com alto teor de fosfatos, que causam grande impacto ambiental (PERUMALSAMY e MURUGESAN, 2006). Este problema pode ser facilmente evitado usando sal biodegradável, tal como citrato. No entanto, o estudo de PEG/sistemas de citrato e de sua eficiência na recuperação de biomoléculas tem sido limitado a apenas alguns estudos de investigação. Estes estudos concentraram-se na recuperação de amilase (ZHI et al., 2004), penicilina acilase (AGUILAR et al., 2006) e hexoquinase (OLIVEIRA et al., 2003). O PEG e seus derivados têm sido amplamente utilizados em alimentos, cosméticos, sabões e medicamentos, devido a suas propriedades de atoxicidade e por não serem considerados antigênicos nem imunogênicos (COIMBRA et al., 2003). Assim, estudos da aplicação dos SABs na recuperação de celulases tornam-se interessantes, diante dos poucos estudos encontrados na literatura.

Segundo Coimbra et al. (2003), a quantidade de reagentes químicos consumidos determina a competitividade entre a extração com SABs e as outras técnicas de biosseparação. Por isso, a possibilidade de reutilização dos constituintes das fases deve ser considerada.

Sabe-se que há emprego em operações industriais; porém, dado seu caráter sigiloso, tais aplicações não são descritas em publicações especializadas. Há, portanto, um caminho a ser explorado, pois a viabilidade econômica já é bem estabelecida e os SABs são considerados no meio científico como tecnologia suficientemente madura para uso na indústria (RITO-PALOMARES, 2004).

Herculano et al., 2012 investigaram a separação e a purificação de celulases a partir de complexos celulósicos produzidos por *Aspergillus japonicus* URM5620 em sistemas de duas fases aquosas (APTS). Um modelo de planejamento fatorial (2^4) foi utilizado para avaliar a influência de polietileno glicol (PEG) de massa molar (1000-8000 g/mol), concentração (20,0-24,0 %, w/w), concentração de citrato de sódio (15-

20%, w/w) e pH (6,0-8,0) na divisão e purificação diferencial do complexo de celulase composta por β -glucosidase (β G), endoglucanase (EGase) e celulase total (FPase). O sistema PEG/citrato de sódio resultou em separações características das celulases, na qual as partições de β G dirigiram-se à fase de sal e FPase e EGase, ao topo (fase PEG). Este processo proporciona aumento eficiente e atrativo do fator de purificação. O melhor rendimento de atividade para FPase (2,67%) foi obtida com 24% (w/w) de PEG 1000 g/mol e 15% (w/w) de citrato de sódio a pH 8,0. No entanto, o maior fator de purificação (64,8) foi observado com 20% (w/w) de PEG 8000 g/mol.

2.3.4.2. Precipitação com Sulfato de Amônio

Dentre as técnicas de precipitação, a utilização de sulfato de amônio é a mais utilizada, devido à precipitação da maioria das proteínas ocorrerem em uma molaridade alta, não promover o aquecimento da solução (em comparação com a utilização de solventes como etanol), apresentar uma densidade que não interfere na sedimentação da maioria das proteínas e promover o efeito de concentração das proteínas (KANWAR et al., 2006).

Todavia, esta técnica de precipitação é considerada de baixa resolução de separação devido à baixa especificidade. Saxena et al. (2003) realizaram um estudo sobre os métodos de purificação e observaram que cerca de 80% dos sistemas de purificação utilizam a etapa de precipitação, dos quais, 60% usam sulfato de amônio e 35% usam etanol, acetona ou um ácido, seguido pela combinação de algum método cromatográfico.

A definição das operações de um processo de purificação depende do uso da molécula alvo e também de suas características físico-químicas e do tipo de impurezas presentes (KORNBERG, 1990; GUPTA, GUPTA e RATHI, 2004).

Abbas et al. (2002), com a finalidade de estudar o isolamento e a caracterização de uma lipase extracelular de uma cepa isolada de *Mucor* sp., de palma de frutas, utilizaram para a precipitação da proteína 75% (m/v) de sulfato de amônio a 0°C, obtendo uma atividade lipolítica específica de 129 U/g e um rendimento total de 99%. Resultados semelhantes foram verificados no estudo de Castilho et al. (2000) para a purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp.. Neste processo, utilizaram o sulfato de amônio a 70% para a precipitação e obtiveram uma atividade específica de 103 U/g.

Como pode ser observado, o processo de purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de uma enzima. A escolha do processo de purificação enzimática deve ser feita levando em consideração a necessidade de uma boa recuperação da atividade enzimática aliada a um alto grau de pureza. Além disso, o processo deve ser simples e barato, evitando sucessivas etapas. Em geral, a fase de purificação é a etapa que mais contribui para o custo total de obtenção de uma enzima. Em comparação às técnicas citadas anteriormente, a partição em sistema aquoso bifásico é uma alternativa bastante eficiente para a separação e purificação de bioprodutos como proteínas. São muitas as vantagens oferecidas por este tipo de sistema, como: ambiente biocompatível, baixa tensão interfacial, baixa energia, fácil aplicação em grande escala, operação contínua e alta sensibilidade no reconhecimento das interações das proteínas ligantes (SELVAKUMAR et al., 2010).

2.4. Produção de bioetanol de segunda geração

A fermentação alcoólica é um processo biológico no qual compostos orgânicos, como açúcares, são convertidos por microrganismos (leveduras) em compostos mais simples, etanol e CO₂ e outros subprodutos. Ainda hoje a via fermentativa é a mais importante para a obtenção de álcool no Brasil, tanto para a produção de etanol de primeira geração (E1G), pela cana-de-açúcar, quanto de segunda geração (E2G), a partir de biomassas lignocelulósicas. O que torna a produção de etanol por fermentação a forma mais econômica de sua obtenção é a diversidade de matérias-primas naturais e residuais existentes no país (PEREIRA JR; COUTO; SANTA ANNA, 2008).

A produção de etanol é, geralmente, realizada em três etapas: obtenção de uma solução de açúcares fermentescíveis, fermentação destes açúcares em etanol, e separação e purificação de etanol. A forma de execução destas etapas depende da biomassa utilizada, como mostra a Figura 2.14 (MUSSATO et. al, 2010).

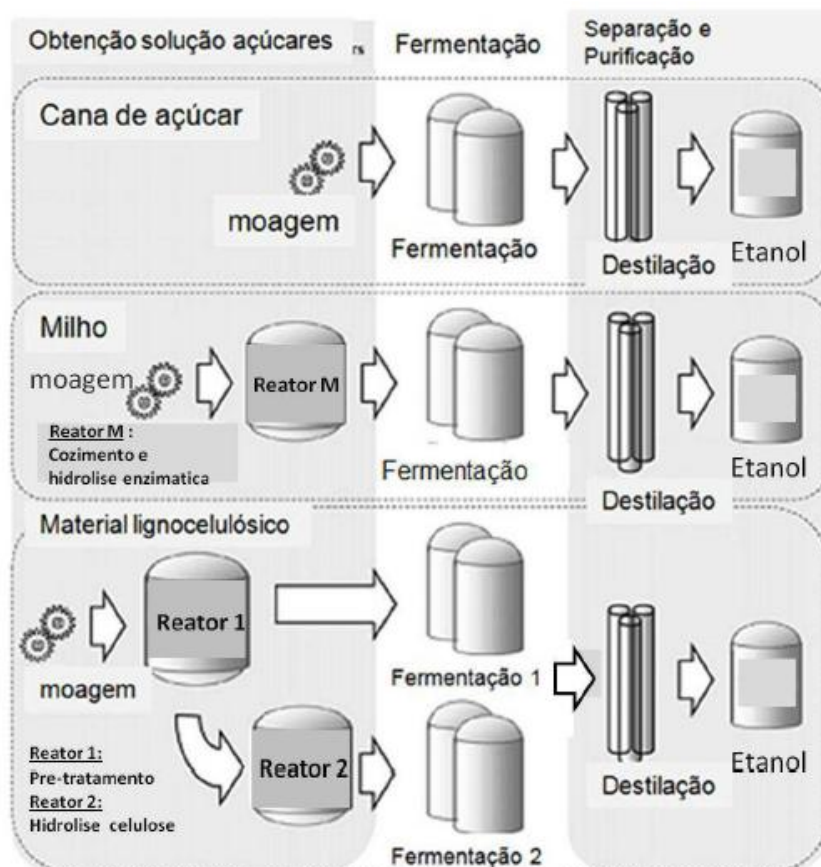


Figura 2.14 – Fluxograma com as matérias-primas principais e os processos utilizados para a produção de etanol (adaptado de MUSSATTO et al., 2010).

Como pode ser observado (Figura 2.14), a etapa anterior à fermentação para obtenção de açúcares fermentescíveis é o que diferencia os processos de produção de etanol a partir do açúcar simples (E1G), a partir do amido e a partir do material lignocelulósico. Na produção de etanol que utiliza sacarose, a etapa de hidrólise é desnecessária, pois a sacarose é um açúcar fermentescível. Já, na produção de etanol de amido de milho, torna-se necessária a sacarificação (Reator M): o amido é gelatinizado por cozimento e submetido a hidrólise enzimática para formação de monômeros de glicose, os quais podem ser fermentados pelos micro-organismos. Nos processos que utilizam biomassa lignocelulósica, é necessária a abertura das fibras e tratamento para conversão da hemicelulose e da celulose em açúcares fermentescíveis: a) abertura das fibras de celulose; b) separação da celulose da hemicelulose, com hidrólise destas em pentoses e hexoses (Reator 1); c) hidrólise da celulose a glicose (Reator 2).

A produção de etanol a partir de lignocelulósicos envolve quatro etapas principais: Pré-tratamento da biomassa para tornar a celulose e hemicelulose acessíveis a hidrólise; Hidrólise ou sacarificação do material pré-tratado à hexoses (geradas pela

hidrólise da hemicelulose, em menor quantidade, e da celulose) e pentoses (provenientes da hidrólise da hemicelulose); Fermentação alcoólica do hidrolisado por levedura e destilação do fermentado. Na Figura 2.15 é apresentado um diagrama com as etapas de produção de etanol celulósico a partir de bagaço de cana.

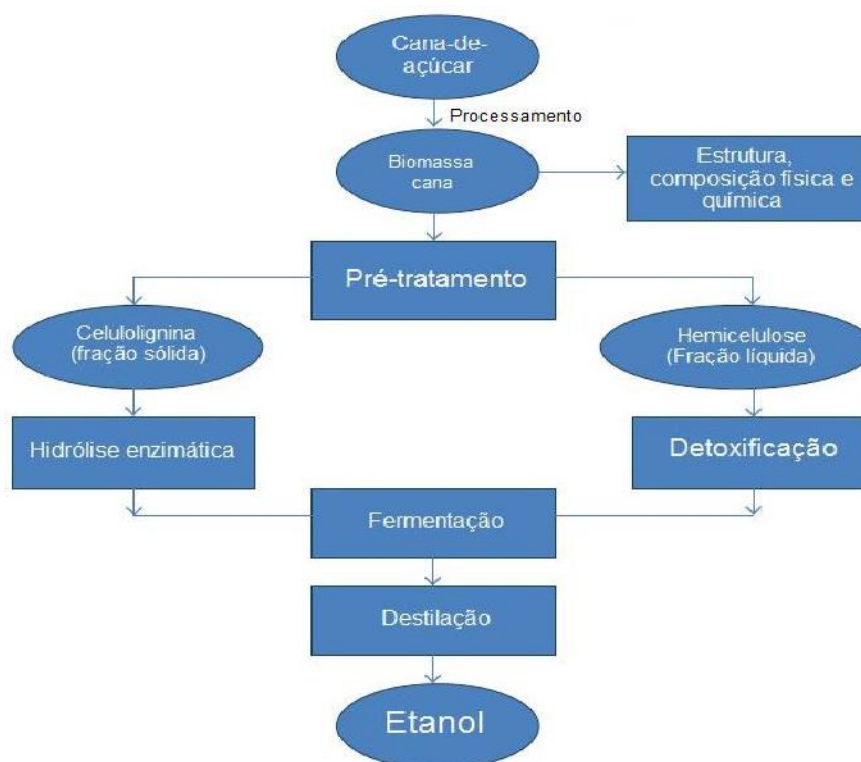


Figura 2.15 – Diagrama da bioconversão da biomassa de cana em etanol de segunda geração (adaptado de CANILHA et al., 2012).

As tecnologias envolvidas para a produção de etanol de segunda geração são mais complexas e o custo da produção é mais elevado quando comparado com a produção de etanol a partir de cana, beterraba ou milho. No entanto, a maioria dos materiais lignocelulósicos apresenta um grande potencial para a produção de etanol em grande escala para o consumo mundial como um combustível renovável. A biomassa lignocelulósica se tornará, portanto, a matéria-prima principal para a produção de etanol no futuro próximo (MUSSATTO et al., 2010).

Como já abordados anteriormente as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática das biomassas lignocelulósicas, nos próximos tópicos serão abordados as formas de condução da fermentação destes hidrolisados.

Existem diversas configurações para se realizar a fermentação dos hidrolisados de materiais lignocelulósicos, tanto se tratando do sistema de operação do reator -- batelada, batelada alimentada, CSTR, dentre outros --; quanto dos microrganismos fermentadores utilizados. Segundo OLSSON et al., 2006 o ideal que o sistema para produção de etanol celulósico sejam os mais próximos possíveis do E1G, já que as tecnologias estão prontamente disponíveis nas usinas de produção deste biocombustível, logo uma adaptação seria mais simples.

2.4.1. Estratégias para produção de bioetanol de segunda geração

Visando a otimização da produção de etanol, algumas estratégias de condução das fermentações alcoólica são realizadas. As etapas de hidrólise e fermentação podem ser conduzidas de forma separada, SHF (*Separated Hydrolysis and Fermentation*) ou de forma simultânea SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*).

2.4.1.1. Hidrólise e fermentação separadas (SHF)

Neste processo a hidrólise da biomassa celulósica ocorre num estágio separado da fermentação alcoólica. A principal vantagem deste tipo de processo é a possibilidade de se conduzir a hidrólise e fermentação em suas condições ótimas de pH e temperatura, ou seja, específica de cada etapa (OLSSON et al., 2006).

Por outro lado, existem algumas desvantagens inerentes a esta estratégia: Inibição do complexo celulásico pelos açúcares liberados na hidrólise, principalmente celobiose e glicose que se acumulam no meio, conferindo uma hidrólise incompleta da celulose e rendimentos não muito altos (WINGREN et al., 2005); Possibilidade de contaminação, como o tempo envolvido na etapa de hidrólise é muito longo, a solução de glicídios torna-se uma fonte disponível para os microrganismos indesejados. Além disso, as próprias enzimas podem constituir uma fonte potencial de contaminação. Em escala industrial, seria muito difícil esterilizar, pois a autoclavação inativaria as enzimas (TAHERZADEH e KARIMI, 2007).

2.4.1.2. Hidrólise e fermentação simultâneas (SSF)

A hidrólise e a fermentação alcoólica neste processo ocorrem na mesma etapa. Esta estratégia apresenta inúmeras vantagens, dentre elas: Redução da inibição das

celulases pelo produto, pois os açúcares gerados pelas enzimas são consumidos imediatamente pelo microrganismo responsável pela fermentação alcoólica; Menor complexidade e custo do processo comparado ao SHF, pois reduz o número de reatores, minimização dos riscos de contaminação, devido às baixas concentrações de açúcar livre e pela presença de etanol no meio; e maiores rendimentos de hidrólise, já que o equilíbrio das reações enzimáticas são deslocados no sentido de formação de mais produto, visto que a glicose é concomitantemente consumida (VÁSQUEZ et al., 2007; SILVA, 2010; CARLI, 2011).

Entretanto, como desvantagem tem-se o desfavorecimento da cinética enzimática devido à necessidade de conduzir o processo dentro da faixa ótima do microrganismo fermentador. Em relação a este aspecto, estudos têm sido realizados no sentido de produzir celulases que atuem em valores de pH e temperatura próximos daqueles ótimos para o processo fermentativo (TAHERZADEH e KARIMI, 2007; SILVA, 2010).

2.4.2. Leveduras utilizadas na fermentação alcoólica

Dentre os microrganismos mais utilizados nos processos de fermentação alcoólica está a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, intensamente utilizada na produção industrial de álcool combustível, devido à sua capacidade de assimilar facilmente a glicose da cana ou da celulose de biomassas residuais (SILVA, 2010).

O grande sucesso da *S. cerevisiae* na indústria de biotecnologia é devido à alta eficiência fermentativa e robustez, pois se trata de processos não estéreis. Possui importantes características, como tolerância a baixos valores de pH e alta concentração de açúcar e etanol, propriedades como alta competitividade perante contaminação (bacteriana ou por outras leveduras) na fermentação industrial e alta resistência a inibidores presentes na biomassa hidrolisada, além da capacidade de crescer anaerobicamente (ANDRIETTA et al., 2007; MISSAWA, 2009).

Os microrganismos devem ser capazes de fermentar todos os monossacarídeos presentes na biomassa e resistir a potenciais inibidores do hidrolisado (AGBOGBO et al., 2006). Os microrganismos capazes de fermentar pentoses presentes na biomassa hemicelulósica são: os microrganismos geneticamente modificados, como a *Saccharomyces cerevisiae* e as bactérias *Escherichia coli* e *Zymomonas mobilis* e os microrganismos naturalmente fermentadores, como as leveduras *Pichia stipitis*,

Candida shehatae e *Pachysolen tannophilus*. Entre essas leveduras a *Pichia stipitis* apresenta grande potencial para aplicações industriais por ter bom rendimento e conversão em etanol. Esta levedura apresenta características fisiológicas que a tornam muito interessante para a bioconversão em etanol, boa capacidade para fermentar xilose, e também é capaz de fermentar outros açúcares como a glicose, manose, galactose e celobiose. Isto torna a *Pichia stipitis* um microrganismo com grande potencial e uso em processos de fermentação alcoólica a partir de hidrolisados hemicelulósicos ou através da sacarificação e fermentação simultânea (AGBOGBO et al., 2006; FERREIRA, 2010).

Pichia stipitis pertence a um grupo de leveduras isoladas existentes na madeira e nas larvas de insetos que aí habitam. Esta levedura tem a capacidade de utilizar a maior parte dos açúcares presentes na madeira, porque produz diversas celulasas e hemicelulasas para hidrolisar os polissacarídeos da madeira em monossacarídeos (ALMEIDA, 2009).

As pentoses, arabinose e xilose, são geradas tanto no pré-tratamento de biomassas ricas em celulose como no processo de hidrólise enzimática necessário para liberação de glicose da biomassa de forma a favorecer a fermentação tradicional da glicose, gerada pela hidrólise enzimática, por *Saccharomyces cerevisiae* que pode ser utilizado de forma conjunta com a *Pichia* de forma a conjugar o melhor crescimento e produção de etanol da *S. cerevisiae* a facilidade de fermentação de pentose em metabolismo diáuxico que só favorece a fermentação de pentoses ao fim da conversão de hexoses (GROOTJEN et al., 1991; LIN et al., 2012).

Gupta, Sharma e Kuhad (2009) estudaram a produção de etanol celulósico, utilizando como matéria-prima a *Prosopis juliflora* (arbusto espinhoso comum da vegetação do semi-árido) e as leveduras *Pichia stipitis* NCIM 3498 para a fermentação das pentoses e *Saccharomyces cerevisiae* para fermentação das hexoses. O hidrolisado hemicelulósico contendo 18,24 g/L de açúcares, quando fermentada com *P. stipitis* produziu 7,13 g/L de etanol, após 24 h. Para a fermentação de hidrolisado celulósico (37,47 g/L), utilizando *S. cerevisiae*, obteve 18,52 g/L de etanol, após 16 h.

Ferreira (2010) avaliou a necessidade de suplementação nutricional e a concentração inicial de xilose e células no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar sobre os parâmetros fermentativos de sua bioconversão a etanol pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2. Este estudo demonstrou que esta levedura

mostrou-se viável a produção de bioetanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, com uma conversão em etanol de $Y_{P/S}$ de 0,19 g/g.

2.4.3. Estudos e dados da literatura de produção de etanol 2 G

No processo de fermentação de lignocelulósicos, algumas dificuldades são apontadas: depois do pré-tratamento, o material hidrolisado contém não somente açúcares fermentescíveis, mas também muitos componentes que apresentam efeito inibidor para os microrganismos utilizados na fermentação; custo de enzimas celulósicas para hidrólise e aumento de produtividade do etanol. Neste sentido, diversos estudos têm sido realizados no sentido de superar as dificuldades inerentes ao processo de fermentação de lignocelulósicos.

Reconhecendo a crescente demanda por etanol, o uso de complexo enzimático bruto produzido por FES emerge como uma importante forma de produção de enzimas celulolíticas no próprio local de produção de etanol. Esta proposta tem sido encarado como uma alternativa viável, capaz de reduzir o custo da produção de E2G (ASWATHY et al., 2010; Xin et al., 2013; THOMAS, LARROCHE, PANDEY, 2013; ROCHA et al., 2013).

A fim de melhorar a transferência de calor e massa, o processo FES tem sido estudado utilizando vários formatos de biorreatores (leito fixo, tambores rotativos, leito fluidizado gás-sólido e vários bioreatores agitados rotativo) e o complexo de enzima bruto é obtido no fim de FES pela lavagem do meio sólido fermentado (MITCHELL et al., 2000; MITCHELL, MEIENF e KRIEGER, 2003; LEVER, HO e CORD-RUWISCH, 2010).

Islam et al. (2013) realizaram fermentação de papel como substrato nas concentrações de 10 g/L e 45 g/L por *Clostridium Thermocellum*, com otimização do meio de cultura com o uso de nutrientes e vitaminas, para 5 dias fermentação alcoólica, obtiveram 3,5 e 13,6 g/L de etanol (batelada).

Lever e Ho (2012) estudaram a otimização a produção de etanol pelo uso de agentes esterilizantes na fermentação etílica (batelada) de palha de trigo (200 g/L) hidrolisada por enzima comercial e hidrolisada por complexo enzimático bruto, como resultado obtiveram 5,6 e 8,7 g/L de etanol, respectivamente. Demonstrando que a produção e utilização de extrato enzimático bruto é uma alternativa promissora na

fermentação alcoólica de biomassas celulósicas, principalmente pela redução de custos de enzimas comerciais.

Xu et al. (2011) estudaram fermentação alcoólica (batelada) de sorgo, utilizando enzima comercial, com otimização das condições de pré-tratamento e fermentação com o uso de hidrólise ácida, a concentração de etanol obtida foi de 8,4 g/L.

Lever, Ho e Cord-Ruwisch (2010) avaliaram a fermentação de palha de trigo sem pré-tratamento na concentração de 47 g/L, sendo a produção de complexo enzimático bruto por FES de *Trichoderma reesei* utilizado na fermentação etílica de palha de trigo, com tempos variáveis entre 1 e 7 dias. A máxima concentração de etanol obtida neste estudo foi 5,5 g/L de etanol.

Segundo Kristensen, Felby e Jorgensen (2009) trabalhar com altas concentrações de sólidos na hidrólise enzimática para conversão de celulose é uma vantagem, pois se aumenta a concentração do produto e a produtividade da planta enquanto se diminui o gasto com água e energia no processo.

2.5. Perspectivas e importância do desenvolvimento do E2G

Com o aumento do preço do petróleo, o bioetanol se torna um candidato ideal para substituir o papel dos combustíveis fósseis. Assim, esta fonte renovável se torna cada dia mais importante para a população, especialmente em termos de melhoria da produtividade, eficiência e diminuição dos custos de produção (NGUYEN, LE e KY, 2014).

Um grande marco na história do etanol no Brasil ocorreu em 14 de novembro de 1975, data em que foi instituído o Programa Nacional do Alcool (Proálcool) pelo decreto nº 76.593 (NOVACANA, 2014). O Proálcool diversificou a atuação da indústria açucareira com grandes investimentos apoiados pelo Banco Mundial, possibilitando a ampliação da área plantada com cana-de-açúcar e a implantação de destilarias de etanol. Neste mesmo ano estimulou-se a substituição da gasolina pelo etanol para uso em automóveis e intensificou o uso da mistura de etanol e gasolina como combustível (SIQUEIRA et al., 2008). A experiência serviu como alternativa para diminuir a vulnerabilidade energética do país, devido à crise mundial do petróleo. A lei também concedeu ao Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA) a responsabilidade de formular as

especificações sobre o álcool. Em julho de 1979 foi lançado o primeiro carro 100% a álcool produzido no Brasil, o Fiat 147. Em 2003 ocorreu a introdução dos veículos de combustível *flex* e foi lançado o primeiro carro com motor *flex*, que permitiu a utilização tanto de etanol quanto de gasolina, ou uma mistura dos dois em qualquer proporção (NOVACANA, 2014).

O uso do etanol como biocombustível é quase que exclusivo do Brasil e Estados Unidos, porém ele é também utilizado na produção de aditivos por toda União Europeia, Índia e China (SANTOS et al., 2011).

Apesar de estar presente em diversos produtos do cotidiano, o etanol é mais utilizado, como combustível. Para se ter uma ideia, na safra 2012/2013, foram produzidos mais de 21 bilhões de litros do biocombustível no país. Deste volume, foram consumidos aproximadamente 18 bilhões de litros e pouco mais de 3 bilhões foram exportados (VEIGA FILHO e RAMOS, 2006; NOVACANA, 2014). A Figura 2.16 mostra a moagem da cana-de-açúcar no Brasil e a Figura 2.17 mostra a evolução brasileira da produção de açúcar e etanol, respectivamente.

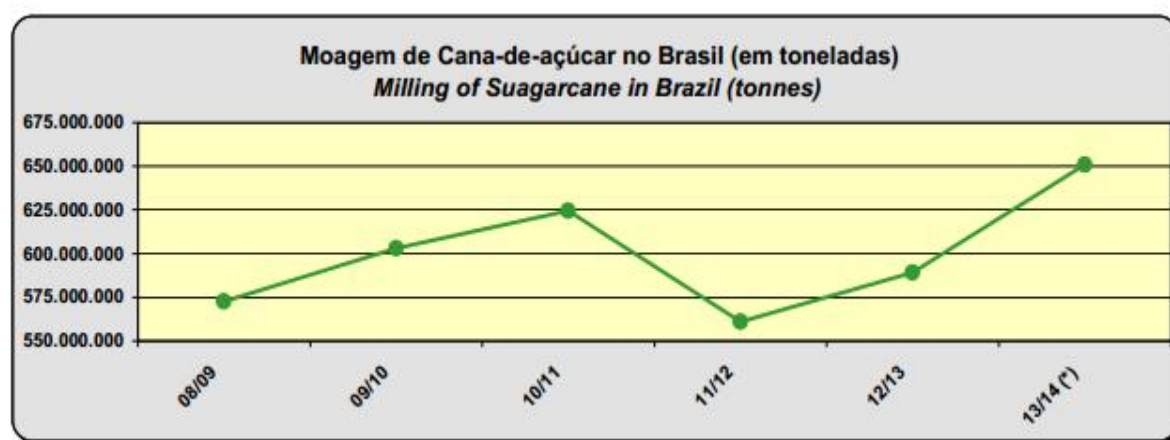


Figura 2.16 – Moagem de cana-de-açúcar no Brasil em toneladas/safra-ano (MAPA, 2014).

O etanol, como alternativa de energia renovável, está sendo aceito em todo o mundo como um substituto visível para os combustíveis à base de petróleo tradicionais. Em particular, etanol celulósico, pode ser produzido a partir de biomassa lignocelulósica barata e abundante (KIM e KIM, 2014).

A matéria-prima para a produção do E2G é oriunda das práticas agroindustriais, seu desenvolvimento independe de maiores áreas de plantio, evitando a concorrência com o cultivo de alimentos, além de evitar o desmatamento de mais

florestas nativas a fim de se expandir as áreas cultiváveis. Este biocombustível a partir de biomassa lignocelulósica amplia as rotas de conversão, aumentando a segurança energética do país. Também, o coloca em posição de destaque na produção de combustíveis renováveis e bem desenvolvidos em relação às tecnologias aplicadas (NYKO et al., 2010).

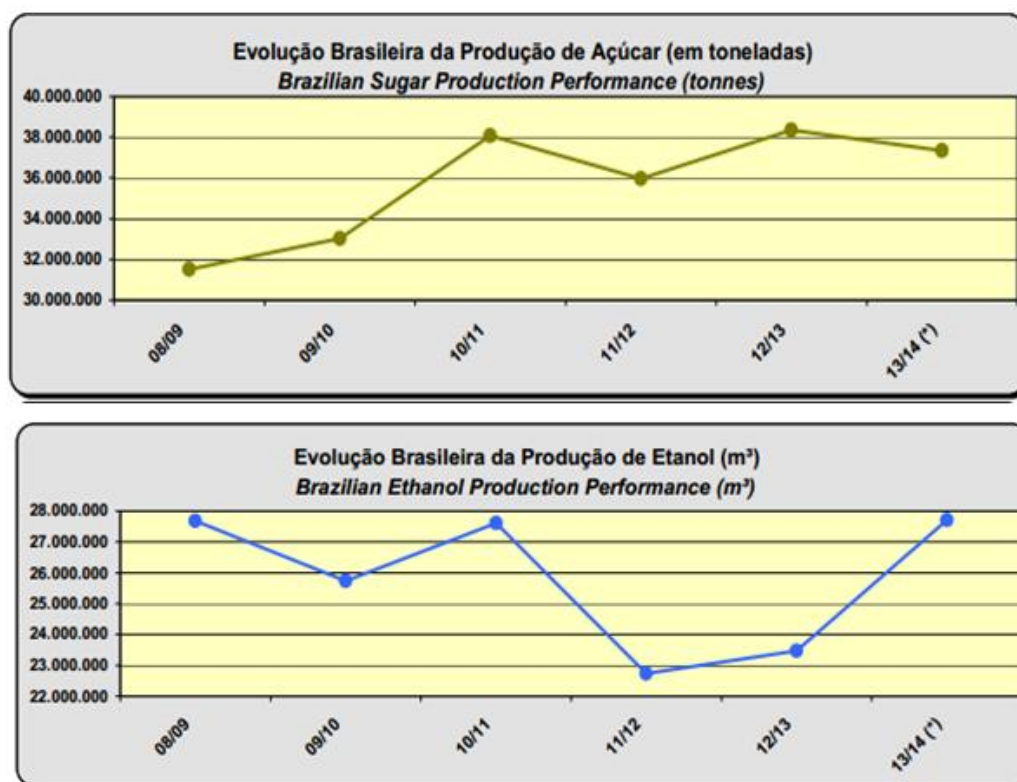


Figura 2.17 – Evolução brasileira da produção de açúcar em toneladas/safra-ano e produção de etanol em m³/safra-ano (MAPA, 2014).

No Brasil, as primeiras plantas destinadas à produção deste tipo de biocombustível já estão sendo preparadas e iniciarão suas operações no segundo semestre de 2014 são a Raizen - Costa Pinto, instalada em Piracicaba/SP com R\$ 230 milhões em investimentos, e a Granbio - Carlos Lyra, em São Miguel dos Campos/AL (Grupo Granbio), com capacidade produtiva de 82 milhões de litros de etanol/ano, investindo R\$ 4 bilhões até 2020, de acordo com informações da ÚNICA (União da Indústria de Cana-de-açúcar).

As tecnologias ainda estão em desenvolvimento e inúmeros avanços são necessários a fim de se aumentar a produção de etanol. Os investimentos em pesquisas como métodos de pré-tratamentos, infraestrutura, natureza da matéria-prima, processos

de produção, e otimização do processo devem ainda ser realizados para reduzir os custos de produção do etanol, tornando este processo mais eficiente economicamente e energeticamente (LADISLAO, GOMEZ, 2008; GOMES et al., 2012). As pesquisas têm como objetivo diminuir os desafios da produção de bioetanol e estão concentradas em duas grandes áreas: pré-tratamento e hidrólise e fermentação do hidrolisado (AGEITEC, 2014).

No trabalho desenvolvido por Woiciechowski et al. (2002), a hidrólise enzimática apresentou um custo de operação 72 vezes superior à hidrólise ácida, devido aos custos das enzimas e dos diferentes insumos químicos necessários. Entretanto, de acordo com a empresa *Novozymes*, o desenvolvimento das técnicas de obtenção e o aperfeiçoamento da ação enzimática ao longo dos últimos anos foi capaz de reduzir o consumo de enzimas pela metade, alcançando o valor de U\$0,50/gal de etanol no ano de 2010, como apresentado na Figura 2.18.

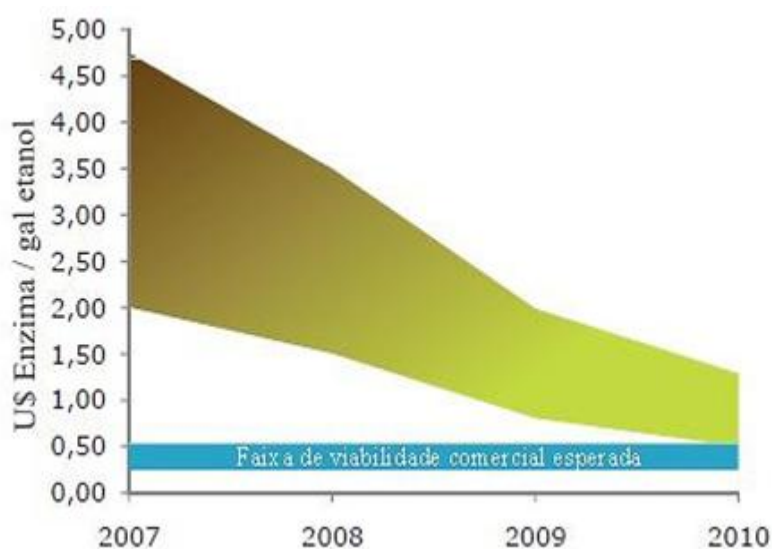


Figura 2.18 – Desenvolvimento do custo das enzimas aplicadas ao processo hidrolítico (adaptado de NOVOZYMES, 2010).

Neste contexto, pode-se ter uma ideia do quanto às pesquisas na área de produção de enzimas ainda são de suma relevância e do longo caminho ainda a percorrer em busca de energia renovável, sustentável e com preço competitivo, que atenda as exigências do mundo contemporâneo.

2.6. Inteligência artificial e métodos heurísticos de busca de soluções

2.6.1. Inteligência Artificial

A inteligência artificial (IA) é a ciência da engenharia do desenvolvimento de máquinas e programas computacionais inteligentes que utilizam métodos não-algorítmicos e simbólicos de solução que se dividem em três grandes tecnologias principais: sistemas especialistas, redes neurais e sistemas de lógica Fuzzy (BAUGHMAN e LIU, 1995).

O nome inteligência artificial foi criado em 1959 para se referir ao uso do conhecimento da inteligência humana e animal, mas este não se restringe a métodos do conhecimento de formas biológicas de vida, pois também utiliza métodos que não são necessariamente observadas em seres vivos e métodos que utilizam uma quantidade de conhecimento superior e que um ser humano pode realizar.

No Quadro 2.3 são apresentados os principais marcos históricos da inteligência artificial.

Quadro 2.3 – Principais marcos históricos da inteligência artificial (IA).

Data	Fato
1937	Alan Turing apresentou seus estudos sobre máquinas inteligentes.
1945	Inteligência artificial emerge como área de conhecimento com a cibernética (NOBERT WINER).
1949	Donald Hebb descreve a regra de aprendizagem biológica dos neurônios ainda hoje utilizadas como forma de aprendizagem nas RNAs.
1950	Alan Turing apresentou a discussão sobre critérios de consideração para máquinas e sistemas inteligentes.
1954	Foi criada a primeira rede neuronal (BELMOND FARLEY e WERLEY CLARK).
1955	John Maccarthy cria o nome inteligência artificial.
1965	Criação do primeiro sistema especialista (DENDRAL WILLIAN C. WHITE).

Um sistema de IA deve ser capaz de fazer três funções: (1) armazenar conhecimento, (2) aplicar o conhecimento armazenado para resolver problemas e (3) adquirir novo conhecimento através da experiência. Um sistema de IA possui três componentes fundamentais: representação, raciocínio e aprendizagem (SAGE, 1990 *apud* HAYKIN, 2001), como representado na Figura 2.19 (HAYKIN, 2001).

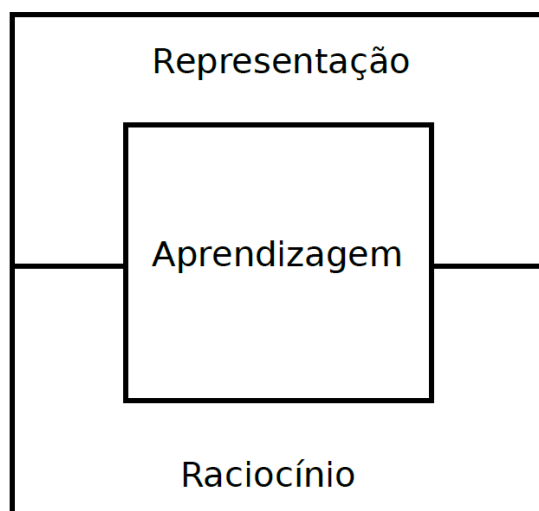


Figura 2.19 – Ilustração dos três componentes principais de um sistema de IA (adaptado de HAYKIN, 2001).

Representação: Provavelmente, a característica mais distinta da IA seja o uso difundido de uma linguagem de estruturas simbólicas para representar tanto o conhecimento genérico sobre um domínio do problema de interesse como o conhecimento específico sobre a solução do problema. Os símbolos são normalmente formulados em termos familiares, o que o torna as representações simbólicas da IA relativamente fáceis de serem entendidas por um usuário humano. De fato, a clareza da IA simbólica a torna bastante adequada para a comunicação homem-máquina (HAYKIN, 2001).

“Conhecimento”, como utilizado pelos pesquisadores de AI, é apenas mais um termo para dados. Ele pode ser do tipo declarativo ou procedimental. Em uma representação declarativa, o conhecimento é representado como uma coleção estática de fatos, com um pequeno conjunto de procedimentos gerais utilizados para manipular os fatos. Uma característica particular das representações declarativas é que elas parecem possuir um significado próprio, do ponto de visto usuário humano, independentemente do seu uso dentro do sistema IA. Em uma representação procedimental, por outro lado, o conhecimento está incorporado em um código executável que representa o significado do conhecimento. Ambas as formas de conhecimento, declarativo e procedimental, são necessários na maioria dos domínios de problemas de interesse (HAYKIN, 2001).

Raciocínio: Na sua forma mais básica, raciocínio é a habilidade de resolver problemas para um sistema ser qualificado como um sistema de raciocínio, ele deve satisfazer certas condições (FISCHLER e FIRSCHEIN, 1987 *apud* HAYKIN, 2001):

- O sistema deve ser capaz de expressar e resolver uma vasta gama de problemas.
- O sistema deve ser capaz de tornar conhecidas para ele tanto a informação explícita como a informação implícita.
- O sistema deve ter um mecanismo de controle que determine quais as operações devem ser aplicadas para um problema particular, quando uma solução para este problema foi obtida, ou quando deve ser encerrado o tratamento deste problema.

A resolução de problemas pode ser vista como um problema de busca. Uma maneira comum de lidar com a “busca” é utilizar regras, dados e controle (NILSSON, 1980 *apud* HAYKIN, 2001). As regras operam sobre os dados, e o controle opera sobre as regras. Em muitas situações encontradas na prática, o conhecimento disponível é incompleto ou inexato. Em tais situações, são utilizados procedimentos de raciocínio probabilístico, permitindo deste modo que sistemas de IA lidem com incertezas (RUSSELL e NORVIG, 1995; PEARL, 1988 *apud* HAYKIN, 2001).

Aprendizagem: No modelo simples de aprendizagem máquina o ambiente fornece alguma informação para um elemento de aprendizagem. O elemento de aprendizagem utiliza, então, esta informação para aperfeiçoar a base de conhecimento, e finalmente o elemento de desempenho utiliza a base de conhecimento para executar a sua tarefa. Normalmente, a informação que o ambiente fornece a máquina é imperfeita, resultando que o elemento de desempenho não sabe previamente como preencher os detalhes ausentes ou ignorar os detalhes que não são importantes. Portanto, a máquina opera inicialmente por suposição e depois recebe realimentação do elemento de desempenho. O mecanismo de realimentação permite que a máquina avalie suas hipóteses e as revise, se necessário (HAYKIN, 2001).

2.6.2. Redes neurais artificiais (RNAs)

Rede neuronal é uma máquina que é projetada para modelar a maneira como o cérebro realiza uma tarefa particular ou função de interesse; a rede é normalmente implementada utilizando-se de componentes eletrônicos ou é simulada por programação em um computador digital. Para alcançar bom desempenho, as redes neurais empregam uma interligação maciça de células computacionais simples denominadas “neurônios” ou ‘unidades de processamento’. Pode-se então, oferecer a seguinte definição de uma rede neuronal vista como uma máquina adaptativa (HAYKIN, 2001):

Uma rede neuronal é um processador maciçamente paralelamente distribuído constituído de unidades de processamento simples, que têm a propensão natural para armazenar conhecimento experimental e torná-lo disponível para uso. Ele se assemelha ao cérebro em dois aspectos:

1. O conhecimento é adquirido pela rede a partir de seu ambiente através de um processo de aprendizagem.
2. Forças de conexão entre neurônios, conhecidas como pesos sinápticos, são utilizadas para armazenar o conhecimento adquirido.

O procedimento utilizado para realizar o processo de aprendizagem é chamado de algoritmo de aprendizagem, cuja função é modificar os pesos sinápticos da rede de uma forma ordenada para alcançar um objetivo de projeto desejado.

Os pesos são associados a diferentes funções de transferência, a exemplo da tangente hiperbólica (*tansing*) (Equação 2.1 e Figura 2.20), funções sigmoid (*sig*) (Equação 2.2 e Figura 2.21), gaussiana (*sine*) (Equação 2.3 e Figura 2.22) e *lnea* (*purelin*). Uma ilustração da Rede neuronal artificial pode ser observada na Figura 2.23.

$$f(x) = \tanh(x) = \frac{e^x - e^{-x}}{e^x + e^{-x}} \quad (2.1)$$

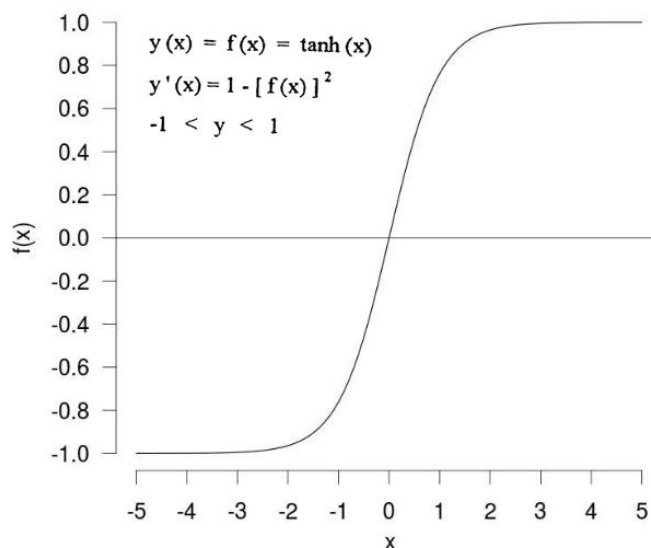


Figura 2.20 – Função de transferência tangente hiperbólica (BAUGHMAN e LIU, 1995).

$$f(x) = \frac{1}{1 + e^{-x}} \quad (2.2)$$

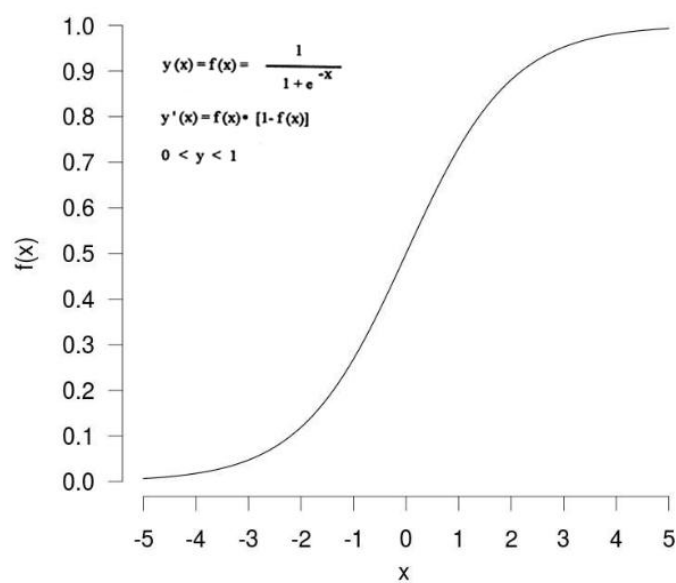


Figura 2.21 – Função sigmoid (S-shaped function) (BAUGHMAN e LIU, 1995).

$$f(x) = \exp\left[-\frac{x^2}{2}\right] \quad (2.3)$$

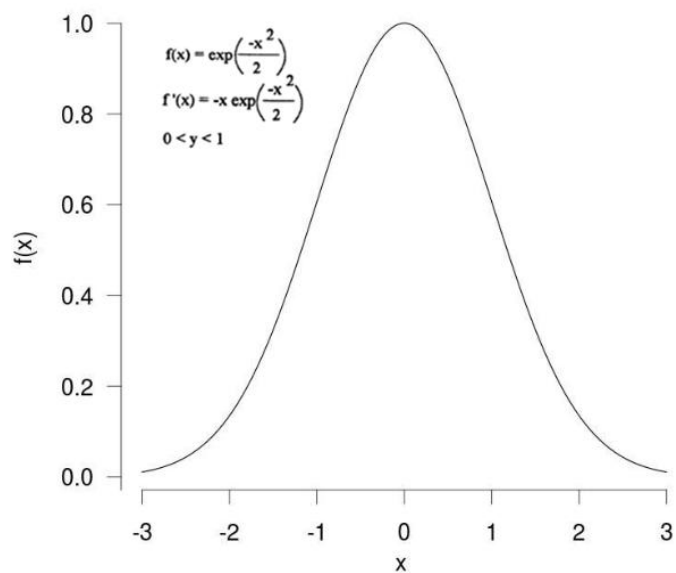


Figura 2.22 – Função de transferência Gaussiana (BAUGHMAN e LIU, 1995).

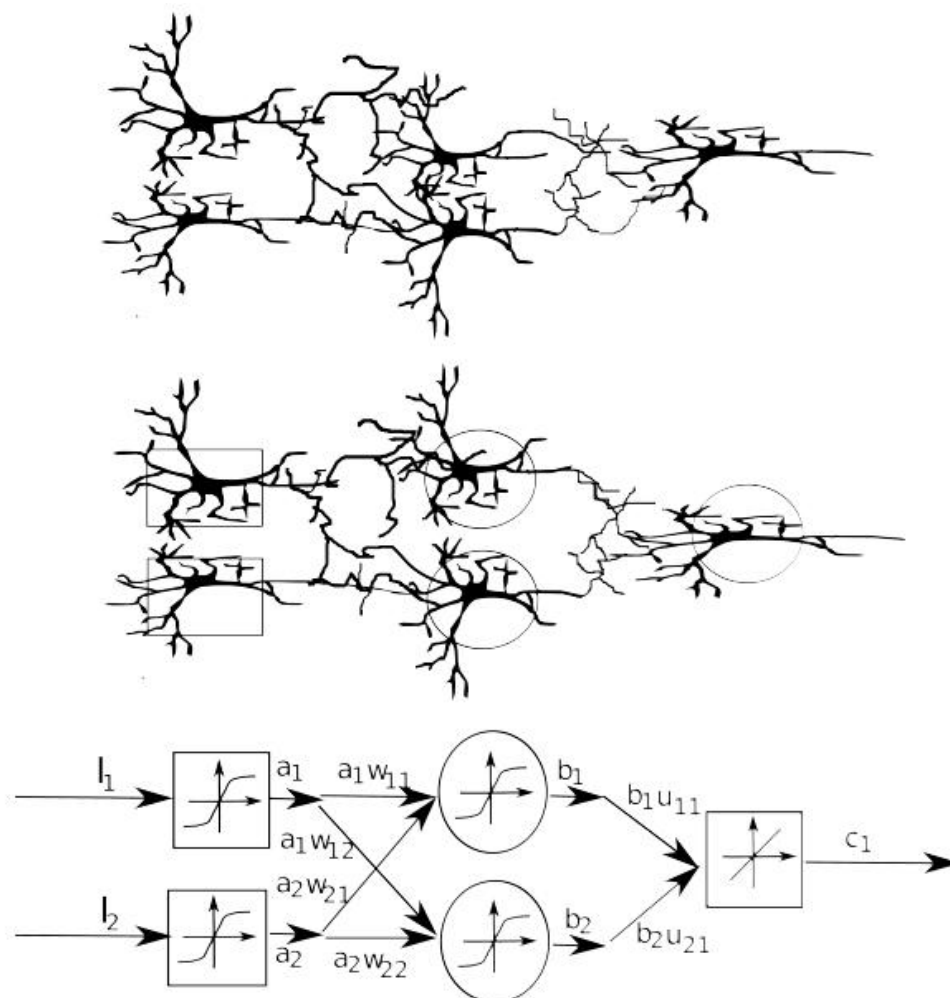


Figura 2.23 – Rede neuronal artificial (RNA).

2.6.2.1. Métodos heurísticos de otimização associadas às redes neurais

Uma vez que uma rede neuronal artificial esteja validade torna-se necessária associar a esta rede, métodos capazes de buscar respostas de interesse, que são obtidas a partir RNAs. Sendo que entre respostas de interesse em engenharia bioquímica, constam conhecer condições operacionais (pH, temperatura do processo, concentração de enzima, inóculo e substrato), assim como o tempo do processo associado a otimização de resposta. Entre as diversas possíveis respostas de interesse se destacam o máximo de produtividade, maior concentração de produto, menor custo operacional, menor concentração de impurezas e maior conversão de substrato.

A resposta de interesse constitui uma função objetivo que precisa ser minimizada ou maximizada segundo um método de otimização como os métodos que

utilizam derivadas (exemplo dos métodos de Newton, Quasi-Newton, Gauss-Newton, Levenberg-Marquardt), métodos de buscas diretas que utilizam derivadas (exemplo dos métodos SIMPLEX e Hooke Jeeves) e métodos heurísticos (exemplo dos métodos de Monte Carlo, Algoritmo Genético, enxame de partículas – PSO, colônia de formigas – ACO).

Os métodos heurísticos são em especial úteis em problemas fortemente não-lineares, problemas que são conhecidas boas estimativas iniciais para solução e para problemas que não possuem uma solução bem estabelecida (PUCHKIN, 1969; SCHAWAAB e PINTO, 2007). Nestes métodos, pode-se utilizar algumas forma de conhecimento com aprendizado automático para eventos e buscas com finalidade de melhorar as estimativas e reduzir o tempo de respostas.

Os métodos PSO e ACO utilizam-se destas estratégias, pois estes se baseiam na eficiência com que colônias de formigas (ACO), pássaros ou peixes (PSO) otimizam a busca de alimentos, ou seja, utilizam uma forma de conhecimento ou aprendizado na buscas de respostas.

O primeiro algoritmo baseado no comportamento de colônia de formigas (*Ant System*) foi desenvolvido por Marco Dorigo, na década de 1990 e deu origem a outros algoritmos que foram denominados de ACO (*Ant Colony Optimization*). O algoritmo ACO resume-se em: construção das soluções com as formigas, atualização dos feromônios, ações *daemon*, fim das atividades e fim do procedimento (DORIGO e STÜTZLE, 2004).

No método ACO é utilizado certo número de formigas (N_{formigas}), e cada formiga percorre uma camada imaginária, que corresponde aos valores das variáveis capazes de fornecer valor resposta de interesse em condição otimizada, como mostra a Figura 2.24 na qual a formiga hipotética percorre a camada $X_1 = X_1^{\text{opt}}$, $X_2 = X_2^{\text{opt}}$, $X_3 = X_3^{\text{opt}}$, $X_4 = X_4^{\text{opt}}$ e $X_5 = X_5^{\text{opt}}$, na qual X_1^{opt} , X_2^{opt} , X_3^{opt} , X_4^{opt} e X_5^{opt} são valores de P_1 , P_2 , P_3 , P_4 e P_5 , que otimizam a resposta de interesse.

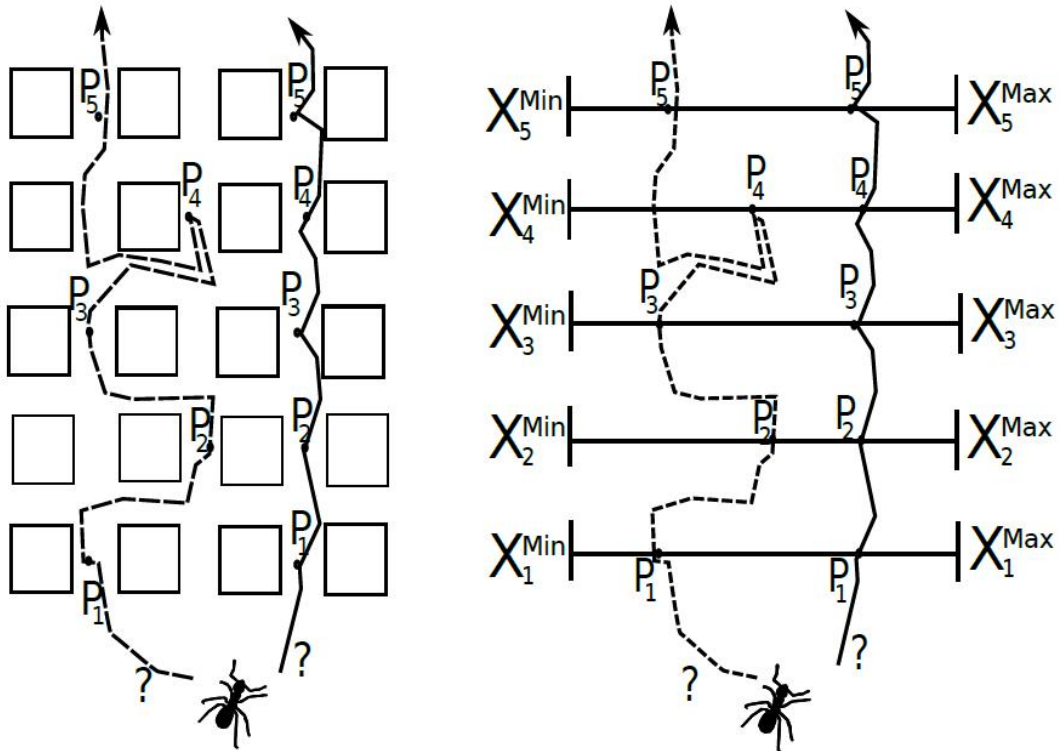


Figura 2.24 – Representação do caminho percorrido pela formiga que fornece $X_1 = P_1$, $X_2 = P_2$, $X_3 = P_3$, $X_4 = P_4$ e $X_5 = P_5$, na qual X_i ($i=1,2,3,4,5$) representa as variáveis que influenciam nas respostas.

No método heurístico ACO é feita a consideração da estigmergia, que representa a autorganização da colônia de formigas, caracterizado pela comunicação entre as formigas que modifica o ambiente por uma trilha de feromônios que é reforçado ou evapora e influi na escolha dos valores das variáveis que influem na resposta de interesse segundo uma função probabilística (p_{ij}) que é associada à atração relacionada ao feromônio (τ_i) e visibilidade do objeto (η_i) (Equação 2.4 e 2.5).

$$p_{ij} = \frac{\tau_i^\alpha \eta_i^\beta}{\sum_{k=1}^N \tau_k^\alpha \eta_k^\beta} \quad (2.4)$$

$$\tau_i^{k+1} = (1 - \rho) \tau_i^k + \Delta \tau_i^k \quad (2.5)$$

Com $0 \leq \rho \leq 1$ representando a taxa de evaporação do feromônio, e quanto maior o valor deste, mais rápido será a adaptação das formigas, e p_{ij} representa a probabilidade da formiga trocar o caminho anterior (j) pelo novo caminho (i), e é um

valor que deve ser comparado a cada busca com a busca anterior para escolha ou não de um novo caminho. Na Equação 2.4, α e β referem-se ao balanço de feromônios e visibilidade do objetivo sendo que a visibilidade pode ser representada com $\eta = Q/F^{OBJ}$.

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais, os microrganismos e as biomassas utilizados no desenvolvimento experimental deste trabalho, bem como a metodologia empregada para cada etapa. As etapas do trabalho estão ilustradas na Figura 3.1 apresentada a seguir:

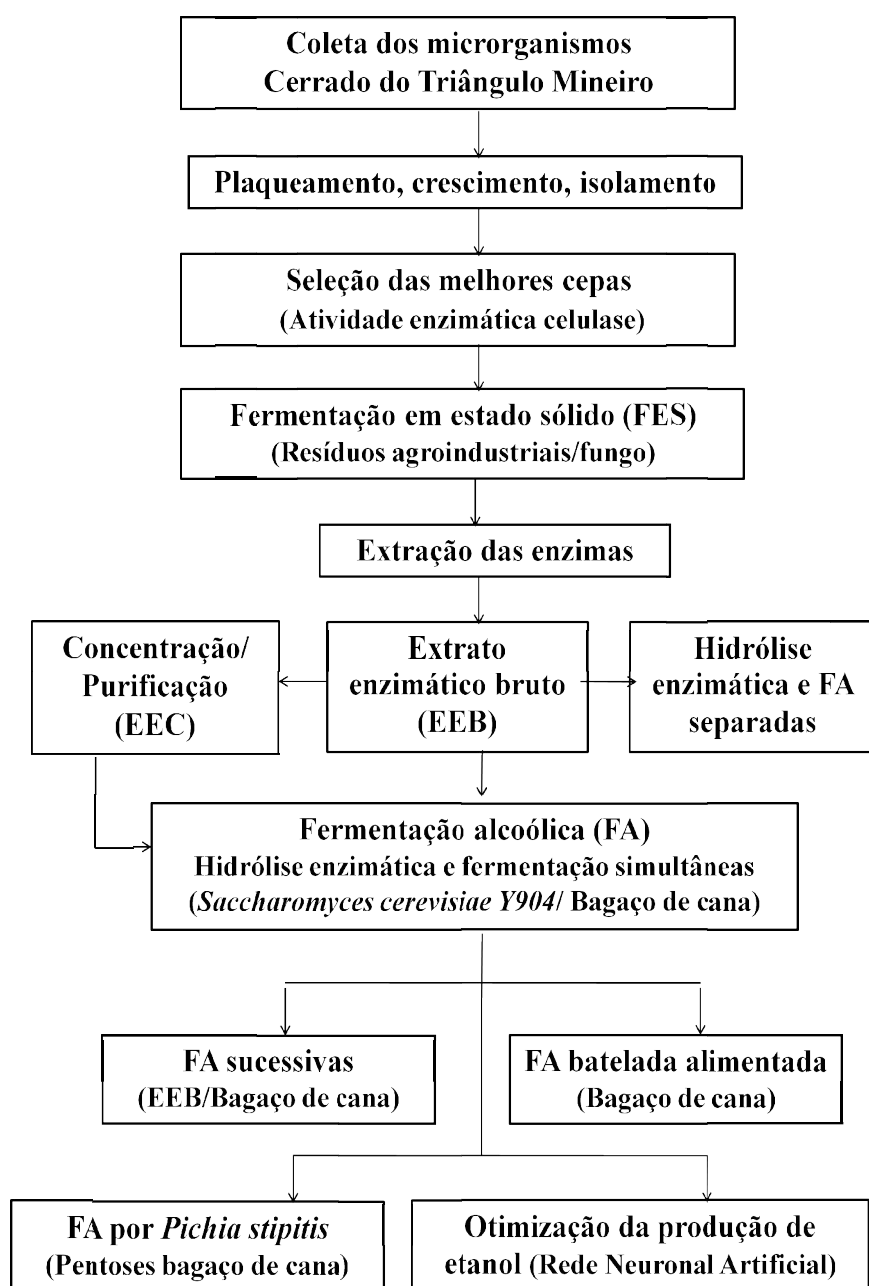


Figura 3.1 – Fluxograma ilustrativo das etapas de trabalho.

3.1. Microrganismos

As coletas das cepas utilizadas neste trabalho iniciaram-se em novembro de 2010 (período chuvoso), em alguns locais do município da cidade de Uberlândia e da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba: na Fazenda do Glória, pertencente à Universidade Federal de Uberlândia (UFU); em fazendas dos municípios de Estrela do Sul/MG, Patos de Minas/MG e Monte Carmelo/MG pertencente à UFU.

Foram coletadas 105 amostras de frutos e fragmentos de cascas de material proveniente do ecossistema do Cerrado, colocados em sacos plásticos esterilizados e imediatamente transportados para o laboratório de Engenharia Bioquímica (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química/UFU.

Fragmentos do microrganismo presente no material coletado foram inoculados em placas de Petri contendo meio *Czapek* (Tabela 3.1) previamente esterilizados. Este meio é indicado para crescimento e isolamento de fungos. Após inoculação, as placas foram incubadas em estufa ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) por cinco dias para o crescimento.

Utilizou-se também, com a finalidade de servir como referencial de comparação, as cepas notadamente produtoras de celulase, *Aspergillus niger* ATCC 16404 e *Trichoderma reesei* CCT 2768 adquiridas da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello (Campinas, SP-Brasil). Estas cepas foram utilizadas apenas para o teste inicial de atividade enzimática (celulase) em presença de celulose como única fonte de carbono.

Todas as linhagens coletadas foram preservadas de acordo com duas metodologias distintas: por repique contínuo e por glicerol 10%, adaptada de Deshmukh (2003).

Para a preservação por repique contínuo, as linhagens coletadas no Cerrado foram repicadas em placas de Petri contendo meio de cultura agarizado; *Czapek* para os fungos coletados e meio Batata Glicose Agar (*PDA*) para as cepas adquiridas comercialmente. A composição dos meios *Czapek* e *PDA* está descrita na Tabela 3.1 (DSMZ, 2010). As preservações foram feitas em duplicata, conservadas sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) e renovadas por cultivo a cada 20 dias.

Para a preservação em glicerol 10%, as cepas foram repicadas em placas de Petri contendo meio agarizado. Após o crescimento do microrganismo foram cortados, com o auxílio de uma seringa plástica, três círculos superficiais de Agar contendo o microrganismo. Tais círculos foram imersos em um tubo de ensaio etiquetado contendo

glicerol 10%, previamente esterilizado. As preservações foram feitas em duplicata, conservadas sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) e renovadas por cultivo a cada seis meses.

Tabela 3.1 – Composição dos meios *PDA* e *Czapek*

<i>PDA</i> (g/L)		<i>Czapek</i> (g/L)	
Infusão de batatas	200,0	NaNO ₃	2,0
Glicose	20,0	K ₂ HPO ₄	1,0
Agar	15,0	MgSO ₄	0,5
		KCl	0,5
		FeSO ₄	0,01
		Glicose	20,0
		Agar	20,0

Os fungos que cresceram no laboratório foram numerados, para facilitar o estudo, por lotes de oito fungos. Esta sequência, bem como o local de origem e as características dos microrganismos, estão descritas no Quadro 3.1.

Quadro 3.1 – Fungos, local de origem e descrição do fungo no momento da coleta

Fungo	Local de origem	Descrição no momento da coleta*
A1	Coletado em fruta manga coquinho, Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Verde, filamentoso, tipo mofo
A2	Coletado em fruta manga caturra, Campus de Patos de Minas UFU/MG	Branco, filamentoso, tipo pasta
A3	Coletado em fruto pequi, Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Verde, filamentoso, tipo mofo
A4	Coletado em pimenta dedo de moça, Campus de Patos de Minas UFU/MG	Preto acinzentado, filamentoso, tipo mofo
A5	Coletado em fruto maracujá, Fazenda no município de Patos de Minas/MG	Verde acinzentado, filamentoso, tipo mofo
A6	Coletado em fruta pitanga, Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Verde, filamentoso, tipo mofo
A7	Coletado em fruto acerola, Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Verde, filamentoso, tipo mofo
A8	Coletado em coco, Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Preto esverdeado, filamentoso, tipo mofo
B1	Coletado em banana-da-terra, Campus da cidade de Uberaba/MG	Verde, filamentoso, tipo mofo
B2	Retirado de madeira branca, Fazenda do	Verde, filamentoso, tipo mofo

	Glória Uberlândia/MG	
B3	Retirado de madeira amarela, Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Verde, filamentosos, tipo mofo
B4	Árvore do Cerrado, Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Verde, não filamentosos
B5	Árvore do Cerrado/ Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Amarelo claro, orelha de pau
B6	Coletado em ramo no chão, Campus da cidade de Uberlândia/MG	Cogumelo branco
B7	Coletado em caule no chão, Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Marrom, orelha de pau
B8	Coletado em ramo no chão, Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Vermelho terra, orelha de pau
C1	Coletado em fruta laranja, Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Verde, filamentosos, tipo mofo
C2	Coletado em aroeira, Fazenda no município de Patos de Minas/MG	Verde água, não filamentosos
C3	Coletado em abóbora cabotiá, Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Verde, filamentosos, tipo mofo
C4	Coletado em caule no chão, Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Preto, filamentosos, tipo mofo preto
C5	Coletado em caule no chão Fazenda do Glória Uberlândia/MG	Preto, filamentosos, tipo mofo preto
C6	Coletado em manga, Campus da cidade de Uberlândia/MG	Preto, filamentosos, tipo mofo
C7	Coletado no caule de Ipê, Fazenda no município de Estrela do Sul/MG	Verde água, não filamentosos
C8	Coletado em caule podre (jatobá), Fazenda Estrela do Sul/MG	Verde escuro, filamentosos, tipo mofo
D1	Coletado em mangueira, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Preto, não filamentosos
D2	Coletado em sucupira, Fazenda no município de Monte Carmelo /MG	Verde acinzentado, não filamentosos
D3	Coletado em mangueira, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Branco, não filamentosos
D4	Coletado em angico-do-Cerrado (tronco no chão), Fazenda no município de Monte Carmelo/MG	Branco, filamentosos
D5	Coletado em caule no chão (abacateiro), Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Amarelo, filamentosos
D6	Coletado em caule no chão (mangueira), Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Vermelho, orelha de pau
D7	Coletado em angico branco, Fazenda no município de Monte Carmelo MG	Branco, não filamentosos
D8	Coletado em caule no chão em (jenipapeiro),	Marrom claro, não filamentosos

	Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia-MG	
E1	Coletado em abacateiro, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Branco com laranja, não filamentoso
E2	Coletado em ramo podre (mangueira), Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Laranja clarinho, não filamentoso
E3	Coletado em goiabeira, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Branco, não filamentoso
E4	Coletado em caule podre (mangueira), Fazenda Estrela do Sul/MG.	Laranja clarinho, não filamentoso
E5	Coletado em sucupira, Fazenda no município de Monte Carmelo/MG	Branco, não filamentoso
E6	Coletado ramo podre de pequiheiro. Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Amarelo, não filamentoso
E7	Coletado em fruto amescla, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Branco, não filamentoso
E8	Coletado em caule no chão (Ipê), Fazenda Estrela do Sul/MG	Amarelo, filamentoso
F1	Coletado caule podre de jatobá, Fazenda no município de Estrela do Sul/MG	Branco amarelado, não filamentoso
F2	Coletado no caule de eucalipto, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Verde água, não filamentoso, tipo pó esbranquiçado
F3	Chão da mata, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia-MG	Cogumelo cinza
F4	Coletado em fruto jabuticaba/Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Verde, não filamentoso
F5	Coletado fruto jaca, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Cinza, filamentoso, tipo mofo
F6	Coletado em fruta banana caturra, Campus da cidade de Patos/MG	Preto, filamentoso
F7	Coletado em folha da jenipapeira, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Branco, não filamentoso
F8	Coletado em fruto jenipapo, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Cinza, não filamentoso
G1	Coletado em folhas árvore jenipapeiro, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Cinza alaranjado, não filamentoso, tipo ferrugem
G2	Coletado em fruto manga espada, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Preto, não filamentoso
G3	Coletado em Mama-cadela, Fazenda no município de Irai de Minas/MG	Marrom, não filamentoso
G4	Coletado em braquiária / Fazenda no município de Irai de Minas/MG	Branco, filamentoso, tipo mofo
G5	Coletado em folhas de goiabeira, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Cinza alaranjado, não filamentoso, tipo ferrugem

G6	Coletado em sementes de eucalipto, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Cinza, não filamentoso
G7	Coletado em folhas de mangueira, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Cinza alaranjado, não filamentoso, tipo ferrugem
G8	Coletado em fruto pitanga, Fazenda Estrela do Sul/MG	Preto, filamentoso, tipo mofo preto
H1	Coletado em fruta jaboticaba, Fazenda em Estrela do Sul/MG	Preto, filamentoso, tipo mofo preto
H2	Coletado em fruta amora, Fazenda Estrela do Sul/MG	Verde, filamentoso, tipo mofo
H3	Coletado em jiló, Fazenda em Estrela do Sul/MG	Preto, filamentoso, tipo mofo preto
H4	Coletado em fruto figo, Fazenda em Estrela do Sul/MG	Verde, filamentoso, tipo mofo
H5	Coletado em fruto jaca, Fazenda em Estrela do Sul/MG	Preto, filamentoso, tipo mofo preto
H6	Coletado em fruto guariroba, em Estrela do Sul/MG	Verde, filamentoso, tipo mofo
H7	Coletado em folhas de mangueira, Campus da cidade de Monte Carmelo/MG	Preto, filamentoso, tipo mofo preto
H8	Coletado em fruto araticum, Fazenda Estrela do Sul/MG	Verde, filamentoso, tipo mofo
I1	Coletado árvore Cerrado, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia-MG	Verde, filamentoso
I2	Coletado galhos, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia-MG	Verde, filamentoso
I3	Coletado árvore Cerrado, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia-MG	Verde, filamentoso
I4	Coletado galhos, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia-MG	Preto, filamentoso
I5	Coletado caule de árvore, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia-MG	Preto, filamentoso
I6	Coletado em Ipê em Fazenda no município de Patos de Minas/MG	Preto, filamentoso
I7	Coletado mangueira, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia-MG.	Preto, filamentoso

A levedura utilizada para as fermentações alcoólicas foi à cepa *Saccharomyces cerevisiae* Y904 produzida pela Mauri Brasil Ind. Com. Ltda, na forma liofilizada. Esta levedura foi estocada sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) em embalagem fechada. Esta levedura é comercializada e utilizada no Brasil em plantas industriais de fermentação alcoólica. Para os testes de fermentação das pentoses foi utilizada *Pichia stipitis* (ATCC 58376) mantida em meio de composição (g/L): 10,0 xilose, 5,0 arabinose, 5,0 glicose, 1,0

(NH₄)₂SO₄, 1,0 MgSO₄.7H₂O, 3,0 extrato de levedura, 15 Agar, com repique a cada 20 dias.

3.2. Biomassas

As biomassas utilizadas foram: farelo de arroz, adquirido de beneficiadora da região (Uberlândia/MG); soro de queijo em pó reconstituído na concentração de lactose de $36 \pm 1,5$ g/L, gentilmente cedido pela empresa Cargill, Uberlândia/MG; bagaço de cana-de-açúcar não tratado termicamente (BNT); bagaço de cana tratado a explosão a vapor, com diferentes condições de severidade (JOLLEZ et al., 1993): baixa severidade (12 kgf/cm^2 e tempo de 8 minutos) (BBS) e alta severidade (19 kgf/cm^2 e tempo de 4 minutos) (BAS), gentilmente cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba/SP.

As biomassas foram armazenadas em sacos plásticos fechados sob refrigeração (5 ± 1 °C). Nas Figuras 3.2 e 3.3 estão apresentadas as biomassas. Os procedimentos de caracterização dos bagaços de cana estão descritos no item 3.3.17.



Figura 3.2 – Imagem ilustrativa do bagaço de cana-de-açúcar não tratado termicamente-BNT; bagaço de cana tratado a explosão a vapor à baixa severidade-BBS e bagaço de cana tratado a explosão a vapor à alta severidade (BAS).



Figura 3.3 – Imagem ilustrativa do farelo do beneficiamento de arroz e do soro de queijo.

3.3. Metodologia experimental

3.3.1. Seleção dos microrganismos por avaliação do índice enzimático

A seleção dos fungos coletados no Cerrado do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, inicialmente foi realizada pela atividade enzimática (celulase) de degradação da celulose em meio Agar, com celulose como única fonte de carbono, fundamentada na metodologia descrita por Teather e Wood (1982) e Herculano et al., (2011). Neste estudo, foram utilizadas como referência de produção de celulase, as cepas comerciais, *Aspergillus niger* ATCC 16404 (I8) e *Trichoderma reesei* CCT 2768 (I9).

Para os ensaios foi utilizado meio Agar-carboximetilcelulose, com a seguinte composição em (g/L): 0,5 MgSO_4 ; 0,5 KCl ; 3,0 NaNO_3 ; 0,01 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 KH_2PO_4 ; 15,0 Agar; 10,0 carboximetilcelulose. Foram inoculados, com auxílio de uma micropipeta, 10 μL de solução do fungo em estudo, no centro da placa de Petri contendo o meio Agar-carboximetilcelulose (Figura 3.4).

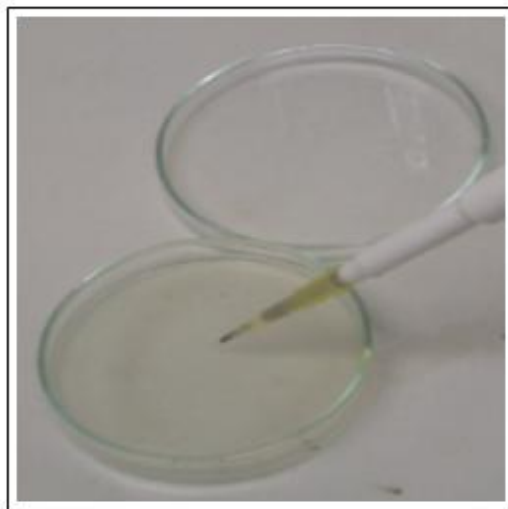


Figura 3.4 – Inoculação do fungo em estudo em meio contendo celulose como única fonte de carbono.

As placas, em triplicata, foram incubadas por dois dias a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Depois desse período, foi vertido sobre as placas 10 mL de solução corante de vermelho congo (1 g/L). Após 15 minutos em repouso a solução foi descartada. Em seguida, as culturas foram lavadas com solução de NaCl 2M e deixadas em repouso com esta solução por mais 15 minutos. A presença de zonas claras ao redor das culturas é indicadora da atividade de celulase, além da magnitude desta. Os diâmetros das colônias e dos halos de hidrólise produzidos foram medidos com paquímetro durante os dois dias. As atividades celulares foram avaliadas em termos de índice enzimático, calculado pela relação entre o diâmetro do halo gerado, mm, (ϕ_h) ao revelar o fungo com vermelho de congo e o diâmetro da colônia, mm, (ϕ_c).

Os fungos mais promissores na produção de celulasas foram identificados pela Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia (Campinas, SP-Brasil) e Laboratório Exame (Uberlândia, MG-Brasil), por testes bioquímicos de taxonomia convencional. Esta metodologia é baseada na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem teste com dados das espécies de referência descritas na literatura (PITT e HOCKING, 1985; SAMSON et al., 1995; BARNETT e HUNTER, 1999; ALVES-PRADO et al., 2010; DSMZ, 2013; MYCOBANK, 2013).

3.3.2. Fermentações

Neste estudo foram realizadas dois tipos de fermentações. A fermentação em estado sólido (FES) para a produção do complexo enzimático bruto (EEB) empregando os fungos e a fermentação alcoólica (FA) para a produção de etanol empregando levedura.

As respostas adotadas para este estudo foram: atividade enzimática em *FPase* (item 3.3.16.1), concentração de açúcares redutores (item 3.3.16.3), concentração de proteína (item 3.3.16.4), concentração celular no meio fermentado da FES e de etanol no meio obtido da FA (item 3.3.16.5) e determinação de açúcares e de etanol (item 3.3.16.2) no meio fermentado da FA. Todos os experimentos e métodos analíticos foram realizados em triplicata.

3.3.2.1. Fermentação em estado sólido (FES) para a produção do complexo enzimático bruto

Inóculo: Para o preparo do inóculo para as FES foi utilizado meio de cultura *Czapek* líquido, conforme composição em (g/L): 2 NaNO₃; 1 K₂HPO₄; 0,5 MgSO₄; 0,5 KCl; 0,01 FeSO₄; 20,0 Glicose, previamente esterilizado em autoclave a 1,0 atm por 20 min. Esporos da linhagem do fungo em estudo, foram inoculados em Erlenmeyer de 250 mL de volume, com tampão de algodão envolto em gaze, contendo 100 mL de *Czapek* líquido. O meio inoculado foi deixado em mesa agitadora a 120 rpm, por 48 h em temperatura ambiente (28 ± 2 °C). As células geradas foram centrifugadas e ressuspensas em água, obtendo uma concentração celular da ordem de 10⁶ esporos/mL. A seguir estas células foram utilizadas nas FES visando à produção de complexo enzimático.

FES: As fermentações para produção de enzimas foram conduzidas em reator estático (frascos cônicos de 500 mL de volume) com 40 g de substrato e 40 g de água com células centrifugadas vindo do inóculo. Os substratos sólidos consistiam de bagaço de cana e farelo de arroz, com composições e tempos de fermentação definidos em cada experimento.

Extração das enzimas: para extração das enzimas foi utilizado 100 mL de soluções de *Tween* 80 1% em água; *Tween* 80 1% em soro de queijo ou *Tween* 80 1% em soro de queijo hidrolisado com ácido ou enzima, estas soluções são definidas e

descritas em cada experimento. Em seguida o meio fermentado foi filtrado e centrifugado a 18.900g por 20 minutos e o EEB foi obtido do sobrenadante.

3.3.2.2. Processo de fermentação alcoólica (FA) com hidrólise simultânea para produção de etanol

Visando avaliar a produção de etanol, as FAs foram realizadas com 100 mL do meio obtido do EEB produzidos por FES, 25 g de substrato sólido e levedura, em reator batelada sobre mesa agitada, com volume total de 250 mL. A FA e a hidrólise enzimática foram simultâneas. As condições adotadas para a FA foram as mesmas das fermentações com caldo de cana-de-açúcar: temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, pH de 4,5, concentração de inóculo (levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904) de 30 g/L. O tempo de fermentação, a composição do substrato (biomassa) utilizado na produção de etanol foram adotados de acordo com cada experimento. O meio de FA foi suplementado com sais com em (g/L): 5,0 fosfato de potássio monobásico, 1,0 sulfato de magnésio, 1,0 cloreto de amônio, 5,0 g cloreto de potássio e 1,0 g /L de extrato de levedura. Para evitar contaminação nas fermentações alcoólicas foi feita adição de antibiótico *Kamoran*® na concentração de 6 ppm. Um esquema do procedimento de fermentações realizado pode ser observado na Figura 3.5, com hidrólise enzimática e fermentação alcoólica simultâneas.

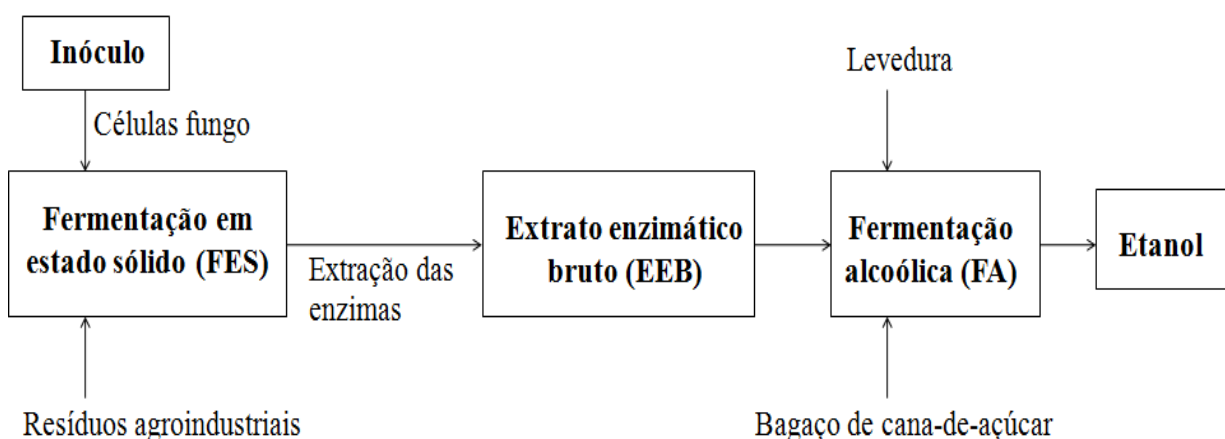


Figura 3.5 – Fluxograma ilustrativo das fermentações realizadas para produção de enzimas e etanol.

3.3.3. Testes de referência para avaliar a produção de etanol

Para avaliar a produção de etanol foram realizados testes de referência para determinar a concentração de etanol proveniente do extrato enzimático e dos substratos sólidos adicionados na fermentação alcoólica. Estes testes foram realizados todas as vezes que o substrato sólido ou as condições das fermentações eram alterados, a fim de subtrair estes valores da concentração final de etanol, assim, neste trabalho, os resultados de etanol representam apenas a ação do extrato enzimático.

3.3.4. Avaliação do tempo e da composição do meio da FES para produção do complexo enzimático bruto

Neste estudo foram realizados testes visando avaliar as biomassas a serem utilizadas como substrato sólido e fonte de carbono e energia para os fungos do Cerrado, na produção dos extratos enzimáticos brutos por FESs e o tempo necessário para tais fermentações. Inicialmente utilizou-se o fungo F2 (*Mucor racemosus Fresenius*), previamente selecionado no teste de degradação de celulose (item 3.3.1), como promissor na produção de celulase, para definir uma condição padrão de FES para os testes de produção de etanol com os demais fungos selecionados.

No estudo dos meios sólidos, as FESs foram conduzidas de acordo com o item 3.3.2.1, com o fungo em estudo e com substratos para FES descritos na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Composição dos meios de FES para produção dos extratos enzimáticos.

Meio produção de enzimas	BBS (%p/p)	Farelo de arroz (%p/p)
MPE1	100	0
MPE2	80	20
MPE3	60	40
MPE4	40	60
MPE5	20	80
MPE6	0	100

BBS: Bagaço de cana tratado a explosão a vapor na condição de baixa severidade (12 kgf/cm² por 8 min).

O tempo de FES foi de 60 horas, as enzimas foram extraídas com 100 mL de solução de *Tween* 80 1% em água deionizada. Para fermentações alcoólicas foram

utilizados como substratos sólidos, bagaço de cana-de-açúcar tratado a explosão a vapor, na condição de baixa severidade (BBS) e tempo de fermentação de 48 h, demais condições descritas no item 3.3.2.2 (FA).

Para avaliar a influência do tempo de FES na qualidade dos extratos enzimáticos, foram realizadas FES para tempos de 24, 36, 48, 72, 84 e 96 h, com fungo em estudo, meio sólido de 40% BBS, 60% farelo de arroz (MPE4). As enzimas foram extraídas com 100 mL de solução de *Tween* 80 1% em água deionizada (item 3.3.2.1). As Fermentações alcoólicas (FAs) foram conduzidas de acordo com condições descritas no item 3.3.2.2, com substrato sólido BBS e tempo de fermentação de 48 h.

3.3.5. Avaliação da composição do substrato na produção de etanol a partir de complexo enzimático obtido da cepa selvagem selecionada

Para a avaliação do substrato sólido na produção de etanol foram realizadas FAs com extrato enzimático bruto produzido por FES, condições descritas no item 3.3.2.1, com fungo em estudo F2 (*Mucor racemosus Fresenius*), meio sólido de 40% BBS, 60% farelo de arroz (MPE4), durante 72 h de fermentação. As enzimas foram extraídas com 100 mL solução de *Tween* 80 1% em água deionizada.

As fermentações alcoólicas (FA) foram conduzidas nas condições descritas no item 3.3.2.2, com tempo de fermentação de 48 h e os substratos sólidos avaliados para produção de etanol, bagaço de cana tratado a explosão a vapor, na condição de baixa severidade, alta severidade e bagaço de cana não tratado termicamente (“in natura”), estão descritos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Composição dos substratos sólidos na fermentação alcoólica na produção de etanol.

Substrato sólido	BBS % (p/p)	BAS % (p/p)	BNT % (p/p)
MFA1	100	0	0
MFA2	98	0	2
MFA3	96	0	4
MFA4	94	0	6
MFA5	50	50	0
MFA6	0	100	0

BBS: bagaço de cana tratado a explosão a vapor na condição de baixa severidade (12 kgf/cm², 8 min.). BAS: bagaço de cana tratado a explosão a vapor na condição de alta severidade (19 kgf/cm², 4 min.); BNT: bagaço de cana não tratado termicamente.

3.3.6. Comparação da produção de etanol a partir de extrato enzimático produzido por diferentes cepas selvagens coletada no Cerrado Triângulo Mineiro.

Neste estudo foi avaliada a capacidade dos extratos enzimáticos brutos (EEB) gerados por fermentação sólida dos diferentes fungos selecionados do Cerrado (mais promissores em produção de celulase) na produção de etanol. Os EEB foram produzidos de acordo com o item 3.3.2.1, com substrato MPE4 (40% BBS, 60% farelo de arroz) e por 72 h de FES. Os fungos avaliados foram de número C7, E3, E6, E8, F2, I1, I2, I3, I4, I5, I6 e I7. As enzimas foram extraídas com 100 mL solução de *Tween* 80 1% em água deionizada.

Para cada fermentação alcoólica foi utilizado 100 mL do EEB, e o substrato para produção de etanol foi o meio MFA3 (96% BBS, 4% BNT). O tempo de fermentação alcoólica foi de 48 h e demais condições descritas no item 3.3.2.2.

3.3.7. Produção de etanol a partir do complexo enzimático produzido pela cepa selvagem selecionada (*M. racemosus Fresenius*) empregando diferentes soluções para extração da enzima

Este estudo teve por objetivo avaliar a influência dos diferentes meios de extração de enzima na produção de extratos enzimáticos e etanol, visando o aproveitamento do soro de queijo, um subproduto das indústrias de laticínios, abundante

localmente e rico em lactose e nutrientes. As FES foram realizadas conforme item 3.3.2.1, com a cepa *M. racemosus Fresenius* (F2) e substrato MPE4 (40% BBS, 60% farelo de arroz) durante 72 h de FES. Os meios para extração das enzimas estão descritos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Os meios para extração das enzimas após FES.

Código	Descrição do meio de extração de enzimas
ST	<i>Tween</i> 80 a 1% em água deionizada.
SW	<i>Tween</i> 80 a 1% em soro de queijo com $36 \pm 1,5$ g/L de lactose.
SWHA	<i>Tween</i> 80 a 1% em soro de queijo hidrolisado com H ₂ SO ₄ (1%) em autoclave a 0,5 atm por 20 min (condições definidas em testes preliminares).
SWHE	<i>Tween</i> 80 a 1% em soro hidrolisado com β -galactosidase (comercial de <i>Aspergillus oryzae</i>) 3 g/L (pH 4,5, $35 \pm 1^\circ\text{C}$ e 2 h) (FREITAS et al., 2011).

Para produção de etanol (conforme item 3.3.2.2) foi utilizado 100 mL do EEB produzido pela FES, extraídos com as diferentes soluções de extração, e o substrato para fermentação alcoólica foi o MFA3 (96% BBS+4% BNT). Os tempos de FA foram 24, 36, 48 e 60 horas, avaliando como resposta a produção de etanol.

3.3.8. Fermentações sucessivas utilizando *Mucor racemosus Fresenius*

Visando aumentar a produção de etanol sem aumentar a quantidade de substrato sólido na fermentação alcoólica, pois a proporção de carga de sólidos e extrato enzimático bruto (EEB) estava no limite para fermentação submersa (25 g de substrato sólido/100 mL de EEB), foram realizadas fermentações sucessivas, ou seja, o meio fermentado de cada fermentação alcoólica era utilizado na extração do complexo enzimático da fermentação em estado sólida (FES) seguinte, e este complexo enzimático era utilizado na fermentação alcoólica seguinte.

As FESs foram realizadas conforme item 3.3.2.1, com inóculo *M. racemosus Fresenius* e substrato MPE4 (40% BBS, 60% farelo de arroz) durante 72 h de fermentação. Os meios para extração das enzimas foram: ST, SW, SWHA (Tabela 3.4).

Para produção de etanol (item 3.3.2.2) foi utilizado 100 mL do extrato enzimático bruto produzido por FES, e o substrato para produção de etanol foi MFA3 (96% BBS, 4% BNT). Foram realizadas cinco fermentações alcoólicas sucessivas,

durante 24 h cada, totalizando 120 h de FA, com adição de substrato sólido (MFA3: 96% BBS, 4% BNT) a cada 24 h e em dois procedimentos, um com reposição de novas enzimas e outro com reuso de enzimas.

Fermentações sucessivas com reposição de enzimas: o primeiro extrato enzimático bruto (extraído com ST, SW, SWHA) e substrato sólido foi fermentado por 24 h, após este tempo, o meio fermentado foi filtrado (para retirar o substrato já fermentado) e utilizado para extrair um novo complexo enzimático, no intuito de obter enzimas novas (ativas), e a este adicionava-se um novo substrato sólido (MFA3: 96% BBS, 4% BNT) e procedia-se a fermentação alcoólica por 24 h. Para manter a mesma relação 25 g de substrato sólido em 100 mL de meio na FA, adicionava-se, caso necessário, mais solução de enzima extraída (nova) de outro reator, conforme procedimento mencionado acima. Com este procedimento para a primeira fermentação alcoólica foi utilizado 10 reatores bateladas e ao término da quinta fermentação havia apenas 3 reatores de FA. Neste procedimento as leveduras foram reutilizadas. Um fluxograma ilustrativo do processo de fermentação alcoólica sucessiva pode ser observado na Figura 3.6.

Fermentações sucessivas sem reposição de enzimas: para comparação, foram realizadas fermentações sucessivas, com primeiro EEB extraído com ST, sem a reposição de enzimas, ou seja, neste caso as fermentações sucessivas foram realizadas com o reuso de enzima e de levedura (sem extrair um novo complexo enzimático), apenas adiciona-se substrato sólida a cada 24 h de FA. Visando manter a relação de 25 g de substrato sólido para 100 mL de meio na FA, o número de reatores na primeira, segunda, terceira, quarta e quinta fermentação foram 7, 6, 5, 4 e 3, respectivamente.

A reposição de levedura foi realizada quando a contagem da mesma foi menor do que 10^8 células/mL. Vale ressaltar que para cada fermentação o pH da FA foi corrigido para 4,5 e o meio não foi reconstituído de sais minerais e nem extrato de levedura, em ambos os procedimentos de fermentações sucessivas.



Foram realizadas fermentações sucessivas, conforme procedimento descrito no item 3.3.8., com extrato enzimático produzido *M. racemosus Fresenius* e outra por extrato enzimático produzido por *A. niger* (I4), visto que esta cepa selvagem se mostrou promissora nos resultados de produção de celulase e etanol (item 3.3.1. e 3.3.6.) O meio sólido foi MPE4 (40% BBS, 60% farelo de arroz) e o tempo de FES foi 72 h. As enzimas foram extraídas com solução de água e *Tween* 80 1% (ST). O meio sólido para

produção de etanol foi de MFA3 (96% BBS), com adição de sais e extrato de levedura apenas na primeira FA, durante 24 h de FA.

3.3.10. Misturas dos complexos enzimáticos produzidos por *M. racemosus Fresenius* e *A. niger*

Com a finalidade de hidrolisar o máximo de açúcares à fermentação alcoólica foi avaliada a utilização de misturas de enzimas produzidas por duas cepas coletadas no Cerrado, as quais se mostraram mais promissoras nos resultados de produção de celulase e etanol, *M. racemosus Fresenius* (F2) e *A. niger* (I4). As FES foram produzidas separadamente, ou seja, uma para cada fungo, ambas de acordo procedimento de produção de enzimas descrito no item 3.3.2.1, com substrato sólido MPE4 (40%BBS, 60% farelo de arroz) por 72 h de FES. As enzimas foram extraídas com 100 mL solução de *Tween* 80 1% em água deionizada. Então, misturadas e utilizadas na produção de etanol, conforme proporções descritas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Misturas de complexos enzimáticos de *M. racemosus Fresenius* e *A. niger*.

(%) Extrato enzimático bruto							
<i>M. racemosus Fresenius</i>	0	25	35	50	65	80	100
<i>A. niger</i>	100	75	65	50	35	20	0

Para produção de etanol foi utilizado 100 mL dessas misturas de EEBs, e o substrato foi MFA3 (96% BBS, 4% BNT) com 24 h de FA. As demais condições descritas no item 3.3.2.2.

3.3.11. Fermentação alcoólica em batelada alimentada

Visando aumentar a concentração de etanol foram realizados testes de batelada alimentada, ou seja, com adição de carga de sólidos (bagaço de cana tratado) durante a fermentação alcoólica. Os extratos enzimáticos brutos foram produzidos de acordo com o item 3.3.2.1, com substrato MPE4, e *Aspergillus niger*, durante 72 h de FES. As enzimas foram extraídas com solução de *Tween* 80 1 % em água deionizada. A FA foi conduzida em reator de 1000,0 mL, e as demais condições estudadas até agora, item

3.3.2.2, concentração de inóculo (*S. cerevisiae* Y904) de 30 g/L, temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, pH de 4,5, 150 rpm. O substrato sólido foi MFA3 (96% BBS, 4% BNT). O reator, contendo 300 mL de EEB e inicialmente 25 g de carga de sólido (MFA3), fermentado por 24 h, então o reator foi alimentado com 25 g de carga de sólido por mais 24 h, totalizando 96 h 75 g de carga de sólidos e 120 FA.

3.3.12. Uso de inteligência artificial na avaliação dos efeitos de temperatura, tempo e quantidades de extrato enzimático, bagaço de cana e inóculo e na produção de etanol

3.3.12.1. Ensaios experimentais

Para avaliar o efeito das variáveis, temperatura, tempo, extrato enzimático, concentração inicial de *Saccharomyces cerevisiae* (inóculo) e bagaço de cana na fermentação de etanol de segunda geração, pelo uso de técnicas de inteligência artificial, foi feita a avaliação de produção de etanol na fermentação em 19 experimentos distintos, com as condições descritas na Tabela 3.6. Nestes ensaios, as concentrações de açúcares e etanol foram determinadas para tempos de 0, 10, 14, 18, 22, 26, 34, 38, 40, 42, 44, 46 e 48 h de fermentação alcoólica.

Os extratos enzimáticos foram produzidos de acordo com o item 3.3.2.1, com substrato MPE4 (40% BBS, 60% farelo de arroz), e *Aspergillus niger*, durante 72 h de FES. As enzimas foram extraídas com solução de *Tween* 80 1 % em água deionizada e este extrato enzimático bruto (EEB) utilizado para as fermentações alcoólicas (FAs) (Tabela 3.6). O meio de FA foi, suplementado com sais e extrato de levedura (item 3.3.2.1), pH 4,5, com agitação de 150 rpm.

Tabela 3.6 – Descrição das condições dos ensaios de avaliação dos efeitos de tempo temperatura, extrato enzimático, inóculo e bagaço de cana na produção de etanol.

Ensaio	T (°C)	EEB (%)	Inóculo (g/L)	BBS (%)
1	40	100	35	25
2	40	100	25	15
3	30	60	35	25
4	40	60	25	25
5	30	100	25	25
6	30	100	35	15
7	40	60	35	15
8	30	60	25	15
9	40	60	25	15
10	40	60	35	25
11	40	100	35	15
12	30	60	25	25
13	30	60	35	15
14	30	100	25	15
15	40	100	25	25
16	30	100	35	25
17	35	80	30	20
18	35	80	30	20
19	35	80	30	20

EEB: extrato enzimático bruto; Inóculo: *Saccharomyces cerevisiae* Y904; BBS: bagaço de cana tratado na condição de baixa severidade.

3.3.12.2. Avaliação das melhores condições associadas à produção de etanol

As 1729 medidas experimentais representativas das concentrações em diferentes tempos e temperatura de fermentação alcoólica foram utilizados para ajustar a rede neuronal, com a utilização de 2/3 dos pontos e no treinamento da rede 1/3 dos pontos na validação deste tratamento. Foi utilizada rede neuronal múltiplas camadas, com duas camadas ocultas de neurônios *tansing* (função de transferência tangente hiperbólica) e a camada de saída de dados do tipo *purelin* (função de transferência linear) e demais parâmetros descritos no Quadro 3.2.

Quadro 3.2 – Parâmetros da rede neuronal.

Tipo	Rede neural de múltiplas camadas
Neurônios	5,4,3,1
Taxa global de aprendizagem	0,01
Momento global	0,5
Camadas ocultas	<i>tansing</i>
Camadas de saída	<i>purelin</i>
Método de treinamento	Adaptação de gradiente descendente

No ajuste da rede neuronal foram utilizadas biblioteca Amore (*a more flexible neural network*) da linguagem R com parâmetros apresentados (Quadro 3.2) em 900 diferentes arquiteturas com número de neurônios nas camadas ocultas variável entre 1 e 30 para cada camada oculta e a melhor configuração foi escolhida como sendo aquela que apresentou melhor coeficiente de correlação referente aos pontos de validação da rede.

A determinação das condições otimizadas de tempo e temperatura, quantidades de levedura, bagaço de cana e extrato enzimático bruto associadas à produção de etanol foram avaliadas pelos métodos heurísticos de otimização por colônia de formigas (ACO-*ant colony optimization*). No método ACO foram utilizados um número variável de formigas e busca com parâmetros associados ao ajuste de feromônios (τ_{ij}); $\alpha=1$; $\beta=2$, $\rho=0,5$ (taxa de evaporação), sendo utilizado 500 formigas e 500 buscas, totalizando 250.000 avaliações.

3.3.13. Fermentação alcoólica de bagaço de cana tratado por *Pichia stipitis*

Nesta etapa do trabalho foram estudadas fermentações alcoólicas com bagaço de cana tratado a baixa severidade (BBS) por levedura fermentadora de pentoses, *Pichia stipitis*.

Inicialmente foi feito um processo de adaptação da *Pichia stipitis* em meio com pentoses, visando estimular o consumo destes açúcares pela levedura. Pré-inóculo: meio na seguinte composição (g/L): 10,0 xilose, 5,0 arabinose, 5,0 glicose, 1,0 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 extrato de levedura, o pH foi ajustado para 6,5 (GUPTA, SHARMA e KUHAD, 2009; SILVA et al., 2012). A este meio previamente esterilizado,

inoculou-se a *Pichia stipitis*, mantendo a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, 150 rpm por 24 h. Então, as células foram centrifugadas e utilizadas na FA, obtendo uma concentração celular da ordem de 10^8 células/mL.

Os extratos enzimáticos foram produzidos de acordo com o item 3.3.2.1, com substrato MPE4, e *A. niger*, durante 72 h de FES. As enzimas foram extraídas com água deionizada e 1% de *Tween* 80 e este EEB utilizado então para as FA. O meio de fermentação alcoólica foi 25,0 g de MFA3, suplementado com sais e extrato de levedura (item 3.3.2.1).

Para fermentações alcoólicas (FA) foram realizados três procedimentos:

- Procedimento 1: As FAs foram realizadas utilizando simultaneamente a *Pichia stipitis* (10^8 células/mL) e *Saccharomyces cerevisiae* (30 g/L) em pHs de 6,5, 5,5 e 4,5, para os tempos de fermentação de 48 e 72 horas.
- Procedimento 2: As FAs foram realizadas inicialmente com a *S. cerevisiae*, nas condições desta levedura: concentração de inóculo de 30 g/L, temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, pH de 4,5, 150 rpm. E após 24 h de FA, o caldo fermentado foi ajustado para as condições da levedura *P. stipitis*, temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, pH de 6,5, 150 rpm, e fermentado por mais 48 h.
- Procedimento 3: As FAs foram realizadas inicialmente com a *P. stipitis*, temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, pH de 6,5, 150 rpm, durante 48 h de fermentação. Após, o caldo de fermentação foi ajustado para condições da *S. cerevisiae*, temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, pH de 4,5, 150 rpm e fermentado por mais 24 h.

3.3.14. Processos Hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica

Neste estudo a hidrólise enzimática da biomassa celulósica por EEB foi realizada separadamente da fermentação alcoólica. Os extratos enzimáticos foram produzidos de acordo com o item 3.3.2.1, com substrato MPE4, e *A. niger*, durante 72 h de FES. As enzimas foram extraídas com água deionizada e 1% de *Tween* 80 e este EEB foi utilizado para hidrólise enzimática de 25,0 g de MFA3, a temperatura de 35°C , pHs de 4,0, 4,5; 5,0 e 6,0, durante 24 h de hidrólise. Após este tempo, o meio foi suplementado com sais e extrato de levedura e adicionado a *S. cerevisiae* (30 g/L) (item 3.3.2.1) e fermentado durante 24 h. Um fluxograma do processo de hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica pode ser observado na Figura 3.7.

Na fermentação alcoólica dois procedimentos foram adotados, em um processo a biomassa hidrolisada foi mantida no meio de FA e no outro a biomassa hidrolisada foi retirada e apenas o caldo hidrolisado foi utilizado na FA.

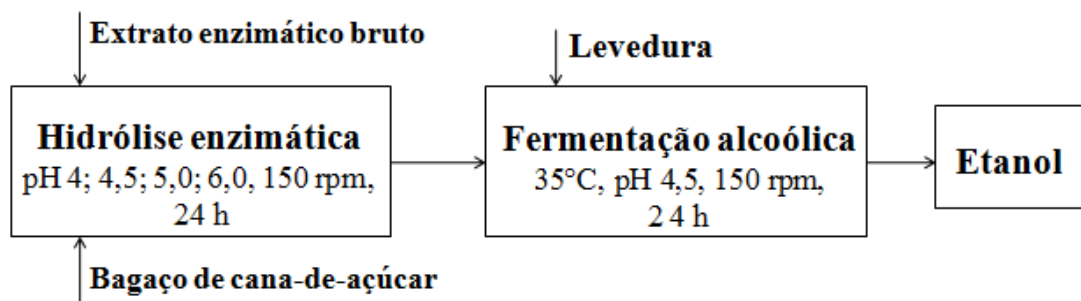


Figura 3.7 – Fluxograma ilustrativo do processo de hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica.

3.3.15. Estudo da Concentração do complexo enzimático

Neste estudo foram purificados os extratos enzimáticos brutos (EEB), visando concentrar as enzimas produzidas por FES *A. niger* e MPE4 (40% de BBS e 60% de farelo de arroz) durante 72 h de FES. Os EEBs foram extraídos com solução *Tween* 80 (1%) em água deionizada, e então seguido os processos de concentração descritos abaixo.

Para produção de etanol foi utilizado 100 mL do extrato enzimático concentrado (EEC), e o substrato para produção de etanol foi 25 g do meio 96%BBS (MFA3). O tempo de FA foi de 24 h e demais condições descritas no item 3.3.2.2.

3.3.15.1. Purificação por Sistema Aquoso Bifásico (SAB)

A preparação dos sistemas aquosos bifásico para a extração de celulasas foi realizado de acordo com metodologia de Herculano et al. (2012), inicialmente os extratos enzimáticos brutos (EEBs) foram clarificados, por filtração a vácuo em papel Whatman nº1, e centrifugado durante 15 min/4500 rpm. Então, os sistemas foram preparados com polietileno glicol (PEG) de diferentes pesos moleculares (2000 e 6000 g/mol) e sal de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em diferentes percentagens, o pH dos sistemas foi ajustado com quantidade apropriada de ácido cítrico para manter um

valor de pH de 7,0 ou 8,0. Estas condições, peso molecular do PEG, % PEG e % de sal e pH estão apresentadas na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Preparação dos Sistemas aquosos bifásicos com PEG/sal citrato de sódio.

Descrição dos Sistemas aquosos bifásicos	
Controle	EEB (sem concentrar)
Experimento 1	20% PEG 6000 g/mol + 10% citrato de sódio + 20% EEB, pH 8,0
Experimento 2	24% PEG 2000 g/mol + 15% citrato de sódio + 20% EEB, pH 8,0
Experimento 3	22% PEG 2000 g/mol + 17,5% citrato de sódio + 20% EEB, pH 7,0
Experimento 4	18% PEG 2000 g/mol + 17,5% citrato de sódio + 20% EEB, pH 7,0
Experimento 5	26% PEG 2000 g/mol + 17,5% citrato de sódio + 20% EEB, pH 7,0

EEB:extrato enzimático bruto; PEG: Polietileno glicol.

As quantidades desejadas de PEG e sal foram colocadas em tubos de centrifugação graduados (15 mL). Os EEBs clarificados, foram adicionado aos tubos, calculado para 20% do total do sistema. Então, foi adicionada água deionizada foi então para atingir um peso final de 10,0 g. Após agitação em Vortex durante 1,0 min, as duas fases foram separadas por sedimentação durante 40 min. Os volumes de fases foram medidos, e as fases superior e inferior foram retiradas separadamente e analisadas.

Tanto os EEBs quanto as amostras de ambas as fases após concentração por SABs foram analisados quanto a atividade enzimática, *FPase* (item 3.3.16.1) e concentração de proteínas (item 3.3.16.4), o que permitiu o cálculo do fator de purificação e etanol (item 3.3.16.2).

3.3.15.1.1. Determinação do fator de purificação

O fator de purificação (FP) foi calculado como a razão entre a atividade específica da fase superior pela atividade específica do extrato enzimático antes da partição (A_i), conforme Equação 3.2:

$$FP = \frac{A_t/C_t}{A_i/C_i} \quad (3.1)$$

Sendo:

A_t : atividade enzimática volumétrica da fase superior; A_i : atividade específica antes da partição;

C_t : Concentração de proteína total na fase superior; C_i : Concentração de proteína do extrato enzimático antes da partição.

3.3.15.2. Precipitação com Sulfato de Amônio (*Salting-out*)

A separação enzimática foi realizada por *salting-out* (precipitação salina) utilizando sulfato de amônio nas concentrações de 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60 e 0,70 g/g da mistura sal e extrato enzimático bruto. Com ajuste de pH para 6,5 e manutenção da mistura salina a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 12 h (*overnight*) seguido de centrifugação a 18900 g e solubilização do precipitado em água em um volume correspondente a 1/3 do volume inicial (ROCHA, 2011).

A avaliação da eficiência da separação foi realizada por determinação de *FPase* (item 3.3.16.1), concentração de proteína (item 3.3.16.4.) e etanol (item 3.3.16.2).

3.3.15.3. Concentração em Rotaevaporador

Os extratos enzimáticos foram concentrados por evaporação a vácuo, Figura 3.8 (Rotaevaporador modelo RV 10 IKA), utilizando vácuo de 500 mm Hg, rotação de 160 rpm e temperaturas 50 e 60°C, faixa de temperatura ótima das enzimas do complexo das celulasas citada na literatura (RABELO, 2010), sendo que o volume do extrato enzimático foi reduzido a 50% e então utilizado para produção de etanol.

A avaliação da eficiência da concentração foi realizada por determinação de *FPase* (item 3.3.16.1), concentração de proteína (item 3.3.16.4.) e etanol (item 3.3.16.2).

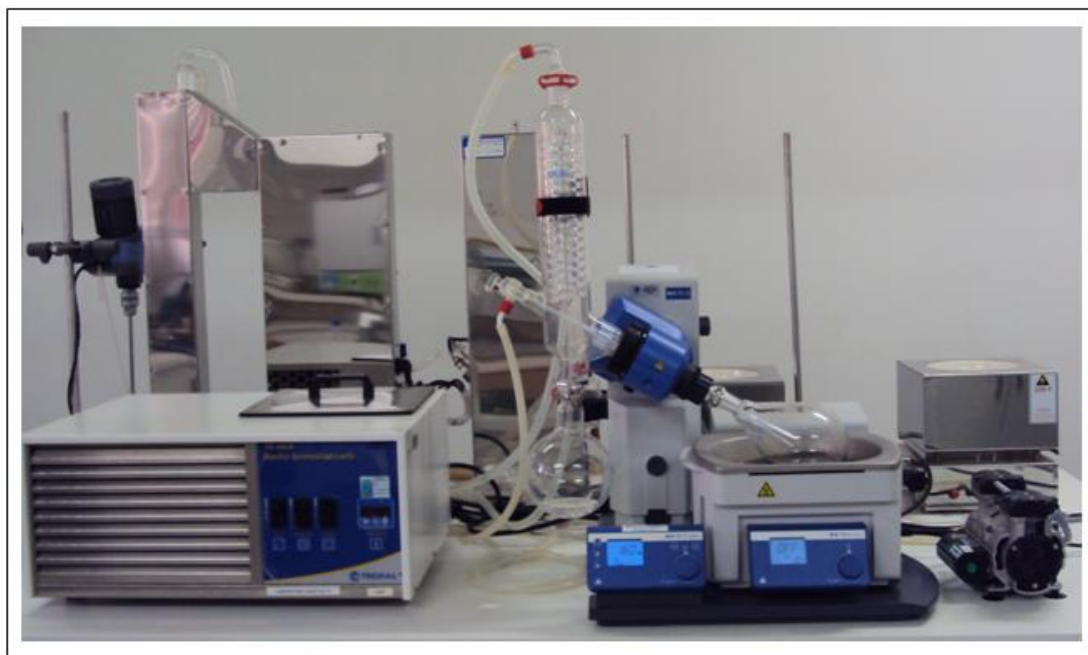


Figura 3.8 – Sistema de evaporação a vácuo (Rotaevaporador) utilizado na concentração de extrato enzimático de *A. niger*.

3.3.16. Métodos analíticos

3.3.16.1. Atividade em celulase

Para determinação da atividade enzimática de celulase total (*FPase*) utilizou-se metodologia proposta por Ghose (1987), a atividade foi avaliada como a velocidade de hidrólise da celulase proveniente de papel de filtro. Foi utilizado 0,05 g de papel de filtro Whatman nº1 como substrato e a concentração de celulase foi quantificada pela hidrólise do papel de filtro em solução tampão de acetato 0,2 mol/L e pH 5,5, temperatura e 45°C pelo uso de 1 mL de extrato enzimático, 2 mL de tampão para tempo de uma hora. A glicose gerada foi dosada pelo método da glicose-oxidase (MANDELS, HONTZ e NYSTROM, 1974). Sendo que uma unidade foi definida como a geração de um micromol de glicose por minuto, expressa em U/g.

3.3.16.2. Determinação de açúcares e etanol

As determinações das concentrações de glicose, lactose e de etanol foram realizadas em HPLC, pelo método de Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE). O

processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. As amostras foram diluídas em água deionizada, filtradas e injetadas no sistema cromatográfico marca *Shimadzu* modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL Ca, na qual os componentes são separados e detectados por refração de luz. A solução de arraste utilizada foi água deionizada, a vazão do eluente de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 80°C e volume de injeção de 20 µL. O etanol e os açúcares foram determinados a partir de suas respectivas curvas de calibração.

3.3.16.3. Determinação da concentração dos açúcares redutores totais

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). Este método baseia-se na redução do ácido 3,5- dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e, ao mesmo tempo, na oxidação do grupo aldeído ou cetônico a grupos carboxílicos, com o desenvolvimento da cor laranja-marrom intenso, sendo lida espectrofotometricamente a 540 nm. Para determinar a concentração dos ART em cada uma das amostras analisadas, foi necessária a construção de uma curva-padrão de glicose.

3.3.16.4. Determinação de proteínas

A determinação de proteínas do complexo enzimático foi realizada por Método proposto por Lowry et al (1951). Neste método, foram utilizadas duas soluções (A e B); a solução A continha 2 g de carbonato de sódio anidro, 0,02 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 100 mL de hidróxido de sódio 0,1 N; e a solução B continha 0,5 g de sulfato de cobre, 2 gotas de ácido sulfúrico em 100 mL de água destilada. No momento da análise, as soluções A e B eram misturadas na seguinte proporção: 50 mL da solução A e 1 mL da solução B, e 3 mL desta mistura era adicionada, em um tubo de ensaio, à 1 mL da amostra. Agitava-se o tubo e esperava-se por 10 min. Após essa etapa, adicionava-se 0,3 mL de Folin-Ciocalteau N/2 (normalidade do reagente diluída à metade) ao tubo de ensaio. Agitava-se e esperava-se por 30 min. Desse processo, surgiu uma coloração azul devido à reação da proteína com o íon cobre em solução alcalina. Para quantificação, utilizava-se um espectrofotômetro à 760 nm para determinação de

proteínas. Para este método, foi necessária a construção prévia de uma curva-padrão de albumina.

3.3.16.5. Determinação de concentração celular

A determinação da concentração celular associada à fermentação em estado sólido foi realizada por plaqueamento em meio *Czapek*, com composição de nutrientes e Agar descrita na Tabela 3.1. Para a determinação da concentração celular das amostras, na fermentação alcoólica, utilizou-se uma câmara de Neubauer espelhada e um microscópio óptico (Olympus). A câmara composta por 25 quadrículos, considerou-se para contagem 5 quadrículos que possuem 16 retículos com uma área de $0,0025 \text{ mm}^2$ e profundidade de 0,1 mm para cada quadrículo. Com isso tem-se um volume total da câmara de $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ }\mu\text{L}$.

Para a contagem das células, diluiu-se a amostra e promoveu-se a homogeneização com vigorosa agitação. Colocou-se esta solução, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, entre a câmara de Neubauer e a lamínula, previamente limpas com álcool 70%. Realizou-se a contagem das células em microscópio óptico utilizando-se um aumento de 100 vezes. O cálculo da concentração de célula foi realizado de acordo com a Equação 3.2 (MADIGAN et al., 2004).

$$\text{Célula/mL} = \frac{\text{n}^{\circ}\text{cel. totais} \times \left(\frac{1}{\text{volume do retículo}} \right) \times \text{diluição}}{\text{n}^{\circ}\text{retículos}} \quad (3.2)$$

3.3.17. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

Para realização da caracterização dos bagaços de cana utilizados neste trabalho (BNT, BBS e BAS), inicialmente, amostras dos mesmos foram previamente secas numa estufa de circulação de ar durante 48 horas a uma temperatura de $40 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (até aproximadamente 10% de umidade). Cada etapa deste processo de caracterização está descrita nos próximos itens.

3.3.17.1. Análises imediatas

Umidade: A análise de umidade foi determinada pelo cálculo da perda de massa em estufa, a uma temperatura de 110°C por 6 horas. Esse procedimento foi baseado no método ASTM E871-82.

Teor de cinzas: O teor de cinzas foi determinado baseado nos métodos ASTM E1534-93, a amostra ficou 4 horas em uma mufla aquecida a 700 °C (SILVA, 2013).

Densidade aparente: Para determinação da densidade (Equação 3.3), foram pesados 100,0 g da amostra de bagaço e colocados em proveta para determinar o volume ocupado, sem haver compactação (BRASIL, 2005).

$$\text{Densidade Aparente (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{massa}}{\text{volume ocupado}} \quad (3.3)$$

pH: Para determinação do pH, foi preparada uma suspensão com 100 mL de água destilada e 5,0 g da amostra de bagaço. Após homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por um período de 30 minutos, depois o pH foi mensurado em potenciômetro digital, previamente calibrado com as soluções padrões (BRASIL, 2005).

Açúcares redutores: Para determinação dos açúcares redutores pesou-se 1,0 g de amostra de bagaço e dilui-se para 50,0 mL de água destilada. Após agitação por 5 minutos, a mesma foi filtrada. A solução filtrada foi analisada pelo método do ácido 3,5- dinitrosalicílico (MILLER, 1959) (item 3.3.15.3).

Sólidos solúveis (Brix): A concentração de sólidos solúveis medida em Brix (°BX) é uma medida relacionada com a quantidade de açúcares presentes na amostra. Amostras de 1,0 g de bagaço foram diluídas para 20,0 mL de água destilada, agitou-se até perfeita homogeneização e deixou-se a suspensão em repouso durante 30 minutos. Após este período a suspensão foi filtrada, e realizada à leitura em refratômetro, obtendo-se o teor de sólidos solúveis do resíduo (BRASIL, 2005).

3.3.17.2. Análise de Celulose, hemicelulose, lignina

Para a preparação da amostra livre de extrativos, foi utilizada metodologia baseada em Hames et al. (2008), amostra de 8,0 g de bagaço foi colocada em um

cartucho de papel filtro e adaptado ao extrator Soxhlet. Foram realizadas duas extrações, a primeira com 250 mL de água destilada, e a segunda com 250 mL de álcool 95%. A extração com cada solvente foi feita por um período de 8 horas de refluxo. O conteúdo recolhido no balão de 500 mL foi rotaevaporado, e o balão seco em estufa a 105 ± 1 °C, deixado em dessecador por uma hora e pesado para determinar o teor de extrativos. A amostra de bagaço livre de extrativos foi seca em estufa a 40 ± 1 °C e então utilizada para determinação de lignina e holocelulose.

3.3.17.2.1. Quantificação da lignina insolúvel (lignina Klason) e solúvel

Para determinação da lignina foi utilizada a metodologia de Browning (1967), 1,0 g da amostra livre de extrativos foi colocada em um Béquer e adicionou-se 15,0 mL de H_2SO_4 (72%), de forma lenta e com agitação constante. A amostra foi então mantida durante 2 horas à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) em agitação. Após este tempo, foi transferida para um balão de 1000,0 mL e então adicionados 560,0 mL de água destilada (para concentração de ácido sulfúrico de 3% (m/m)). O sistema mantido a uma temperatura de 100 ± 1 °C, em refluxo para que não ocorresse perda de água por evaporação (não alterar a concentração da solução de ácido). Após 4 horas, o sistema foi deixado em repouso para a sedimentação do material insolúvel. Este material foi filtrado em funil de placa porosa, previamente tarada, e lavado com 500,0 mL de água destilada quente. Em seguida, foi seco em estufa a 105 ± 1 °C, por 12 horas, e pesado para quantificação do resíduo insolúvel. O conteúdo de lignina insolúvel foi calculado como a percentagem da massa de lignina insolúvel em relação à massa inicial de amostra seca.

O filtrado do procedimento anterior foi colocado em balão volumétrico de 100,0 mL e completado com água destilada até o volume do balão. A partir dessa solução foi retirado 10,0 mL e acrescentado mais 5,0 mL de água destilada, formando assim uma segunda solução. A partir desta nova solução foi possível determinar quantitativamente a lignina solúvel por espectroscopia ultravioleta (UV), a partir da análise das bandas de absorção nas regiões de 215 e 280 nm do espectro. Foi feito um branco (para espectro) realizando o mesmo procedimento para determinar a lignina insolúvel, entretanto, sem a presença de amostra livre de extrativos. A concentração de lignina solúvel foi calculada segundo a Equação 3.4. (GOLDSCHIMID, 1971 *apud* MORAIS, 2005):

$$C_{L.S.} = \frac{4,53 (A_{215} - A_{280})}{300} \quad (3.4)$$

Sendo:

CL.S. = concentração em g L⁻¹ de lignina na amostra;

A₂₁₅ = absorvância da solução a 215 nm menos a absorvância do branco a 215 nm; e

A₂₈₀ = absorvância da solução a 280 nm menos a absorvância do branco a 280 nm.

3.3.17.2.2. Obtenção da holocelulose, hemicelulose e celulose

A concentração de holocelulose, hemicelulose A e B e celulose foram determinadas pelo método descrito por Browning (1967). O procedimento foi realizado da seguinte forma: 5,0 g da amostra foram colocados em um balão e adicionou-se 100,0 mL de água destilada. O balão foi colocado em banho-maria, a $75 \pm 1^\circ\text{C}$ e adicionou-se 2,0 mL de ácido acético e 3,0 g de clorito de sódio, nesta ordem, tampando o balão para não ocorrer à perda do gás cloro produzido na reação. Após 1 hora, adicionou-se novamente 2,0 mL de ácido acético e 3,0 g de clorito de sódio. Esse processo foi repetido por mais duas vezes até que foi observada a holocelulose (coloração branca). A mistura foi então resfriada a $10 \pm 1^\circ\text{C}$, filtrada em funil de placa porosa, previamente tarado, e lavada com água destilada a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ até que o resíduo fibroso apresentasse coloração esbranquiçada. O funil com o resíduo fibroso foi então seco em estufa a $105 \pm 1^\circ\text{C}$ por 6 horas, resfriado em dessecador e pesado para se quantificar o rendimento da holocelulose.

Para obtenção da quantidade de celulose foi transferido 3,0 g de holocelulose para um Erlenmeyer de 250,0 mL, adicionou-se 100,0 mL de solução de KOH (5%) e fez-se uma atmosfera inerte pela passagem de gás nitrogênio, durante os cinco minutos iniciais da extração para evitar a oxidação da celulose. O Erlenmeyer foi vedado, e mantido em agitação constante por 2 horas. A mistura foi então filtrada em funil de placa porosa, lavada com 50,0 mL de solução de KOH (5%) e em seguida com 100,0 mL de água destilada. O filtrado foi então recolhido em um Erlenmeyer de 1,0 L e precipitado com uma solução de partes iguais de ácido acético e etanol (completando-se o volume do Erlenmeyer), obtendo-se assim a hemicelulose A.

Para a obtenção da hemicelulose B, o resíduo fibroso retido no funil foi transferido novamente para o Erlenmeyer de 250,0 mL. O mesmo procedimento para a obtenção da hemicelulose A foi repetido utilizando solução de KOH (24%). Para lavagem do resíduo fibroso retido no funil, utilizou-se 25,0 mL de solução de KOH (24%), 50,0 mL de água destilada, 25,0 mL de ácido acético (10%) e 100,0 mL de água destilada, respectivamente. O filtrado recolhido em Erlenmeyer de 1,0 L foi precipitado com uma solução de partes iguais de ácido acético e etanol (completando-se o volume do Erlenmeyer), obtendo-se assim a hemicelulose B. Após a extração dos componentes solúveis em soluções aquosas de hidróxido de potássio, o resíduo fibroso foi lavado com água destilada até que o filtrado apresentasse pH neutro. O resíduo foi então lavado com 50,0 mL de acetona, seco a $105 \pm 1^\circ\text{C}$, e pesado (celulose).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, apresentam-se os resultados da caracterização do bagaço de cana utilizado neste trabalho, em seguida a seleção dos melhores fungos coletados no Cerrado do Triângulo Mineiro quanto à atividade enzimática (celulase). Em seguida, os resultados do estudo da influência dos meios sólidos para FES com cepa selecionada e tempo para tal fermentação na qualidade dos extratos enzimáticos brutos (EEB), bem como a utilização destes extratos na produção de etanol com *Saccharomyces cerevisiae*, avaliando a composição da carga de sólidos (bagaço de cana) fermentação alcoólica (FA). Na sequência são expostos e discutidos os resultados das diferentes formas de condução de produção de etanol de bagaço de cana: FA com EEB extraídos da FES com diferentes soluções (solução de *Tween* e água ou soro de queijo hidrolisado e não hidrolisado); FA sucessivas, com acréscimo de carga de sólidos e enzimas; FA em batelada alimentada; otimização da produção de etanol por rede neuronal artificial (RNA) e métodos heurísticos de busca por colônias de formigas; FA com levedura fermentadora de pentoses; FA e hidrólise enzimáticas conduzidas separadamente. Finalizando com os resultados das técnicas de concentração de extrato enzimático produzidos por cepa selecionada.

4.1. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

Na Tabela 4.1 são apresentados os resultados obtidos na caracterização do bagaço de cana não tratado termicamente (BNT), tratado a explosão a vapor na condição de baixa severidade (BBS) e na condição de alta severidade (BAS). Pode-se observar (Tabela 4.1) que o pré-tratamento térmico a explosão a vapor na condição de baixa severidade aumentou 1,25 vezes o teor de celulose e na condição de alta severidade 1,36 vezes. Outro ponto observado foi à redução da hemicelulose e que a proporção de lignina teve sua alteração inferior a 5%. Na Figura 4.1 podem ser observados os componentes majoritários do BBS, lignina, celulose e hemicelulose do, após a caracterização por metodologia de Browning (1967).

Tabela 4.1 – Composição das fibras lignocelulósicas e análise imediata dos bagaços de cana.

Biomassa	BNT	BBS	BAS
Celulose (%)	49,8	62,4	67,7
Hemicelulose (%)	25,1	15,1	13,8
Lingina (%)	24,8	23,2	18,9
Umidade (%)	6,5	4,80	4,60
Cinzas (%)	3,1	3,16	2,88
pH	5,2	3,74	3,37
Densidade aparente (g/cm³)	0,126	0,122	0,143
Açúcares redutores (%)	1,8	3,87	6,84
Brix (°BX)	3,2	4,5	5,5

BNT: bagaço de cana-de-açúcar não tratado termicamente; BBS: bagaço de cana tratado a explosão a vapor na condição de baixa severidade (12 kgf/cm², 8 min.); BAS: bagaço de cana de açúcar tratado a explosão a vapor na condição de alta severidade (19 kgf/cm², 4 min.).

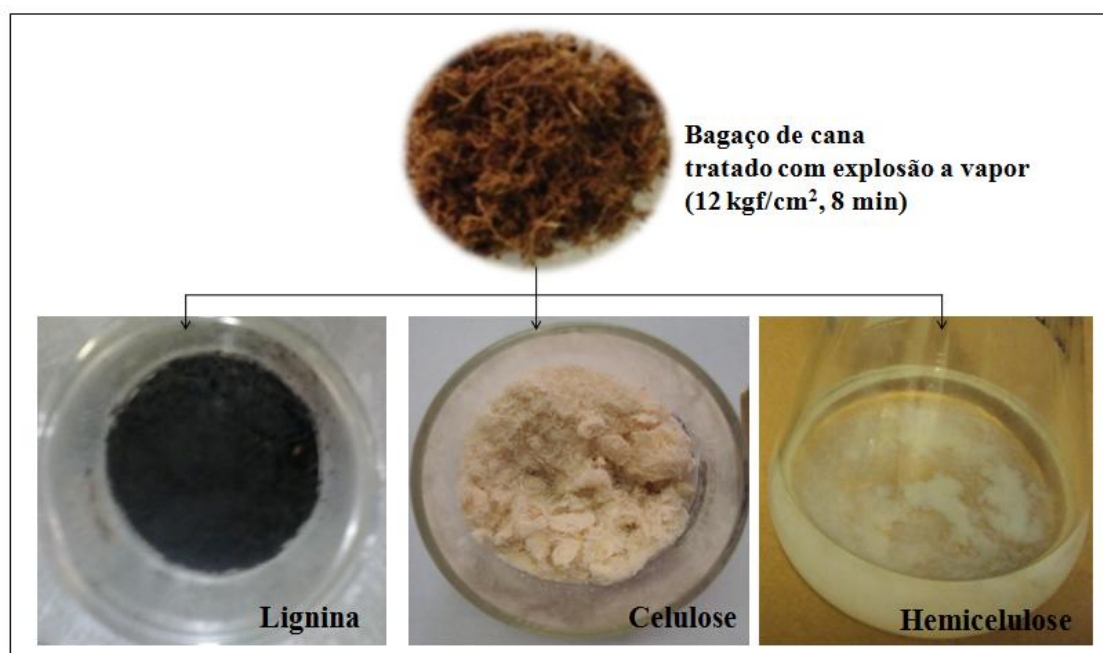


Figura 4.1 – Composição das fibras lignocelulósicas do bagaço de cana tratado a explosão a vapor, na condição de baixa severidade-BBS (12 kgf/cm², 8 min.).

4.2. Capacidade de degradação da celulose

A Figura 4.2 ilustra o resultado do teste de produção de celulase em meio de celulose como única fonte de carbono, evidenciando o halo de hidrólise formado, o qual possibilitou o cálculo do índice enzimático, pela diferença entre o halo de hidrólise gerado e halo da colônia do fungo inoculado, e na Figura 4.3 são apresentados os índices enzimáticos obtidos para os diferentes fungos estudados. É possível observar que os fungos F2, E6, E3, I4, E8, C7, I5, I6, I7, I1, I3 e o *Aspergillus niger* ATCC 16404 (fungo I8) foram os mais expressivos na atividade enzimática (celulase). Este resultado, índice enzimático expressivo para o *Aspergillus niger* era esperado, pois o mesmo é grande produtor de enzimas que incluem as enzimas do complexo da celulase, por esse motivo esse fungo foi adotado como referência. Das 71 cepas coletadas no Cerrado e que cresceram no laboratório (Quadro 4.1), apenas 10 não apresentaram atividade enzimática por esta metodologia.

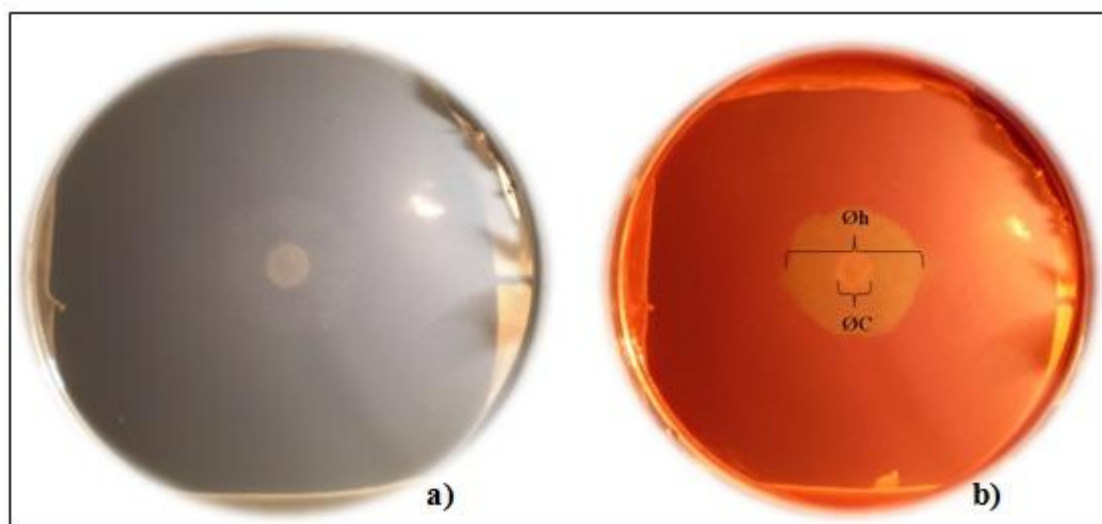


Figura 4.2 – a) Placa de Petri com meio de celulose após 48 h de crescimento do fungo inoculado; b) Revelação com vermelho de congo, evidenciando o halo de hidrólise – Índice enzimático ($\varnothing c$ = diâmetro da colônia; $\varnothing h$ = diâmetro do halo).

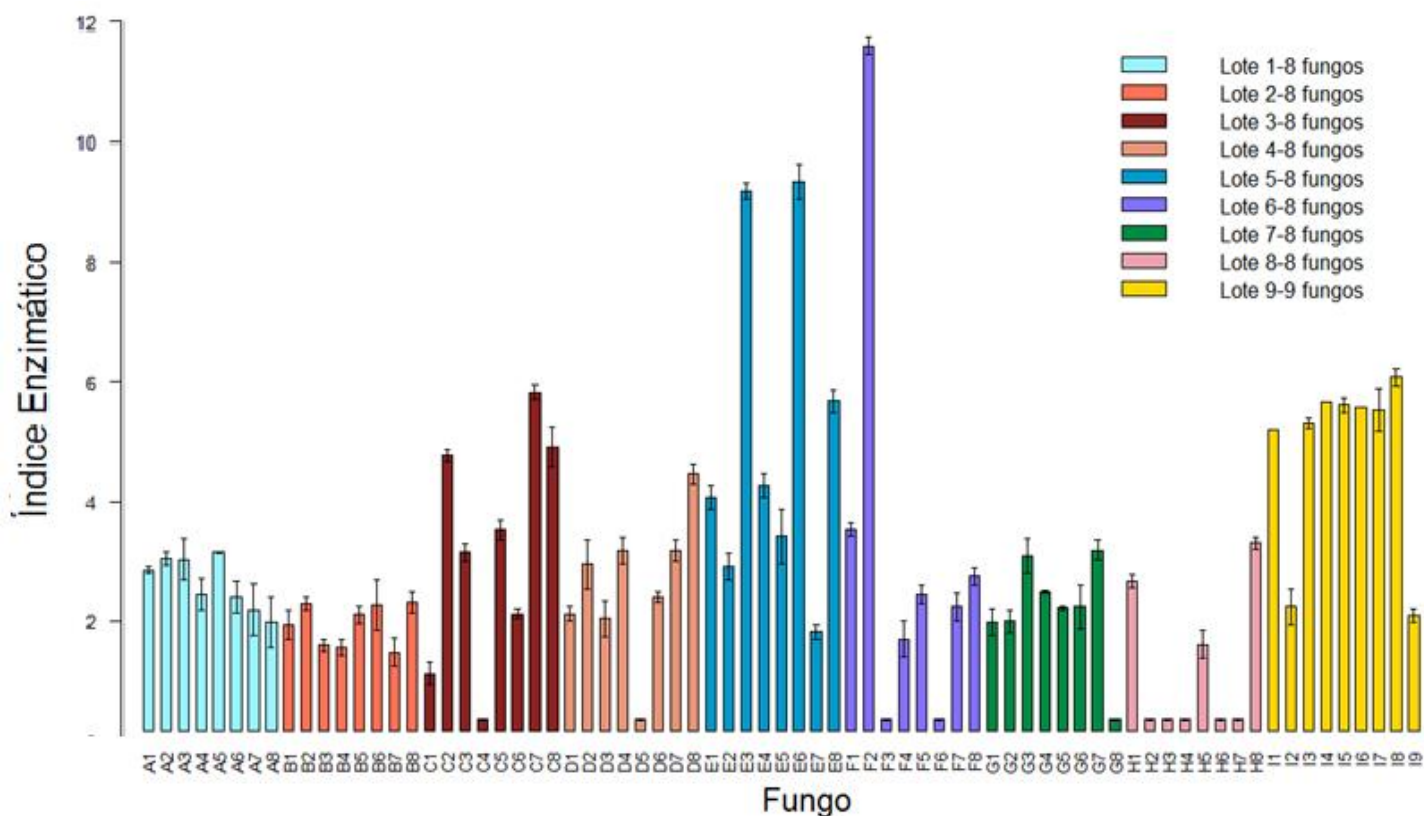


Figura 4.3 – Índice enzimático para os diferentes fungos avaliados no teste de produção de celulase em presença de celulose como única fonte de carbono.

Os fungos que apresentaram melhores resultados em celulase foram identificadas a partir da morfologia e testes bioquímicos e são apresentadas no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 – Identificação dos fungos selecionados por atividade em celulase

Código/Fungos selvagens			
F2	<i>Mucor racemosus Fresenius</i>	I2	<i>Trichoderma reesei</i>
C7	<i>Monilia sitophila</i>	I3	<i>Trichoderma harzianum</i>
E3	<i>Monilia sitophila</i>	I4	<i>Aspergillus niger</i>
E6	<i>Fusarium sp</i>	I5	<i>Aspergillus niger</i>
E8	<i>Acremonium sp</i>	I6	<i>Aspergillus niger</i>
I1	<i>Trichoderma asperellum</i>	I7	<i>Aspergillus niger</i>

Inicialmente optou-se por estudar mais profundamente a cepa identificada como *Mucor racemosus Fresenius* (F2) que apresentou maior índice enzimático (11,8) no teste de produção de celulase em presença a celulose como única fonte de carbono. Este fungo tem sido relatado por vários pesquisadores como produtor de celulase, mas há uma carência de estudos das enzimas produzidas por este microrganismo na produção de etanol. Fungos do gênero *Mucor* são produtores de enzimas celulolíticas como relatado por vários pesquisadores: Nelly (1991); Abdel-Halfez, et al. (2003); Moharram et al. (2004); El-Said, Maghraby e El-Shahir (2006); Vasil Chenko et. al. (2005). Said e Saleem (2008) estudaram fungos coletados do solo da região oeste da Líbia, verificaram alta ocorrência de crescimento do fungo *Mucor racemosus Fresenius* em meio contendo celulose, destacando-se como produtor de endo 1,4- β -glucanase.

4.3. Avaliação do tempo e do meio FES para produção do complexo enzimático empregando o *Mucor racemosus Fresenius*

A Figura 4.4 mostra a influência da composição do meio de FES na qualidade do extrato enzimático bruto, atividade do fungo expressa em termos de produção enzimática de celulase (atividade em *FPase*) e geração de proteínas no extrato enzimático para as situações que se utilizou a mistura farelo de arroz e bagaço de cana após explosão a vapor em baixa severidade (BBS). O tempo de FES foi de 60 horas, a extração da enzima foi realizada com solução de *Tween* 80 1% em água (ST) e na fermentação alcoólica foi utilizado com substrato sólido BBS e tempo de fermentação de 48 h. Os melhores resultados de produção de etanol e atividade em *FPase* pelo uso de extrato enzimático bruto de fermentação sólida foram para os meios com concentração de bagaço de 40 (MPE4) e 20% p/p (MPE5), respectivamente.

No meio constituído de 100% de bagaço, a concentração de etanol foi menor, que nos meios com misturas de proporções de bagaço e farelo de arroz, indicando que o microrganismo precisa de outras fontes de carbono para ativar a produção das enzimas. Este fato pode ser explicado parcialmente pela dificuldade de degradação da celulose mesmo por fungos produtores de complexos de celulase e pela maior concentração de fatores tóxicos nas situações com uso de maior teor de bagaço (o bagaço tem composição complexa associada ao tratamento térmico por explosão de vapor). O farelo de arroz tem elevado teor protéico, fornecendo uma quantidade de nitrogênio orgânico adequada ao crescimento do microrganismo.

Também pode ser observado que a concentração de proteínas e a atividade em celulase *FPase* (U/g) no extrato enzimático podem ser utilizadas como indicativo da atividade biológica do fungo. Ensaios com teor de bagaço superior a 50% sugerem que o *Mucor racemosus Fresenius* tem capacidade de crescer em meio rico em celulose e representa um microrganismo que merece ser investigado em relação a sua capacidade de gerar bioprodutos e complexos enzimáticos associados ao seu crescimento em meio com celulose. Ensaios complementares com a concentração de 50 e 30% de bagaço mostraram que a produção de etanol foi inferior a obtida com 40%, portanto para os demais experimentos foi selecionado para a FES o meio com 40% de BBS e 60% de farelo de arroz, MPE4 (Figura 4.5), onde foi obtido 6,5 g/L de etanol.

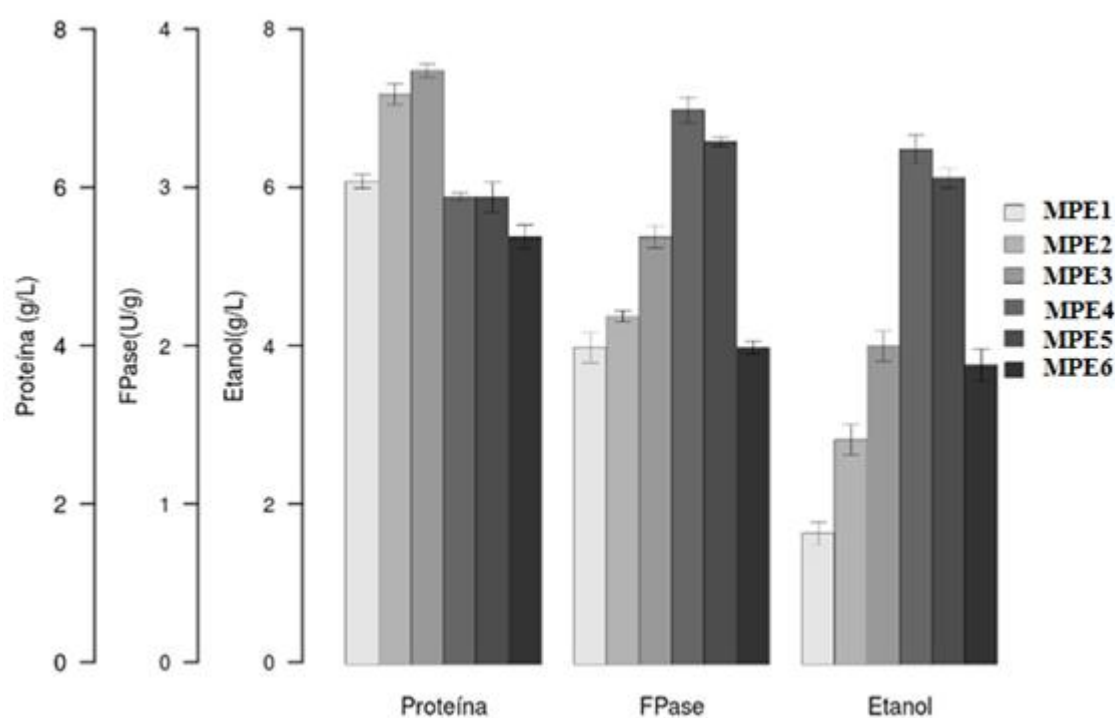


Figura 4.4 – Influência do teor de bagaço tratado a explosão a vapor nas características do EEB produzidos por FES com *Mucor racemosus Fresenius*. Os substratos sólidos foram: 100 (MPE1), 80 (MPE2), 60 (MPE3), 40 (MPE4), 20 (MPE5) e 0% (p/p) (MPE6) de porcentagem de BBS para uma mistura de BBS e farelo de arroz.



Figura 4.5 – Fermentação em Estado sólido com meio com MPE4 (40% de BBS e 60% de farelo de arroz) e *M. racemosus Fresenius*.

Delabona et al. (2012) avaliaram complexos enzimáticos brutos, produzidos por cepa de *Aspergillus fumigatus* selecionada da floresta Amazônica e cultivado com diferentes resíduos agroindustriais (farelo de trigo, bagaço de cana, farelo de soja e casca de laranja) como substrato para FES. Produções mais elevadas de enzima foram obtidas quando o farelo de trigo e mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) foram usados como substrato. A atividade máxima, 5,0 FPU g⁻¹ de *FPase*, ocorreu após 96 h de incubação.

A Figura 4.6 mostra o efeito do tempo da FES na concentração de proteína, na concentração de célula em massa seca e na concentração de ART do caldo da FES e na produção de etanol por FA. A extração do extrato enzimático bruto foi realizada com solução de *Tween* 80 1% em água (ST) e na FA foi utilizado com substrato sólido BBS e tempo de fermentação de 48 horas.

Os resultados mostram que no tempo de 72 horas a produção de etanol foi máxima. Este fato pode estar relacionado à produção de maior quantidade de enzima que pode atuar no substrato e proporcionar maior disponibilidade de açúcares redutores para a *Saccharomyces cerevisiae* na produção de etanol. Este comportamento era esperado, pois as enzimas são fundamentais para a hidrólise da biomassa presente e a disponibilização de açúcar que a levedura é capaz de utilizar para a produção de etanol. Nota-se que na contagem de esporos que a quantidade inicial de esporos era de $1,3 \times 10^6$

esporos/mL e que após 60 horas a quantidade de esporos manteve-se estável na ordem de 10^8 esporos/mL até o final do processo. Nota-se que o açúcar redutor foi maior no início do processo e diminuiu mais sensivelmente até 60 horas. Este comportamento pode estar relacionado ao consumo de açúcar redutor durante o crescimento dos microrganismos. Com estes resultados selecionou-se o tempo de 72 horas para a produção do EEB.

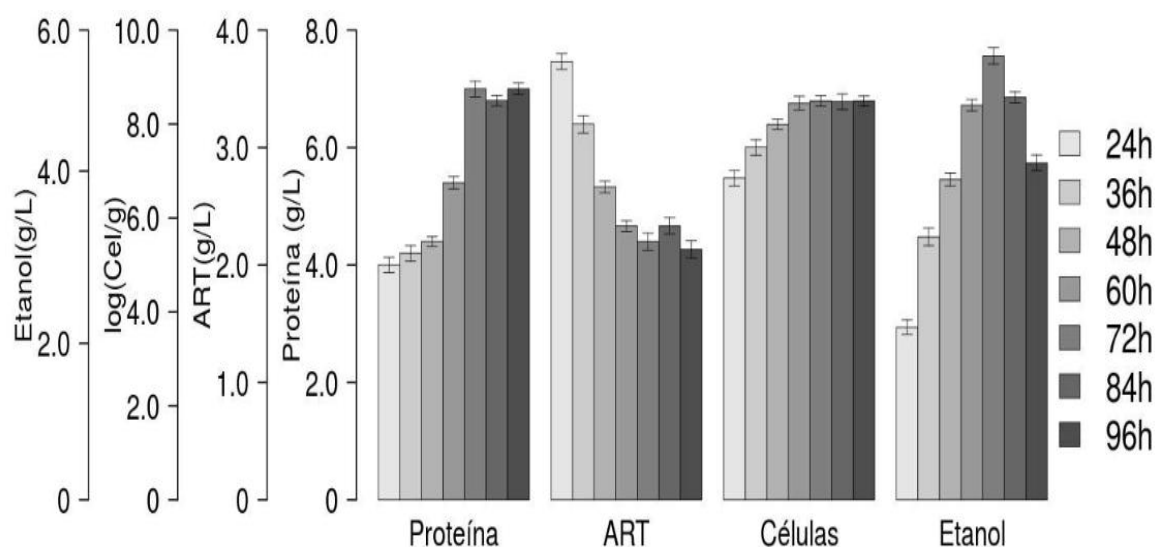


Figura 4.6 – Efeito do tempo da fermentação sólida na concentração de proteína, célula e ART do caldo da FES e na produção de etanol por FA. Para FES utilizou-se MB4 e para a produção de etanol MFA3.

Lever, Ho e Cord-Ruwisch (2010) estudaram um método simplificado de produção de celulase utilizando FES em palha de trigo e *Trichoderma reesei* em vez de preparações de enzimas comerciais e a melhor atividade em celulase, 0,75 e 1,2 FPU/gDS, foi obtida entre 10 e 14 dias de FES. No estudo de Sukumaran et. al. (2009) celulases de *Trichoderma reesei* Rut C30 e *Aspergillus niger* MTCC 7956 produzidas em biomassas de bagaço de cana, palha de arroz e aguapé obtiveram os melhores resultados com 96h de FES para celulase e 72h para β - glicosidase (1,14 e 13,65 FPU/mL, respectivamente). Bigelow e Wyman (2002) avaliaram a produção de celulase por *Trichoderma reesei* Rut C30 e bagaços agroindustriais pretratados com água quente, obtendo atividade enzimática de aproximadamente 0,8 e 1,2 FPU/mL para 120 e 200 horas de produção.

4.4. Avaliação da composição do meio de produção de etanol

A Tabela 4.2 mostra o efeito da composição do meio sólido da fermentação alcoólica na produção de etanol. Os resultados mostram que o tratamento térmico de explosão a vapor gera compostos que inibem parcialmente a capacidade do *Saccharomyces cerevisiae* de produzir etanol, pois a troca parcial do conteúdo de bagaço de cana-de-açúcar tratado por explosão a vapor com baixa severidade (12 kgf/cm², 8 min) por bagaço não tratado termicamente (comparação entre o substrato sólido MFA1 e os MFA2 e MFA3) melhora a produção de etanol e a substituição parcial do bagaço de baixa severidade por bagaço submetido a tratamento de explosão mais severa (19 kgf/cm², 4 min) reduz a concentração final de etanol observada.

Tabela 4.2 – Efeito da composição do substrato sólido da FA na produção de etanol.

Substrato sólido	BBS % (p/p)	BAS % (p/p)	BNT % (p/p)	Etanol (g/L)
MFA1	100	0	0	7,5±0,32
MFA2	98	0	2	8,1±0,37
MFA3	96	0	4	8,6±0,28
MFA4	94	0	6	7,0±0,30
MFA5	50	50	0	6,7±0,26
MFA6	0	100	0	6,1±0,22

BBS: bagaço de cana-de-açúcar tratado a explosão a vapor na condição baixa severidade (12 kgf/cm², 8 min.); BAS: bagaço de tratado a explosão a vapor na condição de alta severidade (19 kgf/cm², 4 min.); BNT: bagaço de cana não tratado termicamente.

A comparação entre os substratos MFA3 e MFA4 mostra que embora o bagaço não tratado favoreça a produção do etanol o excesso do mesmo é capaz de reduzir a produção de etanol o que pode ser explicado pelo fato das enzimas do complexo não atuarem quando as fibras não se encontram abertas por explosão a vapor. Para a FA foi selecionado o substrato sólido com 96% de BBS e 4% de BNT (MFA3). A Figura 4.7 ilustra fermentação alcoólica realizada com substrato sólido MFA3.



Figura 4.7– Fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae* de substrato sólido, MFA3 e extrato enzimático bruto.

4.5. Comparação da produção de etanol a partir do complexo enzimático produzido por diferentes cepas selvagens coletadas no Cerrado Brasileiro

Nesta etapa foi avaliado a produção de etanol dos extratos enzimáticos brutos, obtidos por FES das cepas que apresentaram melhor resultado no teste de produção de celulases pela avaliação do índice enzimático (item 4.2). A FA foi realizada conforme metodologia descrita no item 3.3.2.2. Os resultados de concentração de etanol são apresentados na Figura 4.8.

Os resultados mostraram que para concentração de etanol os fungos que apresentaram melhores resultados foram: *Aspergillus niger* (números I4, I5 e I7) e o *Mucor racemosus Fresenius* (número F2). Estes resultados confirmam os resultados obtidos no teste do índice enzimático (item 4.2). A partir destes resultados de produção de etanol, optou-se por utilizar o *M. racemosus Fresenius* e também o *A. niger* selvagem (I4) para os demais testes.

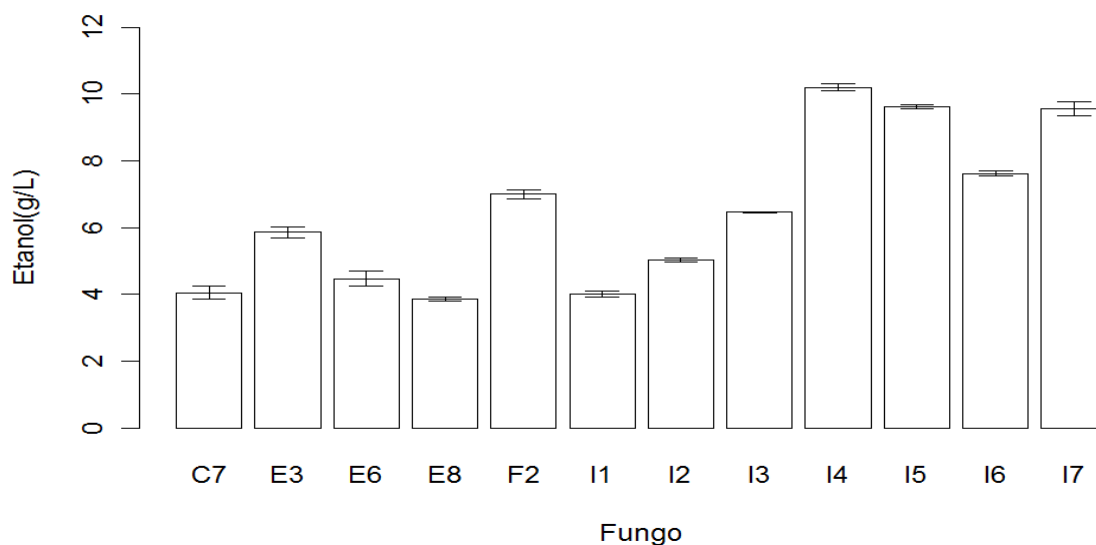


Figura 4.8 – Produção de etanol (48 h de FA) dos fungos pré-selecionados. Fungo de número C7 (*Monilia sitophila*), E3 (*Monilia sitophila*), E6 (*Fusarium sp*), E8 (*Acremonium sp*), F2 (*Mucor racemosus Fresenius*), I1 (*Trichoderma asperellum*), I2 (*Trichoderma reesei*), I3 (*Trichoderma harzianum*), I4 (*Aspergillus niger*), I5 (*Aspergillus niger*), I6 (*Aspergillus niger*) e I7 (*Aspergillus niger*). Fermentação alcoólica de 48 horas.

4.6. Produção de etanol em função do tempo, da solução utilizada para extrair o complexo enzimático e da composição do meio de fermentação alcoólica a partir do complexo enzimático produzido pela cepa selvagem *Mucor racemosus Fresenius*

Visando verificar a contribuição nutricional do soro de queijo na fermentação, foram utilizadas diferentes soluções para extração dos EEBs das FES produzido pela cepa selvagem *M. racemosus Fresenius*. Na Figura 4.9 são apresentados os resultados obtidos para a produção de etanol em função do tempo de fermentação alcoólica utilizando diferentes soluções para extração, ST, SW, SWHA e SWHE, (Tabela 3.4). Nesta Figura é apresentado também a produção de etanol quando utilizou-se a solução SW para extrair a enzima e não houve a adição de extrato de levedura na FA.

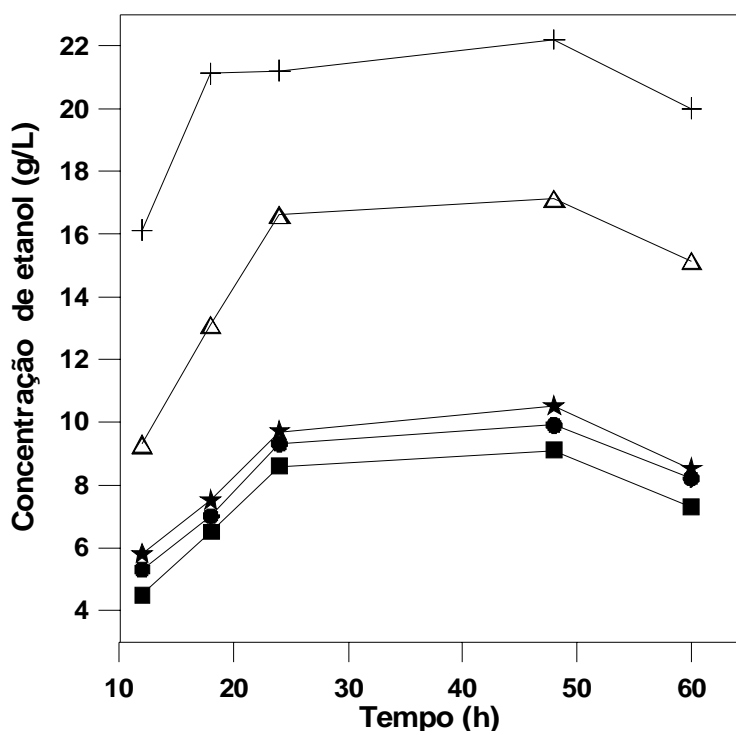


Figura 4.9 – Concentração de etanol em função do tempo de fermentação alcoólica, utilizando para extração das enzimas presentes na FES, as seguintes soluções: *Tween 80* a 1% em água deionizada - ST (■); *Tween 80* a 1% em soro de queijo com $36 \pm 1,5$ g/L de lactose (SW) sem utilizar extrato de levedura na fermentação alcoólica (●); *Tween 80* a 1% em soro de queijo com $36 \pm 1,5$ g/L de lactose (SW) utilizando extrato de levedura na fermentação alcoólica (★); *Tween 80* a 1% em soro de queijo hidrolisado com H_2SO_4 1% em autoclave a 0,5 atm por 20 min – SWHA (Δ); *Tween 80* a 1% em soro hidrolisado com β -galactosidase (*Aspergillus oryzae*) 3g/L (+) – SWHE.

A comparação entre os experimentos realizados em condições distintas de utilização de soro de queijo: sem soro e ensaios com soro não hidrolisado mostra que o uso de soro de queijo na obtenção de EEB reduz a necessidade de complementação do meio de FA com extrato de levedura. Portanto, quando se utilizou soro de queijo na extração do extrato enzimático, não foi adicionado extrato de levedura na fermentação alcoólica.

Observa-se também que o EEB não tem a capacidade de hidrolisar a lactose do soro, pois as concentrações de etanol foram próximas nas três situações com diferentes tempos de ensaio. Com a finalidade de verificar a contribuição da lactose presente no soro de leite na fermentação alcoólica foi feito a lavagem do meio FES com soro de leite hidrolisado química ou enzimaticamente. Assim, optou-se por hidrolisar o soro de leite, com ácido sulfúrico 1% e com essa solução fazer a lavagem do meio sólido obtido da FES para a extração da enzima. A comparação entre as condições de uso de soro sem

hidrólise e ensaios com hidrólise ácida e enzimática mostram que embora a hidrólise ácida seja capaz de aumentar a concentração de etanol de 8,6 para 16,6 g/L (aumento de 1,93 vezes), a hidrólise enzimática foi mais eficiente e aumentou a concentração de etanol para 21,3 g/L (aumento de 2,47 vezes). Este fato pode estar relacionado à produção de componentes tóxicos ou inibitórios resultantes da hidrólise ácida para a atuação de levedura na fermentação alcoólica, já que a hidrólise química, além de não ser realizada em condições amenas, não é específica como a hidrólise enzimática. Os valores obtidos no ensaio com soro hidrolisado foram superiores aos obtidos por Rocha et al. (2013) que obtiveram 11,9 g/L para produção de etanol de biomassa composta de soro de queijo, celulose e farelo de arroz submetido a explosão de vapor com amônia (AFEX).

Pode-se observar na Figura 4.9 que a concentração de etanol foi crescente ao longo do tempo de fermentação até 48 horas, porém o crescimento foi bem mais acentuado até 24 horas para todas as situações analisadas. A média do aumento da concentração de etanol de 24 para 48 horas foi de 6%, portanto adotou-se para os demais experimentos como referência o tempo de 24 horas para a fermentação alcoólica. Os resultados obtidos foram superiores ao encontrado por Lever, Ho e Cord-Ruwisch (2010) para ensaios batelada (5 g/L) e inferiores ao encontrado pelo mesmo autor em ensaios de batelada alimentada (21 g/L). Para 60 horas de fermentação observou-se uma queda na concentração de etanol. Este comportamento pode estar relacionado à perda de álcool etílico devido ao longo tempo de fermentação.

A quantidade de etanol produzida de 21,2 g/L utilizando o soro hidrolisado enzimaticamente (em 24 horas de FA), para as condições de processo utilizado, deve estar próximo do máximo a ser obtido com a quantidade de substrato utilizada. Assim, optou-se por aumentar a quantidade de substrato fazendo os seguintes experimentos para a fermentação alcoólica. Para produção de etanol foi utilizado 100 mL do extrato enzimático bruto produzido pela FES com diferentes quantidades de substrato para produção de etanol: o primeiro consistia de 23 g de bagaço de cana tratado com baixa severidade + 5 g de BNT (82,1% de BBS e 17,9% de bagaço bruto) e demais sais da FA, que passou a ser denominado de MFA7; o segundo tinha a seguinte composição: 26 g de bagaço de cana tratado com baixa severidade + 4 g de BNT (86,7% de BBS e 13,3% de BNT) e demais sais da FA, este meio passou a ser denominado de MFA8. Para extração das enzimas presentes no meio de FES foi utilizado *Tween 80* a 1% em

água deionizada. Para 24 horas de FA obteve-se $8,0 \pm 0,3$ g/L e $7,5 \pm 0,2$ g/L de etanol, quando utilizou o meio MFA7 e MFA8, respectivamente. Nota-se que o aumento na quantidade de substrato não proporcionou melhora na produção de etanol. Este fato deve estar relacionado a problemas de transferência de massa no meio fermentativo, porque, observou-se visualmente, que com esta quantidade de substrato (28 e 30 g para 100 mL de meio) a fermentação alcoólica encontrava-se no limite para ser uma fermentação submersa. Assim, optou-se por continuar os próximos experimentos com a quantidade máxima de substrato na fermentação alcoólica de 25 g de sólidos (MFA3) para 100 mL de complexo enzimático. O interessante é que a produção de etanol aumentou em cada ensaio que foi sendo realizado, apontando que as alterações no processo que estavam sendo realizadas encontravam no sentido positivo do aumento na quantidade de etanol produzida.

Assim, foram realizados experimentos de FA sucessivas (retirando o substrato sólido já fermentado e adicionando nova carga de sólido) e optou-se por continuar avaliando a utilização de soro de queijo, devido à contribuição nutricional de sais, nutrientes e açúcares a FA, a grande quantidade gerada desse subproduto na região de desenvolvimento do presente trabalho, bem como a necessidade de estudos de FA conjugadas deste subproduto com outras biomassas, como a celulose.

4.7. Produção de etanol utilizando fermentações sucessivas

Visando aumentar a produção de etanol foram realizadas fermentações alcoólicas sucessivas com diferentes meios de extração de enzimas. A Figura 4.10 apresenta os resultados obtidos para a produção de etanol em função do tempo de fermentação alcoólica utilizando fermentações sucessivas de 24 horas cada, utilizando diferentes soluções para extração do extrato enzimático bruto: ST, SW, SWHA (Tabela 3.4) produzido pela cepa selvagem *Mucor racemosus* Fresenius. Nesta Figura é apresentado também a produção de etanol quando utilizou a solução SW para extrair a enzima e não houve a adição de extrato de levedura na FA.

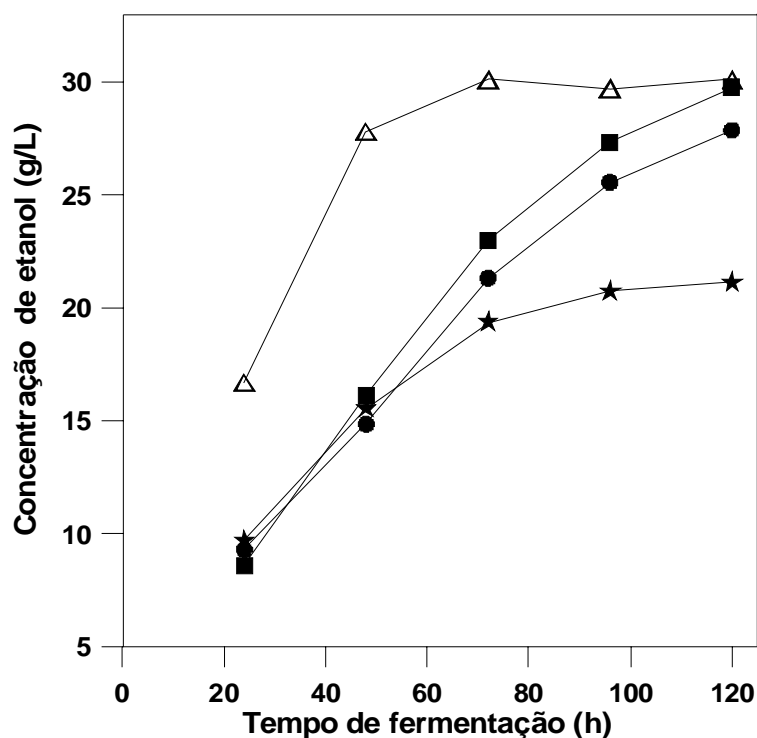


Figura 4.10 – Concentração de etanol em função do tempo para fermentações alcoólicas com alimentação de substrato sólido a cada 24 horas, com e sem reposição de enzima. Para extração do primeiro extrato enzimático bruto foi utilizado 100 mL de solução com Tween 80 a 1% com os seguintes meios: soro de queijo com $36 \pm 1,5$ g/L de lactose, com reposição de enzimas (●); soro de queijo com lactose hidrolisada com H₂SO₄ 1% em autoclave a 0,5 atm por 20 min, com reposição de enzimas (Δ); água deionizada sem reposição de enzima (★); e água deionizada com reposição de enzimas (■).

Os resultados mostram que com a reposição do extrato enzimático bruto a produção de etanol foi crescente e semelhante ao da fermentação sem reposição até a terceira FA. A partir desta fermentação no experimento sem reposição de enzima a produção de etanol permaneceu estável. Este comportamento pode indicar que o açúcar hidrolisado existente no meio foi todo convertido em etanol e que as enzimas não apresentaram atividade suficiente para hidrolisar mais açúcares e manter a produção de etanol crescente, já que nos experimentos em que a enzima nova foi adicionada, a produção de etanol continuou aumentando até a quinta fermentação. Nota-se que com a utilização de soro na primeira obtenção do EEB, a produção de etanol foi de aproximadamente 10% menor a partir de 48 horas de fermentação. Este fato deve estar relacionado a não adição de soro nas demais extrações do meio de FES, pois a partir da segunda fermentação (48 horas) o meio de FES era lavado com o produto da fermentação alcoólica anterior. Assim, para as fermentações sucessivas a extração das enzimas com soro não contribuiu para o aumento na produção de álcool. Os resultados

mostram que a utilização de soro hidrolisado com ácido sulfúrico para a extração do EEB aumentou a produção de etanol até 72 horas de fermentação (30,1 g/L), sendo que o aumento foi mais significativo até 48 horas (27,8 g/L). Este fato indica que compostos provenientes da hidrólise química do soro e das primeiras horas de fermentação foram acumulando no meio fermentativo e pode ter inibido a ação da levedura. Esta última hipótese pode ser confirmada pela redução no aumento da produção de etanol após 72 horas para todas as fermentações estudadas. Com utilização de soro hidrolisado obteve-se 30,1 g/L de etanol em 72 horas de fermentação, sendo que este mesmo valor foi obtido em 120 horas na ausência de soro. Este fato mostra que é possível obter concentrações de etanol próximas em fermentações sucessivas utilizando apenas água para extração do complexo enzimático na FES, quando adotou a técnica de fermentações sucessivas.

Comparando os resultados obtidos neste estudo com os da literatura observa-se que a produção de etanol obtida neste trabalho foi superior. Lever, Ho e Cord-Ruwisch (2010) utilizaram extratos bruto de celulasas produzidos por FES em palha de trigo e *Trichoderma reesei*, neste estudo, os rendimentos de celulase não foram altos, mas suficientes para produzir 6,7 g/L sem adição de biomassa e 21 g/L de etanol de palha de trigo na sacarificação e fermentação simultâneas com *Saccharomyces cerevisiae* e com adições de biomassa para 4 a 7 dias de fermentação alcoólica (fermentação do tipo batelada alimentada).

Sukumaran et al. (2010) demonstraram a aptidão de biomassa de aguapés para a produção de açúcares fermentáveis utilizando celulasas produzidas no local. Teste de ácido e os métodos de pré-tratamento alcalino indicaram que o pré-tratamento alcalino foi mais eficiente em fazer a amostra susceptíveis à hidrólise enzimática. A misturas de enzimas resultou em uma melhoria de sacarificação de 57% para 71%. A fermentação do hidrolisado enzimático utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae* produziu uma concentração de etanol de 4,4 g/L para 84 h de fermentação alcoólica.

Sukumaran et al. (2009) estudaram a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 7956 e palha de arroz hidrolisada com pré-tratamento alcalino e celulasas produzidas por FES, como resultados obtiveram 12,34 g/L de etanol, fermentado por 24 h, usando hidrolisado com concentração de 6% de açúcares redutores, a concentração de etanol mantendo-se em 12 g/L até 40 h de fermentação

alcoólica. Para o hidrolisado com 12% de açúcares redutores, a concentração de etanol foi 25,56 g/L, com fermentação alcoólica de 24 h.

Na literatura encontra-se também várias referências que mostram que a atividade celulósica da cepa selvagem coletada no Cerrado foi elevada (ver resultados apresentados na Tabela 4.2). Este fato justifica também, a boa atuação do complexo enzimático produzido na hidrólise da biomassa lignocelulósica e amilásica. Lever, Ho e Cord-Ruwisch (2010) estudaram um método simplificado de produção de celulase utilizando FES em palha de trigo e *Trichoderma reesei* em vez de preparações de enzimas comerciais. A melhor atividade em celulase, 0,75 e 1,2 FPU/gDS, foi obtida entre 10 e 14 dias de FES.

No estudo de Sukumaran et. al. (2009), celulases foram produzidas a partir de *Trichoderma reesei* Rut C30 e *Aspergillus niger* MTCC 7956 com biomassas de bagaço de cana, palha de arroz e aguapé, em 96h de FES para celulase e 72h para beta-glucosidase, obtendo 1,14 e 13,65 FPU/mL, respectivamente.

Bigelow e Wyman (2002) avaliaram a produção de celulase por *Trichoderma reesei* Rut C30 e bagaços agroindustriais pretratados com água quente, obtendo atividade enzimática de aproximadamente 0,8 e 1,2 FPU/mL para 120 e 200 horas de produção.

Cardona et al. (2014) obtiveram 26,1 g/L de etanol após 50h de processo de duas etapas (hidrólise enzimática seguida de fermentação alcoólica) com capim elefante na concentração de 38,5 g/L. O capim foi submetido a pré-tratamento alcalino e foi utilizado enzima comercial para a hidrólise enzimática.

Portanto os resultados apresentados neste estudo são promissores para a produção de etanol a partir de EEB de *Mucor racemosus Fresenius*.

4.8. Fermentações sucessivas de *Mucor racemosus Fresenius* e *Aspergillus niger*

Como o *Aspergillus niger* (I4) apresentou concentrações de etanol na primeira fermentação superior aos obtidos pelo *Mucor racemosus Fresenius* (item 4.6) foi realizado experimentos de fermentações alcoólicas sucessivas com o *A. niger*, adotando o mesmo procedimento mencionado anteriormente. A extração do complexo enzimático da FES foi realizado com água deionizada e 1% de *Tween* 80 e para a produção de etanol utilizou o procedimento descrito no item 3.3.2.2 com o meio MFA3. Para

comparação a Figura 4.11 apresenta os resultados das fermentações sucessivas empregando os dois fungos. Os resultados mostram que apesar da primeira fermentação alcoólica com o EEB do *A. niger* produzir uma quantidade de etanol 47% superior, a produção de etanol para as demais fermentações sucessivas foram aproximando-se e em 120 horas de fermentação a produção de etanol por *A. niger* foi apenas 7% maior. Estes resultados indicam que com o tempo de fermentação existem metabólitos da fermentação anterior que inibe a ação da enzima e/ou da levedura sobre o substrato, já que foi feito a reposição de enzima a cada 24 horas.

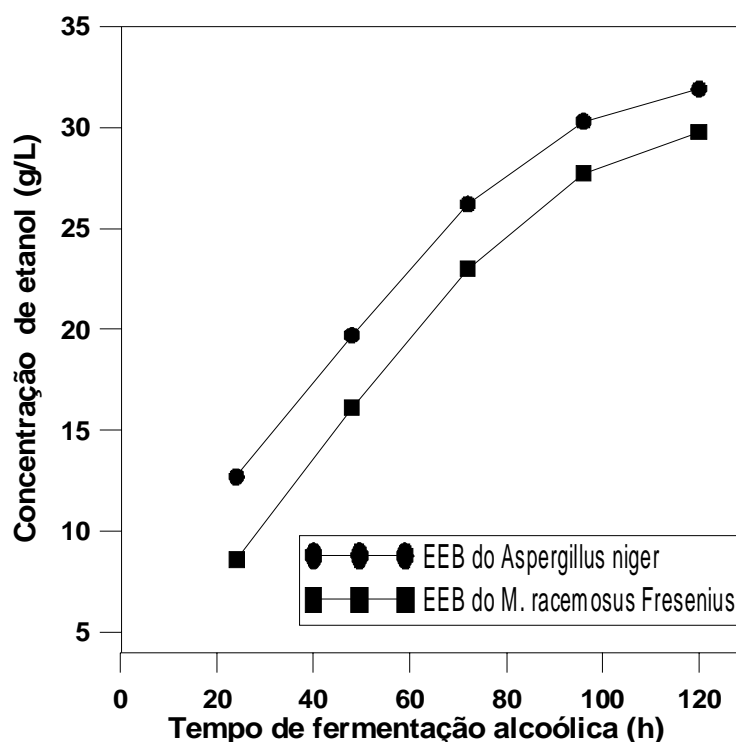


Figura 4.11 – Concentração de etanol em função do tempo de fermentações sucessivas empregando enzimas produzidas de *Aspergillus niger* e de *Mucor racemosus Fresenius*.

4.9. Misturas de complexo enzimático de *Mucor racemosus Fresenius* e *Aspergillus niger*

A Figura 4.12 descreve o resultado comparativo da produção de etanol com EEB de *M. racemosus Fresenius* e de *A. niger* (I4) nas situações de uso puro de extrato enzimático de cada fungo (extremos do eixo horizontal) e mistura de diferentes proporções de extrato enzimáticos brutos dos dois fungos conforme descrito no item 3.3.10.

Os resultados mostraram que com o aumento da percentagem volumétrica do complexo enzimático obtido do *A. niger* a produção de etanol aumenta, indicando que este complexo apresenta enzimas com maior capacidade de hidrolisar o substrato em estudo e que não houve sinergismos na mistura destes EEB, que proporcionasse aumento na produção de etanol.

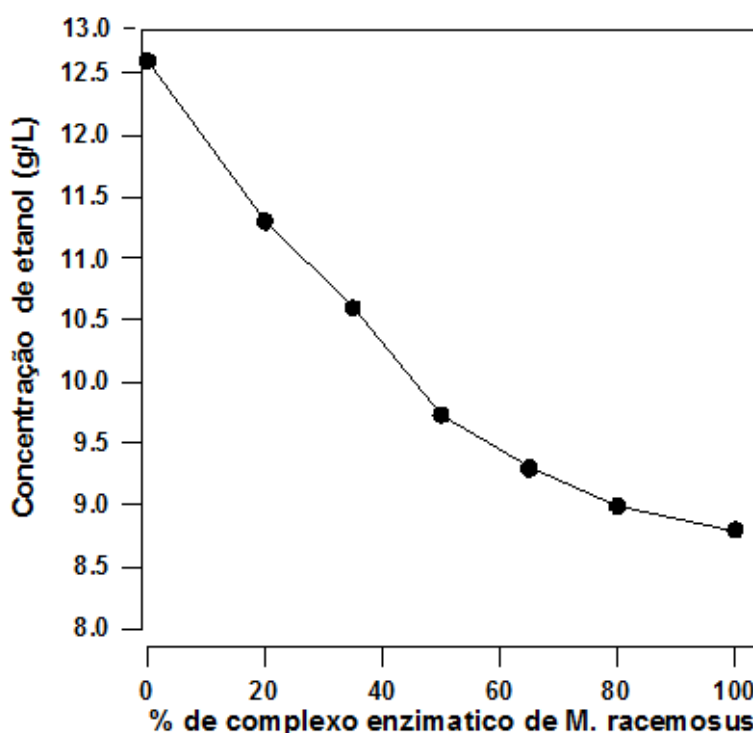


Figura 4.12 – Concentração de etanol produzida empregando mistura de complexo enzimático produzido de *M. racemosus* Fresenius e *A. niger* em porcentagem volumétrica.

4.10. Fermentação alcoólica batelada alimentada

Para comparação foi feito um experimento em batelada alimentada com *Aspergillus niger* (I4), utilizando para produção EEB o meio MPE4 e demais condições descritas no item 3.3.11. Para a fermentação alcoólica foi adicionado, a cada 24 horas, 25 g de meio MFA3, durante 72 horas. A Figura 4.13 apresenta os resultados obtidos para a produção de etanol em função do tempo de fermentação alcoólica utilizando fermentação batelada com adição de biomassa nos tempos inicial (0 horas), 24 horas e 48 horas. Para comparação foi apresentado novamente à produção de etanol utilizando as fermentações sucessivas. Nota-se que após 72 horas no processo batelada alimentada,

quando não há mais adição de biomassa, a concentração de etanol permaneceu constante, este fato indica que a hidrólise da biomassa pela enzima foi suficiente apenas para a manutenção da cultura e para a reposição de etanol, que pode ter sido perdida por evaporação.

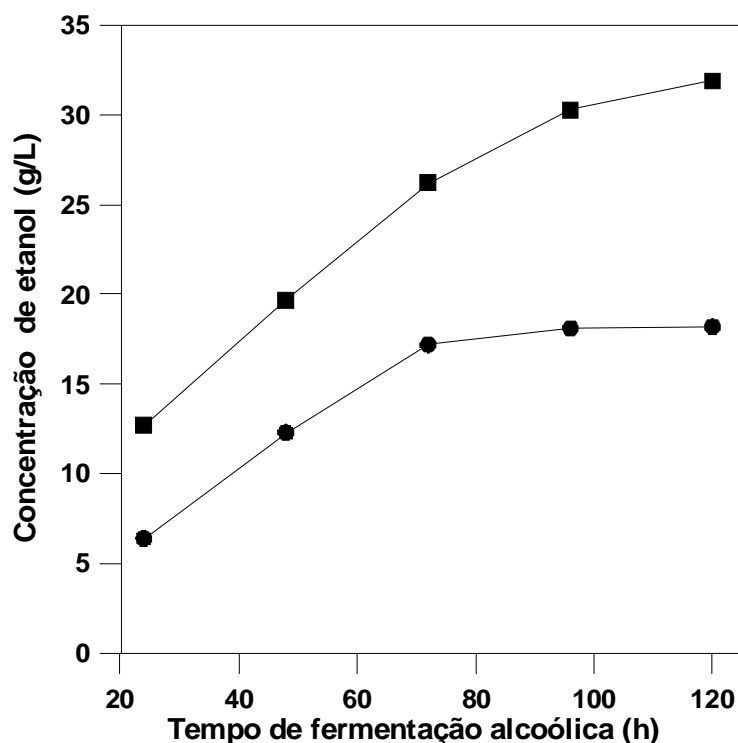


Figura 4.13 – Concentração de etanol em função do tempo de fermentações utilizando processo batelada alimentada e fermentação sucessiva, empregando enzimas do extrato enzimático bruto (EEB) produzidas por *Aspergillus niger*. (■) Fermentações sucessivas; (●) fermentação batelada alimentada.

Os resultados mostram que o aumento da concentração alcoólica com o tempo foi maior na fermentação sucessiva. Porém, como a fermentação batelada começou com o volume de 300 mL, a quantidade de etanol presente no meio fermentativo era maior. Por outro lado, quanto menor a concentração de etanol no meio mais caro é o processo de concentração do mesmo e os custos de separação geralmente são maiores do que os de produção, devido aos gastos de energia para a execução do mesmo.

4.11. Otimização da produção de etanol por rede neuronal e métodos heurísticos

Na Tabela 4.3 são apresentados, de forma simplificada, os resultados obtidos na escolha de neurônios associados à rede neuronal artificial (RNAs), a primeira

camada de neurônios (N_1) e segunda camada (N_2), na avaliação da concentração de etanol. Pode-se observar que a rede com quatro neurônios na primeira camada oculta e três neurônios na segunda camada oculta (Figura 4.14) representou de forma adequada a fermentação de etanol de segunda geração com explicação de 95% dos resultados obtidos ($R^2 = 0,95$).

Tabela 4.3 – Neurônios da primeira camada oculta (N_1), segunda camada oculta (N_2) e coeficiente de correlação (R^2) associada à RNA com as quantidades de neurônios N_1 e N_2 .

$N_1 = 4$ $N_2 = 1$ $R^2 = 0.8812329$	$N_1 = 5$ $N_2 = 1$ $R^2 = 0.8695715$	$N_1 = 6$ $N_2 = 1$ $R^2 = 0.8730392$
$N_1 = 4$ $N_2 = 2$ $R^2 = 0.9124276$	$N_1 = 5$ $N_2 = 2$ $R^2 = 0.9387282$	$N_1 = 6$ $N_2 = 2$ $R^2 = 0.935743$
$N_1 = 4$ $N_2 = 3$ $R^2 = 0.9504854$	$N_1 = 5$ $N_2 = 3$ $R^2 = 0.9335442$	$N_1 = 6$ $N_2 = 3$ $R^2 = 0.9427692$
$N_1 = 4$ $N_2 = 4$ $R^2 = 0.9247424$	$N_1 = 5$ $N_2 = 4$ $R^2 = 0.9459157$	$N_1 = 6$ $N_2 = 4$ $R^2 = 0.9440572$
$N_1 = 4$ $N_2 = 5$ $R^2 = 0.9496924$	$N_1 = 5$ $N_2 = 5$ $R^2 = 0.9389725$	$N_1 = 6$ $N_2 = 5$ $R^2 = 0.9463757$
$N_1 = 4$ $N_2 = 6$ $R^2 = 0.9328874$	$N_1 = 5$ $N_2 = 6$ $R^2 = 0.9460312$	$N_1 = 6$ $N_2 = 6$ $R^2 = 0.9288444$
$N_1 = 4$ $N_2 = 7$ $R^2 = 0.9292613$	$N_1 = 5$ $N_2 = 7$ $R^2 = 0.9452116$	$N_1 = 6$ $N_2 = 7$ $R^2 = 0.9434681$
$N_1 = 4$ $N_2 = 8$ $R^2 = 0.948688$	$N_1 = 5$ $N_2 = 8$ $R^2 = 0.9336244$	$N_1 = 6$ $N_2 = 8$ $R^2 = 0.9362667$
$N_1 = 4$ $N_2 = 9$ $R^2 = 0.9447483$	$N_1 = 5$ $N_2 = 9$ $R^2 = 0.9416804$	$N_1 = 6$ $N_2 = 9$ $R^2 = 0.9490291$
$N_1 = 4$ $N_2 = 10$ $R^2 = 0.943133$	$N_1 = 5$ $N_2 = 10$ $R^2 = 0.9416775$	$N_1 = 6$ $N_2 = 10$ $R^2 = 0.944224$

RNAs com uma ou duas camadas ocultas são usuais na descrição processos de Engenharia Química, sendo que na maioria dos casos, o número de neurônios por camada oculta inferior a 10 neurônios são resultados usuais na descrição da melhor arquitetura, como pode ser observada em diversos trabalhos da literatura (ZOLTAN, 2007; NAGY, 2002; SARACENO et al., 2010).

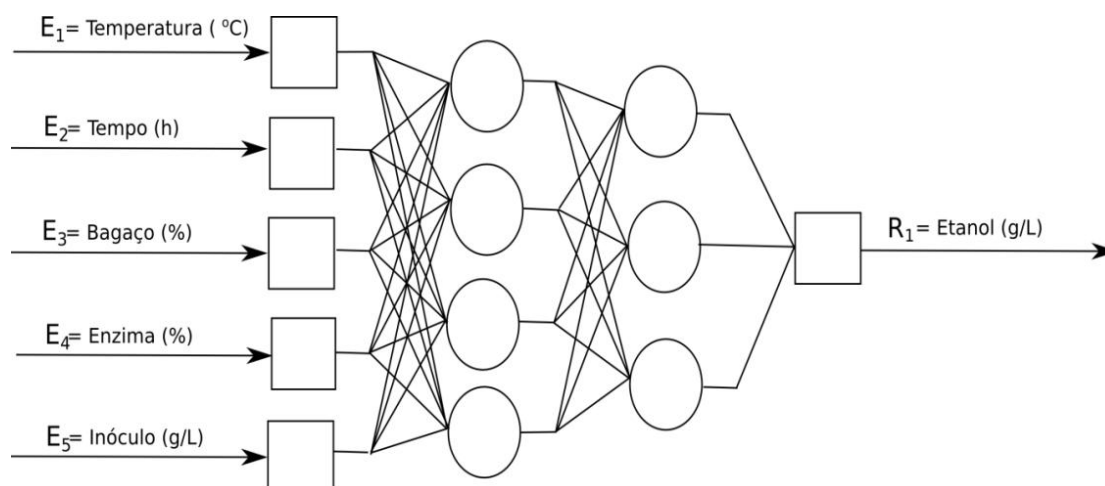


Figura 4.14 – Rede neuronal artificial na avaliação da produção de etanol de segunda geração de extrato enzimático bruto de *Aspergillus niger*.

Na Figura 4.15 é apresentada a distribuição dos resíduos associados à RNA, que mostra que estes se distribuíram de forma aleatória em relação ao erro nulo. Os valores preditos e experimentais obtidos na RNA, tanto na fase de treinamento quanto na fase de validação da rede, são apresentados no Apêndice A1.

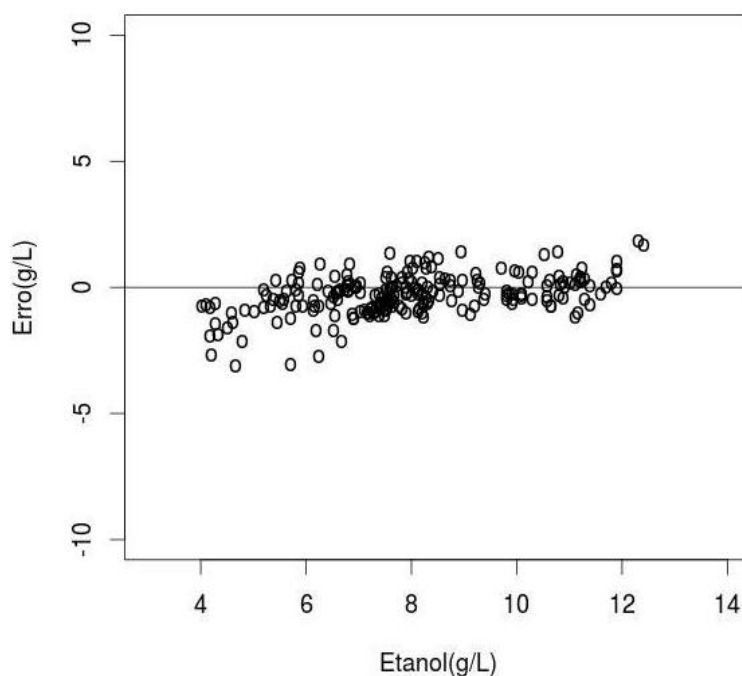


Figura 4.15 – Distribuição dos resíduos associados à validação e treinamento da RNA.

O fato da RNA explicar 95% dos resultados experimentais e apresentar erros distribuídos aleatoriamente faz com que a mesma possa ser usada na otimização das condições de produção de etanol. Na Tabela 4.4 são apresentados os valores de tempo de fermentação alcoólica, temperatura e concentração de enzima, inóculo e bagaço de cana associadas à otimização na produção de etanol, assim como a máxima concentração de etanol referentes à situação otimizada.

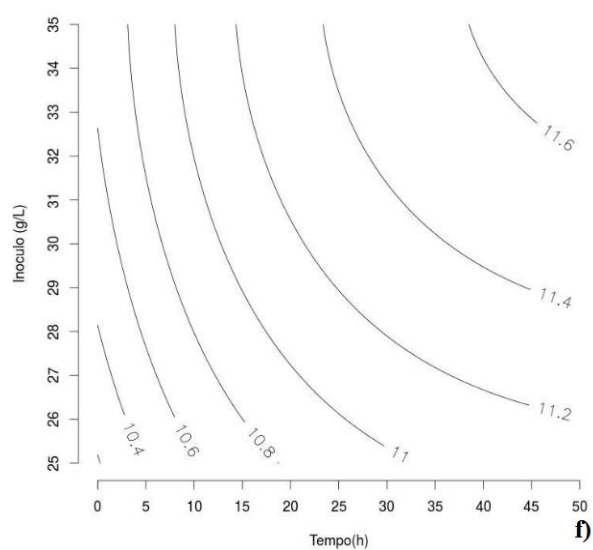
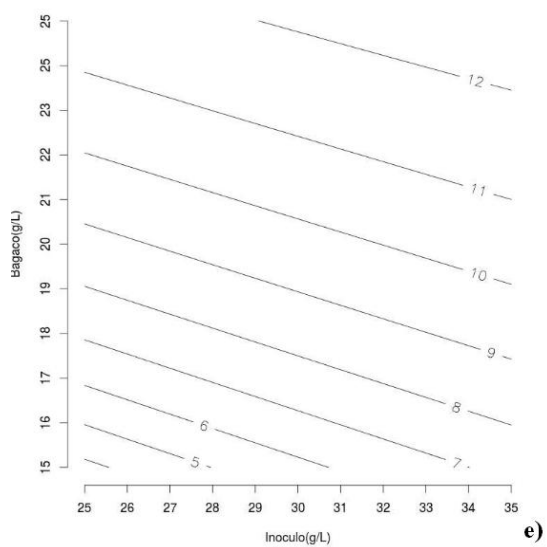
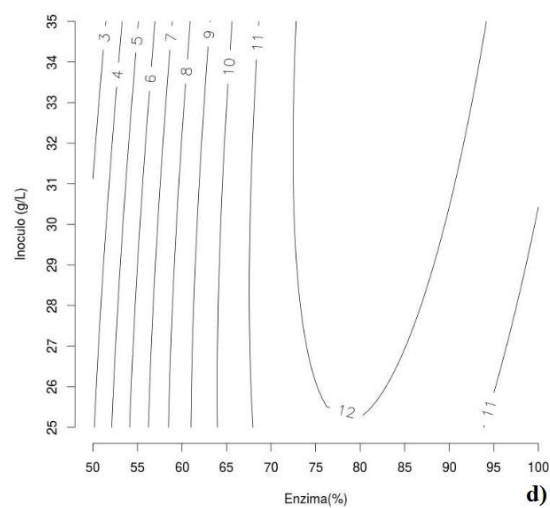
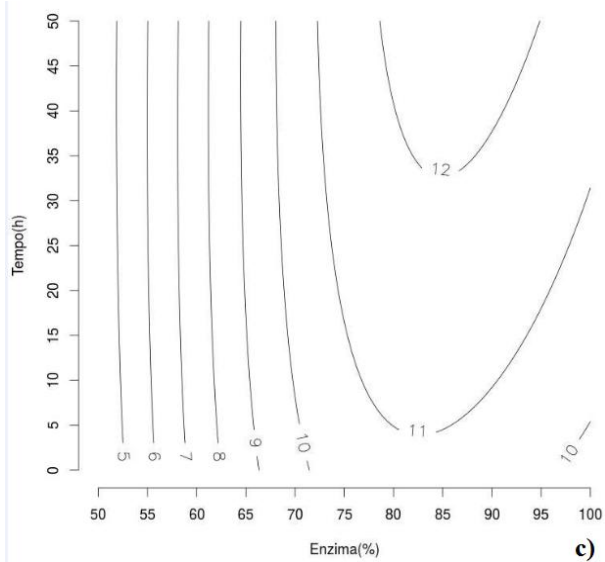
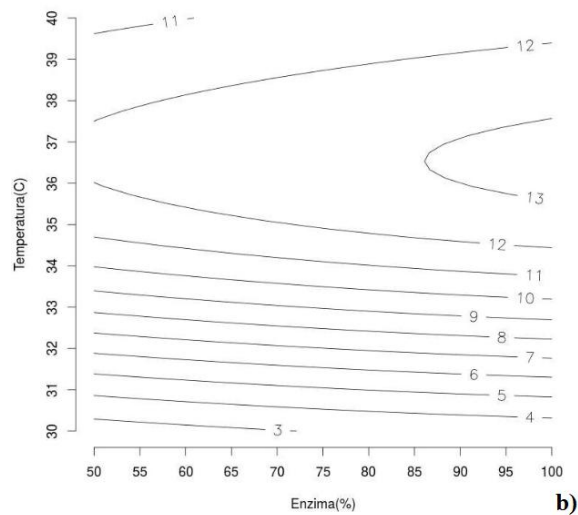
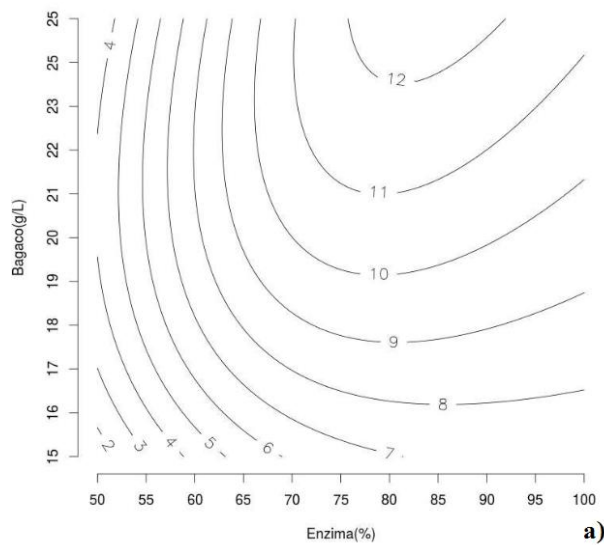
Tabela 4.4 – Resultado da otimização da produção de etanol.

Tempo (h)	T (°C)	EEB (%)	Inóculo (g/L)	BBS (%)	Etanol (%)
47	36,6	88,4	34,4	25	12,6

EEB: extrato enzimático bruto; Inóculo: *Saccharomyces cerevisiae* Y904; BBS: bagaço de cana baixa severidade.

Na Figura 4.16 são apresentados o comportamento da concentração de etanol associadas à condição otimizada. Como pode ser observado na Figura 4.16a a máxima concentração de etanol está associada à concentração de enzima diluída em água na concentração de 88,4% e concentração de bagaço próxima a quantidade que é possível dissolver no meio de fermentação alcoólica (25 %). Referente à temperatura, pode-se observar, Figura 4.16b, que a temperatura ótima (36,6°C) é próxima a temperatura ótima de fermentação alcoólica da *S. cerevisiae* (30 a 35°C) na produção de etanol de caldo cana-de-açúcar (E1G), ou seja, embora o complexo enzimático tenha temperatura ótima superior a 40°C e as células de levedura tenham capacidade de crescimento até 41°C (WATSON, 1987; XH et al., 2010) tem-se que as condições mais favoráveis ao rendimento de etanol na fermentação de celulose e sacarose são próximas.

Referente ao inóculo pode-se observar, Figura 4.16d, que embora a condição ótima de 34,4 g/L de células, tem-se que para concentrações de 27 a 35 g/L (*S. cerevisiae*) fornecem concentração de etanol superiores a 12 g/L, ou seja, próximas do ótimo.



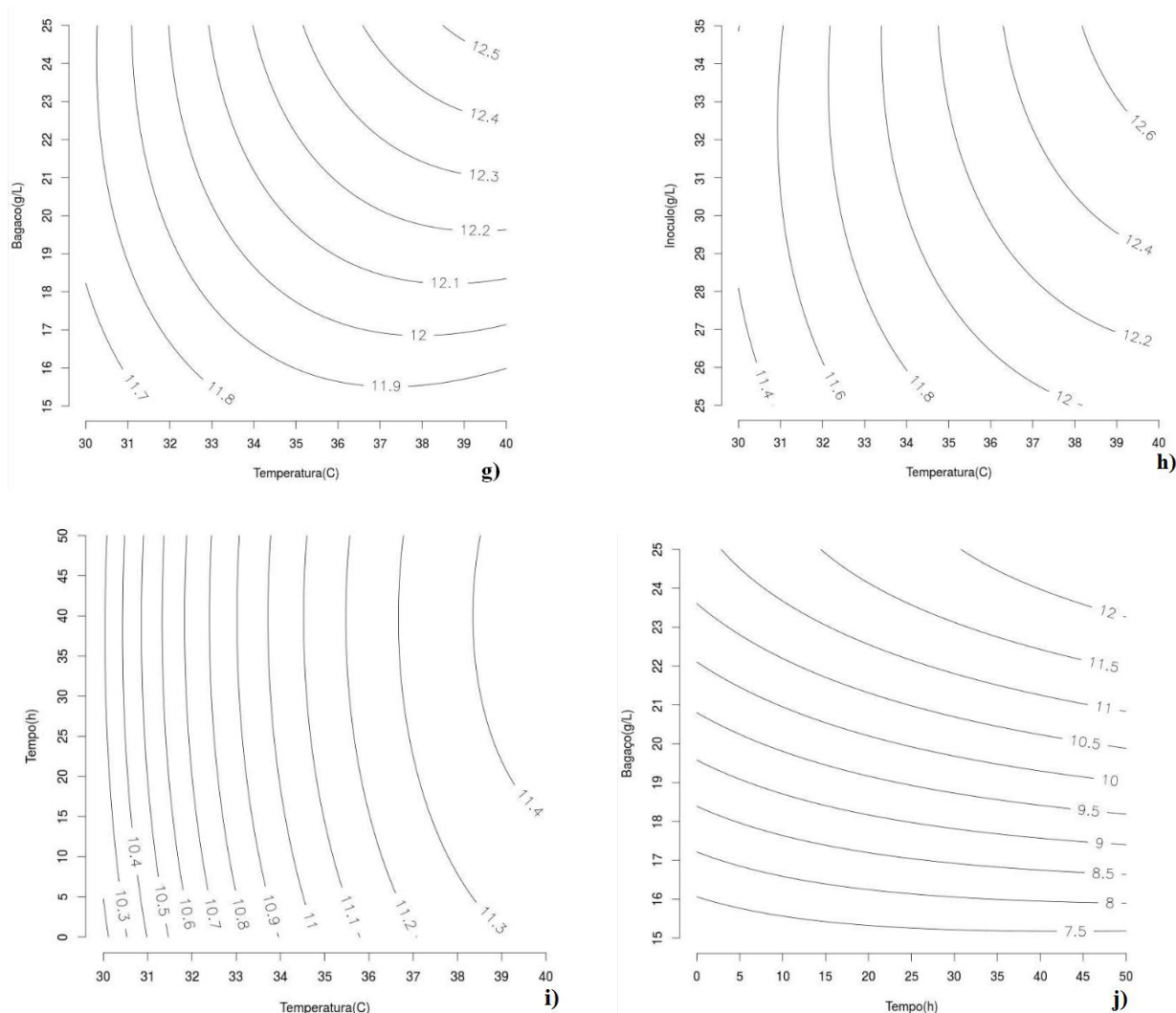


Figura 4.16 – Comportamento da concentração de etanol associadas à condição otimizada para as variáveis, tempo, temperatura de FA, quantidade de enzima, inóculo e bagaço de cana.

Na busca de nova condição para um tempo de 24 horas de fermentação alcoólica, como pode ser observado na Figura 4.16c, a concentração de etanol após 24 h corresponde a aproximadamente 11,85 g/L, ou seja, após este tempo de FA a conversão de celulose à etanol ocorre de forma lenta comparada com a observada nas 24 h iniciais do processo. Estes resultados estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Resultado da otimização da produção de etanol para 24h de processo.

Tempo (h)	T (°C)	EEB (%)	Inóculo (g/L)	BBS (%)	Etanol (%)
24	39,9	80,3	34,9	25	11,85

EEB: extrato enzimático bruto; Inóculo: *Saccharomyces cerevisiae* Y904; BBS: bagaço de cana baixa severidade.

4.12. Fermentação alcoólica de bagaço de cana por *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*

Na Tabela 4.6 são apresentados os resultados das fermentações em que se utilizou simultaneamente a levedura *Pichia stipitis* com *Saccharomyces cerevisiae* para pHs de 6,5, 5,5 e 4,5 e tempos de fermentação de 48 e 72 horas, tempo citado na literatura como adequado para fermentação de *Pichia stipitis* que exige tempos superiores aos utilizados para a *Saccharomyces cerevisiae* (FERREIRA, 2010; SILVA et al., 2012).

Tabela 4.6 – Produção de etanol para a fermentação alcoólica (FA) utilizando de forma simultânea a *Pichia stipitis* com *Saccharomyces cerevisiae* para os tempos de fermentação de 48 e 72 horas utilizando os pHs de 6,5, 5,5 e 4,5.

Componentes	EEB	Tempo de FA 48 h			Tempo de FA 72 h		
		pH 6,5	pH 5,5	pH 4,5	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,5
g/L							
Glicose	3,20	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	1,67	1,3
Xilose	1,95	5,49	4,57	5,33	1,05	3,37	5,18
Manose	0,368	2,63	2,25	2,43	1,83	1,08	2,30
Arabinone	0,278	2,58	3,45	3,6	2,52	1,49	2,69
Etanol	-	12,81	9,38	12,1	12,7	9,25	12,2

Os resultados (Tabela 4.6) mostram que nos pHs de 6,5 e de 4,5 em que a *Pichia stipitis* e a *Saccharomyces cerevisiae* apresentam maiores produção de etanol, respectivamente, a produção de etanol foi 5,5% maior que o valor obtido quando se utiliza apenas *S. cerevisiae*. Por outro lado, o não aumento na concentração de etanol produzido em relação aos experimentos que utilizou apenas *S. cerevisiae*, pode ser devido a maior utilização de açúcares para manutenção celular. Para tempo de fermentação de 72 horas observa-se que houve uma redução nos valores de pentoses

presentes no caldo, mas estes açúcares foram utilizados para a manutenção da biomassa, porque não houve redução na concentração de célula de *S. cerevisiae* no inóculo e houve adição de mais células proveniente da *P. stipitis*. Este fato confirma a hipótese mencionada anteriormente.

Na Tabela 4.7 podem ser observados os resultados das fermentações alcoólicas em que se utilizou inicialmente a *S. cerevisiae* por 24 horas de fermentação em pH 4,5 e a seguir a *Pichia stipitis* por 48 horas utilizando o pH de 6,5. A Tabela 4.8 apresentam os resultados das fermentações alcoólicas em que se utilizou inicialmente a *Pichia stipitis* por 48 horas de fermentação em pH 6,5 e a seguir a *S. cerevisiae* por 24 horas utilizando o pH de 4,5.

Tabela 4.7 – Concentrações dos diferentes constituintes de meio para fermentação alcoólica (FA) com a *S. cerevisiae* por 24 h, seguida pela adição de *Pichia stipitis* e 48 horas de fermentação.

	<i>S. cerevisiae</i> – tempo de FA 24h	<i>Pichia stipitis</i> – tempo de FA 48 h
	g/L	
Celobiose	-	-
Xilose	3,5 ± 0,4	-
Manose	3,1 ± 0,2	0,22 ± 0,4
Arabinose	3,3 ± 0,4	0,38 ± 0,3
Etanol	13,1 ± 0,2	15,3 ± 0,2

Tabela 4.8 – Concentrações dos diferentes constituintes de meio para fermentação alcoólica com a *Pichia stipitis* por 48 h, seguida pela adição de *S. cerevisiae* e 24 h de fermentação

	<i>Pichia stipitis</i> – tempo de FA 48h	<i>S. cerevisiae</i> – tempo de FA 24h
	g/L	
Celobiose	-	-
Xilose	-	-
Manose	0,20 ± 0,3	0,19 ± 0,2
Arabinose	0,55 ± 0,2	0,53 ± 0,3
Etanol	12,6 ± 0,1	12,5 ± 0,1

Os resultados (Tabela 4.7 e 4.8) mostram que a produção de etanol quando se utiliza *S. cerevisiae* como fermentação inicial é 18,7% superior a fermentação iniciada com *P. stipitis* e que com a redução na concentração das pentoses com a adição da

Pichia stipitis foi possível verificar que atuação da rota metabólica desta última estava voltada para a fermentação das pentoses na produção de etanol. Tal fato pode ser explicado pelo comportamento diáuxico da *P. stipitis* que faz com que na abundância de glicose ela venha à só utilizar pentoses ao esgotamento da glicose. Portanto nas condições realizadas nesse estudo a adição de *Pichia stipitis* não promoveu aumento substancial na produção de etanol (GROOTJEN, 1991; LIN et al., 2012).

Gupta, Sharma e Kuhad (2009) estudaram a produção de etanol celulósico, utilizando como matéria-prima a *Prosopis juliflora* (arbusto espinhoso comum da vegetação do semi-árido) e as leveduras *Pichia stipitis* NCIM 3498 para a fermentação das pentoses e *Saccharomyces cerevisiae* para fermentação das hexoses. O hidrolisado hemicelulósico contendo 18,24 g/L de açúcares, quando fermentada com *P. stipitis* produziu 7,13 g/L de etanol, após 24 h. Para a fermentação de hidrolisado celulósico (37,47 g/L), utilizando *S. cerevisiae*, obteve 18,52 g/L de etanol, após 16 h.

Lin et al. (2012) estudaram a produção de etanol, em escala piloto, de palha de arroz hidrolisado, utilizando levedura fermentadora de pentoses, *Pichia stipitis*. A maior produção de etanol foi $0,44 \pm 0,02$ g/g para hidrolisado neutralizado com NaOH, segundo estes pesquisadores o estudo demonstrou o potencial para a produção de etanol a partir da palha de arroz via fermentação da xilose.

4.13. Processos Hidrólise separada da fermentação alcoólica

As Tabelas 4.9 e 4.10 mostram a concentração de celobiose, xilose, manose, arabinose, proteína e etanol no extrato enzimático bruto e após fermentação alcoólica por 24 horas com e sem a presença da biomassa durante a FA, respectivamente, isto é, num processo a biomassa permanecia no meio de FA e no outro a biomassa foi retirada para realizar a FA.

Os resultados mostram que não há necessidade de manter a biomassa celulósica durante a FA, já que os valores de produção de etanol foram próximos e no caso da hidrólise em pH de 4,5 a produção de etanol foi maior para a fermentação alcoólica sem a presença da biomassa celulósica. Outro fato interessante é que houve aumento na concentração das pentoses durante a fermentação alcoólica em todos os pHs analisados, mostrando que a hidrólise da biomassa continuava durante a FA.

Tabela 4.9 – Hidrólise separada da fermentação alcoólica (mantendo o bagaço de cana após hidrólise, fermentando caldo hidrolisado e substrato).

	Hidrólise pH = 4,0		Hidrólise pH = 4,5		Hidrólise pH = 5,0		Hidrólise pH = 6,0	
	EEB	Após FA	EEB	Após FA	EEB	Após FA	EEB	Após FA
	g/L							
Celobiose	0,34	1,49	0,70	1,93	0,36	1,87	0,23	0,69
Xilose	0,43	14,1	9,02	11,5	1,13	14,2	1,06	14,4
Manose	-	-	-	1,8	-	0,52	-	-
Arabinose	0,45	1,67	0,42	1,80	-	-	0,25	-
Proteína	8,5	-	9,2	-	9,1	-	9,9	-
Etanol	-	15,2	-	15,7	-	13,9	-	13,4

EEB = extrato enzimático bruto; FA = fermentação alcoólica.

Tabela 4.10 – Hidrólise separada da fermentação alcoólica (retirando o bagaço de cana após hidrólise, fermentando apenas o caldo hidrolisado).

	Hidrólise pH = 4,0		Hidrólise pH = 4,5		Hidrólise pH = 5,0		Hidrólise pH = 6,0	
	EEB	Após FA	EEB	Após FA	EEB	Após FA	EEB	Após FA
	g/L							
Celobiose	0,62	0,971	0,71	1,49	0,43	0,77	0,21	0,77
Xilose	0,57	9,89	5,86	5,50	0,97	4,75	1,17	5,41
Manose	-	-	-	0,72	-	0,12	-	-
Arabinose	-	1,63	0,68	1,82	-	-	0,22	5,05
Proteína	8,5	-	9,7		9,3	-	10,3	-
Etanol	-	15,3	-	16,8	-	14,2	-	13,8

EEB = extrato enzimático bruto; FA = fermentação alcoólica.

Observa-se também (Tabela 4.9 e 4.10) que a concentração das pentoses no processo em que manteve-se a biomassa durante a FA foi menor, indicando que a presença da biomassa pode ter comprometido a ação da enzima devido a dificuldades difusionais e de contato entre as enzimas e os substratos, por outro lado, se houvesse

levedura capaz de hidrolisar as pentoses provavelmente a quantidade de etanol produzida fosse maior. Comparando os resultados obtidos com a hidrólise simultânea, pode-se afirmar que apesar do pH 4,5 ser bom para ambos os casos, a produção de etanol na hidrólise separado foi 32,3% maior (16,8 g/L). Este fato pode estar relacionado ao maior tempo de hidrólise e ou ao maior controle das variáveis quando se utiliza à hidrólise separada da fermentação alcoólica.

4.14. Processos de purificação do complexo enzimático produzido por cepa selvagem de *A. niger*

A Figura 4.17 representa os resultados de purificação por sistema aquoso bifásico (SAB) por polietileno glicol e citrato de sódio em diferentes condições de massa molecular (item 3.3.15.1.).

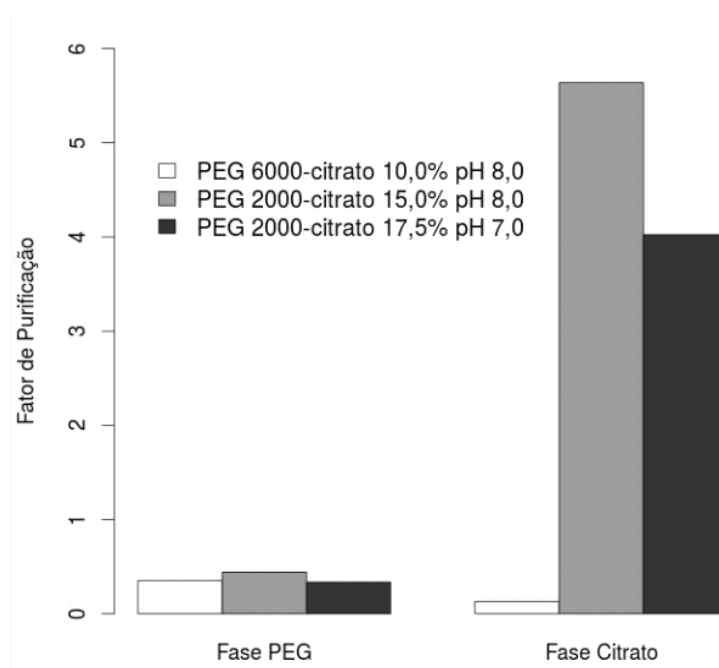


Figura 4.17 – Fator de purificação para o sistema PEG/Citrato de sódio.

Pode-se observar (Figura 4.17) que a melhor condição de purificação ocorre na fase citrato para menor massa molecular de PEG. Estes resultados são coerentes com os obtidos por Herculano et al. (2012) que utilizaram PEG 3350 e 8000 com 17,5% de citrato de sódio e pH 7,0 em SABs para purificar complexo celulolítico produzidos por *Aspergillus japonicus* URM5620. Assim estas condições adicionais de menor massa

molecular de PEG foi utilizada em ensaios posteriores, apresentados na Figura 4.18 que também forneceram melhor purificação na fase citrato.

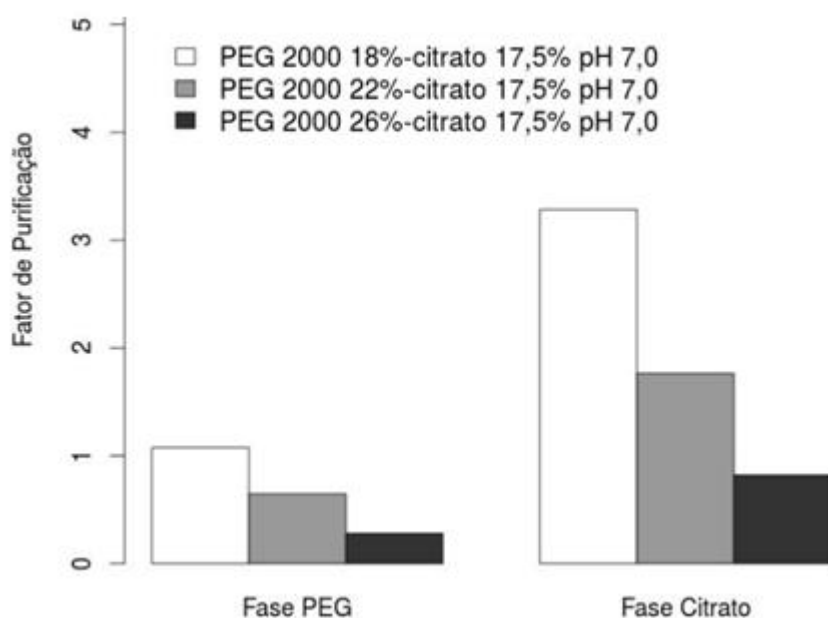


Figura 4.18 – Fator de purificação para o sistema PEG 2000 g/mol e citrato de sódio.

Na Figura 4.19 são apresentados resultados da avaliação da purificação pelo uso de sulfato de amônio, é possível observar que a purificação com sulfato de amônio nas condições testadas não teve efeito como o observado com o sistema de duas fases PEG e citrato (Figuras 4.17 e 4.18). Também é possível observar que os melhores resultados foram obtidos para concentração de 40 e 50 % de sulfato de amônio.

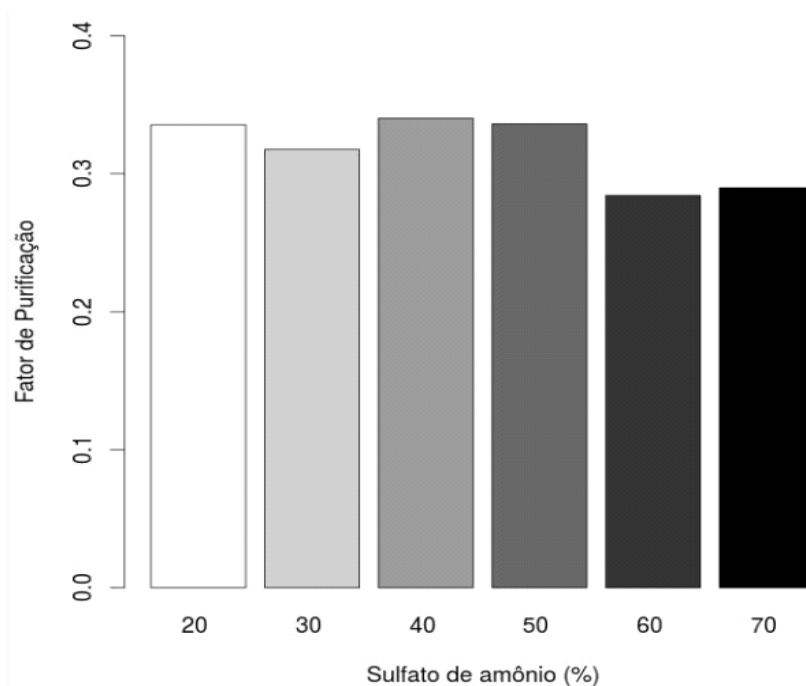


Figura 4.19 – Fator de purificação para sulfato de amônio.

Na Tabela 4.11 são apresentadas as concentrações de etanol obtidas pelo uso de complexo enzimático purificado e uso de sulfato de amônio nas melhores condições apresentadas na Figura 4.19 e em condições de PEG 2000 g/mol, Figura 4.18. Pode-se observar que entre as condições testadas a purificação em sistema bifásico se mostrou superior a purificação em sulfato de amônio.

Tabela 4.11 – Produção de etanol dos complexos enzimáticos purificados.

Experimento	Etanol (g/L)
Extrato enzimático bruto (controle)	12,53
18% PEG 2000	Fase PEG: 8,01/ Fase Citrato: 13,54
22% PEG 2000	Fase PEG: 5,62/ Fase Citrato: 7,34
26% PEG 2000	Fase PEG: 8,35/ Fase Citrato: 5,76
40 g sulfato/g EEB	12,82
50 g sulfato/g EEB	11,81
60 g sulfato/g EEB	9,94

Os resultados (Tabela 4.11) também indicam que as enzimas no complexo enzimático bruto atuam de forma econômica e eficiente, pois a diferença na concentração de etanol final entre a catálise de complexo concentrado e bruto foi, nas melhores condições, inferior a 8,1% (comparação entre os ensaios controle e 18% PEG 2000 (Experimento 4). Nota-se que a maioria das técnicas utilizadas para purificação, proporcionaram uma redução na produção de etanol. Este comportamento pode estar relacionado a inativação ou a perda de enzimas importante para a hidrólises dos açúcares durante o processo de purificação, já que o processo de hidrólise é bastante complexo e envolve várias enzimas e substratos.

A Tabela 4.12 mostra as concentrações de açúcares, proteína, *FPase* e etanol obtidos nas concentrações à 50 e 60°C por evaporação a vácuo em Rotaevaporador. Nestes ensaios, os fatores de purificação obtidos foram 0,77 (50°C) e 0,74 (60°C). Os resultados mostram que com a evaporação a vácuo houve aumento na concentração dos açúcares e de proteína, associadas a perda de água no processo. Para temperatura de 60 °C foi observado uma maior concentração de etanol e açúcares que a de 50 °C, que pode ser explicada pelo fato da condição de 60°C apresentar maior concentração inicial de glicose. Outro fato que reforça esta explicação é que nos dois casos o fator de purificação foi praticamente o mesmo, assim pode se concluir que tanto pela purificação quanto pelo teor de etanol final, o aumento da temperatura de 50°C para 60°C é responsável por reduzir o tempo de concentração sem reduzir o teor de etanol.

Tabela 4.12 – Concentração de extrato enzimático em Rotaevaporador à temperatura de 50 e 60°C.

	Temperatura 50°C			Temperatura 60°C		
	Antes do rota.	Depois do rota.	Após FA	Antes do rota.	Depois do rota.	Após FA
Glicose (g/L)	2,13	3,15	-	2,79	5,43	-
Xilose (g/L)	0,94	1,25	2,99	0,929	1,96	3,10
Arabionose (g/L)	0,18	0,25	3,82	0,336	1,14	4,29
<i>FPase</i> (U/g)	3,4	4,7	-	3,3	4,6	-
Proteína (g/L)	7,2	13,1	-	6,8	12,6	-
Etanol (g/L)	-	-	19,8	-	-	20,6

O aumento na quantidade de etanol foi superior a quantidade de etanol produzida pelos açúcares proveniente da concentração. Este fato mostra que o aumento na concentração de etanol foi devido ao aumento na concentração de enzima no extrato enzimático e/ou ao aumento nas atividades das enzimas presentes no mesmo. A concentração de etanol de 20,6 g/L e de 19,8 g/L para a temperatura de 60 e 50°C, respectivamente utilizando o processo de rotaevaporação foi a maior obtida neste estudo para um processo realizado com uma única fermentação. Este fato mostra que este processo deve ter sido o que causou menor perda de atividade enzimática e ou menor perda de enzima no processo de concentração das enzimas presentes no extrato enzimático bruto.

Com base no exposto até o momento, tem-se que os resultados obtidos neste estudo foram satisfatórios, pois possibilitaram caminhos promissores na produção de etanol de segunda geração, com aproveitamento de resíduos agroindustriais, os quais têm baixo custo e são abundantes no Brasil e localmente, seu aproveitamento reduz os impactos de poluições ambientais e contribui com ampliação da matriz energética brasileira e sustentabilidade do processo de produção de etanol. Outro ponto que merece destaque é a potencialidade das cepas selvagens selecionadas, com destaque para *Aspergillus niger* e *Mucor racemosus Fresenius*, a última ainda pouco estudada na produção de celulasas e bioetanol, ressaltando a importância do trabalho de coleta e seleção de microrganismos, o qual proporcionou um banco de microrganismos promissores na produção de enzimas.

Os resultados obtidos também têm significância na ampliação do conhecimento do uso de soro de queijo, outro resíduo gerado em grande escala e que necessita destino adequado, em fermentações conjuntas com bagaço de cana destinadas à produção de etanol e aproveitamento desta biomassa. As estratégias de produção de complexos enzimáticos brutos produzidos por fermentação em estado sólido de resíduos agroindustriais e fungos selvagens previamente selecionados foram bem sucedidas na produção de E2G, pois representam o desenvolvimento de tecnologias nacionais em todas as etapas da cadeia produtiva, ou seja, a produção das enzimas e do biocombustível, o que contribuiu para a redução dos custos de produção e viabilidade econômica. Portanto, o desenvolvimento deste projeto tem fundamental importância na

produção de energia renováveis, contribuindo no contexto ambiental e econômico e social.

O desenvolvimento desta tese faz parte do Projeto CNPq Edital 46/2009-Linha 1: Etanol/Processo nº 550940/2010-3, este estudo possibilitou avanços nas pesquisas de produção de complexos enzimáticos destinados a hidrólise de biomassa lignocelulósicas para produção de E2G, a execução do mesmo, passou por todas as etapas da cadeia produtiva deste biocombustível, desde a coleta, seleção e manutenção de fungos com potencial celulolítico, depois o desenvolvimento dos extratos de enzimas, hidrólise enzimática, culminando com as estratégias de produção de etanol celulósicos e otimização do processo.

Com certeza a pesquisa foi inovadora, criativa e interessante, possibilitando assim, o conhecimento científico e domínio de todo o processo produtivo, formando profissionais na área acadêmica, de pesquisa e também industrial. Os discentes envolvidos, alunos de doutorado, mestrado, e iniciação científica, aprimoraram seu conhecimentos no laboratório no desenvolvimento das pesquisas, estiveram envolvidos na leitura de artigos científicos, e puderam participar de congressos regionais, nacionais e internacionais relacionados ao tema de pesquisa, podendo trocar conhecimentos e experiências com a comunidade acadêmica e científica brasileira e mundial, permitindo à disseminação do conhecimento. As publicações geradas estão descritas no Apêndice (A2).

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Entre as 71 amostras de fungos coletadas no Cerrado do Triângulo Mineiro, 61 apresentaram atividades em celulase, destas, as que tiveram maior destaque na produção de etanol foram as cepas selvagens identificadas como *Mucor racemosus* Fresenius e *Aspergillus niger*, ressaltando a importância do trabalho de coleta e seleção, o qual proporcionou um banco de microrganismo promissores na produção de enzimas e bioetanol de segunda geração;
- Na produção de extrato enzimático bruto (EEB) por fermentação sólida por *M. racemosus* Fresenius o uso de bagaço de cana com complementação de farelo de arroz e 40 BBS é um meio adequado, sendo que a proporção de 60% de farelo e tempo de FES de 72h representa a condição mais adequada entre as estudadas;
- Na fermentação alcoólica (FA) de etanol de bagaço de cana com a combinação de proporções distintas de bagaço tratado de explosão a vapor na condição de baixa, alta severidade e bagaço não tratado favorece a produção de maior quantidade de etanol que o uso de apenas bagaço de baixa ou de alta severidade. Para tais fermentações os tempos de 24h e 48h se destacam como tempos ideais para o processo;
- Na produção de etanol de complexos enzimáticos brutos é possível melhorar a produção de etanol pela extração das enzimas do meio de FES pelo uso de soro de queijo em substituição ao tradicional método de solução de *Tween*, sendo que a hidrólise ácida deste soro contribuiu no rendimento de etanol;
- Concentrações de etanol superiores a 30 g/L podem ser obtidas sem a concentração de açúcares pelo uso de diferentes estratégias de alimentação de bagaço e enzimas em processo fermentação sucessivas e batelada alimentada. Sendo que o microrganismo *A. niger* se destacou mais que o *M. racemosus* Fresenius nestas fermentações;
- A otimização das condições de fermentação alcoólica com hidrólise simultânea à fermentação, temperatura, proporção de extrato enzimático bruto, quantidade de inóculo e bagaço de cana, mostram que a diluição do extrato enzimático (88,4%)

e uso de temperatura de 36,6°C com teor de bagaço de 25% gerou resultados mais satisfatórios (12,6%) que as fermentações em temperaturas próximas a de hidrólise da celulose (50°C) e que em temperaturas próximas a ótima da FA de sacarose (30 a 35°C);

- A formação de pentoses ao longo da fermentação de etanol de segunda geração favorece o aumento da concentração final de etanol pelo uso de *Pichia stipitis* e *Saccharomyces cerevisiae* em duas etapas, sendo primeiramente a *S. cerevisiae* e na segunda etapa a levedura fermentadora de pentoses, aumentou em 5,5% a produção de etanol quando comparado a apenas a utilização da *S. cerevisiae*;
- A produção de etanol de bagaço de cana com hidrólise separada da fermentação com ajuste de melhores condições para cada uma das etapas (hidrólise e fermentação) favorece maior concentração final de etanol (18,6 g/L) que o uso das condições otimizadas na fermentação simultânea a hidrólise;
- Entre os métodos de concentração de sistemas aquosos bifásicos, precipitação salina com sulfato de amônio e método de evaporação parcial da fase aquosa a vácuo, testados na concentração dos extratos enzimáticos de *A. niger*, tem-se que a evaporação a vácuo apresentou os melhores resultados de etanol (20,6 g/L) em uma única fermentação alcoólica, a temperatura de concentração de 60°C é mais indicada que a 50°C por reduzir o tempo do processo;
- Os resultados obtidos neste estudo foram satisfatórios, pois demonstram caminhos promissores para a produção de etanol de segunda geração, aproveitamento de resíduos agroindustriais, os quais têm baixo custo e são abundantes e pela potencialidade das cepas selvagens selecionadas.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Estudar mais profundamente o processo de hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica; a concentração dos extratos enzimáticos por evaporação a vácuo, e a utilização de *Pichia stipitis* na fermentação alcoólica (FA).
- ✓ Produzir E2G, utilizando os extratos enzimáticos concentrados em rotaevaporador, realizar a hidrólise enzimática do bagaço de cana e na sequência realizar a fermentação alcoólica com as leveduras *S. cerevisiae* e *P. stipitis*;
- ✓ Estudar a produção de extratos enzimáticos com as outras cepas selvagens selecionadas (teste índice enzimático em celulase) neste trabalho e consórcio das mesmas na produção de etanol celulósico;
- ✓ Investigar processos de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar tratado de explosão a vapor, bem como testar outros tipos de pré-tratamento de abertura de fibras, em conjunto com a explosão a vapor.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H.; HIOL A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 968–975, 2002.

ABDEL-HAFEZ, S. I. I.; MOHARRAM, A. M.; EL-SAID, A. H. M.; SALEEM, A. **Effect of two insecticides (Spakill and Tafaban) on incidence, growth and some enzymes production of fungi of maize plants in Upper Egypt**. Proc. of the 8th Arab Congress of Plant Protection, Omar Al-Mukhtar University, El-Beida, Libya, 2003.

ABIQ, Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Disponível em: <<http://www.abiq.com.br/>>. Acesso em: 30/12/13.

AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G.; TORRY-SMITHE, M.; WENGER, K. S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2333-2336, 2006.

AGEITEC, 2014. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/informacao-tecnologica/agencia>> Acesso em: 15/04/14.

AGUILAR, O.; ALBITER, V.; SERRANO-CARREON, L.; RITO-PALOMARES, R. J. **Chromatography. B** 835 77–83, 2006.

ALAM, M. D. Z.; MAMUN, A. A.; QUDSIEH, I. Y.; MUYIBI, S. A.; SALLEH, H. M.; OMAR, N. M. Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 61-64, 2009.

ALMEIDA, H. F. D. **Estudo da estabilidade térmica e bária da levedura *Pichia stipitis***. Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro, Departamento de Química, 100p, 2009.

ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, V. M.; SETTE, L. D.; SILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 161, p. 333-346, 2010.

AMORE, A.; FARACO, V. Potential of fungi as category I Consolidated BioProcessing organisms for cellulosic ethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3286– 3301, 2012.

ANDRIETTA, M.G.S, ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A.. Bioetanol – 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, Campinas, v.109, n. 1299, p. 195-200, 2007.

ANUPAMA, A; RAVINDRA, P. Studies on Production of Single Cell Protein by *Aspergillus niger*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 1, p. 79 - 88, 2001.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, 2010.

ASWATHY, U. S.; SUKUMARAN, R. K.; DEVI, G. L.; RAJASREE, K. P.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Bio-ethanol from water hyacinth biomass: An evaluation of enzymatic saccharification strategy. **Bioresource Technology**, v. 101 (3), p. 925–930, 2010.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 25, p. 551-553, 2008.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fung**, 4th ed., The American Phytophthological Society, St Paul, MN, USA, 1999.

BASSANI, G.; FUCIÑOS, P.; PICÓ, G.; FARRUGGIA, B. *Candida rugosa* lipase Lip1-polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 532-537, 2010.

BAUGHMAN, D. R.; LIU, Y. A. Neural Networks in Bioprocessing and Chemical Engineering. **Academic Press**, p. 488, 1995.

BINOD P., KUTTIRAJA M., ARCHANA M., USHA J.K., SINDHU R., SUKUMARAN R.K., PANDEY A. High temperature pretreatment and hydrolysis of cotton stalk for producing sugars for bioethanol production, **Fuel** 92, 340-345, 2012.

BERLIN, A., GILKES, N., ARWA, K. Appl. **Biochemical Biotechnology**, p. 121–124, p. 163-170, 2005.

BIGELOW, M.; WYMAN, C. E. Cellulase production on bagasse pretreated with hot water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 100, p. 921-934, 2002.

BON, E. P. S. **Enzimas industriais: política e gestão**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5. Brasília. Anais. Brasília, DF, 2002.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**, Ed. Interciência, p. 506, Rio de Janeiro, 2008.

BONNET, J. L.; BOGAERTS, P.; BOHATIER J. Biological treatment of whey by *Tetrahymena pyriformis* and impact study on laboratory - scale wastewater lagoon process. **Chemosphere**, v. 38, n. 13, p. 2979-2993, 1999.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulósicos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BOSS, E. A. **Modelagem e otimização do processo de liofilização: aplicação para leite desnatado e café solúvel**. 2004. 129 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BRASIL Leis, decretos, etc. **Instrução Normativa** nº 13 de 29 de junho de 2005. Diário Oficial da União. Brasília, 30 de junho de 2005.

BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry**. New York: Interscience, 377p., 1967.

BRUGNAGO, R. J.; SATYANARAYANA, K. G.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. The effect of steam explosion on the production of sugarcane bagasse/polyester composites. **Applied Science and Manufacturing**, v. 42, p. 364-370, 2011.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, Courier Companies, Inc, Rockville, MD, 3rd ed., 2001.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal Applied. Microbiology**, v. 93, p. 1020-1025, 2002.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F., FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; e SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, V. 2012 (2012), 15 p.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrates. Research**, v. 337, p. 1291-1296, 2002.

CARDONA, E.; RIOS, J.; PENÃ, J.; RIOS, L. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. **Fuel**, v. 118, p. 41–47, 2014.

CARDORNA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4756-4766, 2010.

CARLI, C. M. **Hidrólise e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada para produção de etanol 2G**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP, 2011.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA JR, G.L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 239–247, 2000.

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

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

CERES. BIOFUELS. Disponível em: <http://www.ceres.net/AboutUs/AboutUs-Biofuels.html>. Acesso em: 05/10/13.

CHANDEL, A.K.; SILVA, S.S. da; CARVALHO, W.; SINGH, O.V. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Malden, v. 87, p. 11-20, 2011.

CHEN, S.; LILI, Q.; BINGZHAO, S. Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C71. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 988-994, 2007.

CHIBATA, I. **Immobilized Enzymes - Research and Development**. New York: John Wiley & Sons, p. 71, 1978.

COIMBRA, J. S. R.; GIRALDO-ZUÑIGA, A. D.; MINIM, L. A.; MEIRELLES, A. J. A. **Uso de sistema aquoso bifásico na extração líquido-líquido**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 10 set. 2013.

COUGHLAN, M.P.; HAZIEWOOD, G.P. β -1,4-xylan degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 17, p. 259–289, 1993.

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

CTC, 2012. Centro de Tecnologia Canaveira, Brasil. Disponível em <www.ctcanaveira.com.br>. Acesso em: 15/12/2012.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 6:578-95, 2009.

DEL BIANCHI, V.L.; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, I.O. Fermentação em estado sólido. In: **Biotecnologia Industrial**, v. 2, p.247-276, 2001.

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

DESHMUKH, S. K. The maintenance and preservation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. **Mycoses**, v. 46, p. 203 – 207, 2003.

DIAS, M. O. S. **Desenvolvimento e otimização de processos de produção de etanol de primeira e segunda geração e eletricidade a partir da cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 282p., 2008.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; MANTELATTO, P. E.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Cogeneration in integrated first and second generation ethanol from sugarcane. **Chemical Engineering Research and Design**, n. 91, p. 1411–1417, 2013a.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; PAVANELLO, L. G.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. **Applied Energy**, 109, p. 72–78, 2013b.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, 103(1), p. 152–161, 2012.

DÍAZ, A. B.; CARO, I.; ORY, I.; BLANDINO, A. Evaluation of the conditions for the DOE (DEPARTMENT OF ENERGY US), 2010 – Joint Genome Institute. Disponível em: <http://www.jgi.doe.gov>. Acesso em: 10/09/13.

DORIGO, M.; STÜTZLE, T. Ant Colony Optimization. **Massachusetts Institute of Technology**. London, England. 305 p. 2004.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S.I.; SILVA, J.B.A.; TEIXEIRA, J.A. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, n. 5, p.1977-1982, 2011.

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Disponível em: <http://www.dsmz.de/>. Acesso em: 08/10/13.

DSMZ: Centro de Pesquisas de material biológico da Alemanha: Disponível em: http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium129.pdf. Acesso em: 10/10/10.

EL-SAID, A. H. M., MAGHRABY, T. A. AND EL-SHAHIR, A. A. **Phyllosphere and phylloplane fungi of Vicia faba cultivated in Upper Egypt and their cellulolytic ability**. Proc. of the second International Conference of Environmental Science, South Valley Univ., Qena, Egypt, 2006.

EL-SAID, A. H. M.; SALEEM, A. Ecological and physiological studies on soil fungi at western region, Libya. **Mycobiology**, v. 36 (1), p.1–9, 2008.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlim: Springer. 5ª ed., 454p., 2004.

FARINAS, C. S. **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011. 13 p. – (Embrapa Instrumentação. Documentos, ISSN: 1518-7179; 54).

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter & CO, 613p., 1989.

FERREIRA, A. D. **Utilização da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMG 43.2 para obtenção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, 114p, 2010.

FERREIRA, I. M., 2008. **Bioma Cerrado** – Um estudo das paisagens do Cerrado. Disponível em: <<http://www4.fct.unesp.br/ceget/paisagens.pdf>>. Acesso em: 14 set. 2013.

FERREIRA, J. F.; PADILHA, G. D. S.; TAMBOURGI, E. G. Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos, **Exacta**, v. 1, p. 49-56, 2009.

FERREIRA, V. **Produção de β -glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 155p., 2010.

FERREIRA, V.; FABER, M. O.; MESQUITA, S. S.; PEREIRA JR., N. Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the β -glucosidase gene. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 1-7, 2010.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e o papel do Instituto Agrônômico no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L.L; VASCONCELOS, A.C.M. de; LANDELL, M.G.A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, 2008. p. 31-44.

FISCHER, J.; LOPES, V.; GALVÃO, C.; TEODORO, J.; FILHO U.; CARDOSO, V. Utilization of Cheese Whey and Cellulosic Biomass for Production of Ethanol by Selected Fungi Strain from Brazilian Savannas. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 1075-1080, 2013.

FORTUNATO, M. R. C. **Utilização do Simulador SuperPro Designer® para Avaliação do Aproveitamento de Soro de Queijo para a Produção de Etanol**. Dissertação de Mestrado em Ciências em Engenharia de Biocombustíveis e Petroquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 212p., 2012.

FREITAS F. F.; MARQUEZ; L. D. S.; RIBEIRO, G. P.; BRANDÃO, G. C.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58–59, p. 33–38, 2011.

GALEMBECK, F; BARBOSA, C. A. S.; SOUSA, R. A. Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 571-581, 2009.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal Food Engineering**, 74, p. 78–88, 2006.

GARZA-MADRID, M.; RITO-PALOMARES, M.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; BENAVIDES, J. Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human sérum albumin as proof of concept. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1082-87, 2010.

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

GOMES, D. G.; GUIMARÃES, P. M. R.; PEREIRA, F. B.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Plasmid-mediate transfer of FLO1 into industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 strain creates a strain useful for repeat-batch fermentations involving flocculation–sedimentation. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 162–168, 2012.

GOMEZ, C. H. R. J. **Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. 1985. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R; GOMES, E. . Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science Technology**, v. 144, p.1-22, 2008.

GROOTJEN, D.R.J.; MEIJLIK, H.H.M.; LANS, RGKM, LUBEN, A.M. Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae* **Enzyme Microbiology Technology**, v.13, p.530-536, 1991.

GUIMARÃES, P.M.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 375–384, 2010.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p. 763–781, 2004.

GUPTA, R.; SHARMA, K. K., KUHAD, R. C. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498, **Bioresource Technology**, 100 (3), 1214-20.

GUSAKOV, A.V.; SALANOVICH, T.N.; ANTONOV, A.I.; USTINOV, B.B.; OKUNEV, O.N.; BURLINGAME, R.; EMALFARB, M.; BAEZ, M.; SINITSYN, A.P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Bioengineering**, v. 97, p.1028–1038, 2007.

GÜVEN, G; PERENDECI, A; TANYOLAÇ, A. Electrochemical treatment of deproteinated whey wastewater and optimization of treatment conditions with response surface methodology. **Journal of Hazardous Materials**, v. 157, n. 1, p. 69-78, 2008.

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

HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, A.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Preparation of Samples for Compositional Analysis: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised). **NREL Report** No. TP-510-42620, 2008, 12 p.

HATZINIKOLAOU, D.G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.. **Modeling of the simultaneous hydrolysisultrafiltration of whey permeate by a thermostable Beta-galactosidase from *Aspergillus niger***, v. 24, p. 161-172, 2005.

HAYKIN, S. **Redes Neurais: Princípios e práticas**, trad. Paulo Martins Engel. 2ed. Porto Alegre: Bookman, 900 páginas, 2001.

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

HERCULANO, P. N.; LIMA, D. M. M.; FERNANDES, M. J. S. ; NEVES, R. P. ; SOUZA-MOTTA, C. M. ; PORTO, A. L. F. Isolation of Cellulolytic Fungi from Waste of Castor (*Ricinus communis* L.) **Current Microbiology**, v. 62, No. 5, p.1416-1422, 2011.

HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; MACIELA., M. H.C.; MOREIRA, K. A.; MOTTA, C. M. S.; PORTO, A. L.F.. Partitioning and purification of the cellulolytic complex produced by *Aspergillus japonicus* URM5620 using PEG–citrate in an aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 335, 8-13, 2012.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) Disponível em: <<http://siscom.ibama.gov.br/monitorabiomas/>>. Acesso em: 10/09/14.

IEF (Instituto Estadual de Florestas). Disponível em <<http://www.ief.mg.gov.br/florestas>>. Acesso em: 14/ 09/13.

ISLAM, R.; ÖZMIHÇI, S.; CICEK, N.; SPARLING, R.; LEVIN, D. B. Enhanced cellulosefermentation and end-product synthesis by *Clostridium thermocellum* with varied nutrient compositions under carbon-excess conditions. **Biomass and Bioenergy**, v. 48, p. 213-223, 2013.

JACOBSEN, S.E.; WYMAN, C.E. Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose at varying solids concentration. **Industrial & Engeneering Chemical**. Res. 41, 1454–1461, 2002.

JING, D.; LI, P.; XIONG, X.; WANG, L. Optimization of cellulase complex formulation for peashrub biomass hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 4, p. 793-800, 2007.

JOLLEZ, P.; CHORNET, E.; OVEREND, R.P. Steam-aqueous fractionation of sugar cane bagasse: An optimization at the pilot plant level, A.V. Bridgewater, **Advances in Thermochemical Biomass Conversion**, p. 1659-1669, 1993.

KANWAR, S. S.; GHAZI, I. A.; CHIMI, S. S.; JOSHI, G. K.; RAO, G. V.; KAUSHAL, R. K.; GUPTA, R.; PUNJ, V. Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metalloproteinase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. **Protein Expression and Purification**, v. 46, p. 421-428, 2006.

KIM, T. H.; KIM, T. H. Overview of technical barriers and implementation of cellulosic ethanol in the U.S. **Energy**, v. 66, p. 13 – 19, 2014.

KONDO, T. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 35, p. 717, 1997.

KORNBERG, A. Why purify enzymes? **Methods Enzimol.**, v. 182, p.1-5, 1990.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. Yield determining factors in high solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p.2-11, 2009.

LADISLAO, B. A., GOMEZ, J.L. T..Second-generation Biofuels and Local Bioenergy Systems.**Wiley InterScience: Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 2, p. 455 – 469. 2008.

LEVER, M.; HO, G. Reducing energy for cellulose ethanol production by the use of sterilizing agents in lieu of steam. **Renewable Energy**, v. 43, p. 403-406, 2012.

LEVER, M., HO, G.; CORD-RUWISCH, R. Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulose from solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 18, p. 7083-7087, 2010.

LIN T.H.; HUANG C.F.; GUO G.L. ; HWANG W.S. ; HUANG S.L. Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v.116, p.314-319, 2012.

LOPES, V. S. **Avaliação de complexos enzimáticos obtidos a partir de fungos do Cerrado para produção de etanol de segunda geração**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG, 2013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.

LYND, L.R.; WEIMER, P.L.; van ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial Celulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 66, n.3, p.506-577, 2002.

MACHADO, D. S. **Seleção de fungos capazes de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brook**, 10. ed. São Paulo, Brasil: Prentice Hall, 2004.

MAIS, U.; ESTEGHLALIAN, A. R.; SADDLER, J. N.; MANSFIELD, S. D. **Applied Microbiology Biotechnology**, p. 98–100, p. 815–832, 2002.

MALPIEDI, L.P.; ROMANINI, D.; PICÓ, G.A.; NERLI, B.B. Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers. **Separation Purification Technology**, v. 65 (1), p. 40-45, 2009.

MANDELS, M., L. HONTZ e J. NYSTROM, 1974. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. **Biotechnology Bioengineering**, 16: 1471-1493.

MAPA, 2014. Ministério da Agricultura, Brasil. Disponível em: <http://www.udop.com.br/download/estatistica/acucar_producao/28mar14_%20producao_cana_acucar_etanol.pdf> Acesso em: 15 abril. 2014.

MARCHANT, R. Understanding complexity in savannas: climate, biodiversity and people. **Current opinion in Environmental Sustainability**, v. 2, p. 101-108, 2010.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme Microbial Technology**, 40, p. 426–432, 2008.

MATHEW, G.M.; SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; ASHOK, P. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. **Journal of Science & Industrial Resources**, v. 67, p. 898-907, 2008.

MEZZARI, A. **Fungos anemófilos em Porto Alegre, RS**. 2002. 75 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias na área de Micologia) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 9, p 426- 428, 1959.

MISSAWA, S. K. **Modificação de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* para o aumento da produtividade de álcool e floculação condicional**. 150 f. Tese (Doutorado em genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation: II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

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

MITIDIERI, S.; CAMASSOLA, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. **Produção de protease para formulação de detergentes biodegradáveis**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. Resumo. Brasília, DF, 2002.

MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). **O bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 10/09/13.

MOHARRAM, A. M.; ABDEL-HAFEZ, S. I. I.; EL-SAID, A. H. M.; SALEEM, A. Effect of two systemic fungicides on cellulose decomposing fungi of tomato plants and on some enzymatic activities. **Acta Microbiologica Immunologica Hungarica**, v. 51, p. 403-430, 2004.

MORAIS, S. A. L., NASCIMENTO, E. A., MELO, D.C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I–Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 817-830, 2010.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, 93, p. 1-10, 2004.

MYCOBANK – **Fungal Databases Nomenclature and Species Bank Online Taxonomic Novelties Submission**. Disponível em: <http://www.mycobank.org>. Acesso em: 08/10/2013.

NAGY, H. M.; WATANABE, K. E HIRANO, M.. Prediction of Sediment Load Concentration in Rivers using Artificial Neural Network Model. **J. of Hydraulic Engineering** 128(6): 588-595, 2002.

NELLY, C. Cellulases of *Trichoderma reesei*: Influence of culture conditions upon the enzymatic profile. **Enzyme Microbial Technology**, v. 13, p. 104-109, 1991.

NGUYEN, C. N.; LE, T. M.; CHU-KY, S. Pilot scale simultaneous saccharification and fermentation at veryhigh gravity of cassava flour for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 56, p. 160–165, 2014.

NOVACANA, 2014. Disponível em: <http://www.novacana.com>. Acesso em: 15/04/14.

NOVOZYMES. Novozymes Company Presentation. 2010. Disponível em: http://www.novozymes.com/en/investor/eventspresentations/Documents/19.05.2010_MRSN_NREC_OSLO.pdf. Acesso em: 10/04/14.

NYKO, D., GARCIA, J. L. F., MILANEZ, A. Y., DUNHAM, F. B.. A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada. **Biocombustíveis. BNDES Setorial**, v. 32, p. 5 – 48. 2010.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, G. G. G.; SILVA, D. P.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M.; PESSOA, A. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 105, p. 787–797, 2003.

OLSSON, L.; SOERENDEN, H. R.; DAM, B. P.; CHRISTENSEN, H.; KROGH, K. M.; MEYER, A. S. Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 117-129, 2006.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 2978-2984, 2007.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. Utilization of cheese whey powder for ethanol fermentation: effects of operating parameters. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 38, p. 711-718, 2006.

PAIVA, C. L. A.; SÁ-PEREIRA, P. A aplicação da Biologia Molecular no aprimoramento da produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 29-53, 2008.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulose hydrolysates. Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, 74, p. 25-33, 2000b.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, 35(10):1153-69, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p.69-80, 2000.

PENG, X. W.; CHEN, H. Z. Single cell oil production in solid-state fermentation by *microspheeropsis sp.* from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. **Bioresource Technology**, n.99, p.3885-3889, 2008.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **In Series on Biotechnology**, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v. 2, p. 45, 2008.

PERUMALSAMY, M.; MURUGESAN, T. Prediction of liquid-liquid equilibria for PEG 2000-sodium citrate based aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 244, p. 52-61, 2006.

PINTO, J. H.; KRAMDEN, D. P. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 60, p. 289-297, 1996.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. (ed). 1985. **Fungi and Food Spoilage**, 3rd ed. Blackie Academic & Professional, London, 2009.

PUCHKIN, V. N. **Heurística: a ciência do pensamento criador**. São Paulo, Zahar Editores, 1969.

QIN, Y.; HE, H.; LI, N.; LING, M.; LIANG, Z. Isolation and characterization of a thermostable cellulase-producing *Fusarium chlamydosporum*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 26:1991-7, 2010.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Dissertação de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, p. 447, 2010.

RABELO, S.C.; CARRERE, H.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A.C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, Philadelphia, v. 102, p. 7887-7895, 2011.

RAJEEV, K.; SUKUMARAN*, V. J. S.; RAVEENDRAN, S.; PARAMESHWARAN, B.; KANAKAMBARAN, U. J.; KUTTAVAN, V. S.; KUNI, P. R.; ASHOK, P. Lignocellulosic ethanol in India: Prospects, challenges and feedstock availability. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4826–4833, 2010.

RAMANATHAN, G.; BANUPRIYA, S.; ABIRAMI, D. Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation. **Journal of Science & Industrial Resources**, India, 69:454–9, 2010.

RAMOS, L. P. **Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais**. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE REUSO/RECICLAJE DE RESÍDUOS SÓLIDOS INDUSTRIAIS, 2000, São Paulo. Anais... São Paulo: Secretaria Estadual do Meio Ambiente, p. 125-126, 2000.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, p.863-871, 2003.

RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; KUSHNER, D. J.; SADDLER, J. N. Steam pretreatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptus viminalis* wood chips. **Holzforschung**, v. 46, p. 149–154, 1992.

RATTER, J. A.; RIBEIRO J. F.; BRIDGEWATER, S. **The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity**. Annals of Botany, London, v. 80, p. 223-230, 1997.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 724, 1996.

RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. **Journal Chromatography B**, v. 807, p. 3–11, 2004.

ROCHA, N.R.A.F.; BARROS, M.A.; FISCHER, J.; FILHO, U.C.; CARDOSO, V. L. Ethanol production from agroindustrial biomass using a crude enzyme complex produced by *Aspergillus niger*. **Renewable Energy**, v. 57, p. 432–435, 2013.

RODRIGUES, A. M.; SANTANA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n.1, p. 57-62, jan./abr. 2001.

ROSA, P. R.; SÁ, E. M. U. COUTINHO FILHO, U.; CARDOSO, V. L. Immobilized *Lactobacillus acidophilus* produced from whey and alginate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 2, p. 267 - 276, 2013.

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

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27(2), p. 205-211, 2004.

RUIZ, E.; CARA, C.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. **Enzyme Microbial Technology**, 42, p. 160–166, 2008.

SADDLER, J. N.; RAMOS, L. P.; BREUIL, C. Steam pretreatment of lignocellulosic residues. **Biotechnology Agricultural Series**, v. 9, p. 73-91, 1993.

SAMSON, R. A.; et al. **Introduction to Food-Borne Fungi**, 4nd ed., CBS, Netherlands, 1995.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, 99 (13):5270-95, 2008.

SANDGREN, M.; SAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress Biophysics Molecular Biology**, v.89, p.246-291, 2005.

SANTOS, E. V.; FERREIRA, L. A. B.; LAMBERT, D.; SOUZA, C. L.; MENDES, E. A. P.; FERREIRA, I. M. **A ocupação do bioma Cerrado: da expansão da fronteira agrícola aos dias atuais**. 2011. Disponível em<
<http://territorioslivresdobaixoparnaiba.blogspot.com.br/2011/01/ocupacao-do-bioma-cerrado-da-expansao.html>>. Acesso em: 14/09/13.

SARACENO, A.; CURCIO, S.; CALABRÒ, V.; IORIO, G. A hybrid neural approach to model batch fermentation of “ricotta cheese whey” to ethanol. **Computers and Chemical Engineering**, v. 34, p. 1590–1596, 2010.

SATYANARAYANA, K.G. Steam explosion – a boon for value addition to renewable resources. **Metal News**, v. 22, p. 35–40, 2004.

SAXENA, R.K., SHEORAN, A., GIRI, B., DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal Microbiology Methods**, v. 52, p.1 - 18, 2003.

SCHWAAB, M.; PINTO, O. C. **Análise de Dados Experimentais I: Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros**. Editora E-papers, p. 461, 2007.

SELVAKUMAR, P.; LING, T. C.; WALKER, S.; LYDDIATT, A. A practical implementation and exploitation of ATPS for intensive processing of biological feedstock: A novel approach for heavily biological feedstock loaded ATPS. **Separation and Purification Technology**, v.75, p. 323-331, 2010.

SILVA, C. V. **Caracterização do bio-óleo produzido por pirólise rápida do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química, p. 90, 2013.

SILVA, F. B.; ROMÃO, B. B; CARDOSO, V. L; COUTINHO FILHO, U.; RIBEIRO, E. J. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed soybean molasses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p. 61-68, 2012.

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 259–265, 2012.

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, p. 123, 2010.

SILVEIRA, C.M.; FURLONG, E.B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 805-811, 2007.

SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. J.; MANTOVANI, V. H. C.; PASSOS, F. M. L. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 930–936, 2005.

SIMÕES, G. S. **Avaliação de condições fermentativas iniciais de *Spathaspora arborariae* UFMG-HM 19.1 na produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, p. 72, 2011.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged Fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.

SINGHVI, M.S.; ADSUL, M.G.; GOKHALE, D.V. Comparative production of cellulases by mutants of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of Avicel and cellulose. **Bioresource Technology**, v.102, p.6569-6572, 2011.

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; STURM, W.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; THOLOZAN, J. L.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8156–8163, 2008.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.S.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820–4825, 2010.

SUKUMARAN, R.K.; SURENDER, V.J.; SINDHU, R., BINOD, P.; JANU, K.U., SAJNA, K.V.; RAJASREE, K.P.; PANDEY, A.. Lignocellulosic ethanol in India: Prospects, challenges and feedstock availability. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4826–4833, 2010.

SUKUMARAN, R., K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock an its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, n. 34, p. 421-424, 2009.

SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; PANDEY, A. Microbial cellulases-Production, applications and challenges. **Journal Sciences of Industrial Resources**, v. 64, p. 832-844, 2005.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis process for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, p. 707-738, 2007.

THEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. **Applied and environmental microbiology**, v. 43, n.4, p. 777-780, 1982.

THOMAS, L; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Review Article Biochemical Engineering Journal**, v. 81, n. 15, p.146-161, 2013.

TYEA Y., LEEB K., ABDULLAHA W., LEH C. Potential of *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn. (kapok fiber) as a resource for second generation bioethanol: Effect of various simple pretreatment methods on sugar production, **Bioresource Technology**, 116, 536–539, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

UNICA (União da Indústria da Cana-de-açúcar). Disponível em <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 29/04/14.

VASIL'CHENKO, L. G., KHROMONYGINA, V. V., KARAPETYAN, K. N., VASILENKO, O. V. AND RABINOVICH, M. L. Cellobiose dehydrogenase formation by filamentous fungus *Chaetomium* sp. INBI 2-26 (–). **Journal Biotechnology** 119: p. 44-59, 2005.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N.C.; SOUZA, M. B.; PEREIRA Jr., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 1-12, p. 141-154, 2007.

VEIGA FILHO, A. A., RAMOS, P.. Proálcool e Evidências de Concentração na Produção e Processamento de Cana-de-açúcar. **Informações Econômicas**, v. 36, nº 7. 2006.

VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497–522, 2001.

WATSON K. Temperature relations. In: Rose A H, Harrison J S, editors. *The yeasts*. 2nd ed. Vol. 2. London, United Kingdom: **Academic Press**, p. 41–47, 1987.

WEIZMANN, 2010. **Weizmann Institute of Science**. Disponível em: <http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Bayer/enzymes>. Acesso em: 10/04/10.

WINGREN, A.; GALBE, M.; ROSLANDER, C.; RUDOLF, A.; ZACCHI, G. Effect of reduction in yeast and enzyme concentrations in a SSF based bioethanol process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 485-499, 2005.

WOICIECHOWSKI, A. L., NITSCHKE, S., PANDEY, A., SOCCOL, C. R.. Acid and Enzymatic Hydrolysis to Recover Reducing Sugar from Cassava Bagasse: an Economic Study. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, ISSN 1516 – 8913, v. 45, nº 3, p. 393 – 400. 2002.

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

XIN, F.;ZHANG, H.;WONG, H. Bioethanol Production from Horticultural Waste Using Crude Fungal Enzyme Mixtures Produced by Solid State Fermentation. **BioEnergy Research**, v.6:p. 1030–1037, 2013.

XU, F.; THEERARATTANANOON, K.; WU, X.; PENA, L.; SHI, Y.; STAGGENBORG, S.; WANG, D. Process optimization for ethanol production from photoperiod-sensitive sorghum: Focus on cellulose conversion. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1212-1218, 2011.

YANG, Y.H.; WANG, B.C.; XIANG, L.J.; DUAN, C.R.; WANG, Q.H.; LIAN, J. Construction of a microbial consortium used for solid-state fermentation on rice chaff Colloids and Surfaces B: **Biointerfaces**, v. 32, p. 51-56, 2003.

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

ZHANG, Y.I.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. **Biotechnology Bioengineering**, v. 88, p. 797-824, 2004.

ZHI, W. B.; SONG, J. M.; BI, J. X.; FAN, O. Y. Partial purification of alpha-amylase from culture supernatant of *Bacillus subtilisin* aqueous two-phase systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 27, p. 3-7, 2004.

ZHUANG, J.; MARCHANT, M. A; NOKES, S. E.; STROBEL, H. J. Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 23, p. 679 687, 2007.

ZIJLSTRA, G. M.; GOOIJER, C. D.; TRAMPER, Journal **Current Opinion Biotechnology**, v. 9, p.171-176, 1998.

ZOLTAN, K. N. Model based control of a yeast fermentation bioreactor using optimally designed artificial neural networks. **Chemical Engineering Journal**, v. 127, p. 95-109, 2007.

ZÚÑIGA, U.F.R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. 2010. 228 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

XH. LI, HJ. YANG, B. ROY, EY. PARK, LJ. JIANG, D. WANG, YG. MIAO. Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet **Microbiological Research**, 16, p.190-198, 2010.

CAPÍTULO 8

APÊNDICE

APÊNDICE (A1): VALORES PREDITOS E EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA VALIDAÇÃO E TREINAMENTO DA REDE NEURONAL ARTIFICIAL (RNA).

Tempo	T (°C)	Enzima (%)	Inóculo (g/L)	Bagaço (%)	Etanol (exp.) (g/L)	Etanol (calculado) (g/L)
22	30	60	35	25	6.91	8.132170
26	30	60	35	25	7.19	8.195609
34	30	60	35	25	7.32	8.291810
38	30	60	35	25	7.28	8.268500
40	30	60	35	25	7.56	8.192081
42	30	60	35	25	7.48	8.161257
44	30	60	35	25	7.33	8.122643
46	30	60	35	25	7.56	8.076216
48	30	60	35	25	7.25	8.021970
10	30	100	25	25	7.89	8.150649
14	30	100	25	25	8.13	8.405057
18	30	100	25	25	8.98	8.679992
22	30	100	25	25	9.24	8.974974
26	30	100	25	25	9.96	9.289223
34	30	100	25	25	9.80	9.970767
38	30	100	25	25	9.93	10.401973
40	30	100	25	25	10.10	10.521882
42	30	100	25	25	10.83	10.711836
44	30	100	25	25	10.90	10.904416
46	30	100	25	25	10.57	11.099302
48	30	100	25	25	10.88	11.296152
10	30	100	35	15	6.63	6.796230
14	30	100	35	15	6.79	6.914181
18	30	100	35	15	7.52	7.141670
22	30	100	35	15	7.92	7.297177
26	30	100	35	15	8.95	7.519309
34	30	100	35	15	8.20	8.025712
38	30	100	35	15	8.30	8.309608
40	30	100	35	15	8.20	8.459012
42	30	100	35	15	8.74	8.669183
44	30	100	35	15	8.53	8.829166
46	30	100	35	15	8.22	8.935721
48	30	100	35	15	8.14	9.103636
10	30	60	25	15	4.03	4.775822
14	30	60	25	15	4.18	4.969289
18	30	60	25	15	5.89	5.103157

22	30	60	25	15	5.86	5.270887
26	30	60	25	15	5.73	5.437502
34	30	60	25	15	5.62	5.755057
38	30	60	25	15	5.81	5.899695
40	30	60	25	15	5.49	6.005858
42	30	60	25	15	5.32	6.069910
44	30	60	25	15	5.59	6.090245
46	30	60	25	15	5.85	6.185142
48	30	60	25	15	5.55	6.195384
10	30	60	25	25	6.25	6.974321
14	30	60	25	25	6.48	7.129127
18	30	60	25	25	8.25	7.268279
22	30	60	25	25	8.51	7.388903
26	30	60	25	25	8.37	7.536967
34	30	60	25	25	7.40	7.663855
38	30	60	25	25	7.63	7.686783
40	30	60	25	25	7.64	7.637840
42	30	60	25	25	7.59	7.631125
44	30	60	25	25	7.82	7.666383
46	30	60	25	25	7.73	7.644448
48	30	60	25	25	7.52	7.614787
10	30	60	35	15	4.58	5.565575
14	30	60	35	15	4.83	5.750171
18	30	60	35	15	5.03	5.971859
22	30	60	35	15	6.55	6.111959
26	30	60	25	25	6.77	6.282891
34	30	60	25	25	6.81	6.589060
38	30	60	25	25	6.78	6.718222
40	30	60	25	25	6.57	6.775572
42	30	60	25	25	5.45	6.827661
44	30	60	25	25	6.95	6.874181
46	30	60	25	25	6.95	6.959739
48	30	60	25	25	7.53	6.949360
10	30	100	25	15	5.82	6.536214
14	30	100	25	15	5.93	6.654043
18	30	100	25	15	6.61	6.833802
22	30	100	25	15	6.94	6.944036
26	30	100	25	15	8.33	7.117721
34	30	100	25	15	8.29	7.525312
38	30	100	25	15	8.00	7.759848
40	30	100	25	15	7.91	7.884833
42	30	100	25	15	7.43	8.066980
44	30	100	25	15	8.13	8.203034
46	30	100	25	15	8.64	8.290301
48	30	100	25	15	8.53	8.435426
10	30	100	35	25	7.71	8.740427
14	30	100	35	25	6.23	8.987157
18	30	100	35	25	8.22	9.369972

22	30	100	35	25	9.39	9.649968
26	30	100	35	25	10.22	10.007006
34	30	100	35	25	11.20	10.833150
38	30	100	35	25	11.89	11.230362
40	30	100	35	25	11.40	11.358229
42	30	100	35	25	11.80	11.635143
44	30	100	35	25	11.60	11.839469
46	30	100	35	25	11.90	11.966875
48	30	100	35	25	11.10	12.250095
10	40	100	35	25	8.22	8.778093
14	40	100	35	25	9.30	9.130019
18	40	100	35	25	10.05	9.444625
22	40	100	35	25	10.30	9.714793
26	40	100	35	25	9.85	10.128405
34	40	100	35	25	11.00	10.804021
38	40	100	35	25	11.90	11.192386
40	40	100	35	25	10.64	11.389952
42	40	100	35	25	11.70	11.664572
44	40	100	35	25	11.29	11.790122
46	40	100	35	25	11.40	12.069868
48	40	100	35	25	11.17	12.194564
10	40	100	25	15	6.64	6.758990
14	40	100	25	15	7.02	6.824587
18	40	100	25	15	7.98	6.951213
22	40	100	25	15	8.11	7.096105
26	40	100	25	15	8.03	7.260017
34	40	100	25	15	7.32	7.647276
38	40	100	25	15	7.45	7.871404
40	40	100	25	15	7.03	7.991165
42	40	100	25	15	7.24	8.116047
44	40	100	25	15	7.20	8.299565
46	40	100	25	15	7.50	8.381039
48	40	100	25	15	7.39	8.521039
14	40	100	25	15	4.20	6.868903
18	40	100	25	15	5.70	6.951213
22	40	100	25	15	6.60	7.096105
26	40	100	25	15	7.03	7.260017
34	40	100	25	15	6.56	7.696934
38	40	100	25	15	6.87	7.922517
40	40	100	25	15	7.10	7.991165
42	40	100	25	15	7.16	8.168748
44	40	100	25	15	7.32	8.299565
46	40	100	25	15	7.51	8.435461
48	40	100	25	15	7.78	8.521039
10	40	60	35	15	5.25	5.545587
14	40	60	35	15	5.87	5.723808
18	40	60	35	15	6.82	5.901717
22	40	60	35	15	6.22	6.076272

26	40	60	35	15	7.60	6.244332
34	40	60	35	15	6.42	6.548325
38	40	60	35	15	6.15	6.678098
40	40	60	35	15	6.84	6.736148
42	40	60	35	15	6.73	6.833271
44	40	60	35	15	6.52	6.881283
46	40	60	35	15	6.80	6.878949
48	40	60	35	15	6.16	6.915082
10	40	60	25	15	4.11	4.772115
14	40	60	25	15	4,27	4.924994
18	40	60	25	15	5,42	5.116338
22	40	60	25	15	5,20	5.278558
26	40	60	25	15	6.26	5.359854
34	40	60	25	15	4.27	5.715891
38	40	60	25	15	5.38	5.858663
40	40	60	25	15	5.19	5.964069
42	40	60	25	15	4.62	5.989033
44	40	60	25	15	4.18	6.087890
46	40	60	25	15	4.51	6.103966
48	40	60	25	15	4.33	6.194702
10	40	60	35	25	4.67	7.764245
14	40	60	35	25	6.19	7.900396
18	40	60	35	25	7.68	8.016030
22	40	60	35	25	7.92	8.108685
26	40	60	35	25	8.54	8.176191
34	40	60	35	25	6.51	8.228694
38	40	60	35	25	7.50	8.211004
40	40	60	35	25	7.67	8.243939
42	40	60	35	25	7.62	8.162788
44	40	60	35	25	7.39	8.127059
46	40	60	35	25	7.50	8.083526
48	40	60	35	25	7.62	8.032172
10	40	100	35	15	4.79	6.910786
14	40	100	35	15	6.14	7.063033
18	40	100	35	15	7.62	7.234565
22	40	100	35	15	7.82	7.425993
26	40	100	35	15	7.95	7.637772
34	40	100	35	15	8.08	8.123222
38	40	100	35	15	8.74	8.451253
40	40	100	35	15	8.41	8.541009
42	40	100	35	15	8.29	8.690196
44	40	100	35	15	8.33	8.844179
46	40	100	35	15	8.15	9.002830
48	40	100	35	15	8.20	9.225518
18	40	100	25	25	6.68	8.834179
22	40	100	25	25	8.90	9.062076
26	40	100	25	25	10.78	9.366518
34	40	100	25	25	9.80	10.094957

38	40	100	25	25	10.10	10.385763
40	40	100	25	25	9.91	10.568997
42	40	100	25	25	10.29	10.755382
44	40	100	25	25	10.57	10.944627
46	40	100	25	25	10.80	11.136420
48	40	100	25	25	10.64	11.404009
10	35	80	30	20	7.24	8.077762
14	35	80	30	20	7.53	8.348577
18	35	80	30	20	7.49	8.633073
22	35	80	30	20	7.91	8.929279
26	35	80	30	20	10.53	9.234912
34	35	80	30	20	9.37	9.863959
38	35	80	30	20	9.91	10.181569
40	35	80	30	20	10.80	10.339795
42	35	80	30	20	12.32	10.497103
44	35	80	30	20	11.13	10.653092
46	35	80	30	20	11.20	10.807358
48	35	80	30	20	11.20	10.959502
10	35	80	30	20	7.42	8.077762
14	35	80	30	20	8.01	8.348577
18	35	80	30	20	9.23	8.689132
22	35	80	30	20	9.70	8.929279
26	35	80	30	20	8.76	9.294879
34	35	80	30	20	8.97	9.863959
38	35	80	30	20	9.12	10.181569
40	35	80	30	20	10.10	10.339795
42	35	80	30	20	11.25	10.497103
44	35	80	30	20	10.89	10.653092
46	35	80	30	20	11.18	10.877536
48	35	80	30	20	11.30	10.959502
10	35	80	30	20	6.90	8.130215
14	35	80	30	20	7.65	8.402788
18	35	80	30	20	7.83	8.689132
22	35	80	30	20	8.30	8.929279
26	35	80	30	20	9.28	9.294879
34	35	80	30	20	9.21	9.928011
38	35	80	30	20	9.80	10.247683
40	35	80	30	20	10.63	10.339795
42	35	80	30	20	10.57	10.497103
44	35	80	30	20	12.40	10.722268
46	35	80	30	20	11.90	10.877536
48	35	80	30	20	11.10	10.959502

APÊNDICE (A2): PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS REGIONAIS, NACIONAIS, INTERNACIONAIS E REVISTAS INTERNACIONAIS

- **Congressos Regionais:**

XIX Jornada Em Engenharia Química 2014 (artigo completo) -
Uberlândia/MG, 03 a 08 de agosto de 2014:

Produção de etanol por complexo enzimático e *Pichia stipitis*;

Produção de celulases por *Aspergillus niger* coletado no Cerrado Brasileiro.

XVIII Jornada em Engenharia Química 2013 (artigo completo) -
Uberlândia/MG, 25 a 30 de agosto de 2013 – Produção de celulases por fermentação em estado sólido com *Mucor racemosus Fresenius* e resíduos agroindustriais.

XVII Jornada em Engenharia Química 2012 (artigo completo) -
Uberlândia/MG, 17 a 21 de setembro de 2012 – Produção de Complexo Enzimático por Fungo Selecionado no Cerrado do Triângulo Mineiro.

XVI Jornada em Engenharia Química 2011 (artigo completo) -
Uberlândia/MG, 19 a 22 de setembro de 2011 – Potencial de Fungos do Cerrado e *Trichoderma Reesei* na Produção de Celulase.

- **Congressos Nacionais:**

XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química: COBEQ 2014 (artigo completo) - Florianópolis/SC, 19 a 22 de setembro de 2014:

Purificação de complexo celulolítico de *Aspergillus niger* usando sistema aquoso de duas fases com PEG-citrato;

Estudo da produção de etanol de bagaço de cana por complexo enzimático e *Pichia stipitis*.

XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos: SINAFERM 2013 e X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (artigo completo) - Foz do Iguaçu/PR, 30 de julho-02 de agosto de 2013. Produção de Complexo Enzimático Celulolítico por *Mucor racemosus Fresenius* e Resíduos Agroindustriais para Obtenção de Etanol.

XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos: SINAFERM 2013 e X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (artigo completo) - Foz do Iguaçu/PR, 30 de julho-02 de agosto de 2013. Uso de Extrato Enzimático de *Chrysonilia sitophila* na Produção de Etanol de Celulose.

XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos: SINAFERM 2013 e X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (artigo completo) - Foz do Iguaçu/PR, 30 de julho-02 de agosto de 2013. Produção de Etanol de Bagaço de Cana com o uso de Extrato Enzimático Bruto e Sucessivas Fermentações.

XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química: COBEQ 2012 (artigo completo) - Búzios/RJ, 09 a 12 de setembro de 2012 - Avaliação Comparativa da Produção de Celulase de Biomassa de Sorgo Sacarino e Soro de Leite em Reator Estático e Reatores Rotativos Radial e Axial.

XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos: SINAFERM 2011 (artigo completo) - Caxias do Sul/RS, 24 a 27 de julho de 2011 - Avaliação do Potencial de Fungos do Cerrado na Produção de Celulase: um Estudo Bidimensional.

XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos: SINAFERM 2011 (artigo completo) - Caxias do Sul/RS, 24 a 27 de julho de 2011 - Avaliação da Produção de Etanol Empregando Complexo Enzimático gerado por *Aspergillus niger* com Hidrólise Separada.

XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos: SINAFERM 2011 (artigo completo) - Caxias do Sul/RS, 24 a 27 de julho de 2011 - Avaliação da Atividade de Celulase Produzida por *Aspergillus niger* a partir de Resíduos Agroindustriais (SINAFERM 2011).

IX Congresso Brasileiro de Engenharia Química-Iniciação Científica: COBEQ IC 2011 (artigo completo) - Maringá/PR, 03 a 06 de julho de 2011 - Produção de Complexo Enzimático Hidrolítico e Etanol pelo Aproveitamento de Biomassa Mista de Resíduos Agroindustriais de Arroz e Queijo.

- **Congressos Internacionais:**

9º Congresso Internacional de Bioenergia 2014 (artigo completo) - São Paulo/SP - 01 a 03 de outubro de 2014:

Produção de etanol de bagaço de cana-de-açúcar por mistura de complexo enzimático de *Mucor racemosus Fresenius* e *Aspergillus niger*;

Caracterização dos açúcares em diferentes partes dos colmos do sorgo sacarino;

Construção e teste de reator de abertura de fibra lignocelulósica utilizado no pré-tratamento de biomassa para produção de bioetanol.

8º Congresso Internacional de Bioenergia 2013 (artigo completo) - São Paulo/SP - 05 a 07 de novembro de 2013:

Avaliação da utilização de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de arroz como substrato para a produção de etanol;

Obtenção de etanol a partir de complexo enzimático produzido por diferentes cepas selvagens coletadas no cerrado brasileiro;

Produção de etanol a partir de complexo enzimático produzido pela cepa selvagem *Mucor racemosus Fresenius* empregando diferentes meios para extração das enzimas.

7º Congresso Internacional de Bioenergia 2012 (artigo completo) - São Paulo/SP, 30 de outubro a 01 de novembro de 2012:

Produção de Extrato Enzimático e Etanol Celulósico;

Avaliação das Condições Fermentativas na Produção de Etanol de Segunda Geração Utilizando Complexo Enzimático de Fungo do Cerrado.

6º Congresso Internacional de Bioenergia 2011 (artigo completo) - Curitiba/PR, 16 a 19 de agosto de 2011:

Produção de Complexo Enzimático Hidrolítico e Etanol pelo Aproveitamento de Biomassa Mista de Resíduos Agroindustriais de Arroz e Queijo.

Potencial de Fungos do Cerrado na Produção de Complexo Enzimático para Degradação da Celulose.

11th International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR 2011 (resumo estendido) - Lisboa/Portugal, 5 a 7 setembro de 2011 - Ethanol Production from Whey and Byproducts of Rice Processing.

12th International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR 2014 (resumo estendido) - Porto/Portugal, 10 a 12 Setembro de 2014:

Effects of the Temperature and Broth Composition on Ethanol Production from Sugarcane Bagasse and Crude Enzymatic Extract;

Ethanol production via crude enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse treated with a pressurized batch hot water reactor

- **Revista Internacional:**

Revista: **Renewable Energy**, Fator de impacto: 2.978 Elsevier – Qualis A1 para Engenharia II da CAPES (<http://www.journals.elsevier.com/renewable-energy/>);

Título: Ethanol Production from Agroindustrial Biomass using a Crude Enzyme Complex Produced by *Aspergillus niger*;

Autores: Nattácia R. A. F. Rocha; Maria Aparecida Barros; Janaína Fischer; Ubirajara Coutinho Filho e Vicelma L. Cardoso;

D.O.I.: 10.1016/j.renene.2013.01.053;

Página do trabalho:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148113000918>;

Volume/Ano: 57, 2013.

Revista: **Chemical Engineering Transactions** - The Italian Association of Chemical Engineering (AIDIC) - Qualis B5 para Engenharia II da CAPES (<http://www.aidic.it/cet/>);

Título: Second generation ethanol production using crude enzyme complex produced by fungi collected in Brazilian Cerrado (Brazilian Savanna);

Autores: Janaína Fischer, Verônica dos Santos Lopes, Emanoela Fernanda Queiroz Santos, Ubirajara Coutinho Filho, Vicelma Luiz Cardoso;

D.O.I.: 10.3303/CET1438082

Página do trabalho: <http://www.aidic.it/cet/14/38/082.pdf>

Volume/Ano: 38, 2014.

Revista: **Chemical Engineering Transactions** - The Italian Association of Chemical Engineering (AIDIC) - Qualis B5 para Engenharia II da CAPES (<http://www.aidic.it/cet/>);

Título: Utilization of Cheese Whey and Cellulosic Biomass for Production of Ethanol by Selected Fungi Strain from Brazilian Savannas;

Autores: Janaína Fischer, Verônica dos Santos Lopes, Célia M. A. Galvão, Juliana C. Teodoro, Ubirajara Coutinho Filho, Vicelma Luiz Cardoso;

D.O.I.: 10.3303/CET1332180;

Página do trabalho: <http://www.aidic.it/cet/13/32/180.pdf>;

Volume/Ano: 32, 2013.

Submissão de artigo na Revista (2014): **Biomass and Bioenergy**, Fator de impacto: 3.411 Elsevier – Qualis A1 para Engenharia II da CAPES (<http://ees.elsevier.com/jbb/>);

Título: "Ethanol production from cellulose biomass using a crude enzyme complex produced by the new strain *Mucor racemosus Fresenius* isolated from the Brazilian savanna"

Autores: Janaína Fischer, Nattácia Rodrigues de Araújo Felipe Rocha, Saulo Luiz Cardoso, Verônica dos Santos Lopes, Emmanoela Fernanda Queiroz Santos, Ubirajara Coutinho Filho, Vicelma Luiz Cardoso.