

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR



***Produção de celulasas e hidrólise enzimática de materiais
lenhocelulósicos para a produção de biocombustíveis***

Susana Margarida Paraíso Ferreira

Covilhã, 2008

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

***Produção de celulases e hidrólise enzimática de materiais
lenhocelulósicos para a produção de biocombustíveis***

Susana Margarida Paraíso Ferreira

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior para a obtenção do
grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Fernanda da Conceição Domingues

Covilhã, 2008

AGRADECIMENTOS

São diversas as pessoas a quem tenho que agradecer o apoio e, por vezes, a paciência ao longo da realização deste trabalho.

À Professora Fernanda Domingues, minha orientadora, pela orientação, disponibilidade e atenção dispendidas, assim como constante motivação e amizade que transmitiu.

Ao Professor João Queiroz, agradeço o apoio e conhecimentos científicos que sempre transmitiu, assim como a disponibilidade que sempre demonstrou.

Às Professoras Ana Paula Duarte e Maria Emília Amaral, ao Eng. Nuno Gil e Cristina Gil do Departamento de Ciências e Tecnologia do Papel, pelo apoio, disponibilidade e pelas amostras de giesta a esteva pré-tratadas cedidas para este trabalho.

Aos meus colegas dos diversos Laboratórios do Centro de Investigação da Faculdade de Ciências da Saúde, agradeço o apoio, disponibilidade, amizade e presença constantes.

A todas as pessoas que ao longo da minha vida me acompanharam, ou surgiram ao meu lado em algum momento, principalmente ao meu pai, mãe, irmão, ao Luís e à Cristina, agradeço tudo, a paciência, a amizade, o carinho e apoio constantes.

Ao Instituto de Financiamento e Apoio ao Desenvolvimento da Agricultura e das Pescas (IFADAP) pelo financiamento do projecto 2006.09.001055.1.

Por fim, à Universidade da Beira Interior

RESUMO

Um dos maiores desafios para a sociedade de século XXI é acompanhar a grande procura de energia para transportes, aquecimento e processos industriais. Durante as últimas décadas, o consumo excessivo de combustíveis fósseis, tem levado à procura de novos combustíveis, principalmente de origem renovável. Assim, a produção de energias renováveis (biocombustíveis) tais como etanol, a partir da biomassa proveniente dos resíduos florestais, poderá apresentar uma fonte alternativa aos combustíveis fósseis. A área florestal de Portugal pode ser vista como uma fonte de grandes quantidades de resíduos florestais, nomeadamente giesta (*Cytisus striatus*) e esteva (*Cistus ladanifer*), arbustos nativos do país e considerados em muitas regiões como plantas invasivas. Para além, de a aplicação destes resíduos em bioprocessos ser favorável, pois apresentam-se como um substrato alternativo, também facilita a resolução do problema da sua eliminação. Assim é importante a optimização dos diferentes passos de produção de etanol a partir destes materiais lenhocelulósicos, designadamente do processo de hidrólise da celulose, que neste trabalho foi desenvolvido como um passo de hidrólise enzimática. A produção de celulasas é um assunto chave na hidrólise enzimática de materiais lenhocelulósicos, pelo que é de grande importância conhecer o comportamento do fungo durante a cultura. Em muitos casos, a morfologia do fungo influencia directa ou indirectamente a produtividade das fermentações com fungos, sendo, nosso objectivo avaliar os efeitos da suplementação do meio de cultura com tampões na morfologia e produção de celulasas pelo *Trichoderma reesei* Rut C30. Neste trabalho, foi estudada a morfologia e produção de celulasas em culturas em balão pela suplementação do meio com diferentes sistemas tamponantes a duas concentrações e pH diferentes, usando-se o meio sem tampão como controlo. Os resultados sugerem que a morfologia do fungo é significativamente dependente da adição de diferentes tampões ao meio de crescimento. A morfologia micelial mostra uma clara transição, em culturas com variação do sistema tamponante e concentração dos tampões, de uma forma de agregados a “pellets”. A mais elevada actividade sobre o papel de filtro foi obtida usando o tampão succinato a uma concentração de 100mM e pH 4.8, correspondendo a uma morfologia micelial dispersa. Neste trabalho, a hidrólise enzimática da esteva e da giesta foi estudada empregando numa primeira fase ensaios preliminares e de seguida estratégias estatísticas para resolução de problemas, como o método de Plackett-Burman e o “Central Composite Design”. O primeiro método foi utilizado com o objectivo de proceder a uma selecção das variáveis a estudar mais importantes a partir de um estudo simultâneo da influência de diversas condições operacionais e reaccionais, e o segundo de optimizar o processo de hidrólise enzimática, por variação de pH, temperatura, concentração de celulasas, concentração do polímero adicionado e tempo de reacção. O estudo do processo de hidrólise enzimática segundo uma metodologia de resposta de superfície não permitiu o ajuste de um modelo estatístico para optimização do processo, mas possibilitou um estudo do processo quanto à influência das variáveis estudadas, verificando-se uma variabilidade devida ao tipo de substrato usado.

ABSTRACT

One of the greatest challenges for society in the 21st century is to meet the growing demand of energy, e.g. for transportation, heating and industrial processes. During the last few decades, the excessive consumption of fossil fuels, has led to an increase in the need for alternative source of fuels, mainly those of renewable origin. These alternative sources may reside in the production of renewable energies, like ethanol, from forestry biomass residues. The portuguese florest can be seen like a source of large amounts of this type of residues, such as broom (*Cytisus striatus*) and rock-rose (*Cistus ladanifer*). These shrubs are native from Portugal and considered in many regions as an invasive plants. The application of these residues in bioprocesses is favorable because they are alternative substrates. In addition, the environmental problem of their disposal may be resolved. Therefore it is important to optimize the different steps in bioethanol production from these lignocellulosic materials, including hydrolysis of cellulose, which was undertaken as a step enzymatic hydrolysis in this work. The cellulase enzyme production is a key issue in the hydrolysis of these materials, and consequently the knowledge of the fungal behavior during culture for cellulase production is of major importance. In several cases, the productivity of fungal fermentations is influenced, either directly or indirectly, by the fungal morphology. Being this relationship between morphology and cellulase production known, the effects of medium supplementation with buffers on morphology and enzyme production by *T. reesei* Rut C-30 were investigated. In this work, the morphology and cellulases production in shake flasks cultivations by medium supplementation with different buffer systems at two different concentration and pH conditions were studied, and a medium with no buffer was used as control. The results suggest that fungal morphology is significantly dependent on the addition of different buffer systems to the nutrient broth. The mycelial morphology shows a clear transition from clumped to pelleted forms in cultures with variation of buffer systems and buffer's concentration. The higher filter paper activity was obtained using 100mM succinate buffer, at pH 4.8, corresponding to a dispersed mycelial morphology. In this work, the enzymatic hydrolysis of rock-rose and broom was studied employing preliminary tests and then experimental design as a statistical problem solving approach, as the Plackett-Burman method and the "Central Composite Design." The first method was used in order to make a selection of the most important variables from the simultaneous study on influence of operating and reactional conditions, and the second to optimize the process of enzymatic hydrolysis, by variation of pH, temperature, concentration of cellulases, added polymer concentration and incubation time. The study of enzymatic hydrolysis using a response surface methodology did not allowed the fit of a statistical model for optimization of the process, but has allowed a study on the influence of the variables and variability due to the type of substrate used.

PALAVRAS-CHAVE

Trichoderma reesei Rut C-30; Morfologia Fúngica; Celulases; Hidrólise enzimática; Resíduos florestais; Plackett-Burman; “Central Composite Design”

KEYWORDS

Trichoderma reesei Rut C-30; Fungal morphology; Cellulases; Enzymatic hydrolysis; Forestry residues; Plackett-Burman; Central Composite Design

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
PALAVRAS-CHAVE	vi
KEYWORDS	vi
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
CAPÍTULO I – Introdução	1
1.1. IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL	2
1.2. PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL	3
1.2.1. Processo de produção de bioetanol a partir de biomassa lenhocelulósica	4
1.2.2. Configuração das etapas do processo de produção de bioetanol	10
1.3. COMPOSIÇÃO DE MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS	11
1.3.1. Celulose	13
1.3.2. Hemiceluloses	14
1.3.3. Lenhina	15
CAPÍTULO II – Celulases	16
2.1. INTRODUÇÃO	17
2.2. ORGANISMOS CELULOLÍTICOS	17
2.2.1. O fungo <i>Trichoderma reesei</i>	18
2.3. CELULASES	19
2.3.1. Modo de acção das celulases	21
2.4. PRODUÇÃO DE CELULASES PELO TRICHODERMA REESEI RUT C30	22
2.4.1. Tipos de fermentação	22
2.4.2. Meios e requisitos nutricionais	23
2.4.3. Regulação da produção de celulases	26
2.4.4. Crescimento celular	26
2.4.5. Morfologia e agregação micelial	27
CAPÍTULO III – Hidrólise Enzimática	30
3.1. INTRODUÇÃO	31

3.2.	MECANISMO DE HIDRÓLISE DA CELULOSE	31
3.3.	FACTORES QUE AFECTAM A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE	33
3.3.1.	Substrato	33
3.3.2.	Celulases	34
3.3.3.	Aditivos	35
3.3.4.	Condições da reacção	35
3.3.1.	Objectivos	37
CAPÍTULO IV – Materiais e Métodos		38
4.1.	PRODUÇÃO DE CELULASES	39
4.1.1.	Estirpe	39
4.1.2.	Armazenamento da estirpe	39
4.1.3.	Meios de fermentação	39
4.1.4.	Preparação do inóculo	40
4.1.5.	Condições de fermentação	40
4.1.6.	Aquisição de imagem	42
4.1.7.	Esterilização de meios e equipamentos	42
4.1.8.	Reagentes	42
4.1.9.	Equipamento	44
4.1.10.	Métodos analíticos	44
4.2.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	47
4.2.1.	Material lenhocelulósico	47
4.2.2.	Enzimas	48
4.2.3.	Reagentes	49
4.2.4.	Equipamento	50
4.2.5.	Ensaio preliminares da Hidrólise enzimática da esteva pré-tratada	50
4.2.6.	Aplicação do desenho experimental Plackett-Burman à hidrólise enzimática de giesta e esteva pré-tratadas	51
4.2.7.	Aplicação do desenho experimental “Central Composite Design” à hidrólise enzimática de giesta e esteva pré-tratadas	52
4.2.8.	Métodos analíticos	55
CAPÍTULO V – Resultados e Discussão		57
5.1.	PRODUÇÃO DE CELULASES	58
5.1.1.	Utilização de tampões para controlo do pH durante a fermentação	58
5.1.2.	Efeito da suplementação do meio de cultura com diferentes tampões	60
5.1.3.	Conclusões	67
5.2.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	69
5.2.1.	Ensaio preliminares	69
5.2.2.	Aplicação do Desenho experimental – plackett-burman à hidrólise enzimática	81
5.2.3.	Aplicação do Desenho experimental “Central Composite Design” à hidrólise enzimática	94

5.2.4. Conclusões	106
CAPÍTULO VI – Conclusões gerais e Perspectivas Futuras	108
Referências bibliográficas	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1- Processos de produção de etanol de acordo com a matéria-prima usada	4
Figura 1.2 - Diagrama geral da produção de etanol a partir de biomassa lenhocelulósica. C – celulose; H –Hemicelulose; L –lenhina; Cel – Celulases; G – Glucose; P – Pentoses; I – Inibidores; EtOH – Etanol (adaptado de [12])	5
Figura 1.3 – Esquema representativo da integração de processos. SSF – Sacarificação e fermentação simultânea; SSCF – Sacarificação e co-fermentação simultânea; CBP – Bioprocesso consolidado (adaptado de [13])	11
Figura 1.4 - Lenhocelulose. <i>Setas</i> representam hidrólise (só os monómeros gerados pela hidrólise, representados pelas <i>setas pretas</i> , podem ser fermentados). <i>G</i> Glucose, <i>Gal</i> galactose, <i>F</i> frutose, <i>Man</i> manose, <i>X</i> xilose, <i>Ara</i> arabinose, <i>Outros</i> L-ramnose, L-fucose, ácidos urónicos (adaptado de [2])	12
Figura 1.5 – Estrutura da celulose considerando a repetição das unidades de anidrocetobiose unidas por ligações 1,4 (adaptado de [27])	14
Figura 1.6 - Dois exemplos de estruturas de hemiceluloses: (1) polímero de xiloglucano com formas monoméricas de glucose e xilose, e (2) galactomanano com formas monoméricas de galactose e manose (adaptado de [33])	14
Figura 2.1 - Desenvolvimento de estirpes a partir do <i>Trichoderma reesei</i> QM6a	18
Figura 2.2 - Degradação enzimática de celulose a glucose. A CBHI Celobiohidrolase I actua nas extremidades reductoras; CBHII Celobiohidrolase II actua nas extremidades não reductoras; EG endoglucanases hidrolisam ligações internas. □-G □-Glucosidase cliva o dissacárido celobiose a glucose (adaptado de [30])	20
Figura 2.3 - Representação esquemática da organização dos domínios nas enzimas celulolíticas. CBD- domínio de ligação à celulose, CD- domínio catalítico (adaptado de [51])	21
Figura 2.4 - Representação esquemática das morfologias típicas de fungos em cultura submersa (adaptado de [78])	27
Figura 4.1 - Curva de calibração do método de Bradford para determinação de proteína total da absorvância a 585nm em função da concentração de albumina sérica bovina	46
Figura 4.2 - Curva de calibração do método de determinação de açúcares reductores da absorvância a 540nm em função da concentração de glucose	47
Figura 4.3 – Representação esquemática do funcionamento da sonda de determinação da concentração de glucose	55
Figura 5.1 – Influência da suplementação do meio de cultura com tampões sobre a actividade celulolítica	60
Figura 5.2 – Actividade enzimática sobre o papel de filtro após 96 horas de fermentação	61

Figura 5.3 - Concentração de proteína no sobrenadante após 96 horas de fermentação	61
Figura 5.4 - Actividade da α -glucosidase após 96 horas de fermentação	62
Figura 5.5 - Actividade específica para as culturas suplementadas com diferentes sistemas tamponantes e sem adição de tampão (controlo)	63
Figura 5.6 - Relação de massa de glucose/peso seco em função do estado em que se apresenta o substrato	70
Figura 5.7 - Relação de massa de glucose/peso seco em função do pH	71
Figura 5.8 - Relação de massa de glucose/peso seco em função do tipo de tampão	72
Figura 5.9 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da concentração do tampão	73
Figura 5.10 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função do tempo de reacção	74
Figura 5.11 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da percentagem de fracção sólida	75
Figura 5.12 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função do volume reaccional	75
Figura 5.13 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da agitação	76
Figura 5.14 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da temperatura de reacção	77
Figura 5.15 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da concentração de celulasas adicionada (NS-50013)	77
Figura 5.16 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da concentração de α -glucosidase adicionada (NS-50010)	78
Figura 5.17 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da temperatura de reacção	79
Figura 5.18 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da adição de complexo enzimático NS-50012	80
Figura 5.19 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da adição do tipo de preparação enzimática usada (NS-50013 ou NS-50012)	81
Figura 5.20 - Gráfico de Pareto para os efeitos dos factores de acordo com a sua magnitude (valor absoluto) relativa à esteva pré-tratada	83
Figura 5.21 - Representação gráfica da influência do pH na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada	85

Figura 5.22 – Representação gráfica da influência da temperatura na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada	85
Figura 5.23– Representação gráfica da influência da concentração de celulases na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada	86
Figura 5.24– Representação gráfica da influência da concentração de α -glucosidase na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada	86
Figura 5.25 – Representação gráfica da influência do volume reaccional na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada	87
Figura 5.26– Representação gráfica da influência da concentração de PEG 4000 na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada	87
Figura 5.27 – Representação gráfica da influência da concentração de substrato na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada	88
Figura 5.28 – Gráfico de Pareto para os efeitos dos factores de acordo com a sua magnitude (valor absoluto) relativa à giesta pré-tratada	89
Figura 5.29– Representação gráfica da influência do pH na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada	90
Figura 5.30 – Representação gráfica da influência da temperatura na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada	91
Figura 5.31 – Representação gráfica da influência da concentração de tampão na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada	91
Figura 5.32 – Representação gráfica da influência da concentração de celulases na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada	92
Figura 5.33 – Representação gráfica da influência do tempo na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada	92
Figura 5.34 – Representação gráfica da influência do tipo de tampão na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada	93
Figura 5.35 – Representação gráfica da influência da agitação na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada	93
Figura 5.36 – Gráfico dos valores previstos versus os observados para o modelo para a esteva pré-tratada	98
Figura 5.37 – Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e da temperatura, mantendo fixo o pH, a concentração de PEG 4000 e o tempo, para a esteva pré-tratada	98

- Figura 5.38– Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e do pH, mantendo fixos a temperatura, a concentração de PEG 4000 e o tempo, para a esteva pré-tratada 99
- Figura 5.39 – Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e do PEG 4000, mantendo fixo a temperatura, o pH e o tempo, para a esteva pré-tratada 100
- Figura 5.40 - Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e ao tempo, mantendo fixo a temperatura, o pH e a concentração de PEG 4000, para a esteva pré-tratada 100
- Figura 5.41 – Gráfico dos valores previstos versus os observados para o modelo para a giesta pré-tratada 104
- Figura 5.42 – Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e da temperatura, mantendo fixo o pH, a concentração de PEG 4000 e o tempo, para a giesta pré-tratada 104
- Figura 5.43– Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e do pH, mantendo fixos a temperatura, a concentração de PEG 4000 e o tempo, para a giesta pré-tratada 105
- Figura 5.44– Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e do tempo, mantendo fixos a temperatura, o pH e a concentração de PEG 4000, para a giesta pré-tratada 106

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Conteúdos de celulose, hemicelulose e lenhina de resíduos comuns e madeira (fonte: [15] ^a , [28] ^b)	12
Tabela 4.1 - Descrição dos sistemas tamponantes usados nas culturas em balão	40
Tabela 4.2 - Lista de reagentes usados ao longo do trabalho experimental	42
Tabela 4.3 - Características dos equipamentos utilizados	44
Tabela 4.4 - Composição química das plantas completas utilizadas como matéria-prima para a hidrólise enzimática	48
Tabela 4.5 - Lista de reagentes usados ao longo dos ensaios de hidrólise enzimática	49
Tabela 4.6 - Características dos equipamentos utilizados	50
Tabela 4.7 – Variáveis e seus dois níveis usados no desenho experimental Plackett-Burman	51
Tabela 4.8 – Matriz dos ensaios para o desenho experimental segundo Plackett-Burmann com as variáveis nas unidades codificadas	52
Tabela 4.9 – Níveis dos factores utilizados de acordo com o desenho experimental CCD	53
Tabela 4.10 – Matriz dos ensaios para o CCD com as variáveis nas unidades codificadas	54
Tabela 5.1 - pH ao fim de 96 horas de fermentação	59
Tabela 5.2 - Percentagem da espécie ácido fórmico no tampão formato a diferentes concentrações e pH	63
Tabela 5.3 - Evolução da morfologia do <i>Trichoderma reesei</i> Rut C-30 ao longo do tempo, em meio sem adição de tampões e por suplementação com tampões citrato, formato, succinato e ftalato – ampliação 40x	65
Tabela 5.4 - Morfologia do <i>Trichoderma reesei</i> Rut C-30 em meio suplementado com tampões citrato, formato, succinato e ftalato, usando duas concentrações diferentes de tampão e pH, após 96 horas – ampliação 40x	67
Tabela 5.5 - Intervalos de pH recomendados pelo fabricante para as preparações enzimáticas	71
Tabela 5.6 - Intervalo de capacidade tamponante de cada tampão utilizado nos ensaios	72
Tabela 5.7. Condições experimentais dos ensaios realizados	82
Tabela 5.8-Resposta (relação massa de glucose produzida glucose /massa seca de substrato) às variáveis para a giesta e esteva	82
Tabela 5.9 – Quadro ANOVA relativo aos ensaios com esteva pré-tratada	84
Tabela 5.10 – Quadro ANOVA relativo aos ensaios com a giesta pré-tratada	89
Tabela 5.11 – Parâmetros que foram mantidos constantes para os ensaios relativos ao CCD	94

Tabela 5.12 - Matriz do desenho experimental e respectivas respostas experimental e prevista para a hidrólise enzimática realizada com esteva pré-tratada	95
Tabela 5.13 – Quadro ANOVA para a resposta relativa à esteva pré-tratada	97
Tabela 5.14 – Matriz do desenho experimental e respectivas respostas experimental e prevista para a hidrólise enzimática realizada com giesta pré-tratada	101
Tabela 5.15 – Quadro ANOVA para a resposta relativa à giesta pré-tratada	103

LISTA DE ABREVIATURAS

Ara -	Arabinose
BSA -	Albumina sérica bovina
CBD-	Domínio de ligação à celulose
CBH-	Celobiohidrolase
CBP -	Bioprocessamento consolidado
CCD-	“Central composite design”
CD -	Domínio catalítico
Cel -	Celulases
Conc.-	Concentração
DMC -	Conversão microbiana directa
DNS -	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EG -	Endoglucanase
EtOH-	Etanol
EUA -	Estados Unidos da América
F -	Frutose
G -	Glucose
H -	Hemiceluloses
HMF -	Hidroximetilfurfural
I -	Inibidores
L -	Lenhina
Man -	Manose
P -	Pentoses
PEG -	Poli(etileno)glicol
R ² -	Coeficiente de correlação
SDA -	Sabouraud dextrose agar
SHF -	Hidrólise e fermentação separadas
SSCF-	Sacarificação e co-fermentação simultâneas
SSF -	Sacarificação e fermentação simultâneas
X -	Xilose
β-G -	β-Glucosidase

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1.1. IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Um dos maiores desafios para a sociedade de século XXI é acompanhar a grande procura de energia para transportes, aquecimento e processos industriais [1].

Durante as últimas décadas, o consumo excessivo de combustíveis fósseis, particularmente nas grandes áreas urbanas, contribuiu para elevados níveis de poluição [2]. Assim, têm surgido uma crescente procura por combustíveis para transportes que permitam a redução da emissão de gases com efeito de estufa, nomeadamente dióxido de carbono (CO₂), e permitam reduzir a dependência em combustíveis fósseis [3].

Como a maioria dos combustíveis e químicos contendo carbono são de origem fóssil, existem estudos que prevêem o seu esgotamento já no próximo século. Para além de que, a combustão de combustíveis fósseis causa a libertação de níveis elevados de gases com efeito de estufa para a atmosfera, o que pode levar ao aquecimento global [4]. Como consequência, a sociedade deve mudar gradualmente de uma economia baseada em combustíveis fósseis para uma economia baseada em recursos sustentáveis. Aqui a biomassa poderá ter um papel importante [5]. Uma via para reduzir os efeitos ambientais e a dependência de combustíveis fósseis é a utilização de bioetanol. A energia resultante de biomassa pode ter um papel importante na redução da emissão de gases que participam no efeito de estufa, dado que o CO₂ resultante dos resíduos de biomassa foi originalmente absorvido durante o processo fotossintético [6]. Apesar de com a adição de etanol à gasolina, ocorrer uma diminuição na emissão de CO₂ para a atmosfera, a combustão de bioetanol, em geral, resulta na emissão de baixos níveis de monóxido de carbono, exaustão de compostos orgânicos voláteis e outros compostos de efeito de estufa [2], [7], [5].

Em conjugação com os factores mencionados, a União Europeia tem vindo a promover a utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes em substituição dos combustíveis fósseis, nomeadamente através da Directiva 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 8 de Maio de 2003, transposta para a legislação portuguesa pelo Decreto-Lei n.º 62/2006, onde se estabelece como meta de colocação no mercado de biocombustíveis e de outros combustíveis renováveis de 5,75 % de toda a gasolina e de todo o gasóleo utilizados para efeitos de transporte colocados no mercado, até 31 de Dezembro de 2010 [8], [9].

O etanol é já produzido em larga escala e é facilmente aplicável nos nossos dias a veículos de combustão interna, sendo geralmente adicionado à gasolina numa proporção de 10% de etanol para 90% de gasolina [7]. Existindo novos automóveis que podem mesmo utilizar misturas contendo etanol acima de 20%, veículos que podem funcionar com etanol puro e os chamados veículos de combustível flexível que podem usar misturas de 0-85% de etanol adicionado a gasolina. O etanol como combustível é usado de diversas formas, no entanto, a principal utilização nos dias de hoje é como aditivo combustível oxigenado, pois a sua adição leva a um

aumento do número de octanas da mistura (gasolina/etanol), sendo menos tóxico que outros aditivos [5].

Cerca de 90% de todo o etanol é derivado da fermentação de colheitas de amido ou açúcar e o restante é produzido sinteticamente. A maioria da produção e consumo é localizada no Brasil e Estados Unidos da América (EUA), correntemente o etanol produzido para o mercado de combustíveis é produzido a partir de açúcar (Brasil) ou amido (EUA) a preços considerados competitivos [7], [1], [6], [2].

As tecnologias de fermentação para produção de etanol a partir de amido ou açúcares estão bem desenvolvidas, mas apresentam determinadas limitações relacionadas com o facto de estas colheitas apresentarem um elevado valor pela sua aplicação para alimentação animal e necessidades humanas, não sendo suficientes para suprir a crescente procura de etanol como combustível [1], [7], o seu rendimento em termos de açúcar por hectare é muito baixo comparado com a maioria das formas prevalentes de açúcar na natureza: celulose e hemicelulose [7], o custo da matéria-prima é aproximadamente 40-70% do custo total do processo de produção de bioetanol [1] e a resultante redução dos gases com efeito de estufa a partir da utilização de etanol baseado em açúcar ou amido não é tão elevada como seria desejável [10]. Estes factores levam a uma exploração das matérias-primas lenhocelulósicas, menos dispendiosas, tais como resíduos florestais e agrícolas para produção de etanol [1], contendo quantidades substanciais dos polímeros polissarídeos. Para além, da aplicação destes resíduos em bioprocessos serem um substrato alternativo mais barato, também ajuda na resolução da eliminação destes resíduos [6], e não leva aos mesmos problemas éticos que a utilização de fontes de alimento para a produção de energia [3].

Considerando que em Portugal, a floresta representa aproximadamente 38% do território, isto pode-se traduzir numa grande abundância de resíduos florestais para utilização, como matéria-prima, na produção de biocombustíveis. A utilização destes resíduos contribuirá para a sua valorização económica o que se poderá traduzir num incentivo para a limpeza e manutenção da floresta.

1.2. PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL

O etanol é correntemente produzido a partir de cana-de-açúcar e materiais contendo amido, onde a conversão do amido a etanol inclui um passo de liquefação (para tornar o amido solúvel) e um passo de hidrólise (para produção de glucose), sendo a glucose resultante prontamente fermentada a etanol. Embora existam semelhanças entre o processo de utilização de materiais lenhocelulósicos e amido, os desafios tecno-económicos são diferentes [1], apresentando-se o primeiro como um processo mais complexo, como se pode observar na figura 1.1.

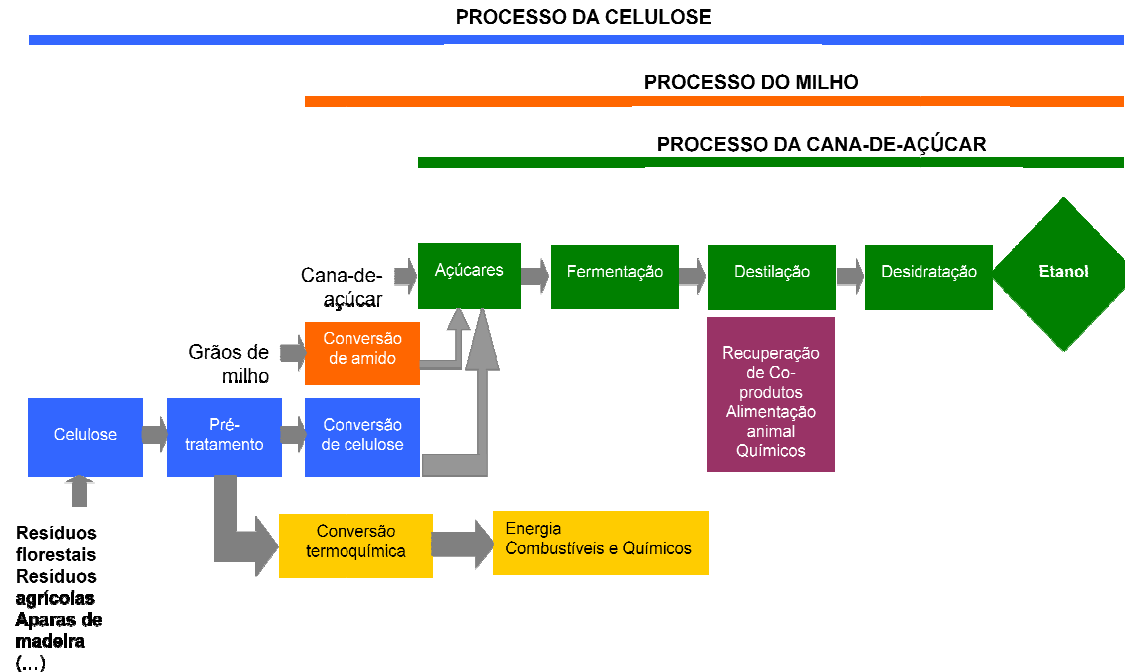


Figura 1.1- Processos de produção de etanol de acordo com a matéria-prima usada

A abundância destes biopolímeros na natureza torna os materiais lenhocelulósicos em fontes importantes de matéria-prima para a produção de bioetanol em grande escala [11], no entanto, as tecnologias de conversão de biomassa lenhocelulósica a etanol estão relativamente pouco desenvolvidas quando comparadas com as metodologias para o etanol de cana-de-açúcar ou amido [12].

Embora, o custo da biomassa lenhocelulósica seja muito inferior ao das culturas de açúcar e amido, o custo de obtenção de açúcares a partir de materiais lenhocelulósicos para a fermentação ainda é muito elevado. Por este motivo é crucial resolver problemas envolvidos na conversão de materiais lenhocelulósicos a açúcar e posteriormente a etanol. No entanto, a heterogeneidade na matéria-prima e a influência de diferentes condições do processo nos microrganismos e enzimas torna o processo de produção de etanol a partir de biomassa lenhocelulósica bastante complexo [5].

1.2.1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASSA LENHOCELULÓSICA

O processo global de produção de bioetanol a partir de biomassa lenhocelulósica inclui diversos passos: pré-tratamento de biomassa, hidrólise da celulose, fermentação de hexoses, separação e tratamento de efluentes (Figura 1.2.). Para além destes passos, podem ser levados a cabo os passos de destoxificação e fermentação das pentoses libertadas durante o pré-tratamento. A configuração sequencial empregue para obter etanol celulósico implica que a fracção sólida do material lenhocelulósico pré-tratado, que contém a celulose numa forma

acessível a ácidos ou enzimas, seja submetida a hidrólise (sacarificação). Após hidrólise da celulose, o hidrolisado resultante é fermentado e convertido a etanol, seguindo-se a recuperação e concentração do produto por destilação [12].

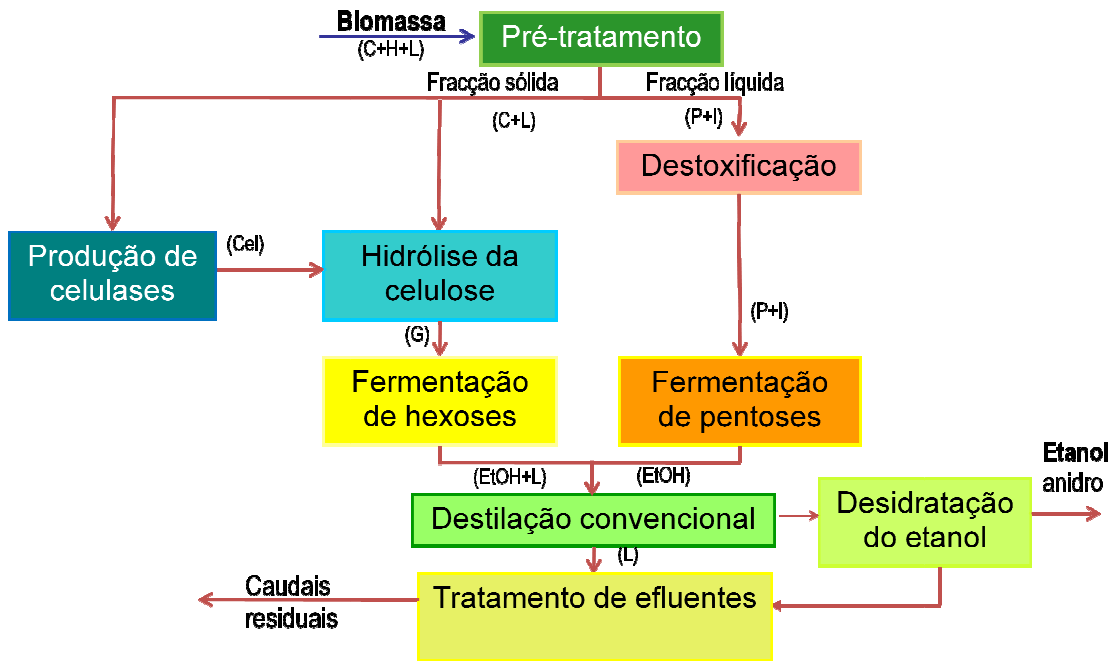


Figura 1.2 - Diagrama geral da produção de etanol a partir de biomassa lenhocelulósica. C – celulose; H –Hemicelulose; L –lenhina; Cel – Celulases; G – Glucose; P – Pentoses; I – Inibidores; EtOH – Etanol (adaptado de [12])

Tomando em consideração a interação e sequência dos processos pode ser importante uma análise resumida de cada etapa individualmente.

1.2.1.1. PRÉ-TRATAMENTO

Nos processos de conversão de biomassa a etanol, o pré-tratamento basicamente refere-se às ações mecânicas e físicas para redimensionar e limpar a biomassa, e destruir a sua estrutura celular para a tornar mais acessível a posterior tratamento químico ou biológico. Cada tipo de matéria-prima requer um método de pré-tratamento específico para minimizar a degradação do substrato, e para maximizar o rendimento de açúcares. A redução de tamanho do material aumenta a área superficial, de tal modo que o transporte de catalisadores, enzimas e vapor até às fibras é mais fácil e rápido. Isto também permite que as enzimas no passo de hidrólise penetrem as fibras e atinjam os açúcares oligoméricos [7]. Os pré-requisitos para um pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos eficaz incluem: (1) produção de fibras reactivas; (2) elevada recuperação de pentoses numa forma não degradada; (3) não originar a libertação de compostos que inibem significativamente a fermentação; (4) necessidade de pequena ou

ausência de redução de tamanho da matéria-prima; (5) baixos custos em termos do material requerido; (6) não produza resíduos sólidos; (7) elevado grau de simplicidade do processo e (8) eficácia em misturas com baixos conteúdos de substrato [13], [14].

Na tentativa de tornar as fontes de celulose mais facilmente digeríveis por enzimas, o passo de remoção de lenhina e hidrólise de hemiceluloses é muitas vezes classificada como pré-tratamento, onde as hemiceluloses em redor e/ou lenhina são removidas, e a estrutura da microfibrilha de celulose é modificada. Através de tratamentos químicos, físicos ou biológicos, a lenhina e toda ou parte das hemiceluloses são solubilizadas. Subsequentemente, quando é adicionada água ou vapor, o polímero de hemiceluloses livre é hidrolisado a açúcares monoméricos ou oligoméricos. Os açúcares solúveis resultantes são principalmente xilose, e ainda, manose, arabinose e galactose. Uma pequena porção de celulose pode também ser convertida a glucose. No entanto, a celulose será convertida num passo separado. O produto é filtrado e pressionado, separando-se duas fracções, os sólidos (celulose+lenhina) seguem para a hidrólise da celulose, e os líquidos (contendo açúcares) seguem para um passo de fermentação. Durante a hidrólise, os açúcares resultantes das hemiceluloses podem ser degradados a ácidos fracos, derivados de furanos e derivados fenólicos. Estes compostos inibem a fermentação subsequente, levando a rendimentos em etanol reduzidos. A produção destes inibidores aumenta quando a hidrólise ocorre em condições severas: temperaturas elevadas e concentrações elevadas de ácido [7].

Existem numerosos métodos de pré-tratamentos ou combinações disponíveis: pré-tratamento ácido (a baixa temperatura e ácido concentrado ou elevada temperatura e ácido diluído), pré-tratamento alcalino, autohidrólise ou “*steam explosion*”, pré-tratamentos com solventes orgânicos, pré-tratamento com “liquid hot water” ou combinações de pré-tratamento químico com biológico [2], [7], [14]. O pré-tratamento ácido tem a vantagem de libertar monómeros de açúcares a partir das hemiceluloses e expor as fibras de celulose para posterior acção enzimática, no entanto, tem a desvantagem de produzir compostos inibidores, de tal modo que pode ser necessário um passo adicional de destoxificação. Tomando em consideração a necessidade de introdução deste passo, por inibição dos processos subsequentes, poderá ser vantajoso o desenvolvimento de uma estirpe tolerante aos inibidores, devido ao elevado custo do processo de destoxificação [2].

1.2.1.2. HIDRÓLISE DA CELULOSE

Na hidrólise, a celulose é convertida a glucose ($(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \rightarrow nC_6H_{12}O_6$). Esta reacção é catalisada por ácido diluído, ácido concentrado, ou enzimas (celulases). Num processo de hidrólise sem pré-tratamento prévio os rendimentos são tipicamente de 20%, enquanto que os rendimentos após pré-tratamento podem exceder os 90% [7].

A hidrólise ácida só é aplicada em processos denominados por processos de duas fases de ácido (ácido diluído e concentrado), após pré-tratamento ácido. A hidrólise ácida pode ser

realizada com diversos tipos de ácido, incluindo ácidos sulfúrico, clorídrico, fosfórico, nítrico e fórmico [5].

Os processos que envolvem ácidos concentrados são realizados a baixas temperaturas e originam elevados rendimentos (por exemplo, rendimentos em glucose de 90%), mas as grandes quantidades de ácidos usados podem causar problemas associados com corrosão de equipamentos e consumo elevado de energia para recuperação do ácido [5].

O processo de ácido diluído é a mais antiga tecnologia de conversão da biomassa para celulose etanol. A principal vantagem da hidrólise com ácido diluído é o consumo relativamente baixo de ácido. No entanto, são requeridas temperaturas elevadas para atingir taxas de conversão de celulose a glucose aceitáveis, sendo que as temperaturas elevadas também aumentam a taxa de decomposição dos açúcares resultantes das hemiceluloses e corrosão do equipamento [5].

A hidrólise enzimática é realizada usando as enzimas celulasas, que são uma mistura complexa de enzimas que agem sinergeticamente sobre as fibras de celulose [15] e são produzidas por organismos que vivem em materiais celulósicos. Ambas as bactérias e fungos podem produzir celulasas, mas a atenção em termos de produção tem sido centrada nos fungos devido às suas condições de crescimento em aerobiose e superior taxa de produção [16]. No entanto, a produção de celulasas corrente (temperatura ótima de 28°C) é difícil de combinar com a hidrólise enzimática [7]. O passo de hidrólise enzimática tem várias vantagens quando comparada com a hidrólise ácida: as condições menos drásticas do processo originam rendimentos potencialmente elevados e a manutenção dos custos é baixa quando comparada com a hidrólise ácida ou alcalina (não existe problema de corrosão). O processo é compatível com muitas das opções de pré-tratamento, embora métodos puramente físicos não sejam tipicamente adequados a um passo subsequente de hidrólise enzimática de celulose. Apesar de os processos de hidrólise com ácido estarem tecnicamente mais desenvolvidos, os processos enzimáticos têm custos projectados comparáveis e ainda com possibilidade de melhoria por optimização do processo. A hidrólise enzimática é influenciada negativamente por características estruturais, tais como cristalinidade, grau de polimerização da celulose, e conteúdo de lenhina, e positivamente pela área superficial [7].

1.2.1.3. FERMENTAÇÃO

A biomassa lenhocelulósica apresenta uma grande percentagem de açúcares disponíveis, sendo importante a sua recuperação para posterior fermentação, de forma tornar o processo eficiente e economicamente rentável. Existe uma variedade de microrganismos com capacidade de fermentar hidratos de carbono a etanol sob condições de anaerobiose, incluindo-se geralmente bactérias, leveduras ou fungos.

Todos os microrganismos têm limitações: quer na incapacidade de fermentar simultaneamente pentoses e hexoses, de conduzirem a baixos rendimentos em etanol [7].

A produção de etanol a partir de açúcares derivados de amido e sacarose foi comercialmente dominada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura pode crescer em açúcares simples, tais como glucose, e em dissacáridos como sacarose. *Saccharomyces* é também geralmente reconhecida como segura, enquanto aditivo alimentar para consumo humano, sendo assim ideal para a produção de bebidas alcoólicas e para levedar o pão [6].

Como os açúcares derivados da biomassa são uma mistura de hexoses (principalmente glucose) e pentoses (principalmente xilose) e a maioria das estirpes nativas de *S. cerevisiae* não metabolizam xilose, têm-se desenvolvido basicamente duas vias alternativas para aumentar os rendimentos da fermentação a etanol derivado de açúcares da biomassa. A primeira via foi adicionar a leveduras e outros microrganismos naturalmente etanologénicos vias metabólicas de pentoses por engenharia genética, a segunda via foi a melhoria dos rendimentos em etanol por engenharia genética em microrganismos que têm a capacidade de fermentar ambas hexoses e pentoses [17], [18], [19]. Embora ambas as vias apresentem sucesso, as taxas e rendimentos em misturas de açúcares derivados de biomassa ainda não atingiram valores passíveis de comercialização. Para além de que, em contraste com as soluções derivadas de amido ou sacarose, os hidrolisados derivados de biomassa tendem a possuir inibidores da fermentação (ácido acético, furfural, etc.) que devem ser removidos quando existem em concentrações elevadas ou requerem o desenvolvimento de estirpes robustas que sejam resistentes a esses inibidores [17], [18].

1.2.1.4. DESTOXIFICAÇÃO

Durante a hidrólise ácida dos materiais lenhocelulósicos são produzidos diversos compostos inibidores, tais como produtos de degradação de açúcares, principalmente furfural e hidroximetilfurfural (HMF); da degradação da lenhina, derivados fenólicos; compostos derivados da estrutura lenhocelulósica; iões metálicos pesados; podendo ainda existir ácido do pré-tratamento e hidrólise com ácido. Estes componentes são tóxicos ou inibitórios para a hidrólise enzimática e organismos fermentativos, e deve ser removida ou neutralizada antes da fermentação; de outra forma terão de ser aplicadas grandes quantidades de microrganismos fermentativos no passo de fermentação [7], [20], [21], [22], [23]. A sua toxicidade é um factor limitante do processo de bioconversão que utiliza os hidrolisados. Existe uma grande variedade de técnicas biológicas, físicas e químicas propostas para a redução da concentração destes compostos nos hidrolisados lenhocelulósicos. No entanto, a eficiência de qualquer método de destoxificação depende quer da composição dos hidrolisados, que difere consoante o material usado, quer das condições de hidrólise empregues [7], [20].

Para remover os compostos indesejados, a biomassa pré-tratada é primeiramente separada nas fracções, líquida e sólida. A fracção sólida é então lavada com água para remover os compostos inibidores para a fracção líquida. Eventualmente, a fracção líquida pode ser submetida a métodos biológicos, físicos, químicos ou combinações destes, para destoxificação

e remoção ou diminuição da concentração dos inibidores de processos subsequentes [20], [21]. Como cada método de destoxificação é específico para certos tipos de compostos, podem obter-se melhores resultados combinando dois ou mais métodos [20].

1.2.1.5. RECUPERAÇÃO DO PRODUTO

As tecnologias para a conversão de biomassa lenhocelulósica a etanol resultam, geralmente na produção de meios de fermentação com baixas concentrações de etanol. O processo tradicional de recuperação consiste na separação do etanol do meio de fermentação e sua concentração a 95% por destilação. Este processo é seguido por um passo de destilação azeotrópica para desidratar o etanol a 99.9% [16].

A integração de processos de produção de etanol e separação do mesmo do meio de cultura é uma alternativa atractiva para a melhoria dos processos de fermentação alcoólica. Quando o etanol é removido do meio de cultura, o seu efeito de inibição na taxa de crescimento é diminuído ou neutralizado [12].

1.2.1.6. SÓLIDOS RESIDUAIS/ ENERGIA DE PRODUÇÃO/ TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS

A eliminação de resíduos é um assunto relevante, dado que nos processos de produção de etanol a partir de materiais lenhocelulósicos se geram grandes quantidades de resíduos, incluindo: (1) químicos que necessitam de recuperação para reutilização ou eliminação; (2) biomassa celular após fermentação; (3) água residuais geradas durante o processo [2].

O sólido residual maioritário deste processo é a lenhina. A sua quantidade e qualidade diferem em função da matéria-prima e processo aplicado. A produção de co-produtos a partir de lenhina, como hidrocarbonetos de elevadas octanas, onde se incluem aditivos a combustíveis, pode ser importante para a competitividade do processo. A lenhina pode substituir o fenol nas vastamente usadas resinas de fenol-formaldeído largamente usadas. Todos os resíduos sólidos (lenhina, compostos de holocelulose residuais, e massa celular) podem ser usados para produção de calor e electricidade [7], [13].

Para que o processo seja sustentável, do ponto de vista ambiental, a utilização de água potável, a quantidade de águas residuais e consumo de energia devem ser minimizados. O consumo de água pode, por exemplo, ser minimizado pela recirculação das águas nos passos de lavagem, por exemplo [5], [21], enquanto as águas residuais, que contêm quantidades significativas de compostos orgânicos, tais como "*corn steep liquor*", acetato de amónio, ácido acético, furfural e HMF, necessitam de processamento antes da sua deposição no meio ambiente [7].

1.2.2. CONFIGURAÇÃO DAS ETAPAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Quando é aplicada a hidrólise enzimática são possíveis diferentes níveis de integração de processos, como é apresentado na figura 1.3. Em todos os casos, é requerido o pré-tratamento da biomassa para tornar a celulose mais acessível às enzimas, e para hidrolisar as hemiceluloses [7].

À configuração onde os processos são individuais e sequenciais é denominada de Hidrólise e Fermentação Separadas (ou sequenciais) (SHF – *Separate Hydrolysis and Fermentation*). O SHF é uma das configurações do processo que tem sido mais extensivamente testada. Quando se realiza a fermentação das pentoses, esta é realizada numa unidade independente. A necessidade de fermentações separadas é devida ao facto de microrganismos fermentadores de pentoses fermentarem pentoses e hexoses mais lentamente que microrganismos que só assimilam hexoses. Além disso, os microrganismos anteriores são mais sensíveis a inibidores e ao etanol produzido, por esta razão, o hidrolisado de hemiceluloses resultante do pré-tratamento deve ser destoxificado [12]. A maior vantagem deste método é que é possível conduzir a hidrólise da celulose e fermentação nas suas condições óptimas. A inibição da actividade das celulasas pelos açúcares libertados, celobiose e glucose, é a sua maior desvantagem [24], [2].

A configuração Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF – *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) combina a hidrólise da celulose com a fermentação directa da glucose produzida. Este processo apresenta diversas vantagens, nomeadamente: uma maior velocidade de hidrólise, evitando o problema de inibição das enzimas pelo produto, necessita de menor quantidade de enzima, reduz o risco de contaminação e diminui o número de reactores envolvidos. No entanto, como existe a necessidade de trabalhar em condições de hidrólise que não as óptimas, e não é possível utilizar concentrações de substrato muito elevadas, devido ao problema de mistura mecânica e insuficiente transferência de massa, os custos do processo aumentam [7], [25], [24], [2].

Outro modo de operação é a sacarificação e co-fermentação em simultâneo (SSCF – *Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*), onde co-fermentação se refere à fermentação simultânea de hexoses e pentoses, sugerindo-se a fermentação de ambas pentoses e hexoses num único bioreactor [7], [24].

Em todos os processos considerados até este ponto, é requerida uma unidade operacional para produção de enzimas. No bioprocessamento consolidado (CBP – *Consolidated Bioprocessing*), também conhecido como conversão microbiana directa (DMC - *Direct Microbial Conversion*), é produzido etanol juntamente com todas as enzimas requeridas num único bioreactor por uma única comunidade de microrganismos. Este é baseado na utilização de mono- ou co-culturas de microrganismos que fermentam a celulose a etanol. A configuração CBP parece ser uma forma alternativa com enorme potencial e sendo o ponto final lógico da evolução da produção de etanol a partir de materiais lenhocelulósicos [7], [26], [24]. No

entanto, não existem microrganismos ou combinações compatíveis de microrganismos disponíveis que produzam ambas celulasas e outras enzimas nos elevados níveis requeridos e também produzam etanol nas elevadas concentrações e rendimentos necessários, embora alguns microrganismos já combinem múltiplas funções [7].

Microrganismos com a combinação de propriedades de utilização de substrato e formação de produto requeridos para CBP, pode ser atingido através de desenvolvimento com base em duas estratégias. Seguindo uma estratégia de modificação de microrganismos naturalmente celulolíticos tornando-os também produtores eficientes de etanol ou a estratégia que envolve a modificação de organismos não celulolíticos para que expressem sistemas heterólogos de celulasas que permitem a utilização da celulose [26].

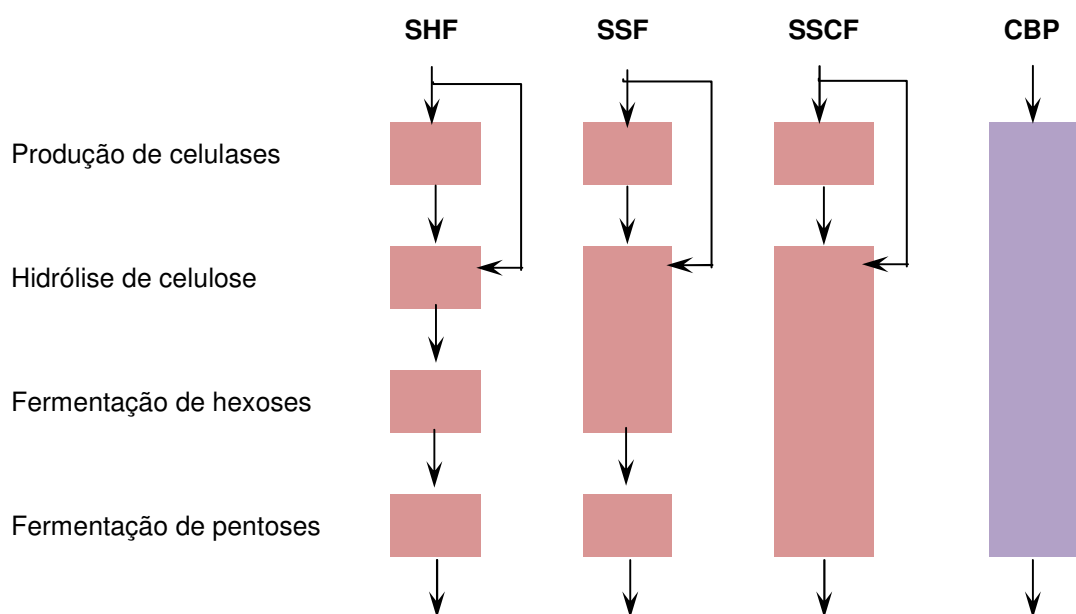


Figura 1.3 – Esquema representativo da integração de processos. SSF – Sacarificação e fermentação simultânea; SSCF – Sacarificação e co-fermentação simultânea; CBP – Bioprocesso consolidado (adaptado de [13])

1.3. COMPOSIÇÃO DE MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS

A grande disponibilidade de matérias lenhocelulósicos e principalmente a sua renovabilidade, têm tornado este material objecto de diversos estudos. Em contraste com as plantas contendo açúcar, a utilização de lenhocelulose como um substrato para a produção de etanol possui como barreira a sua estrutura complexa, que resiste a degradação. A lenhocelulose é composta por três fracções maioritárias: celulose (~45% do peso seco), hemiceluloses (~30% do peso seco), e lenhina (~25% do peso seco) [2].

A biomassa lenhocelulósica é composta por polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose), lenhina e uma pequena parte de extractáveis, ácidos, sais e minerais. A celulose e hemicelulose, que tipicamente compreende dois terços de massa seca, são polissacáridos que podem ser hidrolisados a açúcares (figura 1.4) e eventualmente ser fermentados a etanol. A lenhina não pode ser usada para produção de etanol [7].

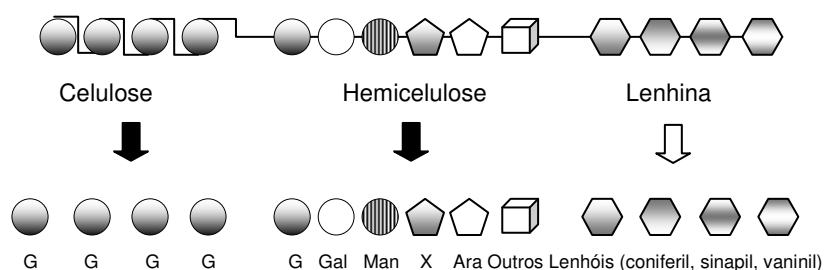


Figura 1.4 - Lenhocelulose. *Setas* representam hidrólise (só os monómeros gerados pela hidrólise, representados pelas *setas pretas*, podem ser fermentados). *G* Glucose, *Gal* galactose, *F* frutose, *Man* manose, *X* xilose, *Ara* arabinose, *Outros* L-ramnose, L-fucose, ácidos urónicos (adaptado de [2])

A composição dos materiais lenhocelulósicos depende das espécies das plantas, da idade, das partes utilizadas, condições de crescimento ou passos de processamento [27]. Na tabela 1.1 são apresentadas composições de diversos materiais lenhocelulósicos e resíduos.

Tabela 1.1 - Conteúdos de celulose, hemicelulose e lenhina de resíduos comuns e madeira (fonte: [15]^a, [28]^b)

Materiais lenhocelulósicos	Celulose (%)	Hemiceluloses (%)	Lenhina (%)
Cana de açúcar ^b	49	31	19
Ervas ^a	25–40	35–50	10–30
Espigas do milho ^a	45	35	15
Folhas ^a	15–20	80–85	0
Palha de arroz ^b	42	32	13
Palha de trigo ^a	30	50	15
Palhas de milho ^b	39	33	15
Troncos de “hardwoods” ^a	40–55	24–40	18–25
Troncos de “softwood” ^a	45–50	25–35	25–35

A maior porção de carboidratos da madeira é composta por polímeros de celulose e hemicelulose com quantidades inferiores de outros polímeros de açúcares tais como amido e pectina. A combinação de celulose e hemiceluloses é designada por holocelulose e corresponde a cerca de 67-70% do peso seco da madeira [29].

Os custos da produção de etanol são altamente sensíveis ao custo da matéria-prima e escala de operação. Mas a constituição da biomassa tem um papel muito importante na performance

do processo, dado que a matéria-prima influencia o rendimento de etanol através da sua composição em hemiceluloses, celulose e açúcares [7].

A maioria dos sistemas de conversão encontrados na literatura, têm-se baseado numa única matéria-prima. Mas considerando o processo, é possível usar múltiplos tipos de matéria-prima, o que se tornará necessário no futuro, quando se pretende a produção de etanol em larga escala [7].

1.3.1. CELULOSE

A celulose é um homopolissacarídeo linear, composto por subunidades de D-glucose ligadas por ligações β -(1,4)-glicosídicas formando moléculas de celobiose [7], [30], [27], [31]. Estas formam longas cadeias (denominadas fibrilas elementares) ligadas por pontes de hidrogénio e forças de van der Waals. As hemiceluloses e lenhina cobrem as microfibrilas (as quais são formadas por fibrilas elementares). As microfibrilas agrupam-se para constituir as fibras de celulose [30]. A conformação secundária e terciária da celulose, tal como a sua próxima associação com a lenhina, hemiceluloses, amido, proteínas e elementos minerais, tornam a celulose uma molécula resistente a hidrólise [2].

A celobiose é a unidade repetitiva da celulose, dado que moléculas adjacentes de glucose sofrem uma rotação de 180° com respeito às adjacentes (Figura 1.5). Esta rotação leva a que a celulose seja altamente simétrica, dado que cada lado da cadeia tem igual número de grupos hidroxilo. O acoplamento de moléculas de celulose adjacentes por pontes de hidrogénio e forças de van der Waals resulta num alinhamento paralelo e estrutura cristalina [27]. Esta estrutura é referida como celulose I ou celulose nativa.

A celulose nativa, referida como celulose I, tem duas formas cristalinas distintas, $I\alpha$, que é dominante na celulose bacteriana e de algas, e $I\beta$, que é dominante nas plantas superiores. A celulose nativa (celulose I) pode ser convertida a outras formas cristalinas (II-IV) através de vários tratamentos [27], [29].

A celulose pode surgir na forma cristalina, no entanto, existe uma pequena percentagem de cadeias de celulose não organizadas, que formam a celulose amorfa. Nesta conformação, a celulose encontra-se mais susceptível à degradação enzimática. A celulose aparece na natureza associada com outras substâncias das plantas, sendo que esta associação pode afectar a sua biodegradação [30].

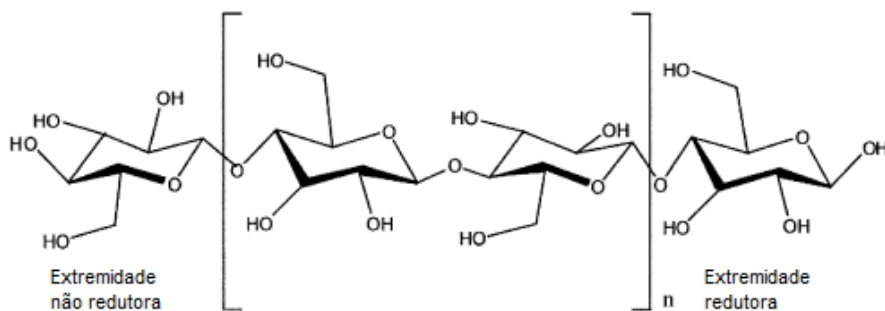


Figura 1.5 – Estrutura da celulose considerando a repetição das unidades de anidrocelobiose unidas por ligações 1,4 (adaptado de [27])

1.3.2. HEMICELULOSES

Em geral, a fracção de hemiceluloses na madeira é formada a partir de diversos polímeros polissacarídeos com menor grau de polimerização que a celulose e contendo maioritariamente os açúcares D-xilopirranose, D-glucopirranose, D-galactopirranose, L-arabinofuranose, D-manopirranose, ácido D-glucopiranosilurónico e ácido D-galactopiranosilurónico com menores quantidades de outros açúcares [29]. As hemiceluloses são polímeros heterogêneos classificados de acordo com os resíduos de açúcar do esqueleto, por exemplo, xilanos, arabinanos, galactanos, sendo construídas por pentoses (D-xilose, D-arabinose), hexoses (D-manose, D-glucose, D-galactose) e ácidos de açúcares (figura 1.6) [32]. As hemiceluloses estão intimamente associadas com a celulose e contribuem para os componentes estruturais da árvore. Usualmente, contêm um esqueleto formado por uma unidade repetitiva de açúcar ligada por ligações β -1,4 com pontos de ramificação 1,2; 1,3 e/ou 1,6 [29].

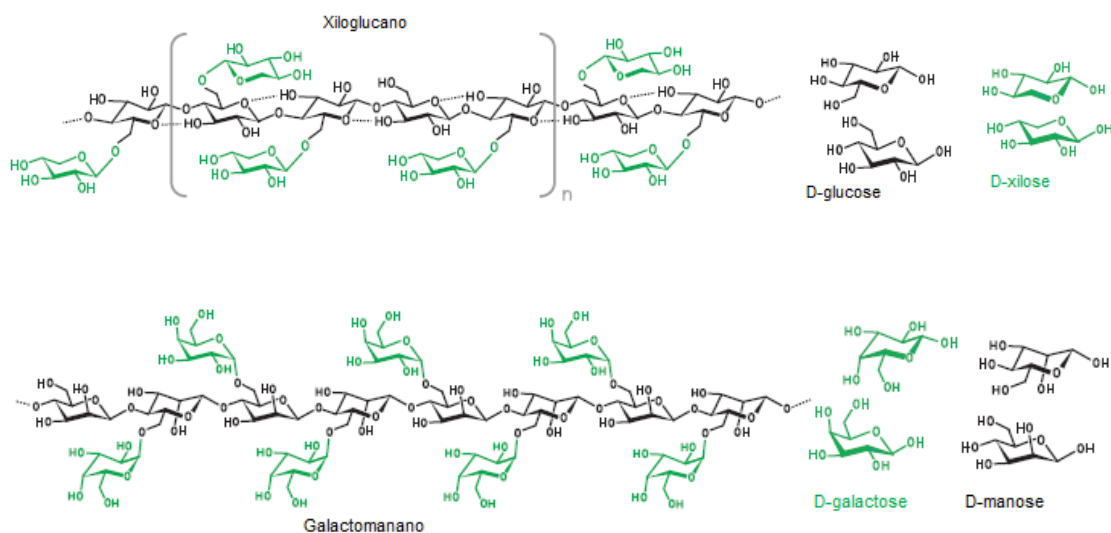


Figura 1.6 - Dois exemplos de estruturas de hemiceluloses: (1) polímero de xiloglucano com formas monoméricas de glucose e xilose, e (2) galactomanano com formas monoméricas de galactose e manose (adaptado de [33])

O grau de ramificação e da identidade dos açúcares em menor quantidade na hemicelulose tende a variar dependendo do tipo de planta [19]. Nas “hardwoods” as hemiceluloses contêm maioritariamente xitanos, enquanto que nas “softwoods” as mais comuns são as glucomananos [32], [34], [30].

A principal diferença, relativamente à celulose, é que a hemicelulose é ramificada com cadeias laterais curtas formadas por diferentes açúcares. Em contraste com a celulose, as hemiceluloses são polímeros facilmente hidrolizáveis, devido à sua natureza amorfa e ramificada [30], [7].

1.3.3. LENHINA

A lenhina (juntamente com a celulose) é o polímero mais abundante na natureza. Esta encontra-se na parede celular, conferindo suporte estrutural, impermeabilidade, e resistência contra ataque microbiano e stress oxidativo. Estruturalmente a lenhina é um heteropolímero amorfo, insolúvel em água e opticamente inactivo, esta consiste em unidades de fenilpropano unidas por diferentes tipos de ligações. O polímero é um produto da desidratação de três álcoois fenilpropínicos: álcool *trans-p*-coumarílico, álcool *trans-p*-coniferílico, e álcool *trans-p*-sinapílico, derivado a partir do ácido *p*-cinamico. Os álcoois coniferílicos são o principal componente das lenhinas de “softwoods”, enquanto que os álcoois siringílicos são os principais constituintes das lenhinas de “hardwoods”. O resultado final desta polimerização é uma estrutura heterogénea cujas unidades básicas se encontram ligadas por ligações C-C e aril-éter [30], [2].

A lenhina não sendo constituída por açúcares é impossível de converter a açúcares, sendo assim um resíduo na produção de etanol e representando um desafio na sua conversão a produtos de valor económico [35]. Esta é degradável apenas por alguns microrganismos, em produtos de elevado valor como ácidos orgânicos, fenóis e baunilha. Através de processos por via química podem ser produzidos aditivos químicos valiosos. Embora estes subprodutos possam melhorar significativamente a competição da tecnologia de produção de etanol, no estudo apresentado por Hamelinck (2005) [7] a lenhina surge com utilização na produção de energia.

A compactação e complexidade da biomassa lenhocelulósica torna-as muito mais difícil de degradar enzimaticamente, comparativamente com o amido, a açúcares fermentáveis. Consequentemente, o custo de produção de etanol a partir desta biomassa é superior ao custo de produção a partir de amido. Para ser competitivo com o etanol derivado de grãos, as enzimas usadas para a hidrólise de biomassa devem tornar-se mais eficientes e muito menos dispendiosas. Além disso, a presença de açúcares que não a glucose nas matérias-primas complica o processo de fermentação porque a conversão de pentoses a etanol é menos eficiente que a conversão de hexoses [19].

CAPÍTULO II – CELULASES

2.1. INTRODUÇÃO

As enzimas celulasas continuam a ser altamente promissoras para utilização no processo de produção de bioetanol a partir da sacarificação enzimática da celulose, devido ao seu elevado potencial de hidrólise da celulose a glucose. No entanto, as enzimas celulasas comerciais ainda são consideradas muito caras para ser usadas na conversão de resíduos lenhocelulósicos a combustíveis líquidos, especialmente etanol [11]. Diversos estudos, determinaram que a produção de celulasas corresponde a aproximadamente 27-40% do custo da produção de etanol a partir de materiais lenhocelulósicos [16]. Assim, reduzindo o custo da produção de celulasas é um assunto chave na hidrólise enzimática de materiais lenhocelulósicos [15].

As estratégias baseadas na utilização de celulasas que podem tornar os processos mais económicos, incluem: um aumento da produtividade volumétrica das enzimas comerciais, produção de enzimas usando substratos mais baratos, produção de preparações enzimáticas com maior estabilidade e produção de celulasas com actividade específica superior sobre substratos sólidos [36].

Devido ao elevado potencial de utilizações das celulasas, quer na indústria têxtil, alimentar, pasta e papel [37], [38], quer nas indústrias emergentes de bioenergia, torna premente a optimização da sua produção para obtenção de preparações de celulasas mais eficazes na hidrólise da celulose [36].

2.2. ORGANISMOS CELULOLÍTICOS

As celulasas para a hidrólise de materiais lenhocelulósicos podem ser produzidas por bactérias e fungos. Estes microrganismos podem ser aeróbicos ou anaeróbicos, mesofílicos ou termofílicos. As bactérias pertencentes aos géneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, e *Streptomyces* podem produzir celulasas [15]. *Cellulomonas fimi* e *Thermomonospora fusca* foram intensivamente estudados para a produção de celulasas. Embora muitas bactérias celulolíticas, particularmente anaeróbias, tais como *Clostridium thermocellum* e *Bacteriodes cellulosolvens*, produzam celulasas com actividade específica elevada, estas não produzem quantidades de enzimas elevadas [16]. Dado que os microrganismos anaeróbios têm uma taxa de crescimento muito baixa e requerem condições de crescimento em anaerobiose, a maioria da produção de celulasas comerciais incidiu sobre os fungos [16]. São diversos os fungos referidos como produtores de celulasas, incluindo *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochete chrysosporium* e espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicillium* [16].

De todos estes géneros, correntemente, a maioria das celulasas comerciais (incluindo β -glucosidase) são produzidas por espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus* [37], [38]. De entre os

diversos microrganismos capazes de produção de celulases, *Trichoderma reesei* produz um sistema enzimático de celulases extracelular, estável e eficiente [39].

2.2.1. O FUNGO *TRICHODERMA REESEI*

O *Trichoderma reesei* é um fungo mesofílico, filamentoso, sendo um dos mais poderosos secretores de proteínas extracelulares, usado industrialmente para a produção de várias proteínas homólogas e heterólogas [40]. Este é um eficiente produtor de celulases e xilanases.

O *T. reesei* foi isolado, quando no Pacífico Sul durante a Segunda Guerra Mundial, um fungo degradou algodão, roupas e tendas.

O *T. reesei* isolado originalmente (estirpe selvagem, QM6a) produz um sistema celulolítico completo extracelular, no entanto, tem como desvantagem a sua susceptibilidade a repressão catabólica na síntese de celulases e a baixa eficácia das celulases devido à sua baixa actividade específica [16]. Com o objectivo de melhorar quer produção de celulases, actividade específica e capacidade de produção de celulases em substratos solúveis, foram produzidas diversas estirpes mutantes, por mutagenese aleatória, as quais possuíam um ou mais destes atributos (figura 2.1) [16].

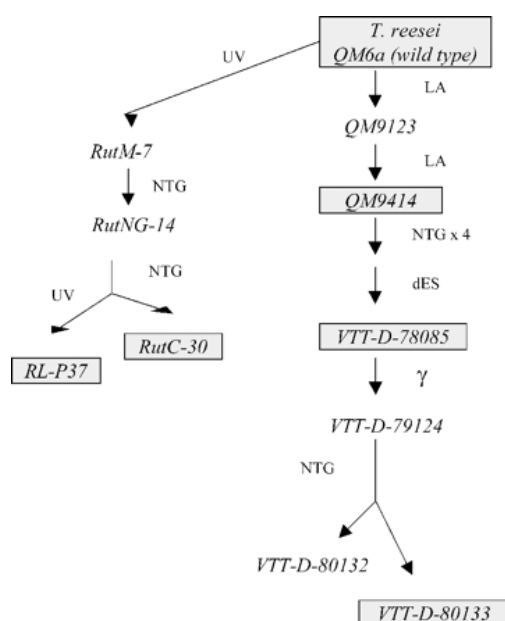


Figura 2.1 - Desenvolvimento de estirpes a partir do *Trichoderma reesei* QM6a

Uma das estirpes desenvolvidas foi o *T. reesei* Rut C-30, que é uma estirpe mutante largamente estudada, parcialmente desreprimida catabolicamente, hiperprodutora de celulases, quando comparada com outras estirpes e com a estirpe nativa [41], [42]. Embora esta seja

capaz de produzir celulasas em elevadas concentrações e rendimentos, a mistura de enzimas secretadas é desequilibrada considerando a razão de β -glucosidase/celulase [42].

O *T. reesei* não produz normalmente celulasas durante o seu crescimento em meio contendo glucose. No entanto, foi demonstrado que a produção de celulasas no *T. reesei* Rut C30 não é sensível a repressão pela glucose dado que comporta uma forma mutante do gene *cre1*, que normalmente transmite a repressão pela glucose [43].

A capacidade de produzir um complexo celulolítico completo enquanto crescendo num substrato solúvel, açúcar metabolizável, também foi conseguido com esta estirpe, sendo que o *T. reesei* Rut C30 produz este complexo em lactose como única fonte de carbono [16]. O desenvolvimento de estirpes, capazes de produção de celulasas em lactose, resolveu os problemas de transferência de massa associados aos substratos celulósicos sólidos. A lactose tem ainda a vantagem de ser um substrato solúvel, barato e que pode ser esterilizado, vantagens que podem facilitar o desenvolvimento de processos contínuos de produção de celulasas [16].

As celulasas do fungo aeróbio *Trichoderma reesei* têm sido foco de investigação ao longo dos últimos 50 anos e são as celulasas que vulgarmente mais se usam na produção de bioetanol em escala laboratorial e piloto [19].

2.3. CELULASES

As celulasas são o grupo de enzimas hidrolíticas capazes de hidrolisar celulose insolúvel a glucose. Estas são produzidas, normalmente, como um sistema de celulasas constituído por diversas e distintas enzimas [44].

Os componentes dos sistemas de celulasas foram primeiro classificados baseando-se no modo da sua acção catalítica e foram mais recentemente classificados com base nas suas propriedades estruturais [45]. Existem três tipos de enzimas que são tradicionalmente incluídas no sistema de celulasas: (i) endoglucanases (endo-1,4- β -glucanases ou 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolases, EC 3.2.1.4), (ii) celobiohidrolases ou exoglucanases (exo-1,4- β -glucanases ou 1,4- β -glucano celobiohidrolases, EC 3.2.1.91), e (iii) celobiasas (β -glucosidases ou β -D-glucosídeo glucohidrolases, EC 3.2.1.21) [44], [31].

O *T. reesei* produz um complexo celulolítico que consiste de diversas celulasas que agem sinergeticamente. Até ao momento foram identificadas pelo menos duas celobiohidrolases (CBHI e II), seis endoglucanases (EGI a VI), 2 β -glucosidases e hemicelulasas. Destas a CBHI, CBHII e EGII são os três principais componentes do sistema de celulasas do *T. reesei*, representando $60\pm 5\%$, $20\pm 6\%$ e $12\pm 3\%$ do total de celulasas, respectivamente [27], [46], [31], [40].

As endoglucanases (EG) podem hidrolisar aleatoriamente ligações internas da cadeia polissacarídea de celulose em locais internos amorfos, produzindo oligossacarídeos de diversos comprimentos, libertando novas extremidades terminais. As celobiohidrolases (CBH) agem de modo progressivo nas extremidades reductoras (CBHI) e não reductoras (CBHII) da cadeia polissacarídea de celulose, extremidades das cadeias existentes ou geradas pelas endoglucanases, libertando celobiose [30], [35], [47], [48]. Ambas enzimas podem degradar celulose amorfa mas, com algumas excepções, as CBHs são as únicas enzimas que degradam eficientemente a celulose cristalina. As CBHs e EGs podem libertar moléculas de celobiose. Uma hidrólise efectiva da celulose também requer β -glucosidases, que são somente activas sobre celo-oligossacarídeos e celobiose, e libertam unidades monoméricas de glucose a partir de celobiose (Figura 2.2). As celulasas distinguem-se de outras hidrolases de glicosídeo pela sua habilidade para hidrolisar ligações β -1,4-glicosídicas entre resíduos glicosílicos [49], [31], [30], [35].

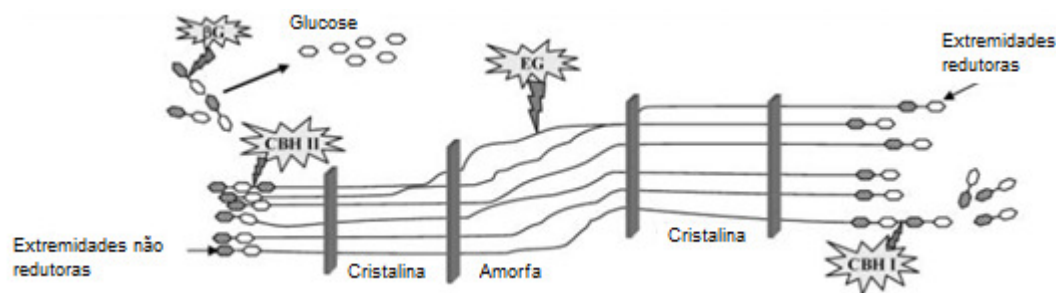


Figura 2.2 - Degradação enzimática de celulose a glucose. A CBHI Celobiohidrolase I actua nas extremidades reductoras; CBHII Celobiohidrolase II actua nas extremidades não reductoras; EG endoglucanases hidrolisam ligações internas. β -G β -Glucosidase cliva o dissacárido celobiose a glucose (adaptado de [30])

Enzimas celulolíticas isoladas a partir de diversas fontes diferem nas suas características moleculares (peso molecular, composição em aminoácidos, e sequência, ponto isoeléctrico, conteúdo em carbohidratos), adsorção à celulose, actividade catalítica, e especificidade ao substrato [44].

Todas as celulasas de *T. reesei*, excepto a EGIII, tal como muitas outras celulasas de outros microrganismos têm uma estrutura de dois domínios consistindo num domínio catalítico (CD - *catalytic domain*) e um domínio de ligação à celulose (CBD - *cellulose binding domain*), que se encontram ligados entre si por um ligante flexível (figura 2.3) [50]. O domínio de ligação à celulose interage com a celulose ligando a enzima a esta. Os CBDs são particularmente importantes na hidrólise da celulose cristalina, tendo-se demonstrado que a capacidade das celobiohidrolases para degradar celulose cristalina diminui quando o CBD está ausente [51]. O efeito do CBD na acção de endoglucanase, EGI e EGII, e celobiohidrolases, CBHI e CBHII de

T. reesei demonstrou ser dependente do substrato [52]. No entanto, o papel e mecanismo exacto de acção dos CBDs é ainda matéria de especulação.

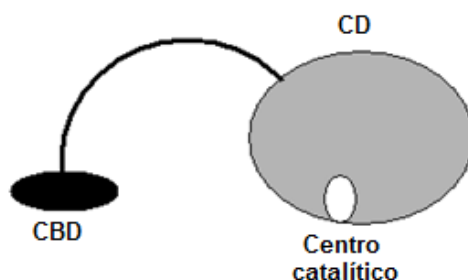


Figura 2.3 - Representação esquemática da organização dos domínios nas enzimas celulolíticas. CBD- domínio de ligação à celulose, CD- domínio catalítico (adaptado de [51])

2.3.1. MODO DE ACÇÃO DAS CELULASES

O sinergismo entre os componentes individuais de um sistema de celulases, isto é, a acção de uma mistura de dois ou mais componentes celulolíticos individuais é superior à soma da acção de cada componente, agindo sobre celulose insolúvel adiciona ainda mais complexidade ao estudo dos mecanismos da acção das celulases. A principal dificuldade no estudo deste fenómeno é que o efeito sinérgico varia dependendo das formas múltiplas de componentes celulolíticos usados no estudo, na fonte de celulases, e na amostra de celulose usadas no ensaio [44].

Existem duas classes de sinergismo em mistura de celulases: sinergismo entre endoglucanases e exoglucanases, e sinergismo entre certas exoglucanases [48].

Ambas as celobiohidrolases (CBHI e CBHII) são muito lentas na diminuição do grau de polimerização da celulose, sendo que as endoglucanases são consideradas como responsáveis pela diminuição do grau de polimerização por clivagem interna das cadeias de celulose em regiões relativamente amorfas, gerando novas extremidades das cadeias de celulose susceptíveis à actuação das celobiohidrolases [31]. Assim sendo, a degradação da celulose cristalina requer uma acção sinérgica de ambas endoglucanases e exoglucanases, as exoglucanases removem rapidamente as unidades de celobiose a partir das extremidades recentemente formadas pela acção de endoglucanases, assim, prevenindo a re-formação de ligações glicosídicas. As duas enzimas podem agir consecutivamente ou em concertação [53].

A necessidade de seis tipos de endoglucanases no sistema celulolítico de *Trichoderma reesei* ainda não foi esclarecida, não se tendo demonstrado claramente sinergismo entre endoglucanases [31].

2.4. PRODUÇÃO DE CELULASES PELO *TRICHODERMA REESEI* RUT C30

2.4.1. TIPOS DE FERMENTAÇÃO

As fermentações microbianas são importantes fontes de produtos biológicos usados na indústria química, alimentar e farmacêutica.

O método de eleição para a fermentação industrial, de um modo geral, depende do microrganismo a utilizar, dos seus mecanismos de regulação metabólica, do produto que se pretende obter e do tipo de materiais usados como substratos. Existem três tipos de fermentação que podem ser considerados: descontínua (“batch”); contínua (fermentador único, com ou sem recirculação de biomassa, ou fermentadores múltiplos); e cultura descontínua com alimentação (“fed-batch”), que é usada em casos de produção de alguns metabolitos secundários sujeitos a repressão catabólica pela fonte de carbono ou de azoto [54].

Os processos descontínuos são de funcionamento mais simples, são considerados processos em sistema fechado, onde não ocorre adição de nutrientes ou remoção de produtos, após o início da fermentação. Existe um grande número de variáveis, entre as quais a densidade celular, concentração de nutrientes e concentração do produto, que se altera continuamente [54].

Os processos em contínuo são um método de prolongar a fase de crescimento exponencial de um microrganismo em cultura descontínua. Consiste de um sistema em que o meio é constantemente renovado a uma determinada velocidade, de forma que se estabeleça um equilíbrio dinâmico, mantendo o volume de cultura, concentração de biomassa, de produto e meio ambiente de cultura, aproximadamente constantes ao longo do tempo [55].

A fermentação descontínua com alimentação ou “fed-batch” é uma cultura que numa primeira fase corresponde a uma cultura descontínua e que posteriormente é alimentada continuamente ou por pulsos, com nutrientes ou aditivos, sem remoção de meio de cultura [55]. A adição intermitente ou contínua de nutrientes pode ser levada a cabo por diversas razões. A quantidade de nutrientes no início da fermentação pode ter de ser restrita para evitar que a necessidade de oxigénio durante a fase de crescimento exceda a capacidade de transferência deste, ou porque elevadas concentrações de determinados nutrientes podem ser inibitórias ou mesmo causar precipitados indesejáveis. Pela adição de nutrientes pode também regular-se o metabolismo do organismo, sendo esta uma das vias mais importantes para aumentar a formação do produto de interesse. Finalmente, existem fermentações onde os nutrientes requeridos durante as fases do crescimento e da formação do produto podem ser diferentes [56].

2.4.2. MEIOS E REQUISITOS NUTRICIONAIS

Como cada microrganismo exhibe padrões nutricionais específicos, os meios de fermentação devem ser formulados para suprir os requisitos básicos de cada um. A formulação óptima do meio de cultura dependerá, então, do microrganismo, do produto pretendido e da escala do processo. Os constituintes do meio devem satisfazer os requisitos elementares para produção de biomassa e metabolitos e deve fornecer a energia adequada à manutenção e divisão celular [54].

Para determinar os requisitos nutricionais precisos de um microrganismo, são usados meios quimicamente definidos, e por adição ou remoção de um constituinte do meio, toma-se conhecimento se esse é um constituinte essencial para o crescimento do microrganismo [54].

Enquanto à escala laboratorial é relativamente fácil ter um meio constituído por compostos puros, a nível industrial, a economia dos processos requer que as matérias-primas não sejam muito dispendiosas e sejam fáceis de armazenar, utilizam-se, por isso, compostos de composição complexa de modo a satisfazerem o maior número possível de necessidades nutricionais do microrganismo [54].

Os requisitos nutricionais e fisiológicos para a máxima produção de celulasas têm sido objecto de estudo, sendo o meio de Mandels um dos mais usados.

Os requisitos básicos para o crescimento microbiano podem ser divididos em duas categorias principais: físicas e químicas. Os aspectos físicos incluem temperatura, pH, e pressão osmótica. Os requerimentos químicos incluem água, fontes de carbono e azoto, sais minerais, oxigénio, e factores orgânicos de crescimento [57].

2.4.2.1. REQUERIMENTOS FÍSICOS

A temperatura é dos factores que mais influencia o crescimento e sobrevivência dos microrganismos [58]. Embora a temperatura seja um parâmetro ambiental controlável, alterações nesta produz simultaneamente alterações em outras variáveis da cultura [59].

No caso do fungo *Trichoderma reesei* Rut C30, foi estudado o efeito da temperatura verificando-se um idêntico crescimento às temperaturas de 17, 28 e 37°C, ocorrendo uma ligeira diminuição da secreção de proteínas a 17°C. À temperatura mais elevada, a secreção pelo *T. reesei* Rut C30 é reduzida em cerca de 4 vezes. Assim verifica-se que tomando-se por base a actividade específica celular (FPU/ mg peso seco) a melhor temperatura é a de 28°C [60].

O pH é um parâmetro importante na produção de enzimas pelo *T. reesei*. Existem diversos estudos acerca da importância do pH na produção de celulasas pela estirpe de *T. reesei*. Uma vez que o pH óptimo para a actividade das celulasas é de aproximadamente 5, foi sugerido que

o crescimento do fungo se desse a valores de pH inferiores de forma a reduzir a acumulação de açúcares extracelulares, diminuindo a repressão catabólica da síntese de enzima [61]. Hadam *et al.* comunicaram que a produção de celulasas era superior para valores de pH de 3.5 com adição de tampão citrato ao meio de cultura [62]. Segundo Juhasz *et al.* [63] um pH de cerca de 6.0, demonstra-se melhor na produção de celulasas em termos de produtividade, no entanto, foi observada desactivação no estágio final da fermentação. Enquanto que para pH 5.0, a actividade de celulasas aumentou gradualmente ao longo de todo o processo de fermentação [63].

Em fermentações submersas, a agitação é importante para uma boa mistura e transferência de massa e calor. Em processo aeróbios, a mistura é fundamental para assegurar uma adequada transferência de oxigénio. No entanto, a agitação aplicada durante a fermentação pode afectar os microrganismos, por dano da estrutura celular, alterações morfológicas, assim como variações na taxa de crescimento e formação de produto [59], e desactivação das enzimas produzidas [64].

Para além, dos factores referidos que devem ser regulados para juntos criarem condições óptimas de crescimento, os microrganismos podem ter outros requisitos, como é o caso da luz, se forem fotossintéticos. Uma atmosfera gasosa controlada será também essencial, dado que os microrganismos requerem uma variedade de gases sendo exemplos o oxigénio, dióxido de carbono, azoto e metano.

2.4.2.2. REQUERIMENTOS QUÍMICOS

O meio de crescimento usado em fermentações submersas industriais favorece tanto o crescimento como a formação de produtos com elevados rendimentos. Os fungos requerem água, oxigénio molecular, uma fonte orgânica de carbono e energia, uma fonte de azoto que não azoto molecular e diversos outros elementos. Pelo menos 13 elementos são essenciais para o crescimento, nomeadamente oxigénio, carbono, hidrogénio, azoto, fósforo, potássio, enxofre, magnésio, ferro, zinco, cobre e molibdénio. Os primeiros oito elementos requeridos são macronutrientes, os restantes são micronutrientes. O meio de fermentação pode ser quimicamente definido (sintético) ou complexo [59].

Os fungos são organismos heterotróficos, requerendo compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Os compostos orgânicos que suportam a maioria do crescimento são usualmente açúcares, mas também podem ser usados polissacarídeos, aminoácido, lípidos, ácidos orgânicos, entre outros [59].

A produção de celulasas tem sido feita utilizando celulose pura como fonte de carbono, mas que é de custo elevado. No entanto, têm-se estudado e proposto, diversos substratos, tais como salgueiro [65], polpa de beterraba [43], resíduos da casca do milho [66], estrume [67], [68] e substratos solúveis como lactose [69].

Para além do carbono, existem outros elementos necessários para a síntese de material celular por parte dos microrganismos. Por exemplo, a síntese proteica requer quantidades consideráveis de azoto e enxofre. A síntese de DNA, RNA e ATP requer azoto e alguns fosfatos [57].

O conteúdo de azoto é de grande importância para a produção de elevadas quantidades de celulasas. O azoto pode ser fornecido como amónia, nitrato ou em compostos orgânicos, tais como aminoácidos ou proteínas [59]. Traços de peptona e extracto de levedura podem estimular um aumento na produção de enzima [70].

O fosfato é uma fonte de fósforo conveniente e de rápida utilização, enquanto formas orgânicas são também usadas em processos industriais. Ambos azoto e fósforo desempenham um importante papel na sobreprodução de metabolitos e afectam a morfologia do fungo [59].

O enxofre é usado na síntese de aminoácidos, fontes naturais de enxofre incluem o ião sulfato, ácido sulfídrico e os aminoácidos que contêm enxofre. O potássio, magnésio e cálcio são cofactores enzimáticos requeridos por alguns microrganismos [57].

São diversos os factores que devem ser considerados nas condições óptimas do meio de cultura. Alguns metais são requeridos para crescimento dos fungos. Os microrganismos requerem quantidades muito diminutas de outros elementos minerais, tais como, ferro, cobre, molibdénio, e zinco; estes são referidos como elementos vestigiais. A maioria é essencial para a função de certas enzimas, usualmente como cofactores. Embora estes elementos possam ser adicionados ao meio, normalmente assume-se que estejam presentes na água da torneira e noutros componentes usados na preparação do meio de fermentação [57], [59].

O efeito estimulador da produção de enzimas por surfactantes é conhecido há algum tempo, Reese *et al.* (1969) [71] comunicaram que os surfactantes estimulavam o aumento da produção de enzimas, principalmente em organismos que produziam pequenas quantidades de enzimas, existindo uma estimulação máxima quando da adição de Tween 80 no tempo zero de incubação.

Posteriormente, surgiram justificações para esta estimulação como as alterações morfológicas e fisiológicas do *T. reesei* influenciarem a produção de enzimas [72], [73], sendo que a utilização de Tween 80 no meio de fermentação inibindo a formação de “pellets” favorece, no caso do *T. reesei* Rut C30, o aumento da concentração de proteína e actividade das celulasas [73].

2.4.3. REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES

Para o *T. reesei* a produção de enzimas para a utilização de substratos complexos, tais como a celulose, é induzida na presença de substrato (ou produtos do mesmo) mas suprimida quando estão disponíveis açúcares facilmente metabolizáveis, tais como a glucose [31].

A formação de celulases ocorre quando o fungo é cultivado e meio contendo celulose. No entanto como a celulose é insolúvel acredita-se que esta é praticamente incapaz de activar a indução directamente, por ser incapaz de entrar na célula. Mas um nível basal de celulases constitutivas poderá degradar celulose em oligossacarídeos, permitindo assim que estes entrem nas células e se convertam num indutor que vá despoletar um elevado nível de expressão de celulases [74].

Em adição à celulose, são diversos os compostos propostos ao longo do tempo como indutores da produção de celulases por *Trichoderma*, tais como substratos solúveis como a sofrorose (identificada em 1962 por Mandels [75] como potente indutor), celobiose, β -celobiono-1,5-lactona e lactose [46], [76], [74], [77]. A celobiose, o menor oligossacarídeo com uma ligação β -1,4, foi relatado como induzindo celulases. No entanto, a sofrorose, que é um dissacarídeo de glucose com uma ligação β -1,2, consegue induzir 2500 vezes mais celulases do que a celobiose [74].

Em contraste a glucose e frutose, que são fontes de carbono preferidas pelos fungos, causam repressão catabólica [46]. A repressão catabólica é um fenómeno observado na indução de celulases quando uma fonte de carbono facilmente assimilável é adicionada [74]. Como a síntese e exportação de proteínas extracelulares requerem uma considerável energia celular, a maioria dos microrganismos, incluindo o *Trichoderma*, param a formação de exoproteínas logo que se encontre disponível um substrato metabolizável. Este fenómeno é bem conhecido e denominado repressão catabólica. A formação de celulases por *T. reesei* é reprimida por monossacáridos como glucose, galactose ou frutose. Outras fontes de carbono relacionadas com a glicólise – como glicerol – também reprimem a formação de celulases, mas não fontes de carbono como citrato [76], [77]. A cinética de repressão catabólica por carbono e desrepressão exhibe diferenças significativas: enquanto a repressão é observada dentro de 3-6 horas, a desrepressão usualmente requer mais tempo. Segundo Kubicek e seus colaboradores, este fenómeno pode ser específico para a lactose (que é usada como uma fonte de carbono conveniente provocando uma desrepressão catabólica de carbono) dado que a β -galactosidase é não constitutiva em *T. reesei* e é sintetizada quando da transferência para o meio com lactose após pré-cultura em glucose [76].

2.4.4. CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento microbiano é caracterizado pela multiplicação do número de células ao longo do tempo. A velocidade com que os microrganismos se multiplicam depende de diversos factores

intrínsecos ao próprio organismo e a factores externos, como é o caso das condições da cultura. O crescimento microbiano é um processo dinâmico, cuja velocidade global é um balanço entre a reprodução e a morte celular.

A cultura em descontínuo, no caso do *Trichoderma reesei*, pode ser dividida em cinco fases. A primeira fase é a fase lag, que quando se usa um inoculo substancial em fase exponencial não é observado, que corresponde ao período de adaptação do microrganismo. Na segunda fase ocorre um crescimento do micélio, mas não formação de produto. Na terceira fase, cessa o crescimento micelial, e pode ocorrer a fragmentação do micélio primário. A quarta fase é caracterizada pela uma rápida formação de produto e crescimento do micélio secundário. Nesta fase o substrato é rapidamente consumido, Na quinta fase, fase estacionária, o crescimento cessa e continua a formação de produto, mas a uma taxa muito inferior [72].

2.4.5. MORFOLOGIA E AGREGAÇÃO MICELIAL

Os fungos filamentosos são microrganismos morfológicamente complexos, exibindo formas estruturais diferentes ao longo do seu ciclo de vida. A estrutura vegetativa básica de crescimento consiste de um filamento tubular conhecido como hifa que é originada pela germinação de um único esporo reprodutivo. À medida que a hifa continua a crescer, esta forma frequentemente ramificações repetidamente para formar uma massa de filamentos hífcos designados de micélio. Quando crescem em cultura submersa, estes fungos exibem formas morfológicas diferentes, indo de filamentos miceliais dispersos até massas miceliais densamente interligadas referidas como “pellets” (figura 2.4) [59].

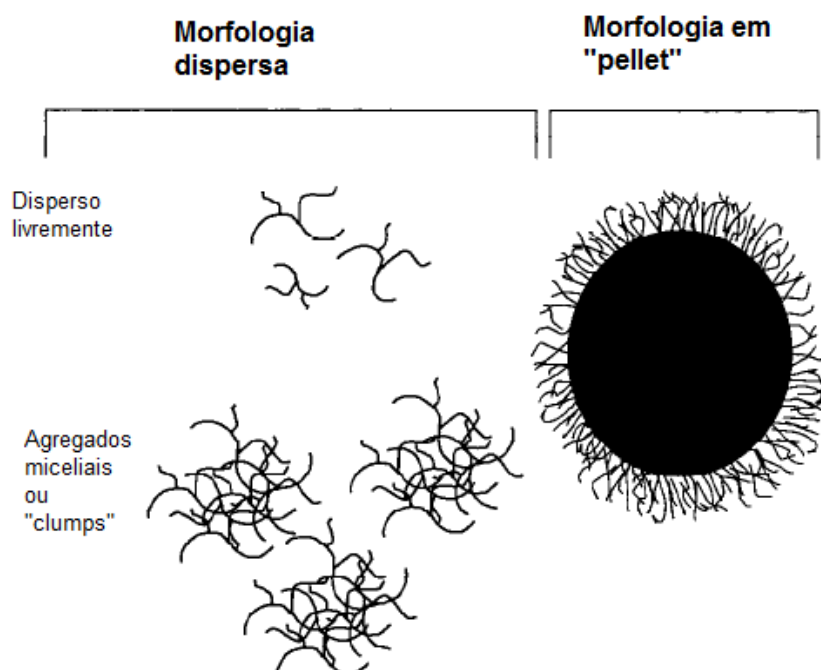


Figura 2.4 - Representação esquemática das morfologias típicas de fungos em cultura submersa (adaptado de [78])

Em culturas submersas, muitos microrganismos filamentosos tendem a agregar e crescer como “pellets”, cuja compactação varia consideravelmente. Os “pellets” são massas de hifas esféricas ou elipsoidais com estrutura interna variável, indo de hifas empacotadas de forma livre, formando “fluffy pellets”, a “pellets” densos, compactos, e fortemente empacotados. A região externa consiste em hifas viáveis e rodeia uma camada de hifas mostrando sinais de autólise. Em “pellets” ocos é encontrada uma terceira camada contendo hifas com uma estrutura da parede irregular, enquanto que o centro do “pellet” contém micélio não identificado. A densidade das hifas dentro dos “pellets” tem significado para a difusão de nutrientes e oxigénio para a biomassa micelial, com consequentes efeitos no crescimento, particularmente no centro dos “pellets” compactos [59].

A forma dispersa consiste de hifas ramificadas ou não ramificadas (dispersas livremente) e agregados (“clumps”) [79]. Em diversos casos, a morfologia dos fungos influencia directa ou indirectamente a produtividade das fermentações de fungos, assim existe uma morfologia considerada desejada considerando a produtividade [59], [80], [73].

Um grande número de factores contribui para o desenvolvimento de uma forma morfológica particular em fermentação submersa e é difícil deduzir relações inequívocas entre as variáveis do processo, formação de produto e morfologia de fungos [59], [80], [81]. O crescimento celular e a sua morfologia são afectados por factores genéticos; tamanho, tipo e idade do inóculo; agitação; constituintes do meio; temperatura e pressão; biossíntese e adição de polímeros, surfactantes e agentes quelantes e pH [59], [81], [82]. Por exemplo, para valores de pH acima de 5.5, as paredes celulares da maioria dos microrganismos encontra-se carregada negativamente, tendendo a causar separação das células agregantes por repulsão electrostática. Isto pode ser suprimido por um aumento da força iónica, ou por pontes com iões Ca^{2+} . A adição de policatiões usualmente induz a agregação, enquanto que os polianiões a suprimem [73, #162].

Diversas fermentações de fungos requerem controlo da morfologia micelial para optimização da produção. A morfologia preferencial é característica de cada organismo. O mecanismo exacto responsável pela formação de “pellets” não é conhecido, e o mecanismo provavelmente varia de espécie para espécie talvez mesmo de estirpe para estirpe. A morfologia de um fungo filamentoso desenvolvida em qualquer sistema de fermentação pode ser considerada como um resultado de várias influências competitivas, um equilíbrio entre forças de coesão e desintegração [59].

No caso de algumas fermentações de fungos pode ser preferida uma forma morfológica particular para atingir uma performance máxima. No caso do fungo *Aspergillus niger* na produção de ácido cítrico é preferida uma forma morfológica em “pellet” [83], para *Aspergillus oryzae* na produção de α -amilase verifica-se uma produção significativamente superior para crescimento filamentoso do que para “pellets” [84].

As fermentações de fungos são sistemas complexos onde as condições operacionais, a reologia do meio, a produção de enzimas, a morfologia dos microrganismos, e o seu estado

morfológico estão todos interrelacionados [85], e em que o controlo da morfologia micelial na fermentação é muitas vezes um pré-requisito para a aplicação industrial.

CAPÍTULO III – HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

3.1. INTRODUÇÃO

Um dos primeiros desafios do processo de bioconversão de lenhocelulose a etanol é ultrapassar a resistência da fracção de celulose à hidrólise enzimática, pois a celulose é intrinsecamente resistente ao ataque enzimático e em combinação com a lenhina e hemiceluloses, estas constituem um “escudo” protector em torno da celulose, que deve ser modificado ou removido antes que possa ocorrer um hidrólise da celulose eficiente, sendo por isso requerido um passo de pré-tratamento dos materiais lenhocelulósicos [86].

As celulasas continuam a ser enzimas promissoras para utilização em processos de produção de bioetanol, baseados na sacarificação enzimática da celulose, devido à possibilidade de proporcionarem elevados rendimentos de conversão de celulose a glucose [11]. No entanto, a sua actividade vai também depender do grau de polimerização e cristalinidade da celulose e da sua associação com hemicelulose e lenhina. A celulose cristalina é altamente resistente ao ataque enzimático, a maioria das cadeias de glucano nas microfibrilas são inacessíveis a enzimas, e quaisquer ligações clivadas pela acção de endoglucanases podem ser rapidamente re-formadas devido à estável orientação das cadeias de glucano [53].

3.2. MECANISMO DE HIDRÓLISE DA CELULOSE

A hidrólise enzimática de celulose é uma reacção heterogénea, em que enzimas celulolíticas convertem a celulose sólida em açúcares solúveis. Esta compreende três passos: adsorção das enzimas celulasas na superfície da celulose, a biodegradação da celulose a açúcares fermentáveis e dessorção das celulasas

O mecanismo enzimático de hidrólise da celulose vastamente aceite envolve acções sinérgicas por endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase ou celobiohidrolase (EC 3.2.1.91), e β -glucosidase (EC 3.2.1.21) [27], [36], [31], como foi referido anteriormente.

A catálise enzimática heterogénea da celulose por celulasas é um processo complexo, onde é necessário um contacto físico entre enzima e substrato para as celulasas levarem a cabo a sua actividade hidrolítica na celulose dos substratos. Foi sugerido por Klyosov (1990) [44] que as celulasas adsorvem na superfície da celulose e desempenham inúmeras acções catalíticas enquanto se deslocam ao longo do substrato. Outra perspectiva, sugere que a enzima, após desempenhar a sua acção catalítica, se separe do substrato e adsorve noutra parte do substrato [87].

Quando um sistema de celulasas actua “in vitro” sobre substratos celulósicos insolúveis, ocorrem três processos em simultâneo: (1) alterações químicas e físicas na fase sólida de celulose; (2) hidrólise primária envolvendo a libertação de intermediários solúveis a partir da superfície de moléculas de celulose, e (3) hidrólise secundária envolvendo a hidrólise de intermediários solúveis a intermediários de peso molecular inferior, e finalmente a formação de

glucose. As alterações químicas na celulose manifestam-se como alterações no grau de polimerização e na concentração de extremidades da cadeia [27].

A hidrólise primária que ocorre na superfície dos substratos sólidos liberta açúcares solúveis com um grau de polimerização até 6 para a fase líquida por hidrólise pelas endoglucanases e exoglucanases. O passo de despolimerização enzimática desempenhado pelas endoglucanases e exoglucanases é o passo limitante para todo o processo de hidrólise de celulose. A hidrólise secundária que ocorre na fase líquida envolve principalmente a hidrólise da celobiose a glucose por β -glucosidases, embora algumas β -glucosidases também hidrolisem celodextrinas mais longas [27].

Durante a hidrólise da celulose, as características do substrato sólido variam, incluindo (1) modificações no número de extremidades da cadeia de celulose por geração pelas endoglucanases e consumo pelas exoglucanases e (2) modificações na acessibilidade da celulose resultando do consumo de substrato e fragmentação da celulose. As acções combinadas das endoglucanases e exoglucanases modificam as características da superfície da celulose ao longo do tempo, resultando em rápidas mudanças na velocidade de hidrólise [36].

Tipicamente, a taxa de hidrólise da celulose por enzimas diminui rapidamente com a conversão, levando à diminuição do rendimento, a longos tempos de processamento, e utilização de elevadas concentrações de enzimas. A taxa de formação de açúcares solúveis por quantidade de enzima adsorvida diminui muito à medida que a hidrólise progride [88]. Têm sido colocadas diversas hipóteses para explicar esta observação, incluindo instabilidade térmica das celulasas, inibição pelo produto da hidrólise, inactivação das celulasas, diminuição da actividade das enzimas, transformação do substrato numa forma de mais difícil digestão, e/ou a estrutura heterogénea do substrato [88].

Existem dois passos na hidrólise enzimática, primeiro dá-se a adsorção das celulasas à superfície da celulose e posterior quebra da celulose a açúcares degradáveis. A adsorção é um processo rápido, sendo que a dessorção das celulasas se dá gradualmente à medida que a hidrólise progride [89]. O processo da adsorção de enzimas à celulose é importante para o conhecimento da hidrólise enzimática da celulose. As enzimas podem ligar à superfície sólida quer específica ou inespecificamente. As interacções são usualmente por pontes de hidrogénio, electrostáticas ou hidrofóbicas. As propriedades da superfície têm um enorme efeito no mecanismo, taxa e extensão da adsorção. A hidrofobicidade da superfície é, geralmente, vista como um importante factor: quanto mais hidrofóbica for a superfície maior a extensão da adsorção. Todas as principais celulasas do *T. reesei* têm aminoácidos hidrofóbicos expostos na superfície. Os resíduos hidrofóbicos na superfície da enzima também podem levar a uma ligação à superfície hidrofóbica da lenhina [50].

3.3. FACTORES QUE AFECTAM A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE

Os factores que afectam a hidrólise enzimática da celulose incluem tipo de substratos, actividade das celulasas e condições de reacção (temperatura, pH e outros parâmetros) [15]. No entanto, os factores limitantes que afectam a hidrólise enzimática da biomassa foram tradicionalmente divididos em dois grupos: características estruturais da biomassa e mecanismo enzimático. No entanto, a natureza heterogénea da biomassa e a multiplicidade de enzimas torna difícil compreender inteiramente as interacções entre enzimas e substratos [90].

Verifica-se que várias características dos substratos lenhocelulósicos podem limitar a taxa e grau de hidrólise pelas celulasas. No entanto, a acção das celulasas também altera características dos substratos à medida que a hidrólise decorre. Assim sendo, é importante compreender a contribuição que o substrato e enzima têm na sacarificação total do substrato [91].

3.3.1. SUBSTRATO

Os materiais lenhocelulósicos têm uma estrutura muito heterogénea, sendo constituídos por celulose, hemiceluloses e lenhina. Apesar do extensivo trabalho de investigação, ainda não se compreende completamente quais as características do substrato que têm maior impacto na taxa de hidrólise da celulose na madeira [91].

A concentração de substrato é um dos principais factores que afectam o rendimento e velocidade inicial da hidrólise enzimática de celulose. Para níveis baixos de substrato, um aumento da concentração de substrato, resulta, normalmente, num aumento do rendimento e velocidade da reacção de hidrólise. No entanto, para elevadas concentrações de substrato pode haver inibição pelo substrato, o que diminui substancialmente a velocidade da hidrólise [15]. A susceptibilidade dos substratos celulósicos às celulasas depende das características estruturais do substrato [91], [15].

Convencionalmente as características estruturais do substrato foram divididas em dois grupos e classificadas como físicas e químicas. As características estruturais químicas são a composição em celulose, hemiceluloses, lenhina e grupos acetil ligados às hemiceluloses. As características estruturais físicas consistem na acessibilidade da área superficial, cristalinidade, a distribuição física da lenhina na matriz de biomassa, grau de polimerização, volume de poro e tamanho da partícula de biomassa. As características estruturais químicas e físicas encontram-se fortemente associadas, isto é, a mudança de uma característica estrutural pode levar a alterações nas outras [90].

A acessibilidade dos materiais lenhocelulósicos tem papel importante na melhoria da hidrólise enzimática. As enzimas celulasas ligam-se à superfície das partículas de substrato antes da hidrólise de celulose insolúvel ter lugar. A estrutura dessas partículas, em combinação com o

tamanho e forma das celulases, determinam se as ligações β -glucosídicas estão ou não acessíveis ao ataque enzimático [27].

É vastamente aceite que a celulose altamente cristalina é menos acessível ao ataque por celulases do que a celulose amorfa, assim a cristalinidade afecta negativamente a eficiência do contacto da enzima com a celulose [90]. O sinergismo das celulases parece ser particularmente importante na hidrólise da celulose cristalina [91].

A lenhina, devido à sua próxima associação com as microfibrilas de celulose, é identificada como sendo o principal inibidor do ataque enzimático à celulose, evitando a acessibilidade das enzimas [90]. Estudos demonstram que a digestibilidade da biomassa é aumentada com a remoção da lenhina [92]. A deslenhificação causa um inchamento da biomassa, ruptura da estrutura da lenhina e subsequentemente leva a um aumento da área superficial interna e volume médio do poro, assim reduzindo a adsorção irreversível das enzimas à lenhina e aumentando a acessibilidade à celulose [91], [90]. A remoção das hemiceluloses também melhora a digestão da celulose apesar do conteúdo em lenhina, por aumento da acessibilidade das celulases à celulose [91].

Zhu *et al.* (2007) [90] verificaram os efeitos do conteúdo de lenhina, do conteúdo de acetil e da cristalinidade, na adsorção e eficácia da enzima. Por comparação com o conteúdo em lenhina, o conteúdo em acetil tem um menor efeito no aumento da quantidade de enzimas adsorvida, no entanto, embora a deslenhificação e desacetilação aumentasse a quantidade de enzimas adsorvida, a taxa inicial de hidrólise não aumentou consideravelmente [90].

Para além do impedimento ao acesso das celulases à celulose, a lenhina tem um segundo efeito que é a inactivação das enzimas. As enzimas ligam irreversivelmente à lenhina, assim limitando a acção destas sobre a celulose [93].

Os substratos lenhocelulósicos são heterogéneos na sua composição em termos de tamanho da partícula, tendo-se demonstrado que entre a população de fibras de um substrato lenhocelulósico, as mais finas têm um volume de poro significativamente maior do que as fibras maiores, sendo que uma diminuição do tamanho da fibra leva a um aumento dos rendimentos da hidrólise [91], [93].

3.3.2. CELULASES

Têm sido sugeridos diversos factores relacionados com a natureza do sistema de celulases como influenciam o processo de hidrólise. Estes incluem inibição do complexo de celulases pelo produto final, inactivação térmica e adsorção irreversível das celulases [91].

A actividade das celulases é inibida pela celobiose e em menor extensão pela glucose. Foram desenvolvidos diversos métodos para reduzir a inibição, incluindo a utilização de elevadas concentrações de enzimas, a suplementação de β -glucosidasas durante a hidrólise e remoção de açúcares por ultrafiltração ou por SSF [15].

A interacção sinérgica das diferentes celulasas pode ser benéfica no aumento da taxa da hidrólise em substratos complexos. No entanto, a extensão do sinergismo exibido pelas celulasas, depende do substrato, com algumas misturas mostrando sinergismo óptimo em substratos cristalinos [91].

O aumento da concentração de celulasas no processo, até uma certa extensão, pode melhorar o rendimento e velocidade da hidrólise, mas irá aumentar significativamente o custo do processo [15]. Na prática, dependendo do tipo de substrato a ser hidrolisado a concentração de enzimas celulasas costuma variar entre 7 e 33 FPU/g de substrato. Geralmente, uma maior quantidade de enzima é requerida se a hidrólise é conduzida em descontínuo onde não existe remoção de açúcares. Nestes casos quando são produzidas concentrações inibitórias de açúcares deve adicionar-se β -glucosidase para converter a celobiose num produto menos inibidor, a glucose [16], [15].

3.3.3. ADITIVOS

Verificou-se que a actividade das celulasas diminui ao longo da hidrólise e que a adsorção irreversível das celulasas à celulose é parcialmente responsável por esta desactivação. Tem sido referido que a adição de surfactantes durante a hidrólise é capaz de modificar as propriedades da superfície da celulose e minimizar a ligação irreversível das celulasas à celulose e conseqüentemente melhorar a hidrólise enzimática [15]. Kar *et al.* relataram o aumento da taxa de hidrólise enzimática das palhas do milho pré-tratadas por adição de Tween 20 e Tween 80, mostrando-se o Tween 20 ligeiramente mais eficaz que o Tween 80. Para além disso o Tween preveniu a desactivação térmica das enzimas permitindo a utilização de temperaturas superiores [94].

Para o mesmo tipo de substrato testado por Kar *et al.*, foi testada a adição de albumina sérica bovina (BSA) por Yang *et al.*, aumentando o rendimento da hidrólise. Este aumento foi justificado por uma elevada afinidade da BSA à lenhina, reduzindo significativamente a adsorção não específica das celulasas à lenhina [95].

Para além da adição de surfactantes não iónicos e proteína foi estudada a adição de polímeros contendo poli(óxido etileno) verificando-se que pode aumentar a hidrólise enzimática da lenhocelulose. A aplicação de poli(etileno)glicol (PEG) facilita a utilização de temperaturas de processo superiores. A adsorção de PEG à lenhocelulose é proposta como sendo devida maioritariamente a interacções hidrofóbicas entre o PEG e a lenhina, ocupando estes os locais disponíveis para ligação inespecífica das celulasas à lenhina [96], [97].

3.3.4. CONDIÇÕES DA REACÇÃO

A hidrólise enzimática de substratos celulósicos é usualmente conduzida a pH aproximado de 4.8 e uma temperatura de 45-50°C [16]. No entanto, a temperatura óptima de hidrólise é

afectada directamente pelo tempo de reacção, quando são aplicados tempos de reacção mais longos são necessárias temperaturas inferiores para obtenção de rendimentos superiores [39].

A mistura reaccional é normalmente sujeita a agitação de forma a conseguir uma mistura eficiente, no entanto, não pode ser muito vigorosa porque pode levar à inactivação das enzimas [16].

Uma baixa concentração de substrato origina um baixo rendimento, e uma elevada concentração de celulasas pode aumentar os custos desproporcionalmente. No entanto, a razão substrato/enzima não deve ser demasiado elevada (inibição) [15].

A hidrólise pode ser melhorada através da adição certos surfactantes, através da utilização de misturas de celulasas de diferentes organismos, e adicionando outras enzimas (por exemplo, pectinase). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise enzimática, a investigação tem incidido simultaneamente sobre o reforço da actividade enzimática nas distintas etapas do processo [15], tal como integrar as diferentes etapas em menos reactores, nas configurações do processo já mencionadas. Os intermediários e produtos finais da hidrólise, celobiose e glucose, inibem a actividade das celulasas, esta inibição pode ser evitada mediante o fornecimento de enzimas extra durante a reacção, ou por remoção do produto por ultrafiltração ou por fermentação em simultânea no mesmo bioreactor onde ocorre a hidrólise enzimática. As enzimas podem ser recuperadas e recicladas, embora a qualidade das enzimas decresça gradualmente [15]. Quando um pré-tratamento químico precede a hidrólise enzimática, pode existir a necessidade de remoção de compostos inibidores das enzimas [7].

3.3.1. OBJECTIVOS

Tomando em consideração a visão global da produção de bioetanol a partir de resíduos florestais, este trabalho focou-se nos passos de produção de celulases e no de hidrólise enzimática de materiais lenhocelulósicos, nomeadamente dois tipos de resíduos florestais pré-tratados: esteva (*Cistus ladanifer*) e giesta (*Cytisus striatus*).

Os principais objectivos deste trabalho foram:

1. Produção de celulases a partir da estirpe de *Trichoderma reesei* RUT C30
 - 1.1. Avaliar a influência da suplementação do meio de cultura com sistemas tamponantes a diferentes pH e concentrações na produção de celulases e morfologia do fungo
2. Avaliar os parâmetros que influenciam o processo de hidrólise da fracção sólida de diferentes resíduos florestais pré-tratados, usando celulases comerciais
 - 2.1. Estudar métodos de redução ou eliminação da ligação irreversível das celulases à lenhina e consequente inibição enzimática.
 - 2.2. Optimizar o processo de hidrólise enzimática da fracção sólida de diferentes resíduos florestais pré-tratados, aplicando estratégias estatísticas de resolução de problemas como o método de Plackett-Burman e “Central Composite Design”

CAPÍTULO IV – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PRODUÇÃO DE CELULASES

4.1.1. ESTIRPE

O microrganismo utilizado neste trabalho para a produção de celulases foi a estirpe de *Trichoderma reesei* Rut C-30 (NRRL 11460) cedida pelo Agricultural Research Service Culture Collection (Peoria, Illinois). *T. reesei* Rut C-30 é uma estirpe modificada geneticamente hiperprodutora de celulases e que não é reprimida pela glucose, quando comparada com a estirpe selvagem [41, #41]. Embora, a estirpe seja capaz de produzir celulases com elevadas concentrações e rendimentos, a mistura enzimática secretada é desbalanceada tendo em consideração a razão de β -glucosidase para celulases [42].

4.1.2. ARMAZENAMENTO DA ESTIRPE

Inocularam-se rampas de meio Sabouraud dextrose agar com a estirpe fornecida, as quais foram incubadas a 30°C, durante 5 a 7 dias. Após esporulação, os esporos de *T. reesei* foram ressuspensos em solução NaCl 0.8% (p/v), contendo Tween 80 a 0.025% (p/v) e 20% de glicerol, por agitação mecânica, transferiu-se o conteúdo para um erlenmeyer estéril. Procedeu-se à distribuição da suspensão por tubos criogênicos estéreis e armazenaram-se a -80°C. As pré-fermentações foram iniciadas recorrendo a um destes tubos.

4.1.3. MEIOS DE FERMENTAÇÃO

As culturas foram realizadas em meio de Mandels modificado, contendo: 2.0 g/L KH_2PO_4 ; 1.4 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.0027 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.0016 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0.0014 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0.0037 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.6 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.4 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.75g/L peptona; 2.0 g/L Tween 80; 0.3 g/L ureia; adicionando-se 30g/L glucose no caso da pré-fermentação. A composição do meio de produção usado foi semelhante à do meio de pré-fermentação, com a exceção de que este foi suplementado com um indutor específico, 20 g/L de lactose. Foi testada a adição de sistemas tamponantes ao meio de Mandels modificado, por dissolução dos componentes do meio de cultura em diferentes sistemas tamponantes, apresentados na Tabela 4.1. O pH inicial do meio dissolvido em água foi ajustado a 4.8 antes da sua esterilização por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos.

Tabela 4.1 - Descrição dos sistemas tamponantes usados nas culturas em balão

Componentes	Concentrações (mM) e pH testados	Capacidade tamponante	pKa
Ácido cítrico + NaOH	50mM, pH 4.0; 50mM, pH 4.8; 100mM, pH4.8	2.15 – 6.51	3.13; 4.76; 6.40
Ácido fórmico + NaOH	50mM, pH 4.0; 50mM, pH 4.8; 100mM, pH4.8	2.6 – 4.8	3.75
Hidrogenoftalato de potássio + NaOH	50mM, pH 4.0; 50mM, pH 4.8; 100mM, pH4.8	4.10 – 5.9	2.95; 5.41
Ácido succínico + NaOH	50mM, pH 4.0; 50mM, pH 4.8; 100mM, pH4.8	3.8 – 6.0	4.21; 5.64

4.1.4. PREPARAÇÃO DO INÓCULO

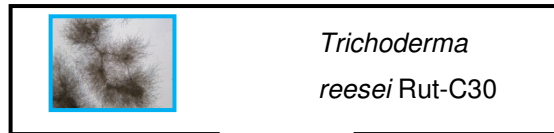
Os esporos conservados a -80°C, foram usados para inocular rampas de Sabouraud dextrose agar (SDA). Após 5 a 7 dias a 30°C, os esporos de cada rampa foram ressuspensos em 5mL de solução estéril de NaCl 0.8%, por agitação mecânica em vortex durante 3 minutos.

Cada pré-fermentação foi iniciada por adição de suspensão de esporos numa razão de 0.1% (v/v). A pré-fermentação foi efectuada por incubação em agitador orbital a 200rpm, durante 48 horas a uma temperatura de 34°C. As fermentações, foram inoculadas a 10% (v/v) com inóculo proveniente da pré-fermentação.


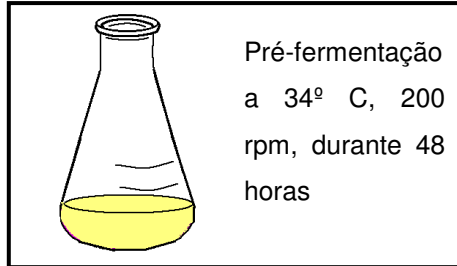
4.1.5. CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

As fermentações para produção de celulasas foram conduzidas com um volume de trabalho de 55 mL em erlenmeyers de 250 mL, e inoculados com inóculo proveniente da pré-fermentação a 10% (v/v). Os ensaios em erlenmeyer foram realizados a 28°C durante 96 horas num agitador orbital.

A análise da evolução da fermentação é feita por recolha de amostras do meio de cultura, de 2 mL de 24 em 24 horas, estas amostras são centrifugadas durante 5 minutos a 5000g numa centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante é utilizado na determinação da concentração de proteína total, actividade enzimática e concentração de açúcares redutores.



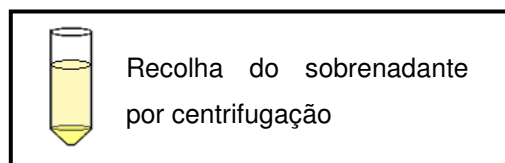
Inóculo de rampas de SDA a 28°C durante 5 dias



Fermentação a 28° C, 150 rpm, início com um inóculo de *T. reesei* em:

- meio de Mandels suplementado com tampões (citrate, formate, ftalate, succinate) usando meio sem tampão como controle.

Prolongamento da fermentação por 5 dias



4.1.6. AQUISIÇÃO DE IMAGEM

Para a análise morfológica do fungo, foi usada uma câmara digital Olympus SP-500UZ montada num microscópio Olympus BX41.

4.1.7. ESTERILIZAÇÃO DE MEIOS E EQUIPAMENTOS

De modo a garantir condições estéreis de crescimento do fungo *Trichoderma reesei*, todos os meios (sólidos de propagação, pré-inóculos e produção), balões e todos os restantes acessórios necessários a estes ensaios foram esterilizados num autoclave a 121 °C, a 1 atm, durante 20 minutos. Os glúcidos e cloreto de cálcio foram esterilizados em separado dos restantes constituintes dos meios de fermentação.

Todas as manipulações do microrganismo (inoculação ou recolha de amostras) foram realizadas à chama, de modo a manter a esterilidade.

4.1.8. REAGENTES

Ao longo do trabalho experimental foram usados diversos produtos químicos, que se apresentam na tabela 4.2, com os respectivos graus de pureza e fornecedores.

Tabela 4.2 - Lista de reagentes usados ao longo do trabalho experimental

Reagente	Grau de pureza (%)	Fornecedor
Ácido cítrico monohidratado	99.5%	Applichem
Ácido acético	100%	Merck
Ácido fórmico	98-100%	Analar
Ácido succínico	99%	Fluka
Hidrogenoftalato de potássio	99.5%	Sigma-Aldrich
Agar	-	USB
D-Celobiose	98%	Sigma
Cloreto de cálcio dihidratado	99%	Sigma
Cloreto de cobalto hexahidratado	-	Sigma
Glucose monohidratada para microbiologia	-	Merck
Extracto de levedura	-	Merck
Dihidrogenofosfato de potássio	99%	Sigma

Reagente	Grau de pureza (%)	Fornecedor
Lactose monohidratada para microbiologia	-	Merck
Peptona	-	Oxoid
Sabouraud dextrose agar	-	Difco
Cloreto de sódio	99.5%	Panreac
Sulfato de amônio	99%	Panreac
Sulfato ferroso heptahidratado	99%	Sigma-Aldrich
Sulfato de magnésio heptahidratado	98%	Sigma
Sulfato de manganês monohidratado	99%	Sigma
Ureia	99.5%	Sigma
Tween 80	-	Aldrich
Etanol absoluto	99.8%	Carlo Erba
Hidróxido de sódio	98%	Sigma
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	98%	Aldrich
Ácido ortofosfórico	85%	Merck
Albumina sérica bovina	-	Sigma
Azul de Coomassie G250	-	Fluka
Papel de filtro Whatman nº1	-	Whatman
Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado	99%	Sigma
Sulfato de zinco monohidratado	99%	Fluka
D-glucose	99.5%	Sigma
Glicerol	86-88%	Ridel-de Haën

4.1.9. EQUIPAMENTO

Ao longo do trabalho experimental, para além do material corrente de laboratório, foram utilizados os equipamentos, apresentados na tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Características dos equipamentos utilizados

Designação	Marca	Modelo
Autoclave	Uniclave	88
Balança analítica	Mettler	Toledo AG 204
Balança analítica	Sartorius	CP225P
Balança	AE	-
Banho térmico	Grant	OLS 200
Centrifuga refrigerada para eppendorfs	Hermle	Z323K
Centrifuga refrigerada	Sartorius	Sigma 3-18K
Espectrofotómetro	Pharmacia Biotech	Ultrospec U/V 3000
Estufa	Selecta P	Incubig
Incubador orbital	Aralab	160E, série 8500
Incubador orbital	Aralab	Agitorb 200
Potenciómetro	Metrohm	744 pH-Meter
Microscópio	Olympus	BX41
Câmara digital	Olympus	SP-500UZ

4.1.10. MÉTODOS ANALÍTICOS

Ao longo das fermentações colheram-se amostras, as quais foram centrifugadas e o sobrenadante resultante foi guardado para determinação da actividade celulolítica total, da proteína total solúvel e concentração de açúcares redutores, e as amostras correspondentes às 96 horas para determinação da actividade da β -glucosidase (celobiase).

4.1.10.1. ACTIVIDADE CELULOLÍTICA TOTAL

A actividade sobre papel de filtro, a qual descreve a actividade celulolítica total, foi realizada de acordo com o procedimento seguinte descrito por Domingues [55]. Neste método, 0.5 mL de

amostra convenientemente diluída em 2 ml de tampão acetato 0.1M a pH 4.8 e 50 mg de pequenos discos de papel de filtro Whatman Nº1 são incubados a num banho termostaticado a 50°C, com uma frequência de agitação de 75U/min, durante 60 minutos. Paralelamente, ao ensaio enzimático é feito um ensaio de controlo para cada amostra testada, em que a amostra contendo a enzima é apenas adicionada após incubação e imediatamente antes da paragem da reacção. A reacção enzimática é terminada colocando as amostras a 100°C, durante 10 min. As amostras são centrifugadas a 5000g durante 5 minutos, para separação do papel de filtro.

Os equivalentes de glucose (açúcares redutores) formados durante o ensaio foram estimados através do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [98], usando a glucose como padrão. Onde, a quantidade de açúcares redutores produzida enzimaticamente, expressa em termos de massa equivalente de glucose, é obtida por subtração da massa equivalente de glucose obtida no controlo, à massa equivalente de glucose obtida no extracto enzimático.

As actividades foram expressas FPU/mL, onde uma unidade internacional de papel de filtro (FPU) é definida como a quantidade de enzima que liberta 1µmol glucose por minuto durante a reacção de hidrólise de 50mg de papel de filtro.

4.1.10.2. ACTIVIDADE DA β-GLUCOSIDASE (CELOBIASE)

A actividade da β-glucosidase foi determinada de acordo com os procedimentos padrão IUPAC e expressa como unidades internacionais [99]. Neste método, 1 mL de amostra convenientemente diluída em tampão citrato 0.05M a pH 4,8 é pré-incubada 5 min. A 50°C, num banho termostaticado. Adiciona-se 1 mL de solução de substrato (celobiose 15mM em tampão citrato 0.05M, pH 4.8 – solução preparada sempre que usada), agita-se e incuba-se num banho termostaticado a 50°C, durante exactamente 30 minutos. A reacção enzimática é terminada por imersão em água fervente durante exactamente 5 minutos. Transferem-se os tubos para um banho de água fria. Paralelamente, ao ensaio enzimático é feito um ensaio de controlo para cada amostra testada, em que se realiza todo o procedimento excepto o passo de incubação a 50°C (alteração ao método descrito por Ghose [99]).

Uma unidade da actividade de β-glucosidase foi definida como a quantidade de enzima convertendo 1µmol de celobiose para produzir 2µmol de glucose em 1 minuto. As concentrações de glucose nos hidrolisados de celobiose foram medidas usando um bioanalizador YSI 7100MBS (sistema bioanalítico de multiparâmetros).

4.1.10.3. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

A quantificação de proteína total no sobrenadante foi realizada através do método de Bradford, o qual se baseia na interacção do corante específico, Azul de Coomassie G-250, com as ligações peptídicas das proteínas solúveis, originando um aumento de absorvência da mistura

analítica proporcional à concentração de proteína. Nas condições do ensaio, o corante está presente na sua forma catiónica (cor acastanhada), e não absorve fortemente a 595 nm. Quando o corante se liga a uma proteína, ocorre uma estabilização da forma aniônica duplamente protonada do corante (restaurando-se a cor azul), que absorve na região dos 595 nm.

Neste método, o reagente de Bradford, é constituído por 0.01% (p/V) de Azul de Coomassie G-250, 5% (V/V) de etanol absoluto e 10% (V/V) de ácido ortofosfórico a 85%, em água destilada.

O procedimento experimental consistiu na adição de 1 mL de reagente a 100 µL de amostra, deixou-se repousar durante 5 minutos, e leu-se a absorvência a 595 nm, tomando como branco água. Este método foi usado para quantificação de proteína no sobrenadante das culturas de *Trichoderma reesei* Rut C-30. Os cálculos de concentração foram efectuados com base nas curvas de calibração efectuadas entre 10 a 100 µg/mL de albumina sérica bovina.

Assim, pelo tratamento dos valores obtidos na realização das curvas de calibração, da regressão linear da média da absorvência a 595 nm em função da concentração de albumina sérica bovina, obteve-se a seguinte equação:

$$Ab_{595nm} = 4.3313 [BSA] - 0.0473,$$

para o intervalo de concentrações de soluções padrão, de 10 a 100 µg/mL, com o coeficiente de correlação de 0,989, estando a curva representada no gráfico da figura 4.1.

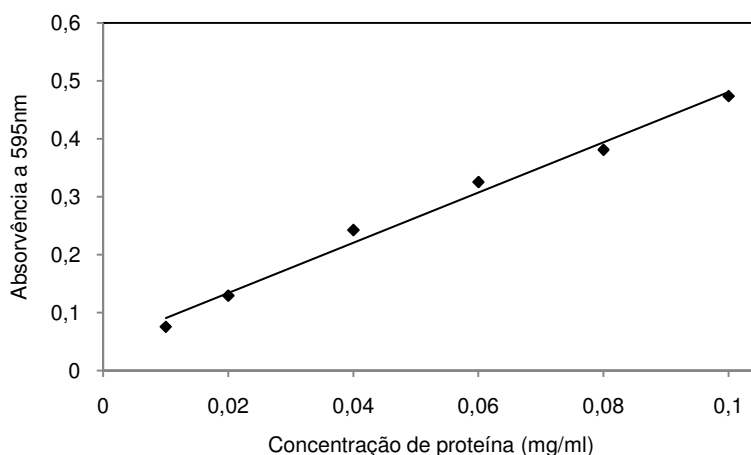


Figura 4.1 - Curva de calibração do método de Bradford para determinação de proteína total da absorvência a 585nm em função da concentração de albumina sérica bovina

4.1.10.4. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A quantidade de açúcares redutores nas culturas foi estimada usando o método de Miller [98], usando a glucose como padrão. Este método baseia-se na formação de um complexo acastanhado, que pode ser estimado espectrofotometricamente, por redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico por açúcares redutores. A cada 0.5mL de amostra é adicionado 0.5 mL de

reagente DNS. Após homogeneização da mistura, taparam-se os tubos com tampas metálicas e colocaram-se num banho a 100°C durante 5 minutos. Após esse período e após o arrefecimento em água corrente, adicionaram-se-lhe 5mL de água destilada e leram-se as respectivas absorvências a 540 nm contra um branco de água. Os cálculos da concentração são feitos através de uma curva de calibração com glucose até 1 mg/mL.

Assim, pelo tratamento dos valores obtidos na realização das curvas de calibração, da regressão linear da média da absorvência a 540 nm em função da concentração de glucose, obteve-se a seguinte equação:

$$Abs_{540nm} = 0.5639 [Glucose] - 0.0154,$$

para o intervalo de concentrações de soluções padrão de 0.05 a 1.0 mg/mL, com o coeficiente de correlação de 0.9997, estando a curva representada no gráfico da figura 4.2.

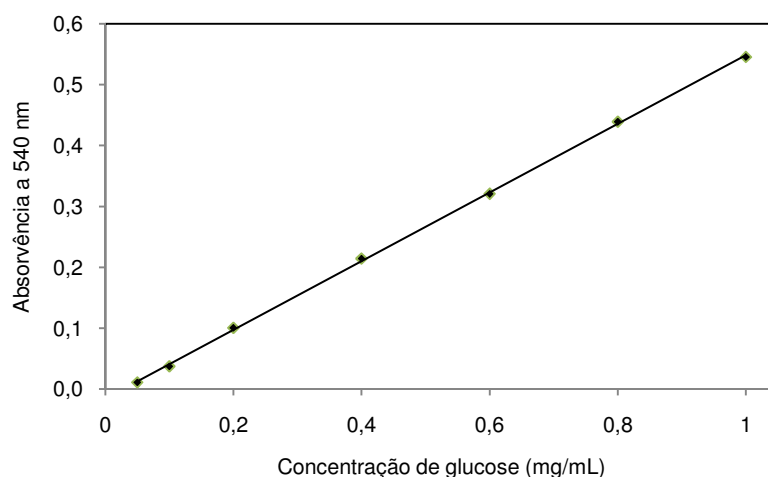


Figura 4.2 - Curva de calibração do método de determinação de açúcares redutores da absorvência a 540nm em função da concentração de glucose

4.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

4.2.1. MATERIAL LENHOCELULÓSICO

As matérias-primas utilizadas neste trabalho de optimização do processo de hidrólise enzimática da fracção sólida resultante de um pré-tratamento com ácido diluído, foram a esteva (*Cistus ladanifer*) e a giesta (*Cytisus striatus*) recolhidas e cedidas pela Associação de produtores florestais do Paúl. As matérias-primas completas foram moídas a partículas de tamanho entre 0.180 mm e 0.500 mm, e posteriormente sujeitas a um pré-tratamento com ácido diluído. O pré-tratamento foi realizado com ácido sulfúrico a 2.6% (p/p) numa razão planta/líquido de 2 g de planta seca/10 mL de líquido, durante 75 minutos a 150°C. Após pré-tratamento, a matéria-prima foi lavada para remoção de vestígios de ácido e inibidores que

possam ter sido formados durante o processo e separada a fracção líquida da sólida, sendo a última fracção utilizada durante os ensaios de hidrólise enzimática. As matérias-primas pré-tratadas foram cedidas pela Unidade de Materiais Têxteis e Papeleiros, tal como a composição química apresentada na tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Composição química das plantas completas utilizadas como matéria-prima para a hidrólise enzimática

Espécies	Extractáveis [%]	Cinzas [%]	Lenhina Insolúvel [%]	Lenhina solúvel [%]	Lenhina total [%]	Total de carboidratos [%] ^a	Açúcares removidos [%] ^b
<i>Cistus ladanifer</i> (esteva)	7.4	3.1	32.0	2.2	34.2	55.3	30.2 (302mg/g)
<i>Cytisus striatus</i> (giesta)	4.7	0.8	22.4	2.3	24.7	69.8	28.4 (284mg/g)

^a Valores determinados por diferença a partir dos outros componentes determinados

^b Açúcares removidos na fracção líquida resultante do pré-tratamento

4.2.2. ENZIMAS

Neste trabalho foram utilizadas três preparações enzimáticas durante os ensaios preliminares e duas para aplicação sobre os substratos durante as metodologias de desenho experimental. Recorreu-se à utilização de uma preparação enzimática consistindo de um complexo de celulases NS50013 (actividade celulolítica sobre o papel de filtro de 63 FPU/mL e actividade da β -glucosidase de 12CBU/mL, determinadas segundo os procedimentos descritos nos pontos 4.1.10.1. e 4.1.10.2.); a uma preparação enzimática de β -glucosidase, NS-50010 (com actividade da β -glucosidase de 925CBU/mL, determinada segundo o procedimento descrito no ponto 4.10.2.2) e um complexo multienzimático, contendo carbohidrases, incluindo arabanase, celulase, 3-glucanase, hemicelulase e xilanase, NS50012 (actividade celulolítica sobre o papel de filtro de 3.6 FPU/mL, determinada segundo o procedimento descrito no ponto 4.1.10.1.), recomendada pela Novozymes para quebrar as paredes celulares para extracção de componentes úteis a partir dos tecidos das plantas, aumentando a disponibilidade do amido e reduzindo a viscosidade. Todas as preparações enzimáticas são da Novozymes.

4.2.3. REAGENTES

Ao longo do trabalho experimental foram usados diversos produtos químicos, que se apresentam na tabela 4.5, com os respectivos graus de pureza e fornecedores.

Tabela 4.5 - Lista de reagentes usados ao longo dos ensaios de hidrólise enzimática

Reagentes	Grau de pureza (%)	Fornecedor
Ácido cítrico monohidratado	99.5%	Applichem
Ácido acético	100%	Merck
Ácido fórmico	98-100%	Analar
Ácido succínico	99%	Fluka
Hidrogenoftalato de potássio	99.5%	Sigma-Aldrich
D-Celobiose	98%	Sigma
Etanol absoluto	99.8%	Carlo Erba
Papel de filtro Whatman nº1	-	Whatman
Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado	99%	Sigma
PEG 4000	-	Merck
Tween 20	-	Panreac Sintesis
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	98%	Aldrich
Cloreto de tetraciclina	-	USB
Etanol	70%	Panreac
Cicloheximida	94%	Sigma

4.2.4. EQUIPAMENTO

Ao longo do trabalho experimental, para além do material corrente de laboratório, foram utilizados os equipamentos, apresentados na tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Características dos equipamentos utilizados

Designação	Marca	Modelo
Balança analítica	Mettler	Toledo AG 204
Bioanalisador multiparamétrico	YSI	7100
Centrífuga refrigerada para eppendorfs	Hermle	Z323K
Espectrofotómetro	Pharmacia Biotech	Ultrospec U/V 3000
Estufa	P Selecta	Incubig
Incubador orbital	Aralab	Agitorb 200
Potenciómetro	Metrohm	744 pH-Meter

4.2.5. ENSAIOS PRELIMINARES DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA ESTEVA PRÉ-TRATADA

Os ensaios preliminares de hidrólise enzimática foram realizados com a fracção sólida de esteva resultante do pré-tratamento com ácido diluído em frascos de vidro com tampa.

A mistura reaccional padrão conteve tampão citrato a pH 4.8 e concentração final 0.05M, com uma concentração de 2.5% (p/V) de sólidos com base no peso seco. À mistura reaccional, para prevenir contaminação microbiana, foram adicionados tetraciclina e cicloheximida, a concentrações finais de 40µg/mL e 30µg/mL, respectivamente. Completou-se o volume final a 3 mL por adição da água necessária, considerando-se que todas as soluções e biomassa possuíam uma gravidade específica de 1.000 g/mL e o volume necessário de enzimas.

As misturas reaccionais foram incubadas em agitador orbital a 50°C para estabilizar a temperatura, antes da adição das enzimas: 25FPU/g peso seco da matéria-prima pré-tratada de actividade de celulasas (complexo enzimático de celulasas NS-50013 da Novozymes) e 25 CBU/ g peso seco de actividade da β-glucosidase (β-glucosidase NS-50010 da Novozymes). Posteriormente, incubou-se a mistura reaccional a 50°C e 250rpm, durante 72 horas.

A hidrólise enzimática foi parada ao fim de 72 horas por imersão imediata em gelo e centrifugação a 5000g a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi sujeito a determinação de glucose num analisador multiparamétrico YSI.

Para se testar a influência de cada variável no processo de hidrólise enzimática e determinar o intervalo a usar no desenho experimental Plackett-Burman, variou-se um parâmetro de cada vez.

4.2.6. APLICAÇÃO DO DESENHO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN À HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE Giesta E ESTEVA PRÉ-TRATADAS

Tomando em consideração os resultados obtidos pelos ensaios preliminares para a esteva pré-tratada foram estudadas as variáveis segundo o método de Plackett-Burman, fazendo variar os 11 factores em simultâneo, quanto ao seu efeito na hidrólise enzimática de giesta e esteva pré-tratada com ácido diluído. Este modelo foi escolhido por permitir o estudo de muitos factores usando poucas medições, sendo um método útil para a selecção dos factores mais importantes, quando se dispõe de muitas variáveis [100]. A resposta considerada neste estudo foi a relação de massa de glucose sobre massa seca de substrato, dado que não se tem conhecimento da concentração de celulose nas amostras, estabelece-se assim uma relação entre a glucose produzidas pela hidrólise enzimática da celulose e a massa total de substrato.

A tabela 4.7 apresenta as variáveis e os dois níveis usados no desenho experimental Plackett-Burman. A selecção do intervalo de trabalho deve ser tomado cuidadosamente, pois quando a diferença é pequena pode não se mostrar qualquer efeito e um intervalo muito grande para uma variável sensível pode mascarar outro componente [101]. O intervalo de trabalho foi seleccionado considerando os valores obtidos para os ensaios preliminares e as limitações dos equipamentos utilizados.

Tabela 4.7 – Variáveis e seus dois níveis usados no desenho experimental Plackett-Burman

Variável	Nível inferior (-1)	Nível superior (+1)
pH	4.0	6.5
Temperatura (°C)	30	55
Concentração do tampão (mM)	10	250
Concentração de celulasas (FPU/ g peso seco)	1	50
Concentração de β -glucosidase (CBU/g peso seco)	1	300
Volume reaccional (mL)	1.5	6
Tempo (h)	24	120
Agitação (rpm)	100	250
Concentração de substrato (%p/V)	2	12.5
Concentração de PEG 4000 (g/L)	0.01	0.2
Tipo de tampão	Acetato	Citrato

Na tabela 4.8, apresenta-se a sequência de ensaios realizados com os factores na forma codificada.

Tabela 4.8 – Matriz dos ensaios para o desenho experimental segundo Plackett-Burmann com as variáveis nas unidades codificadas

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Conc. tampão (mM)	Conc. celulasas (FPU/g peso seco)	Conc. β-glucosidase (CBU/g peso seco)	Volume reaccional (mL)	Tempo (h)	Agitação (rpm)	Conc. substrato (% p/V)	Conc. PEG 4000 (g/g peso seco)	Tipo tampão
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
3	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
4	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
5	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
6	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
7	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
8	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
9	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
10	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
11	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1

Para os resultados obtidos foi efectuado o tratamento estatístico pela utilização do “software” Design Expert 7.1.4.0.

4.2.7. APLICAÇÃO DO DESENHO EXPERIMENTAL “CENTRAL COMPOSITE DESIGN” À HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE Giesta E ESTEVA PRÉ-TRATADAS

Após análise dos resultados obtidos da aplicação do método de Plackett-Burman na hidrólise enzimática de giesta e esteva pré-tratada com ácido diluído, seleccionaram-se os parâmetros que apresentaram um efeito mais significativo. Estes parâmetros foram utilizados para a optimização do processo utilizando uma metodologia de resposta de superfície (RSM), recorrendo ao desenho experimental CCD – “Central Composite Design”. A resposta considerada neste estudo foi a mesma anteriormente considerada para o estudo com o método de Plackett-Burman.

O desenho experimental CCD visa a optimização do processo de hidrólise enzimática, sendo adicionados para além dos pontos factoriais, pontos centrais e axiais e tendo-se realizados dois replicados por ensaio.

Na tabela 4.9 apresentam-se os níveis correspondentes às variáveis estudadas.

Tabela 4.9 – Níveis dos factores utilizados de acordo com o desenho experimental CCD

Variável	Níveis				
	-2	-1	0	+1	+2
A - Temperatura (°C)	20	30	40	50	60
B - pH	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
C - Concentração de celulasas (FPU/ g peso seco)	1.5	21	40.5	60	79.5
D - Concentração de PEG 4000 (g/ g peso seco)	0.01	0.14	0.27	0.4	0.53
E - Tempo (h)	1.5	25		72	95.5

Na tabela 4.10 está representada a matriz utilizada na hidrólise enzimática quer da giesta quer da esteva pré-tratada, com os factores na forma codificada.

Tabela 4.10 – Matriz dos ensaios para o CCD com as variáveis nas unidades codificadas

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Concentração de celulases (FPU/ g peso seco)	Concentração de PEG 4000 (g/ g peso seco)	Tempo (h)
1	-1	+1	+1	-1	+1
2	-1	-1	-1	+1	-1
3	-1	+1	+1	+1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1
5	-1	+1	+1	-1	+1
6	0	0	0	0	+2
7	0	0	0	0	0
8	+1	+1	-1	+1	-1
9	0	0	0	0	-2
10	-1	-1	+1	-1	-1
11	+1	-1	+1	-1	+1
12	0	0	+2	0	0
13	0	0	0	+2	0
14	0	0	-2	0	0
15	-1	-1	-1	+1	-1
16	+1	-1	+1	+1	-1
17	0	0	0	0	0
18	0	-2	0	0	0
19	0	0	0	0	0
20	+1	-1	-1	-1	-1
21	0	0	0	-2	0
22	+1	-1	-1	+1	+1
23	-1	+1	+1	+1	-1
24	-1	+1	-1	-1	-1
25	-1	-1	+1	+1	+1
26	+1	-1	-1	+1	+1
27	+1	+1	+1	-1	-1
28	0	0	0	0	+2
29	+1	+1	+1	+1	+1
30	+1	+1	+1	-1	-1
31	-1	-1	-1	-1	+1
32	0	0	0	0	0
33	-2	0	0	0	0
34	0	0	+2	0	0
35	-1	+1	-1	+1	+1
36	+1	-1	-1	-1	-1
37	+1	+1	-1	+1	-1
38	0	-2	0	0	0
39	+1	-1	+1	+1	-1
40	-1	-1	+1	+1	+1
41	-1	+1	-1	-1	-1
42	0	0	-2	0	0
43	-1	+1	-1	+1	+1
44	0	0	0	+2	0
45	+2	0	0	0	0
46	+2	0	0	0	0
47	+1	+1	-1	-1	+1
48	-1	-1	-1	-1	+1
49	0	7	0	0	0
50	0	7	0	0	0
51	-1	-1	+1	-1	-1
52	0	0	0	0	0
53	+1	+1	+1	+1	+1
54	-2	0	0	0	0
55	+1	-1	+1	-1	+1
56	0	0	0	0	-2
57	0	0	0	0	0
58	0	0	0	-2	0

4.2.8. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.8.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE

A determinação da concentração de glucose no sobrenadante foi realizada com a utilização de um bioanalizador multiparamétrico.

O equipamento possui uma sonda onde se localizam membranas e onde existe uma enzima específica para o substrato de interesse imobilizada entre duas camadas de membrana, de policarbonato e acetato de celulose. O substrato é oxidado quando passa na camada com enzima, produzindo peróxido de hidrogénio, o qual passa através do acetato de celulose para um eléctrodo de platina onde o peróxido de hidrogénio é oxidado. A corrente resultante é proporcional à concentração de substrato.

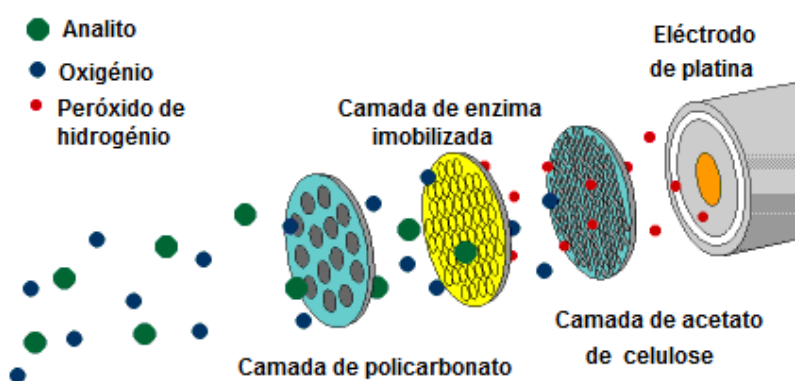
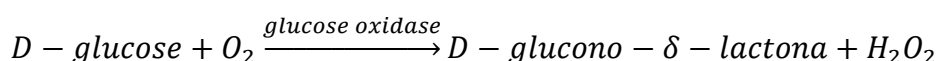


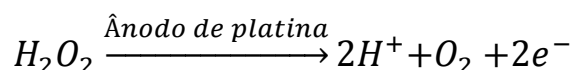
Figura 4.3 – Representação esquemática do funcionamento da sonda de determinação da concentração de glucose

Considerando as três camadas da membrana. A primeira camada, policarbonato poroso, limita a difusão do substrato para a segunda camada (enzima), prevenindo que a reacção seja limitada pela enzima. A terceira camada, acetato de celulose, permite que somente pequenas moléculas, tais como peróxido de hidrogénio, atinjam o eléctrodo, eliminando muitos compostos electroquímicos activos que possam interferir com a medição.

A D-glucose é oxidada na presença de glucose oxidase, produzindo peróxido de hidrogénio e glucono-lactona.



De seguida, o peróxido de hidrogénio é oxidado no ânodo de platina, produzindo electrões. O fluxo de electrões é proporcional à concentração de H_2O_2 e, assim, à concentração de substrato.



As determinações são realizadas após calibração com calibrador de 1.80 g/L de glucose e verificação de linearidade, permitindo-nos a determinação directa de glucose num intervalo de 0.05 a 18.0 g/L, para 10 μ L de amostra.

CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DE CELULASES

Com o objectivo de estudar a influência de diferentes sistemas tamponados na produção de enzimas e morfologia dos fungos, foram produzidas enzimas celulases por fermentação de *Trichoderma reesei* Rut C-30 em meio de Mandels modificado e suplementado com quatro tampões diferentes. Os sistemas tamponantes estudados neste trabalho encontram-se descritos na tabela 4.1. Como controlo foi utilizado um meio não tamponizado, onde a dissolução do meio de cultura foi efectuada em água e o pH acertado no início da fermentação a 4.8.

Dado que, existem relatos da associação entre substrato sólido no meio de fermentação e crescimento fúngico em forma agregada (crescimento em “*pellet*” ou crescimento por adesão) [80], foram usadas, neste estudo, fontes de carbono solúveis, glucose e lactose. Além disso, estas fontes têm a vantagem de permitirem um melhor controlo da fermentação, simplificando o processo operacional, aumentando drasticamente a produtividade e consequentemente a redução do custo de produção de enzimas [102]. A concentração de glucose e lactose usada foi estabelecida considerando o estudo realizado por Figueiredo [103]. O estudo realizado por Olsson e seus colaboradores [43] sobre a influência das fontes de carbono na produção de celulases e hemicelulases pelo *T. reesei* Rut C30, vem apoiar a selecção efectuada, dado que demonstrou que as actividades enzimáticas resultantes de crescimento numa mistura de substratos comparativamente com um só substrato eram geralmente superiores, mantendo a fonte de carbono constante a 50g/L.

A concentração de inóculo usada manteve-se constante, de forma a evitar que ocorressem alterações morfológicas devidas à variação do inóculo, tal como verificado em diversos estudos [73], [82]

5.1.1. UTILIZAÇÃO DE TAMPÕES PARA CONTROLO DO PH DURANTE A FERMENTAÇÃO

Como o crescimento e produção de celulases pelo *T. reesei* são influenciados pelo pH, este é um factor a ter em consideração quando se pretende produzir celulases, utilizando esse fungo. Durante a fermentação com *T. reesei*, o pH do meio de cultura desce de 4.8 até valores tão reduzidos como 2.5 após 2 dias, devido à formação de ácido. Stenberg [61], demonstrou que o decréscimo do pH do meio de 3.0 para 2.4 resulta na perda de 50% da actividade celulolítica sobre o papel de filtro.

Como em fermentações à escala laboratorial em erlenmeyer, o controlo do pH só é possível por ajuste manual, o qual é um processo tedioso e ineficiente, o desenvolvimento de um meio tamponado foi tentado por utilização de vários sistemas tamponados.

A aplicação de tampões no meio de fermentação para a produção de celulases, em cultura em erlenmeyer, já foi estudada por Juhász e seus colaboradores [63] e Kadam e seus colaboradores [62] com resultados divergentes. Juhász e seus colaboradores [63] concluíram

que tampões baseados em ácido orgânicos podem não permitir a regulação do pH ao longo da fermentação, visto que possivelmente ocorria a sua metabolização pelo microrganismo, *T. reesei*, e que a aplicação de tampões resultou numa ligeira diminuição da actividade das celulasas comparativamente com o meio não tamponado. No entanto, Kadam e seus colaboradores [62], referiram a melhoria na produção de celulasas por *T. reesei* Rut C-30 devido ao efeito da adição de tampão citrato a pH 3.5.

Assim sendo, para clarificar o efeito de tampões na produção de celulasas, foi testada a aplicação de diversos tampões compatíveis fisiologicamente com o fungo, em ensaios realizados em erlenmeyers. O pH final, obtido após 96 horas de fermentação, em erlenmeyer apresentou-se superior a 3, sendo que o pH da cultura de controlo era de 2.2 (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - pH ao fim de 96 horas de fermentação

Ensaio	Concentração do tampão (mM)	pH inicial	pH final
Tampão citrato	50	4.0	3.37
	50	4.8	4.17
	100	4.8	4.45
Tampão succinato	50	4.0	3.07
	50	4.8	5.05
	100	4.8	5.03
Tampão formato	50	4.0	4.16
	50	4.8	4.54
	100	4.8	7.46
Tampão ftalato	50	4.0	3.04
	50	4.8	3.82
	100	4.8	4.28
Sem suplementação com tampão		4.8	2.24

A utilização, destes sistemas tamponados, demonstra a sua capacidade para auxiliar na manutenção do pH do meio de cultura em valores que podem evitar a perda de actividade enzimática causada pelo decréscimo do pH durante a cultura, dado que não se verificou uma quebra significativa na actividade das celulasas ao longo do tempo de fermentação, quando comparado com o meio sem adição de tampão (Figura 5.1).

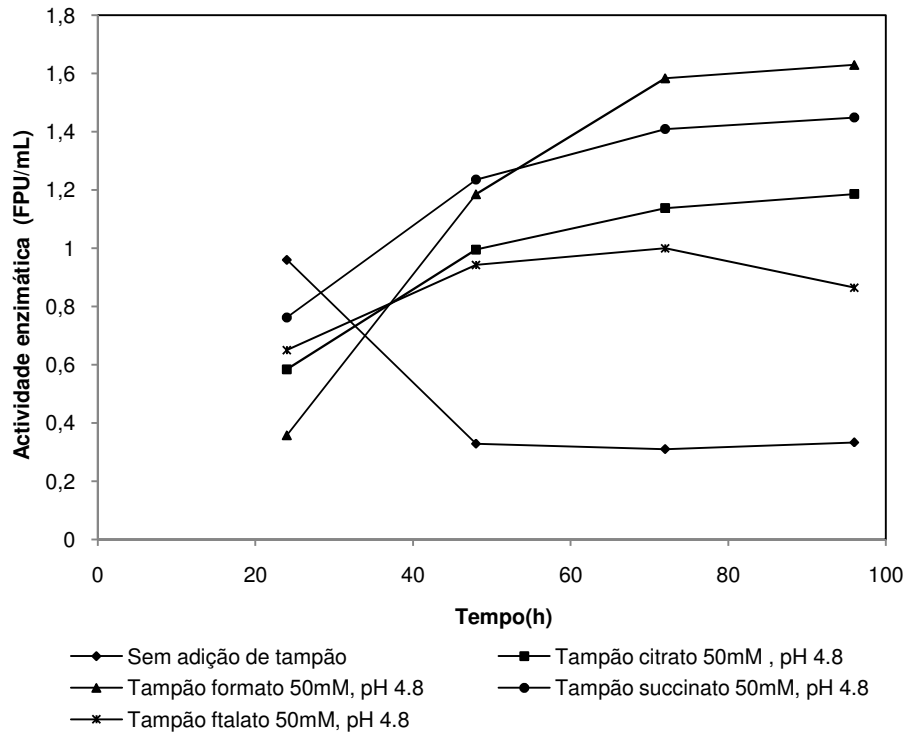


Figura 5.1 – Influência da suplementação do meio de cultura com tampões sobre a actividade celulolítica

Concluindo, os tampões estudados neste trabalho demonstraram capacidade mínima de regulação, neste trabalho, não obstante são capazes de prevenir uma redução do pH a valores inferiores a 3 em culturas de *T. reesei* Rut C-30.

5.1.2. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES TAMPÕES

De forma a proceder a uma comparação do efeito da suplementação do meio de cultura com diferentes tampões, foi avaliada a concentração da proteína extracelular e actividade celulolítica, após 96 horas de fermentação.

Quando comparadas culturas tamponadas com culturas não tamponadas (água) relativamente a actividade celulolítica sobre papel de filtro, pode verificar-se que as culturas tamponadas apresentam actividades consideravelmente superiores. Os resultados sumarizados na figura 5.2 mostram que a actividade enzimática mais elevada foi obtida quando o meio de cultura foi suplementado com tampão succinato 100mM, pH 4.8 chegando a um valor de 1.9 FPU/mL.

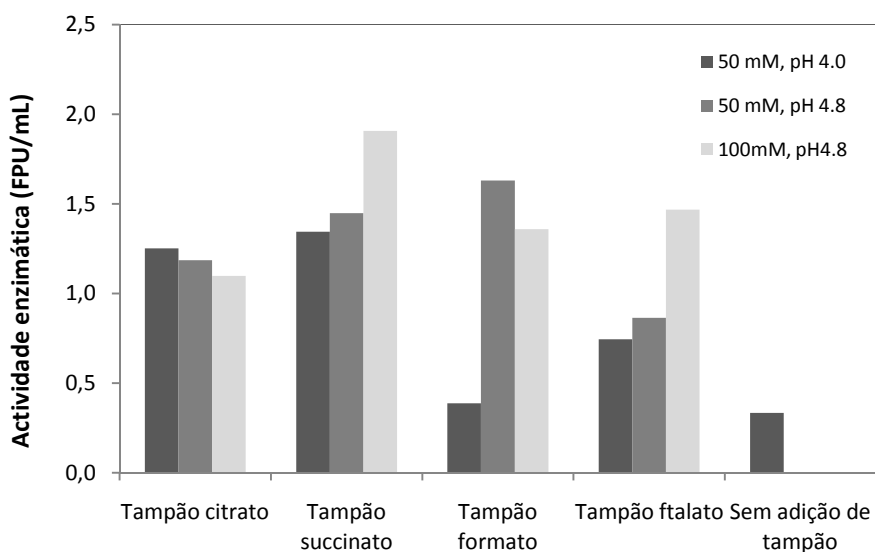


Figura 5.2 – Actividade enzimática sobre o papel de filtro após 96 horas de fermentação

Como se pode observar na figura 5.2 e 5.3, o comportamento apresentado para a actividade enzimática é o mesmo que para a concentração de proteína no sobrenadante.

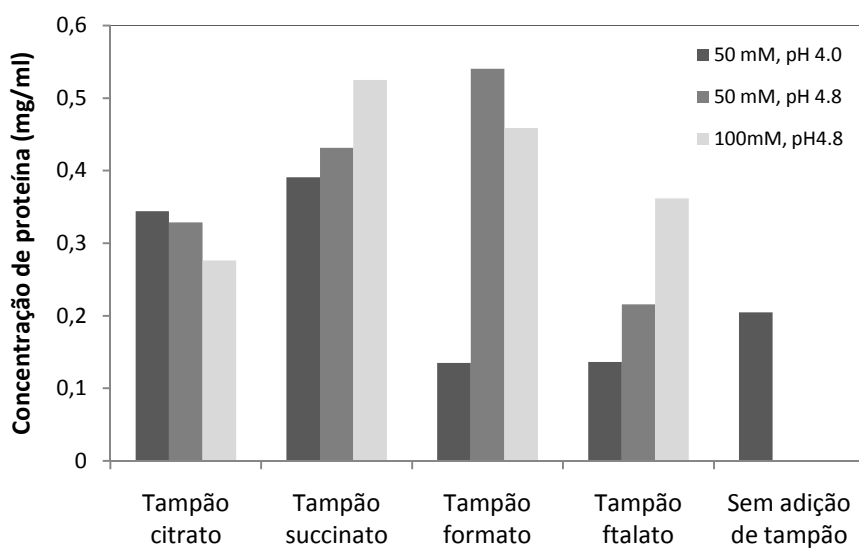


Figura 5.3 - Concentração de proteína no sobrenadante após 96 horas de fermentação

Embora, as condições usadas nestes ensaios não correspondam às mais favoráveis para a produção de β -glucosidase, a actividade desta enzima foi determinada para todas as culturas às 96 horas. Pelos ensaios realizados verificou-se que a actividade da β -glucosidase apresentou valor superior com o tampão succinato a 100mM, pH 4.8 (0.4UI/mL). Embora este seja um valor relativamente baixo, este é representativo quando comparado com a cultura de

controlo (meio sem suplementação com tampão) o qual não apresentou actividade de β -glucosidase (Figura 5.4).

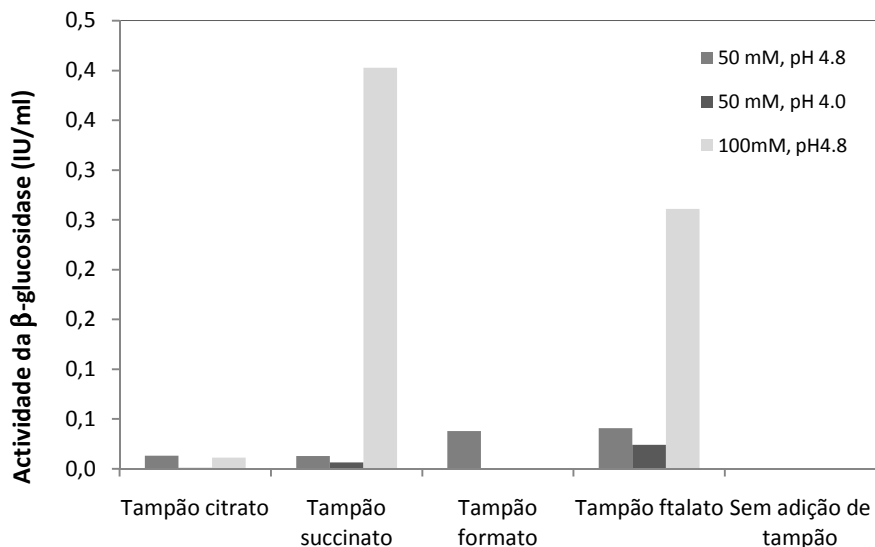


Figura 5.4 - Actividade da β -glucosidase após 96 horas de fermentação

Nos ensaios realizados com sistemas tamponados, as actividades celulolíticas medidas para os ensaios onde o meio de cultura foi suplementado com tampão citrato foi de aproximadamente 3.3 a 3.8 vezes superior ao obtido com culturas não tamponadas, no caso do tampão succinato existiu um aumento de 4 a 5.7 vezes e para os ensaios de suplementação do meio com tampão ftalato ocorreu um aumento da actividade celulolítica de 2.2 a 4.4 vezes, após 96 horas tomando como base de comparação o ensaio de controlo sem adição de tampão ao meio de cultura.

Nos ensaios com sistema tamponante formato, as actividades das enzimas celulolíticas medidas foram de 1.2 a 4.9 vezes superiores às obtidas para culturas não tamponadas. No caso da suplementação do meio com tampão formato a diferença entre 50mM a pH 4.0 e 50mM a pH 4.8, tomando em consideração a actividade enzimática das celulasas (Figura 5.2) e produção de proteínas extracelulares (Figura 5.3), foram directamente relacionadas com o crescimento do fungo. Dado que, o crescimento fúngico foi diminuto a pH 4.0. Para o tampão formato a uma concentração de 100mM e pH 4.8 o crescimento do fungo não foi observado nas primeiras 24 a 48 horas, observação que se pode correlacionar com a baixa produção de proteína extracelular e actividade enzimática. Este fenómeno pode ser justificado pela necessidade de adaptação fisiológica do organismo aos compostos que fazem parte da constituição deste sistemas tamponante (formato), para crescimento. Usando a equação de Henderson-Hasselbach, pode verificar-se que quando ocorre uma variação da percentagem de espécie de ácido fórmico com a variação de pH e concentração de tampão, sendo que quando ocorre redução do pH de 4.8 para 4.0, a percentagem de espécie ácido fórmico aumenta de 8.1 a 35.7%, respectivamente (Tabela 5.2). Sendo que o mesmo efeito ocorre quando se aumenta

a concentração do tampão de 50mM para 100mM, onde o aumento desta espécie vai de 8.1 a 16.2%, respectivamente. Considerando a percentagem da espécie ácido fórmico, o crescimento do fungo e produção enzimática, pode dizer-se que a inibição é proporcional à percentagem da espécie de ácido fórmico no tampão. Assim, parece razoável colocar a hipótese de que a percentagem da espécie de ácido fórmico no sistema tamponante se comporte como um composto inibidor do crescimento fúngico até que ocorra uma adaptação do organismo à composição do meio.

Tabela 5.2 - Percentagem da espécie ácido fórmico no tampão formato a diferentes concentrações e pH

Condições	% Espécie ácido fórmico
pH 4,0; 50mM	35,7
pH 4,8; 50 mM	8,1
pH 4,8; 100mM	16,2

O perfil de produção de celulases mostrou-se paralelo ao das proteínas extracelulares nas diversas fermentações realizadas. Se se comparar o efeito dos diferentes tampões para os parâmetros estudados com a concentração de proteína extracelular, verifica-se uma produção de proteína superior para os tampões citrato e succinato tomando o meio não tamponando como referência. Para culturas suplementadas com tampão ftalato, os resultados obtidos indicam que para este tampão a actividade específica é superior, como se pode verificar na figura 5.5.

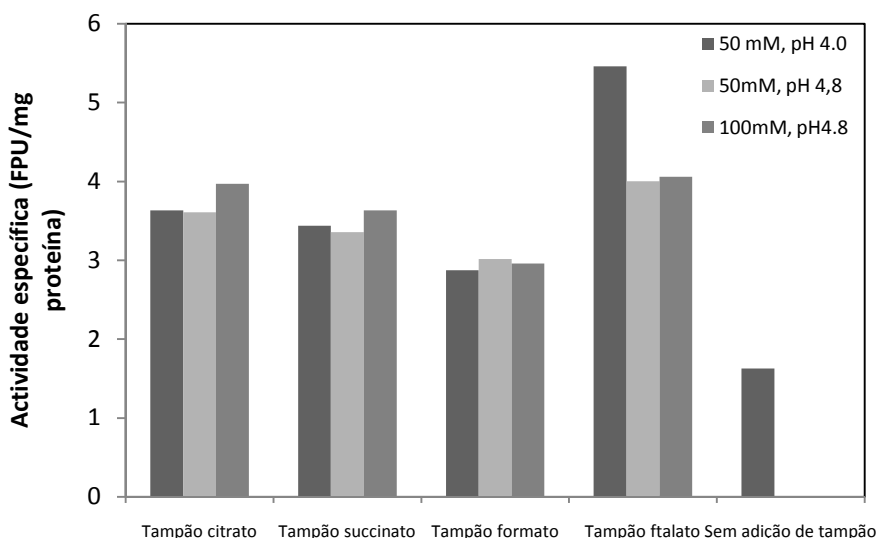


Figura 5.5 - Actividade específica para as culturas suplementadas com diferentes sistemas tamponantes e sem adição de tampão (controlo)

De forma a analisar o efeito da concentração do tampão na produção de proteína e actividade enzimática, foram estudadas duas concentrações diferentes dos tampões (50 e 100mM). Como

se pode verificar pela análise das figuras 5.2 e 5.3, as culturas tamponadas com tampão succinato e ftalato apresentam uma tendência semelhante relativa à produção de proteínas extracelulares e celulasas, tendo em consideração o pH e concentração do tampão testadas. O valor máximo de actividade das celulasas sobre o papel de filtro foi obtido quando a concentração dos tampões subiu até 100mM. Em contraste, as culturas tamponadas com tampão citrato apresentaram uma tendência inversa à apresentada para os casos dos tampões succinato e ftalato, sendo que com o aumento da concentração do tampão citrato ocorre uma diminuição da actividade celulolítica, o que está de acordo com os resultados apresentados por Juhász e seus colaboradores [42], que testaram diferentes concentrações de tampão Tris-maleato e demonstraram que quanto maior a concentração do tampão menor a actividade das celulasas sobre o papel de filtro no quinto dia de fermentação.

No presente estudo, a influência da concentração do tampão sobre a actividade das celulasas está dependente do tampão usado para suplementação do meio de cultura.

De acordo com o estudo de Domingues e seus colaboradores [73] são necessários diversos elementos vestigiais para a produção de celulasas. De acordo, como os mesmos estudos, quando a concentração de iões metálicos no meio foi reduzida para metade, ocorreu uma diminuição na concentração de proteínas extracelulares e actividade das celulasas sobre o papel de filtro [73]. Considerando que o citrato é um reconhecido agente quelante, a suplementação do meio de cultura com este tampão pode levar a um sequestro dos iões reduzindo a biodisponibilidade mineral. Assim, as diferentes tendências de produção relativamente a outros tampões podem ser devidas à reduzida disponibilidade de elementos vestigiais na presença de citrato. Esta hipótese é reforçada pela inferior actividade enzimática obtida quando se eleva a concentração de citrato.

5.1.2.1. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES TAMPÕES SOBRE A MORFOLOGIA

É conhecido que o estado morfológico do fungo *Trichoderma reesei* Rut C-30 afecta o crescimento e a produção de celulasas, podendo dizer-se que existe uma morfologia mais adequada para a máxima produtividade. Assim para controlar a morfologia, é necessário conhecer a relação existente entre as condições da fermentação e a forma morfológica do fungo. O fungo *Trichoderma reesei* cresce com diversas formas morfológicas em cultura em erlenmeyer, dependendo da composição do meio de cultura.

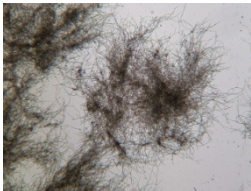



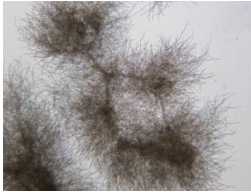
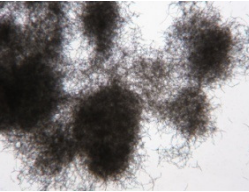
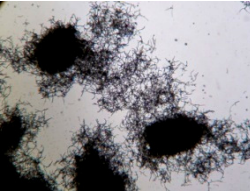
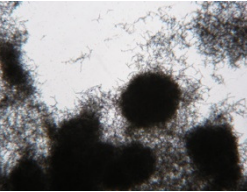
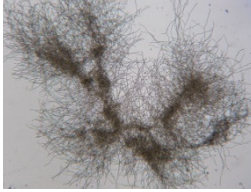

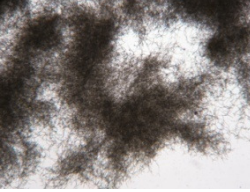



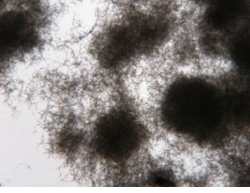
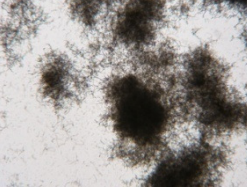



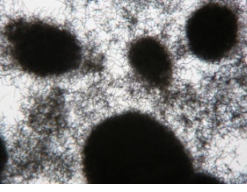
De forma a avaliar o efeito da suplementação do meio de cultura com diferentes tampões sobre a morfologia de *T. reesei* Rut C-30, foram realizados vários ensaios. Todos os ensaios foram iniciados com um inóculo constituído por elementos híficos dispersos. O inóculo foi produzido a partir de uma cultura em "batch" em meio de Mandels modificado não tamponado a pH 4.8, iniciando-se o crescimento a partir de esporos e levando a cultura de 48 horas a uma morfologia dispersa. Quando se iniciou a fermentação do fungo em meio suplementado com

diferentes tampões, a morfologia observada inicialmente nas culturas modificou-se de acordo com o tampão utilizado. No entanto, considerando-se o ensaio relativo ao meio de Mandels modificado sem suplementação com tampão verificou-se que a morfologia inicial se manteve durante todo o período de fermentação.

A tabela 5.3 mostra imagens microscópicas recolhidas a partir das 24 horas até às 96 horas, onde é visível a evolução morfológica do fungo ao longo do tempo de fermentação com os diferentes tampões testados, quando se usa uma concentração de 50mM a pH 4.8.

Tabela 5.3 - Evolução da morfologia do *Trichoderma reesei* Rut C-30 ao longo do tempo, em meio sem adição de tampões e por suplementação com tampões citrato, formato, succinato e ftalato – ampliação

40x

Sistema tamponante	Tempo			
	24h	48h	72h	96h
Sem adição de tampão				
Tampão citrato 50 mM, pH 4.8				
Tampão formato 50 mM, pH 4.8				
Tampão succinato 50 mM, pH 4.8				
Tampão ftalato 50 mM, pH 4.8				

Às 24 horas de fermentação, a forma morfológica de todas as culturas é semelhante. Nesta altura, as culturas podem encontrar-se numa fase de adaptação fisiológica aos constituintes do sistema tamponante. Às 72 horas, a morfologia já se encontra estabelecida em todos os casos,

sendo clara a transição de formas em “clumps” a formas em “pellet” nas culturas suplementadas com os tampões citrato, succinato e ftalato 50mM e pH 4.8. Os primeiros “pellets” que surgem não são mais do que “clumps” densos, mas gradualmente observa-se o surgimento de “pellets” com um core denso esférico ou elipsoidal.

Em todas as culturas suplementadas com tampão formato, tal como para as culturas suplementadas com tampões citrato e succinato a 100mM e as de pH 4.0, a maioria do micélio encontra-se em forma de “clumps”, como partículas de filamentos interligados em torno de um pequeno core, não possuindo uma estrutura compacta usualmente referida como “pellet”.

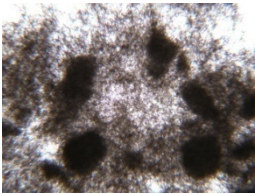
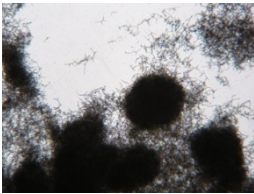
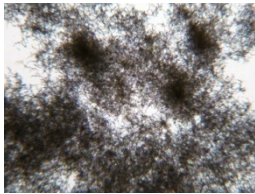
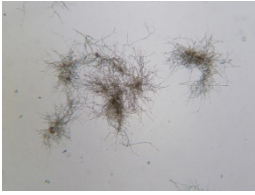

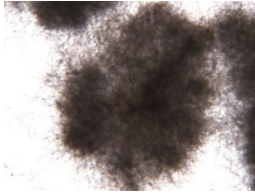
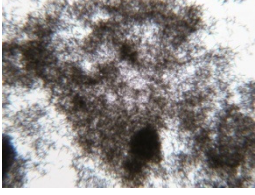
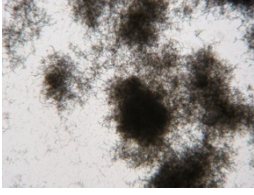
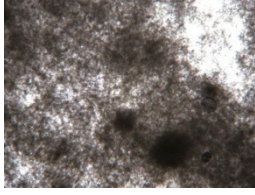

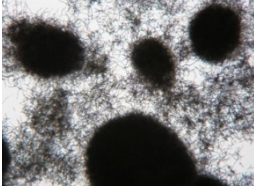
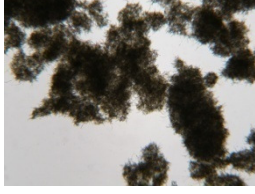
Em meio suplementado com tampão ftalato, encontram-se uma diversidade de morfologias desde hifas dispersas a “pellets”, sendo que as formas dispersas se dividem em hifas dispersas livremente e agregados ou “clumps”. Em culturas de meio suplementado com tampão citrato e ftalato (50mM, pH 4.8) observou-se maioritariamente, a formação de “pellets” compactos esféricos a elipsoidais de core compacto com crescimento lateral limitado.

Em culturas suplementadas com tampão succinato 50mM e pH 4.8, os “pellets” apresentam-se como massas de hifas com ligeiramente entrelaçadas, formando “fluffy pellets”. Nas mesmas condições, os ensaios com tampão formato apresentam agregados dispersos (“clumps”).

O *Trichoderma reesei* Rut C-30 apresentou diferentes morfologias consoante o pH dos tampões utilizados. Com os sistemas tamponantes citrato e succinato, passando de pH 4.0 para 4.8, a morfologia macroscópica apresentou um aumento na agregação dos elementos hifícos após 48 horas. O mesmo aconteceu com a cultura suplementada com tampão ftalato, tendo sido reduzido o tamanho do “pellet” em consequência da diminuição do pH. Estes resultados estão de acordo com Papagianni [59] que reviu a morfologia de fungos em processos de cultura submersa, e refere a tendência de formação de “pellets” à medida que o valor de pH da cultura aumenta. No entanto, segundo Lejeune [104], no seu trabalho com *T. reesei* QM9414 a morfologia só sofre modificações moderadas com o pH, isto pode então sugerir que cada estirpe de *T. reesei* pode responder de modo diferente ao ambiente que o rodeia.

Embora, a natureza da regulação da adesividade da parede celular em microrganismos filamentosos ainda não esteja definida e se encontre correntemente sob investigação, foi proposto que as principais forças responsáveis pela agregação celular sejam interações hidrofóbicas das paredes celulares [82]. Os resultados, obtidos neste estudo, sugerem que os tampões podem modificar as propriedades das paredes celulares e influenciar a morfologia fúngica. Quando a concentração do tampão aumenta, o fungo *Trichoderma reesei* Rut C-30 respondeu com uma diminuição da agregação micelial. Com o aumento da concentração de tampão de 50mM para 100mM, a pH 4.8, ocorreu uma modificação significativa na compactação e rugosidade, em todos os sistemas tamponantes estudados, tal como se pode verificar na tabela 5.4. Em alguns casos pode ver-se uma clara transição de “pellets” compactos para agregados com micélio livre.

Tabela 5.4 - Morfologia do *Trichoderma reesei* Rut C-30 em meio suplementado com tampões citrato, formato, succinato e ftalato, usando duas concentrações diferentes de tampão e pH, após 96 horas – ampliação 40x

Sistema tamponante	Condições		
	50mM, pH 4.0	50mM, pH 4.8	100mM, pH 4.8
Tampão citrato			
Tampão formato			
Tampão succinato			
Tampão ftalato			

A comparação entre diferentes fermentações mostrou que a suplementação dos meios de cultura com tampões tem um papel importante na morfologia do fungo e na produção de celulases. Isto é muito evidente para os resultados obtidos para o tampão succinato 100mM a pH 4.8 e para tampão formato 50mM a pH 4.8. Os resultados também indicam um aumento da atividade celulolítica sobre o papel de filtro com o aumento da concentração do tampão e diminuição da agregação no caso dos tampões ftalato e succinato. No entanto, não se observa a mesma situação com o tampão citrato, provavelmente devido à sua capacidade quelante. Estes resultados estão de acordo com o trabalho apresentado por Domingues [73] onde referiram que a morfologia dispersa aumenta a concentração de proteína extracelular e a atividade enzimática das celulases.

5.1.3. CONCLUSÕES

Em conclusão, foi estudada a influência dos diferentes tampões e da sua concentração na produção de celulases, usando *Trichoderma reesei* Rut C-30, sendo que os resultados indicam que a adição de tampões ao meio de cultura para a produção de celulases favorece o aumento

da actividade celulolítica sobre o papel de filtro, quando comparados com meio de Mandels modificado que não tenha sido suplementado com tampões.

Verificou-se, ainda, que as variações nos tampões usados para suplementação do meio de cultura resultaram em modificações significativas na morfologia do micélio, possivelmente afectando as forças de coesão e/ou repulsão entre células. Foi também observado que variações significativas na morfologia micelial, como consequência de aplicação de diferentes sistemas tamponantes, afectam a produção de celulasas.

Tal como, sugerem os presentes resultados, a morfologia do fungo depende fortemente dos sistemas tamponantes que possam ser usados na suplementação dos meios de cultura, tendo em conta a sua concentração e pH, sugerindo que poderá ser benéfico manipular estes parâmetros por forma a favorecer as morfologias que levem a uma melhor produtividade.

5.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Esta parte do trabalho foi iniciada com a realização de ensaios preliminares sobre o processo de hidrólise enzimática de resíduos florestais, nomeadamente dos arbustos: esteva (*Cistus ladanifer*) e giesta (*Cytisus striatus*), sendo que, numa primeira fase se fizeram variar individualmente os diferentes factores que influenciam o processo. Após verificação da influência dessas variáveis sobre o processo, estabeleceram-se intervalos a utilizar numa metodologia factorial através de um desenho experimental Plackett- Burman. Este método foi utilizado com o objectivo de seleccionar os factores mais importantes de entre diversos factores possíveis. De seguida, para optimização do processo, usaram-se os factores seleccionados através da metodologia anterior, numa metodologia de resposta de superfície, usando um desenho experimental “*Central Composite Design*” (CCD).

Os ensaios foram realizados usando como substratos giesta e esteva pré-tratada com ácido diluído, seguida de uma separação da fracção sólida da líquida. Pois segundo, Tengborg e seus colaboradores, concluíram que a inclusão do pré-hidrolisado (fracção líquida) inibia a hidrólise enzimática de espruce pré-tratado e que a lavagem da fracção sólida com água antes da hidrólise enzimática levava a um aumento substancial da conversão da celulose [105].

Como não se possuía a percentagem de celulose existente nos substratos utilizados, esteva e giesta, para se poder determinar o grau de conversão de celulose a glucose, logo, o rendimento da reacção, estabeleceu-se, para comparação entre ensaios, a utilização de uma relação da massa de glucose produzida por hidrólise enzimática em função da massa de substrato (matéria-prima) usada no ensaio.

5.2.1. ENSAIOS PRELIMINARES

Para a realização dos ensaios preliminares e avaliação dos intervalos a utilizar nas metodologias de desenho experimental, foi utilizada como substrato a esteva pré-tratada.

5.2.1.1. EFEITO DAS CONDIÇÕES DO SUBSTRATO

Uma vez que os ensaios foram realizados em pequena escala e a manipulação da biomassa lenhocelulósica seria mais fácil após secagem, realizaram-se ensaios para se determinar a influência das condições em que se apresenta o substrato, seco ou húmido, procedendo-se à realização de ensaios de hidrólise enzimática segundo o procedimento descrito no ponto 4.2.3. Os resultados revelam que a utilização da biomassa lenhocelulósica na forma húmida directamente resultante da separação das fracções sólida e líquida após pré-tratamento,

conduz a uma degradação da celulose superior à obtida pela utilização do substrato seco, como se pode verificar na figura 5.6.

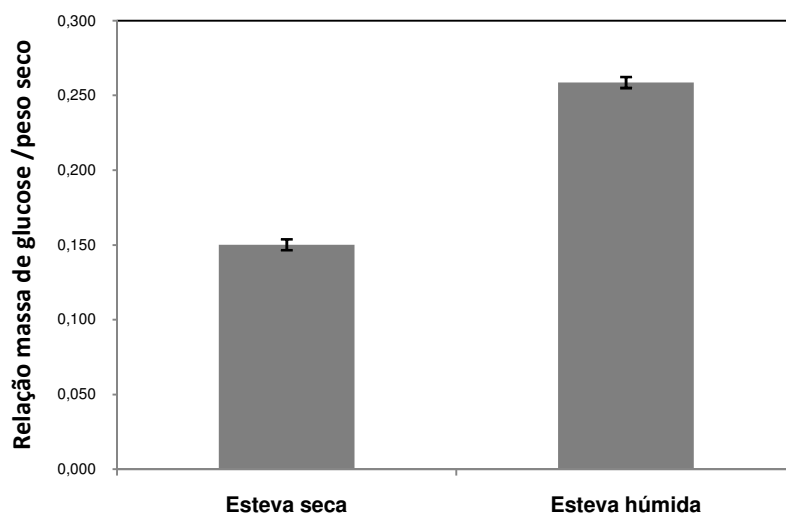


Figura 5.6 - Relação de massa de glucose/peso seco em função do estado em que se apresenta o substrato

Estes dados vão de encontro ao referido nos protocolos do NREL Ethanol Project [106]. De acordo com estes, todos os materiais lenhocelulósicos que tenham sido submetidos a um pré-tratamento aquoso nunca devem ser submetidos a secagem antes da digestão com enzimas, dado que pode ocorrer um colapso irreversível do poro na microestrutura da biomassa levando a uma diminuição da libertação enzimática de glucose a partir da celulose.

Assim sendo, nos ensaios subsequentes foi utilizada a biomassa sempre numa forma húmida procedente directamente do pré-tratamento após separação das fracções sólida e líquida e lavagem da primeira.

5.2.1.2. EFEITO DO PH

Considerando, o intervalo indicado pelo fabricante (apresentado na tabela 5.5) para as diferentes preparações enzimáticas NS-50013 e NS-50010. Estudou-se o efeito do pH do tampão utilizado na mistura reaccional verificando o efeito que este tem sobre as enzimas usadas, para tal foram utilizados tampões de pH 4.0; 4.5; 4.8; 5.0; 5.5; 6.0 e 6.5.

Tabela 5.5 - Intervalos de pH recomendados pelo fabricante para as preparações enzimáticas

Preparações enzimáticas	Intervalo de pH recomendado pelo fabricante
NS-50013 (Complexo de celulasas)	4.5-6.5
NS-50010 (β -glucosidase)	2.5-6.5

Os resultados do estudo do efeito do pH sobre as enzimas aplicadas no processo de hidrólise enzimática, revelam que o valor de pH 4.8 conduz a uma maior libertação de glucose a partir da celulose da biomassa lenhocelulósica, pressupondo uma maior actividade das enzimas nestas condições, tal como se pode observar na figura 5.7. Este valor corresponde ao referido na literatura [16].

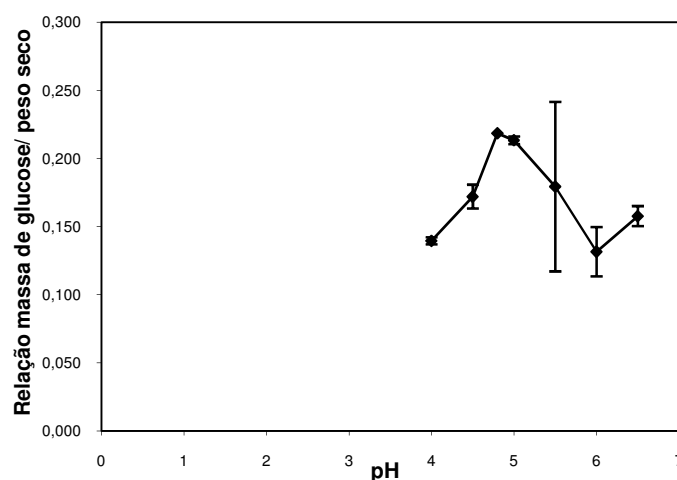


Figura 5.7 - Relação de massa de glucose/peso seco em função do pH

5.2.1.3. EFEITO DO TIPO DE TAMPÃO

Na literatura pode-se encontrar referência à utilização de dois tipos de tampão para determinação da actividade das celulasas: tampão citrato [99] e acetato [107], assim considerando a possível influência dos sistemas tamponantes na actividade celulolítica foram estudados diversos tampões com capacidade tamponante num intervalo onde se encontra o valor de pH 4.8 (tabela 5.6).

Tabela 5.6 - Intervalo de capacidade tamponante de cada tampão utilizado nos ensaios

Sistema tamponante	Capacidade tamponante	pKa
Tampão citrato	2.15 – 6.51	3.13; 4.76; 6.40
Tampão acetato	3.6-5.6	4.76
Tampão formato	2.6 – 4.8	3.75
Tampão succinato	3.8 – 6.0	4.21; 5.64

Por análise da figura 5.8, se se considerar o valor médio obtido para a relação de massa de glucose produzida em função do peso seco da biomassa lenhocelulósica utilizada, em cada ensaio, verifica-se que a libertação de glucose é máxima para o tampão citrato, não se observando, no entanto, uma variação muito significativa com a utilização dos diferentes tampões.

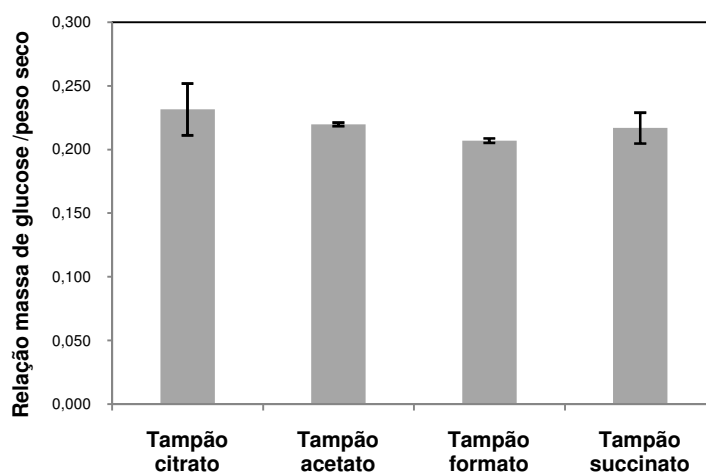


Figura 5.8 - Relação de massa de glucose/peso seco em função do tipo de tampão

5.2.1.4. FORÇA IÓNICA DO TAMPÃO

Ao analisar-se a figura 5.9 pode verificar-se que existe uma correlação entre a força iónica do tampão e a libertação de glucose a partir da celulose presente na esteva pré-tratada. Com o aumento da força iónica existe uma diminuição da libertação de glucose. Segundo, Kim e Hong [108], que realizaram estudos acerca do efeito da força iónica na adsorção das CBHI e II em celulose microcristalina, referem que para a CBHI com o aumento da força iónica a ligação à celulose é melhorada indicando a presença de interacções hidrofóbicas na ligação. Considerando a hidrofobicidade da lenhina e a presença de resíduos hidrofóbicos à superfície das celulasas [50], o aumento da força iónica poderá favorecer a ligação inespecífica das enzimas à lenhina e celulose, assim diminuindo o rendimento da reacção (Figura 5.9).

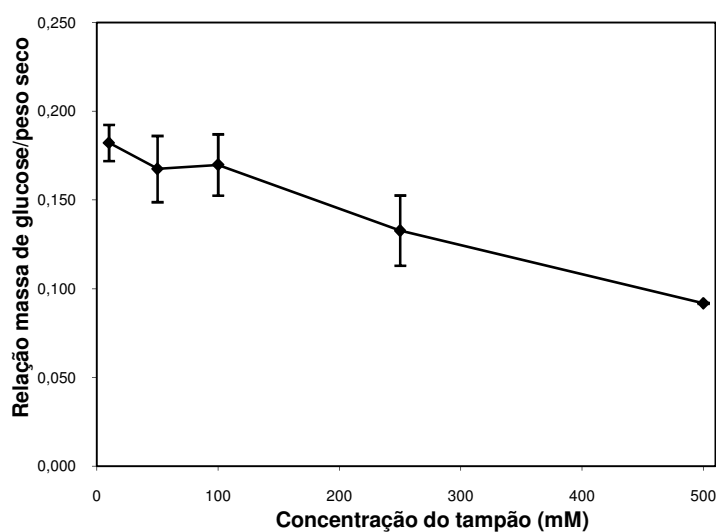


Figura 5.9 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da concentração do tampão

5.2.1.5. EFEITO DO TEMPO

A hidrólise da esteva pré-tratada foi efectuada em tempos de um intervalo de 24 a 168 horas e os resultados encontram-se apresentados na figura 5.10, observando-se que a libertação de glucose aumenta gradualmente ao longo do intervalo de tempo estudado.

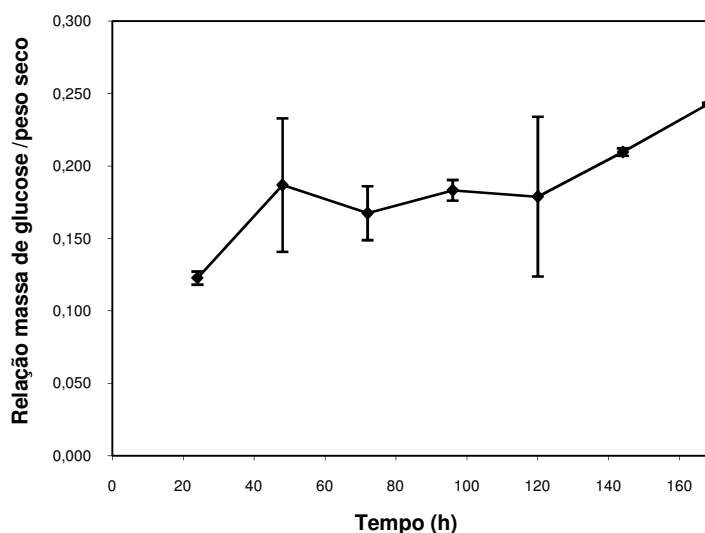


Figura 5.10 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função do tempo de reacção

5.2.1.6. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

A concentração de substrato é um factor considerado importante na hidrólise enzimática dos substratos lenhocelulósicos, porque este influencia a velocidade, grau e rendimento da hidrólise, e assim, influencia significativamente o potencial tecnoeconómico do processo global [15]. Assim sendo, foi estudado o efeito da concentração de esteva pré-tratada, sob o processo de hidrólise enzimática. Os resultados do efeito da concentração de biomassa lenhocelulósica (esteva pré-tratada) com base no peso seco sobre a libertação de glucose a partir da celulose encontram-se representados na figura 5.11. Foram testadas percentagens de fracção sólida de 1; 2; 2.5; 5; 7.5; 10 e 15% com a aplicação de uma quantidade fixa de celulasas de 25FPU/ g peso seco de esteva pré-tratada. Entre as diferentes percentagens de fracção sólida, não foram observadas diferenças significativas em termos de libertação de glucose. Diversos estudos, referiram que com o aumento da concentração de substrato usualmente resulta numa diminuição do rendimento da hidrólise devido a inibição pelo produto, inactivação enzimática ou dificuldades de agitação e outros até determinada concentração não apresentaram variações significativas [109]. Neste caso, a utilização de uma concentração de enzima suficiente é uma explicação possível para a baixa diferença verificada a diferentes percentagens de fracção sólida.

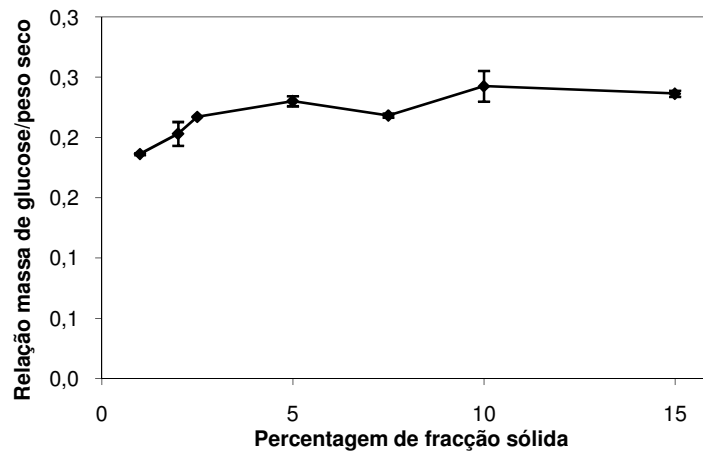


Figura 5.11 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da percentagem de fracção sólida

5.2.1.7. EFEITO DO VOLUME REACCIONAL

Os resultados do efeito do volume reaccional na libertação de glucose a partir de celulose, para os volumes de 1.5; 3; 4.5 e 6 mL, encontram-se representados na figura 5.12, não se verificando no entanto, uma influência significativa no rendimento da hidrólise enzimática, tomando por base uma percentagem de fracção sólida de 2.5% e uma agitação de 250 rpm, mantendo as proporções de todos os constituintes da mistura reaccional, o que pode levar a que a transferência de massa nestas condições ocorra de forma adequada.

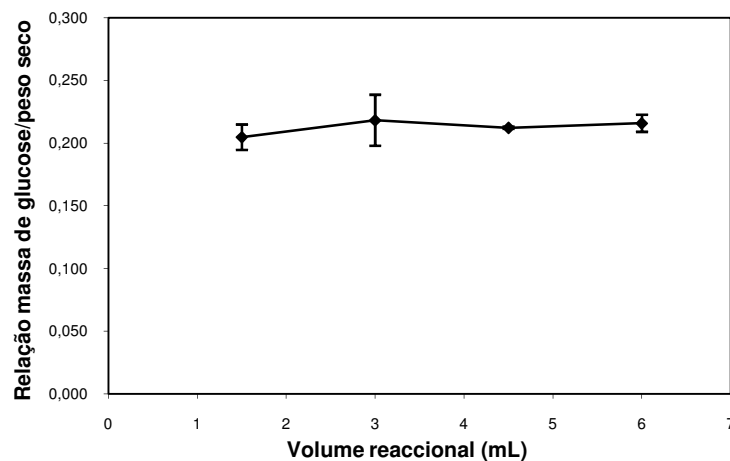


Figura 5.12 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função do volume reaccional

5.2.1.8. EFEITO DA AGITAÇÃO

O efeito da agitação foi testado em incubador orbital para 100 e 250rpm. Verificando-se pelos resultados apresentados na figura 5.13, que para a agitação mais elevada a glucose libertada a partir da celulose presente na esteva pré-tratada também apresentou um valor mais elevado para 72 horas de hidrólise enzimática. Isto pode ser justificado pela melhor transferência de massa que ocorre, também facilitando o acesso das enzimas ao substrato.

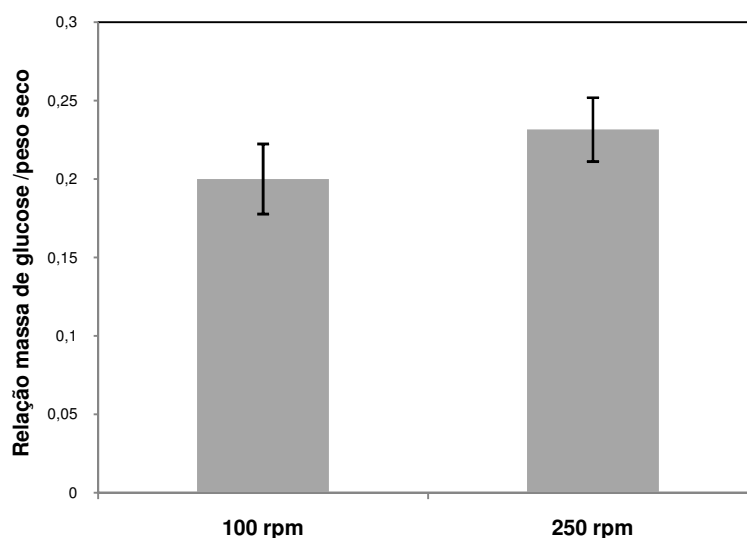


Figura 5.13 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da agitação

A resistência à transferência de massa aumenta com a concentração de substrato, assim pode assumir-se que a agitação será importante para uma adequada transferência de massa, mas também se deve tomar em consideração que a elevadas velocidades de agitação poderá ocorrer inativação com diminuição da actividade enzimática [39].

5.2.1.9. EFEITO DA TEMPERATURA

A hidrólise enzimática da esteva pré-tratada foi realizada a uma temperatura de 35°C e 50°C. A libertação de glucose por hidrólise enzimática aumentou com o aumento da temperatura, apresentando um valor superior para uma temperatura de 50°C (Figura 5.14). Esta observação (considerando estes dois pontos) coincide com o descrito como a temperatura óptima para hidrólise enzimática de diferentes materiais lenhocelulósicos [110]. Segundo, Viikari e seus colaboradores existe uma cessação da hidrólise após 24h a 60°C e após 48horas a 55°C, ocorrendo inativação de celulasas nativas de *Trichoderma* e β -glucosidase de *Aspergillus niger* a temperaturas superiores a 60°C [40].

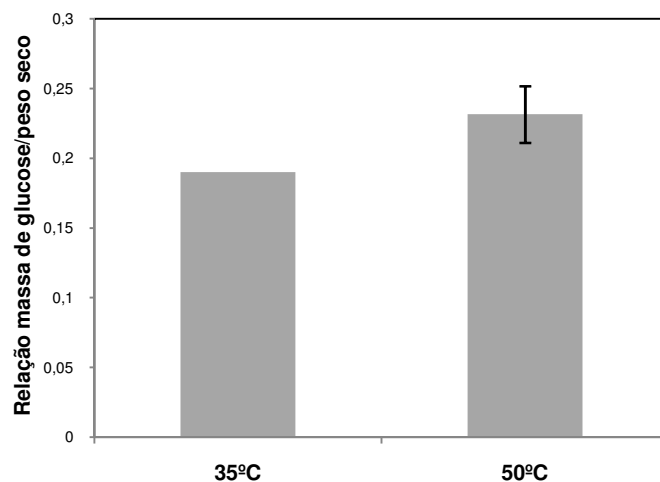


Figura 5.14 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da temperatura de reacção

5.2.1.10. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CELULASES

Os resultados obtidos com a hidrólise enzimática da esteva pré-tratada, utilizando o ensaio padrão descrito no ponto 4.2.3., mas usando doses diferentes de enzima celulases (apresentada como FPU/ g peso seco de esteva pré-tratada), são mostrados na figura 5.15. Para cada valor de concentração de celulases, após 72 horas de hidrólise enzimática, ocorre um aumento na relação de massa de glucose produzida por massa seca de esteva pré-tratada com o aumento da concentração de celulases. Apenas foi considerada até 50FPU/g peso seco neste estudo, porque concentrações elevadas já não são consideradas economicamente rentáveis.

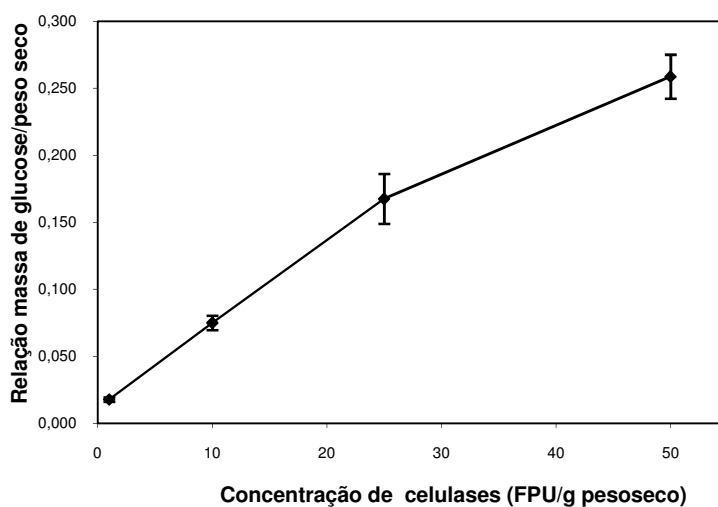


Figura 5.15 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da concentração de celulases adicionada (NS-50013)

5.2.1.11. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE β -GLUCOSIDASE

A adição de β -glucosidase é habitual no processo de hidrólise enzimática de materiais lenhocelulósicos, para diminuir a inibição pelo produto provocada pela acumulação da celobiose. Assim, foi testada a suplementação enzimática com β -glucosidase para valores de 0; 20; 25; 40; 80 e 160 CBU por grama de esteva pré-tratada seca. Na figura 5.16 está apresentada a relação de massa de glucose libertada da biomassa seca presente na mistura reaccional em função da suplementação com β -glucosidase. Para a concentração de celulases de 25 FPU/ g de biomassa seca, verificou-se um aumento da relação de massa de glucose libertada com base no peso de biomassa seca com o aumento da concentração de β -glucosidase de 0 a 160 CBU/ g de biomassa seca em cerca de 27%.

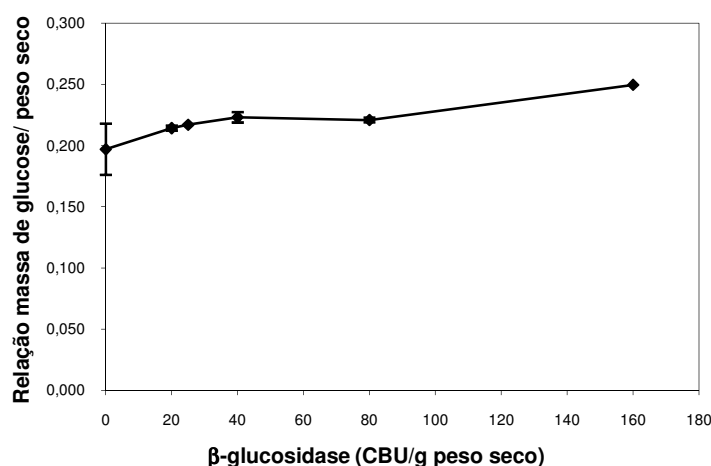


Figura 5.16 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da concentração de β -glucosidase adicionada (NS-50010)

5.2.1.12. EFEITO DA ADIÇÃO DE SURFACTANTE OU POLÍMERO

Eriksson e seus colaboradores [111], testaram a adição de diversos surfactantes à hidrólise enzimática de lenhocelulose e verificaram um aumento da conversão de celulose a açúcares solúveis, permitindo a diminuição das enzimas usadas. Foram testados diversos surfactantes, sendo que o poli(oxietileno)₂₀sorbitan-monolaurato (Tween 20) (2.5g/L para 50g/L de espruce pré-tratado com vapor) se apresentou como o composto que levou a uma maior diminuição da quantidade de celulases adicionada à hidrólise enzimática. A adição de albumina sérica bovina mostrou-se também eficiente quando adicionada à mistura reaccional antes das celulases [111], [95]. Börjesson e seus colaboradores [96], [97] estudaram a adição de polímeros, como poli(etileno)glicol (PEG) 4000, à hidrólise enzimática verificando-se um aumento do rendimento da reacção, sendo que 0.05g PEG 4000/g biomassa seca se mostrou suficiente para bloquear a superfície da lenhina de espruce pré-tratado com vapor.

Assim tomando em consideração o custo, para a esteva pré-tratada foram testados e comparados os surfactante Tween 20 e polímero PEG 4000, tendo-se obtido os resultados apresentados na figura 5.17. Verificou-se uma melhoria significativa do rendimento da hidrólise por adição de qualquer um dos compostos, sendo, no entanto, mais visível aquando da utilização do PEG 4000.

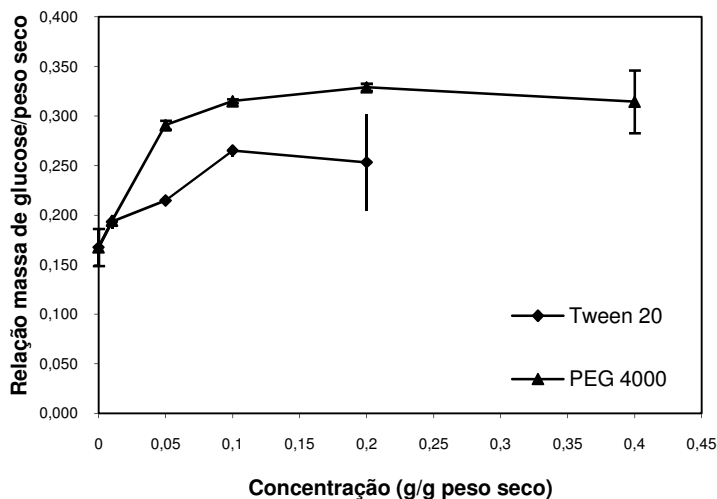


Figura 5.17 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da temperatura de reacção

No caso do Tween 20, foi descrito que como ocupa as regiões hidrofóbicas na superfície da lenhina pode levar a uma diminuição da ligação das celulasas à lenhina e por isso aumentar a concentração de enzimas disponíveis para a hidrólise da celulose[111]. O poli(etileno)glicol (PEG) é descrito como que além de adsorver à lenhina e prevenir a adsorção inespecífica das enzimas, o seu uso permite trabalhar a temperaturas superiores (50°C) durante o processo de hidrólise enzimática, resultando num menor tempo de reacção [96]. Considerando os dados obtidos, e a maior facilidade de manipulação do PEG, devido à elevada viscosidade do Tween 20, seleccionou-se o PEG 4000 para utilização nos ensaios utilizando a metodologia de desenho experimental.

.5.2.1.13. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA UTILIZANDO A PREPARAÇÃO ENZIMÁTICA NS-50012

Considerando, a composição da preparação enzimática NS-50012 foram realizados ensaios com base no seu conteúdo em termos de actividade celulolítica, usando-se o ensaio descrito no ponto 4.2.3., com substituição do complexo celulítico NS-50013 pelo NS-50012. Tendo-se ensaiado as actividades de celulasas nas concentrações 1; 10; 25 e 50 FPU/mL. Verifica-se a mesma tendência que se observou para o estudo com a preparação enzimática NS-50013 (Figura 5.18)

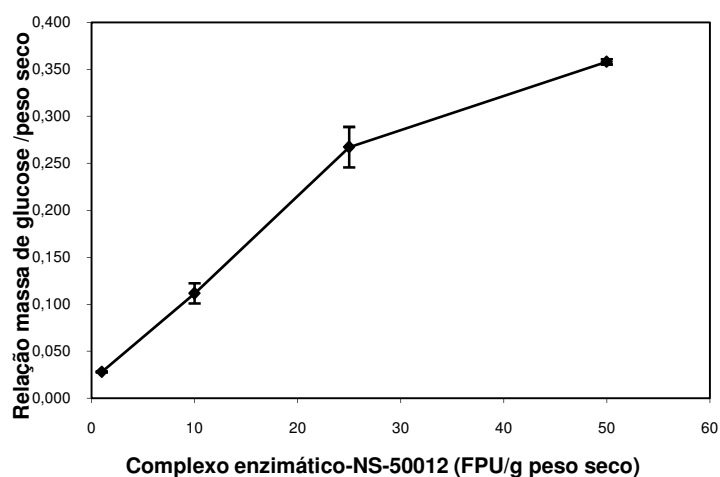


Figura 5.18 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da adição de complexo enzimático NS-50012

Quando se procede à comparação entre a aplicação das duas preparações enzimáticas, NS-50013 e NS-50012, para a mesma actividade de celulasas sobre papel de filtro, 25FPU/g peso seco, verifica-se uma maior libertação de glucose para o caso de utilização de NS-50012 (Figura 5.19). Isto pode ser justificado pelo facto de o último complexo enzimático possuir outras enzimas que não celulasas que poderão degradar as hemiceluloses e lenhina, facilitando o acesso das enzimas à celulose.

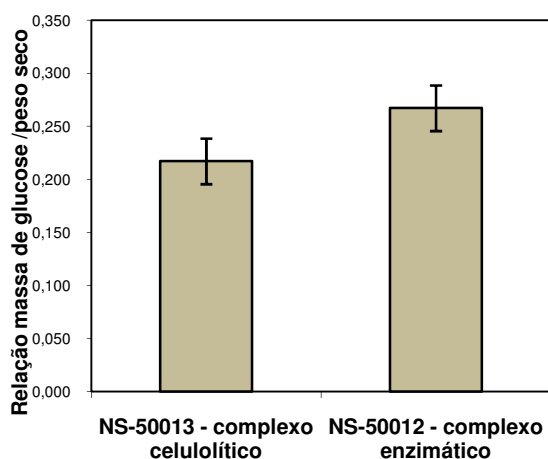


Figura 5.19 - Relação da massa de glucose libertada com a biomassa em função da adição do tipo de preparação enzimática usada (NS-50013 ou NS-50012)

5.2.2. APLICAÇÃO DO DESENHO EXPERIMENTAL – PLACKETT-BURMAN À HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

É bem conhecido que as enzimas mostram condições óptimas de operação como temperatura e pH, implicando um aumento da taxa de desnaturação da enzima com altas temperaturas e uma alteração no estado iónico dos resíduos de aminoácidos da enzima em função do pH. Estas duas variáveis, temperatura e pH, foram estudadas em conjunto com força iónica, tipo de sistema tamponante, concentração de enzimas (celulases e β -glucosidase), volume reaccional, tempo de incubação, velocidade do incubador orbital (agitação), concentração de substrato e concentração de polímero (PEG 4000). A variável pH foi fixada por utilização de uma solução tampão. A variável força iónica está relacionada com a concentração do sistema tamponante usado para fixar o pH.

O parâmetro de resposta às variáveis foi a relação de glucose produzida por peso seco de matéria-prima pré-tratada, giesta ou esteva.

Assim, os efeitos da mudança nas variáveis desde um valor inferior para um valor superior foram simultaneamente estudados por aplicação do desenho experimental de Plackett-Burman. Com o objectivo de seleccionar os factores mais importantes. Foi construída uma matriz com grau de resolução III para 11 factores, 12 ensaios e 3 replicados, para cada tipo de matéria-prima pré-tratada, giesta (*Cytisus striatus*) e esteva (*Cistus ladanifer*). A matriz é apresentada pela tabela 5.7. Os valores mínimo e máximo para algumas das variáveis foram escolhidos tomando em consideração os valores óptimos (temperatura e pH) conhecidos pela literatura relativa às enzimas usadas no estudo e informação do fornecedor, a possibilidade de

inactivação ou desnaturação das enzimas em condições extremas, tal como os ensaios preliminares realizados.

As variáveis e condições experimentais (tabela 5.7) foram as mesmas para os ensaios realizados com esteva ou giesta como matéria-prima. Os valores para a resposta às variáveis encontram-se listados na tabela 5.8.

Tabela 5.7. Condições experimentais dos ensaios realizados

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Conc. tampão (mM)	Conc. celulasas (FPU/g peso seco)	Conc β-glucosidase (CBU/g peso seco)	Volume reaccional (mL)	Tempo (h)	Agitação (rpm)	Conc. substrato (% p/V)	Conc PEG 4000 (g/g peso seco)	Tipo tampão
1	4.0	30	10	1	1	1.5	24	100	2	0.01	Acetato
2	6.5	55	10	1	1	6	24	250	12.5	0.01	Citrato
3	4.0	30	10	50	1	6	120	100	12.5	0.2	Citrato
4	4.0	30	250	1	300	6	24	250	12.5	0.2	Acetato
5	4.0	55	250	1	300	6	120	100	2	0.01	Citrato
6	6.5	55	250	1	1	1.5	120	100	12.5	0.2	Acetato
7	4.0	55	250	50	1	1.5	24	250	2	0.2	Citrato
8	4.0	55	10	50	300	1.5	120	250	12.5	0.01	Acetato
9	6.5	30	250	50	300	1.5	24	100	12.5	0.01	Citrato
10	6.5	30	250	50	1	6	120	250	2	0.01	Acetato
11	6.5	30	10	1	300	1.5	120	250	2	0.2	Citrato
12	6.5	55	10	50	300	6	24	100	2	0.2	Acetato

Tabela 5.8-Resposta (relação massa de glucose produzida glucose /massa seca de substrato) às variáveis para a giesta e esteva

Ensaio	GIESTA				ESTEVA			
	Resposta		Média		Resposta		Média	
1	0,023	0,021	0,023	0,022	0,009	0,010	0,009	0,009
2	0,052	0,050	0,049	0,050	0,021	0,020	0,019	0,020
3	0,233	0,253	0,246	0,244	0,226	0,217	0,218	0,221
4	0,034	0,030	0,029	0,031	0,024	0,025	0,025	0,025
5	0,059	0,057	0,059	0,058	0,009	0,010	0,010	0,009
6	0,079	0,076	0,076	0,077	0,079	0,077	0,073	0,077
7	0,318	0,316	0,297	0,310	0,242	0,245	0,240	0,243
8	0,432	0,451	0,421	0,435	0,128	0,120	0,130	0,126
9	0,082	0,079	0,075	0,078	0,064	0,066	0,073	0,067
10	0,197	0,196	0,190	0,194	0,161	0,178	0,177	0,172
11	0,012	0,011	0,000	0,008	0,000	0,011	0,000	0,004
12	0,296	0,312	0,315	0,307	0,190	0,206	0,203	0,200

A versão 7.1.4. do “Design Expert” da State Ease Inc., foi utilizada para tratar os resultados obtidos. O resultado usado como resposta foi a média das respostas obtidas nos ensaios realizados com a giesta e esteva pré-tratadas.

Os resultados são interpretados com base nas estimativas de como cada factor experimental afecta a resposta. A análise estatística fornece estimativas desses efeitos. O efeito de cada factor é a diferença no valor da resposta associado com a passagem do nível inferior para o superior. Quando um factor é importante causa um grande efeito, assim o processo apresentará resultados significativamente melhores para um destes níveis. Quando um factor não é importante para o processo não haverá uma grande alteração na performance do processo e é assim associado a um pequeno efeito [100].

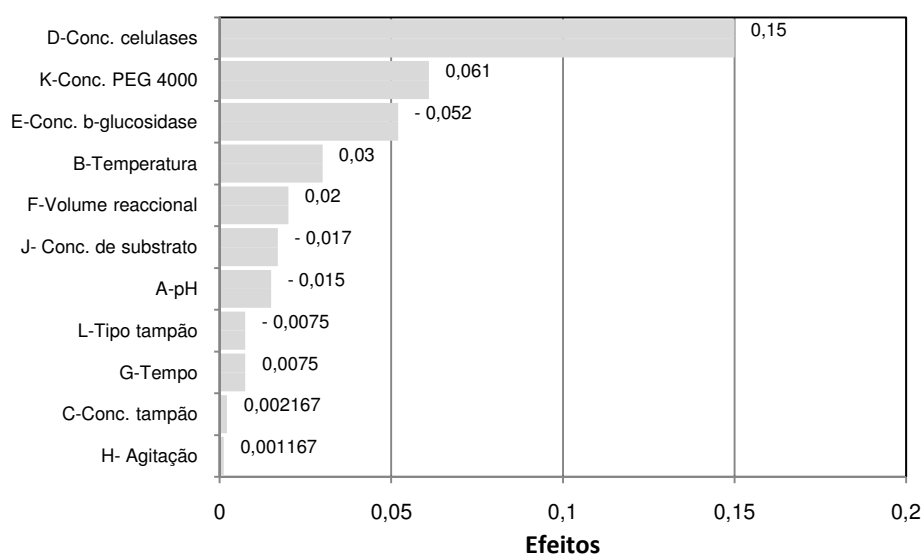


Figura 5.20– Gráfico de Pareto para os efeitos dos factores de acordo com a sua magnitude (valor absoluto) relativa à esteva pré-tratada

A figura 5.20 apresenta os efeitos (intervalo de confiança de 95%) para cada variável na libertação de glucose a partir da celulose para cada tipo de material lenhocelulósico utilizado, esteva. Os sinais negativos significam que a mudança na variável do nível inferior para o nível superior produz uma diminuição na eficiência de libertação de glucose, enquanto o sinal positivo significa que esta mudança favorece o aumento da libertação de glucose [100]. A partir da tabela pode observar-se que todos os factores estudados afectaram a libertação de glucose por hidrólise enzimática da celulose. No entanto, pela análise do quadro ANOVA podem seleccionar-se os factores significativos.

Tabela 5.9 – Quadro ANOVA relativo aos ensaios com esteva pré-tratada

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p Prob>F
Modelo	0.089955	7	0.012851	144.5247	0.0001
A-pH	0.000721	1	0.000721	8.105904	0.0465
B-Temperatura	0.002611	1	0.002611	29.36176	0.0056
D-Conc. celulasas	0.065269	1	0.065269	734.044	< 0.0001
E-Conc. β -glucosidase	0.00806	1	0.00806	90.64761	0.0007
F-Volume reaccional	0.00122	1	0.00122	13.72165	0.0208
J-Conc. substrato	0.00085	1	0.00085	9.56045	0.0365
K-Conc. PEG 4000	0.011224	1	0.011224	126.2315	0.0004
Residual	0.000356	4	8.89E-05		
Total	0.09031	11			

$R^2 = 0.9961$

O valor de F 144.52 para o modelo mostra que este tem significado, existindo uma possibilidade de 0.01% de os resultados serem devido a ruído. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0.9961, o que corresponde a que 99.61% da variabilidade da resposta pode ser explicada por este modelo estatístico. Os valores Prob>F inferiores a 0.05 indicam os termos do modelo que apresentam significado, assim os termos com níveis de significância superiores a 5% foram eliminados. Neste caso, os termos A, B, D, E, F, J, K, são os termos significativos do modelo.

A equação final estimada para a resposta Relação de massa de glucose produzida/massa seca é:

$$\text{Resposta} = -0.00951 - 0.0062 \cdot \text{pH} + 0.00118 \cdot \text{Temperatura} + 0.00301 \cdot \text{Concentração de celulasas} - 0.00017 \cdot \text{Concentração de } \beta\text{-glucosidase} + 0.00448 \cdot \text{Volume reaccional} - 0.00160 \cdot \text{Concentração de substrato} + 0.32193 \cdot \text{Concentração de PEG 4000}$$

Esta equação matemática pode ser usada para prever a resposta que ocorre perante variação dos factores nela incluídos.

Design-Expert® Software

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = A: pH

Actual Factors

B: Temperatura = 42.50

C: Conc. tampão = 130.00

D: Conc celulasas = 25.50

E: Conc b-glucosidase = 150.50

F: Volume reaccional = 3.75

G: Tempo = 72.00

H: Agitação = 175.00

J: Conc. substrato = 7.25

K: Conc. PEG 4000 = 0.11

L: Tipo tampão = Acetato

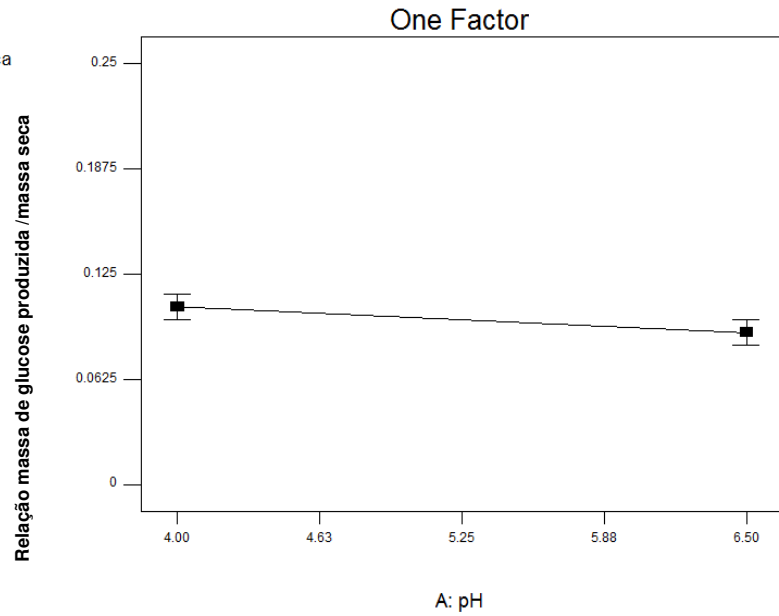


Figura 5.21 – Representação gráfica da influência do pH na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada

Design-Expert® Software

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = B: Temperatura

Actual Factors

A: pH = 5.25

C: Conc. tampão = 130.00

D: Conc celulasas = 25.50

E: Conc b-glucosidase = 150.50

F: Volume reaccional = 3.75

G: Tempo = 72.00

H: Agitação = 175.00

J: Conc. substrato = 7.25

K: Conc. PEG 4000 = 0.11

L: Tipo tampão = Acetato

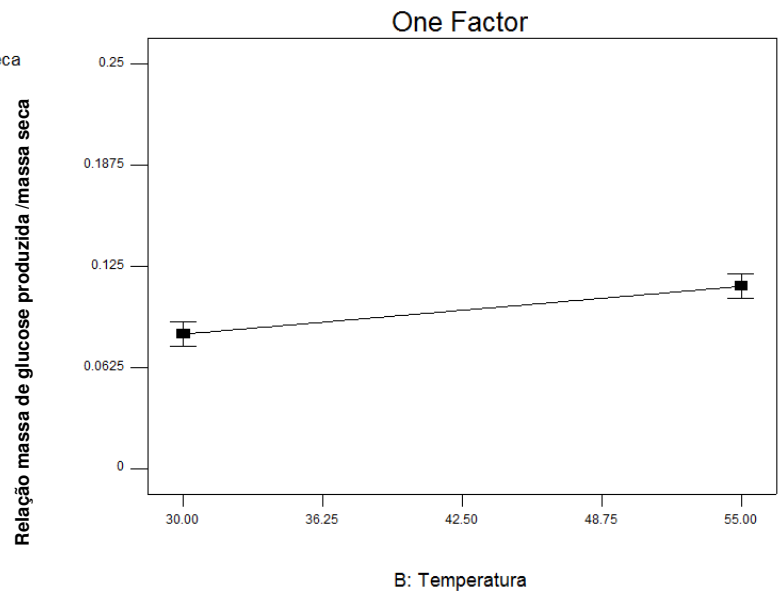


Figura 5.22 – Representação gráfica da influência da temperatura na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada

Design-Expert® Software

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = D: Conc celulases

Actual Factors

A: pH = 5.25

B: Temperatura = 42.50

C: Conc. tampão = 130.00

E: Conc b-glucosidase = 150.50

F: Volume reaccional = 3.75

G: Tempo = 72.00

H: Agitação = 175.00

J: Conc. substrato = 7.25

K: Conc. PEG 4000 = 0.11

L: Tipo tampão = Acetato

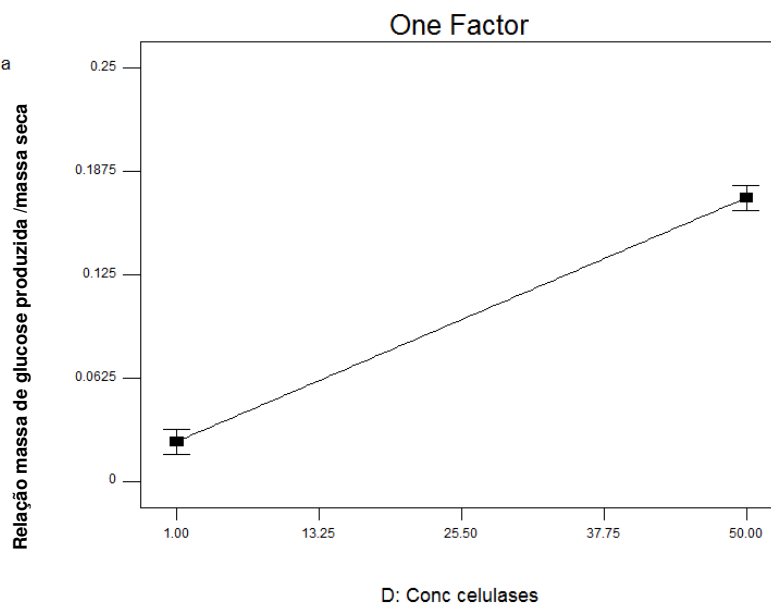


Figura 5.23– Representação gráfica da influência da concentração de celulases na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada

Design-Expert® Software

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = E: Conc b-glucosidase

Actual Factors

A: pH = 5.25

B: Temperatura = 42.50

C: Conc. tampão = 130.00

D: Conc celulases = 25.50

F: Volume reaccional = 3.75

G: Tempo = 72.00

H: Agitação = 175.00

J: Conc. substrato = 7.25

K: Conc. PEG 4000 = 0.11

L: Tipo tampão = Acetato

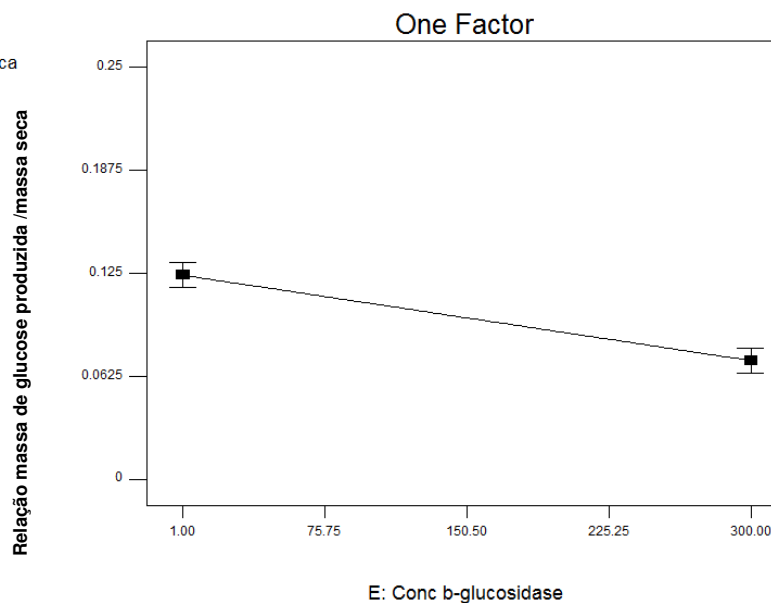


Figura 5.24– Representação gráfica da influência da concentração de β -glucosidase na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada

Design-Expert® Software

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = F: Volume reaccional

Actual Factors

A: pH = 5.25

B: Temperatura = 42.50

C: Conc. tampão = 130.00

D: Conc. celulasas = 25.50

E: Conc. b-glucosidase = 150.50

G: Tempo = 72.00

H: Agitação = 175.00

J: Conc. substrato = 7.25

K: Conc. PEG 4000 = 0.11

L: Tipo tampão = Acetato

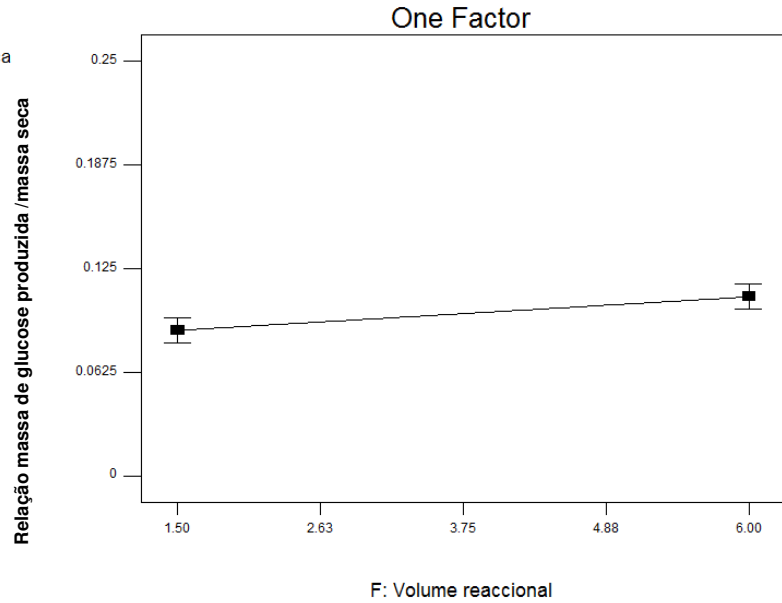


Figura 5.25 – Representação gráfica da influência do volume reaccional na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada

Design-Expert® Software

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = K: Conc. PEG 4000

Actual Factors

A: pH = 5.25

B: Temperatura = 42.50

C: Conc. tampão = 130.00

D: Conc. celulasas = 25.50

E: Conc. b-glucosidase = 150.50

F: Volume reaccional = 3.75

G: Tempo = 72.00

H: Agitação = 175.00

J: Conc. substrato = 7.25

L: Tipo tampão = Acetato

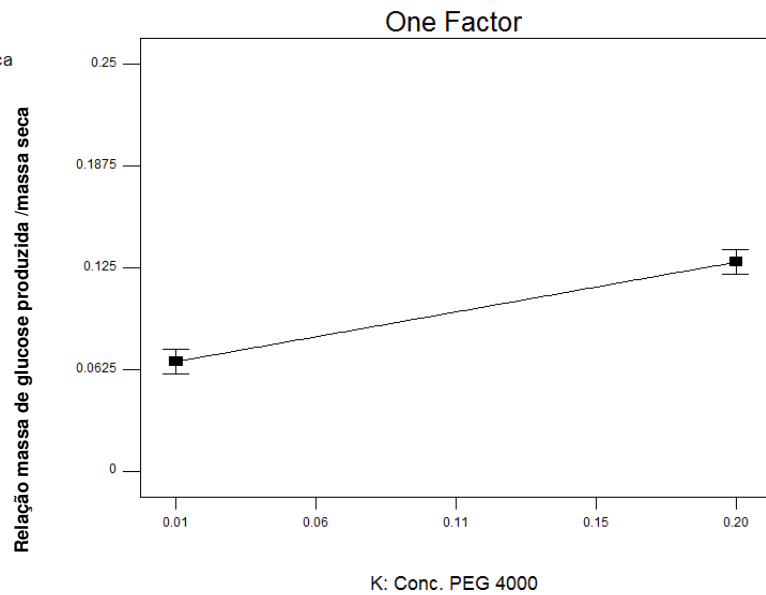


Figura 5.26– Representação gráfica da influência da concentração de PEG 4000 na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = J: Conc. substrato

Actual Factors

A: pH = 5.25

B: Temperatura = 42.50

C: Conc. tampão = 130.00

D: Conc celulasas = 25.50

E: Conc b-glucosidase = 150.50

F: Volume reaccional = 3.75

G: Tempo = 72.00

H: Agitação = 175.00

K: Conc. PEG 4000 = 0.11

L: Tipo tampão = Acetato

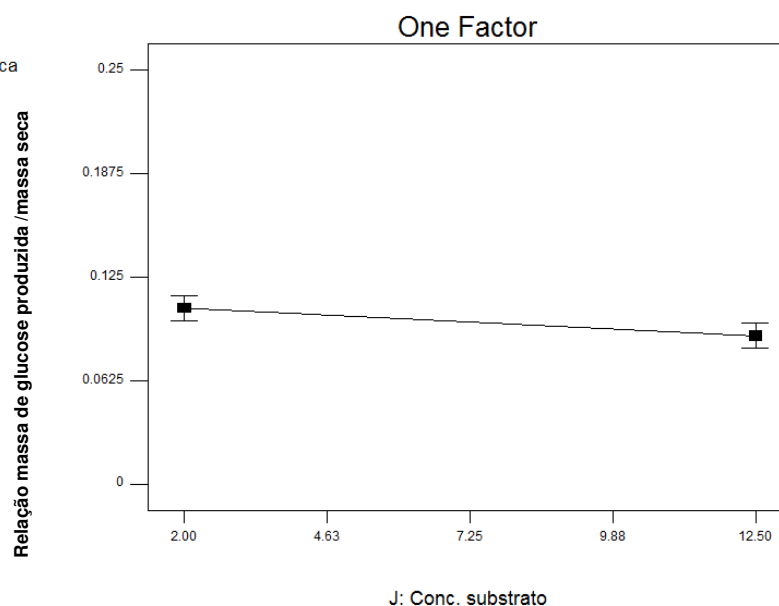


Figura 5.27 – Representação gráfica da influência da concentração de substrato na relação massa de glucose produzida/massa seca de esteva pré-tratada

Da análise estatística anterior e por observação dos gráficos relativos pode verificar-se que a concentração de celulasas (figura 5.23) é o factor que apresenta maior efeito sobre a libertação de glucose a partir da esteva pré-tratada, levando a um aumento de cerca de 6.7 vezes da libertação de glucose passando-se de 1 para 50 FPU/g de peso seco de esteva pré-tratada, tal como verificado nos ensaios preliminares. A concentração de PEG 4000 (figura 5.26) demonstra ter também um efeito positivo acentuado sobre a relação de massa de glucose libertada por massa seca de esteva pré-tratada, justificado pelo elevado teor de lenhina deste substrato (34.2% na esteva antes de sujeita a pré-tratamento, onde 32% correspondem a lenhina insolúvel).

Contrariamente aos ensaios preliminares e à literatura [16], [39], [112] a adição de β -glucosidase (figura 5.24) não levou a uma melhoria na conversão de celulose a glucose, mas sim a uma diminuição acentuada, verificando-se, segundo a análise estatística que o valor absoluto do efeito negativo da adição de β -glucosidase é mesmo superior ao valor absoluto do pH (figura 5.21) e da temperatura (figura 5.22).

A temperatura de incubação mostrou ser uma variável estatisticamente significativa, sendo o seu efeito positivo, isto pode justificar-se por o aumento da temperatura levar a uma aproximação da temperatura óptima das celulasas.

A concentração de substrato (figura 5.27) tem um efeito negativo sobre a libertação de glucose a partir da celulose da esteva pré-tratada, que pode ser justificado por com o aumento da percentagem de esteva pré-tratada está-se a aumentar a consistência e logo a dificultar a transferência de massa.

A variável pH apresentou um efeito negativo, pois a passagem de um nível inferior para um superior leva a um afastamento do pH óptimo das celulasas.

A variável tempo mostrou não ser significativa para a esteva, este facto pode ser atribuído a uma inactivação das enzimas ou falta de estabilidade após um certo tempo.

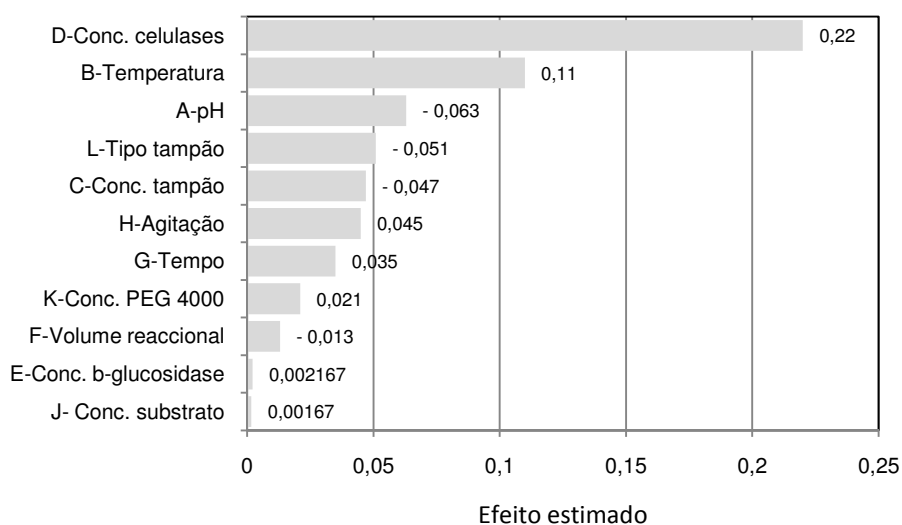


Figura 5.28 – Gráfico de Pareto para os efeitos dos factores de acordo com a sua magnitude (valor absoluto) relativa à giesta pré-tratada

Tabela 5.10 – Quadro ANOVA relativo aos ensaios com a giesta pré-tratada

Origem de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p Prob>F
Modelo	0.212486	7	0.030355	66.31378	0.0006
A-pH	0.012097	1	0.012097	26.42654	0.0068
B-Temperatura	0.035752	1	0.035752	78.10395	0.0009
C-Conc. tampão	0.006487	1	0.006487	14.17094	0.0197
D-Conc celulases	0.140617	1	0.140617	307.1912	< 0.0001
G-Tempo	0.003571	1	0.003571	7.800655	0.0492
H-Agitação	0.006211	1	0.006211	13.568	0.0211
L-Tipo tampão	0.007752	1	0.007752	16.93519	0.0147
Residual	0.001831	4	0.000458		
Total	0.214317	11			

$R^2=0.9914$

O valor de F 66.31 para o modelo mostra que este tem significado, existindo uma possibilidade de 0.06% de os resultados serem devido a ruído. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0.9914. Os valores Prob>F inferiores a 0.05 indicam os termos do modelo

que apresentam significado, assim os termos com níveis de significância superiores a 5% foram eliminados. Neste caso, os termos A, B, C, D, G, H, L, são os termos significativos do modelo.

A equação final para a resposta Relação de massa de glucose produzida/massa seca, tomando como referência o tipo de tampão usado, corresponde para o tampão acetato a:

$$\text{Resposta} = -0.04184 - 0.0254 * A + 0.00437 * B - 0.00019 * C + 0.00442 * D + 0.00036 * G + 0.00030 * H$$

Para o tampão citrato:

$$\text{Resposta} = -0.09267 - 0.02540 * A + 0.00437 * B - 0.00019 * C + 0.00442 * D + 0.00036 * G + 0.00030 * H$$

Design-Expert® Software

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = A: pH

Actual Factors

B: Temperatura = 42.50

C: Conc. tampão = 130.00

D: Conc celulasas = 25.50

E: Conc b-glucosidase = 150.50

F: Volume reaccional = 3.75

G: Tempo = 72.00

H: Agitação = 175.00

J: Conc. substrato = 7.25

K: Conc. PEG 4000 = 0.11

L: Tipo tampão = Acetato

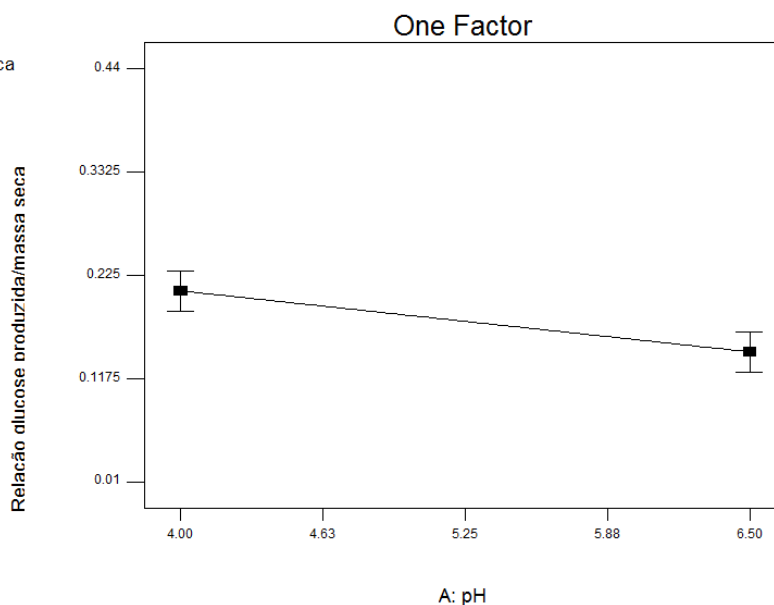


Figura 5.29– Representação gráfica da influência do pH na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada

Design-Expert® Software

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = B: Temperatura

Actual Factors

A: pH = 5.25
C: Conc. tampão = 130.00
D: Conc celulasas = 25.50
E: Conc b-glucosidase = 150.50
F: Volume reaccional = 3.75
G: Tempo = 72.00
H: Agitação = 175.00
J: Conc. substrato = 7.25
K: Conc. PEG 4000 = 0.11
L: Tipo tampão = Acetato

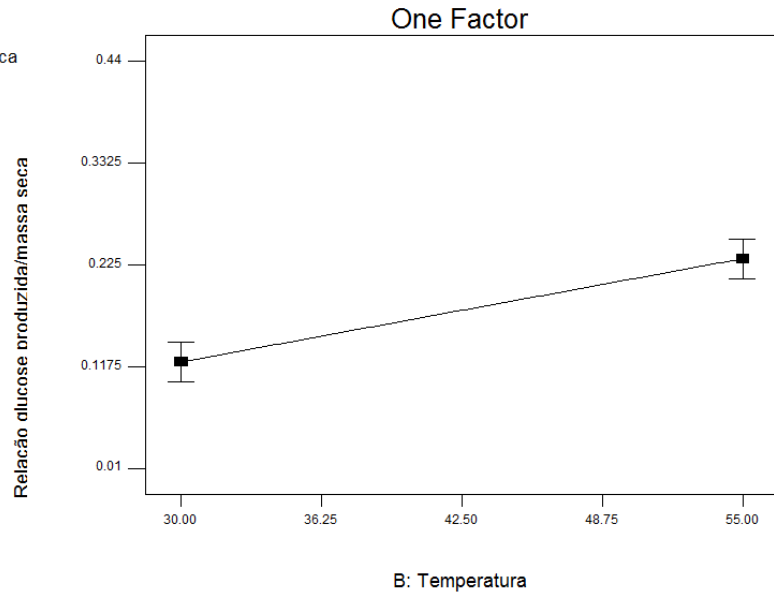


Figura 5.30 – Representação gráfica da influência da temperatura na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada

Design-Expert® Software

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = C: Conc. tampão

Actual Factors

A: pH = 5.25
B: Temperatura = 42.50
D: Conc celulasas = 25.50
E: Conc b-glucosidase = 150.50
F: Volume reaccional = 3.75
G: Tempo = 72.00
H: Agitação = 175.00
J: Conc. substrato = 7.25
K: Conc. PEG 4000 = 0.11
L: Tipo tampão = Acetato

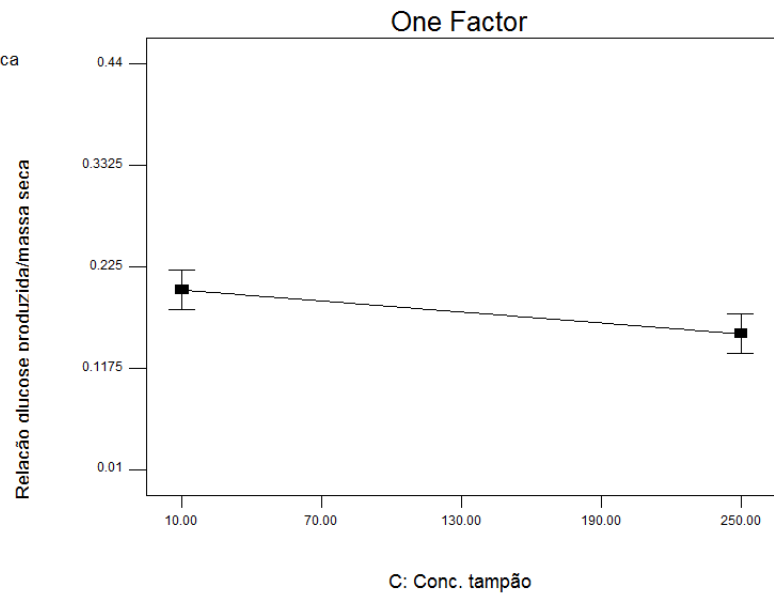


Figura 5.31 – Representação gráfica da influência da concentração de tampão na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada

Design-Expert® Software

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = D: Conc celulases

Actual Factors

A: pH = 5.25

B: Temperatura = 42.50

C: Conc. tampão = 130.00

E: Conc b-glucosidase = 150.50

F: Volume reaccional = 3.75

G: Tempo = 72.00

H: Agitação = 175.00

J: Conc. substrato = 7.25

K: Conc. PEG 4000 = 0.11

L: Tipo tampão = Acetato

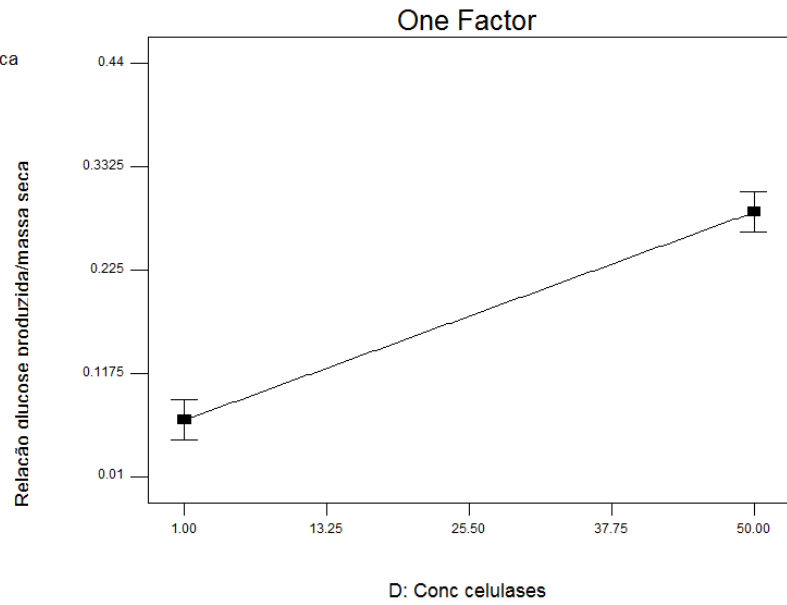


Figura 5.32 – Representação gráfica da influência da concentração de celulases na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada

Design-Expert® Software

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = G: Tempo

Actual Factors

A: pH = 5.25

B: Temperatura = 42.50

C: Conc. tampão = 130.00

D: Conc celulases = 25.50

E: Conc b-glucosidase = 150.50

F: Volume reaccional = 3.75

H: Agitação = 175.00

J: Conc. substrato = 7.25

K: Conc. PEG 4000 = 0.11

L: Tipo tampão = Acetato

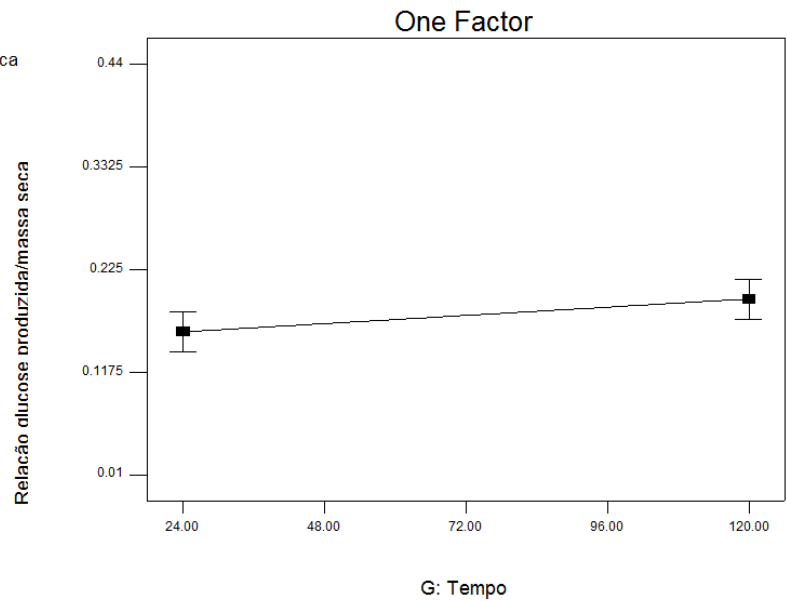


Figura 5.33 – Representação gráfica da influência do tempo na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada

Design-Expert® Software

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = L: Tipo tampão

Actual Factors

A: pH = 5.25

B: Temperatura = 42.50

C: Conc. tampão = 130.00

D: Conc celulasas = 25.50

E: Conc b-glucosidase = 150.50

F: Volume reaccional = 3.75

G: Tempo = 72.00

H: Agitação = 175.00

J: Conc. substrato = 7.25

K: Conc. PEG 4000 = 0.11

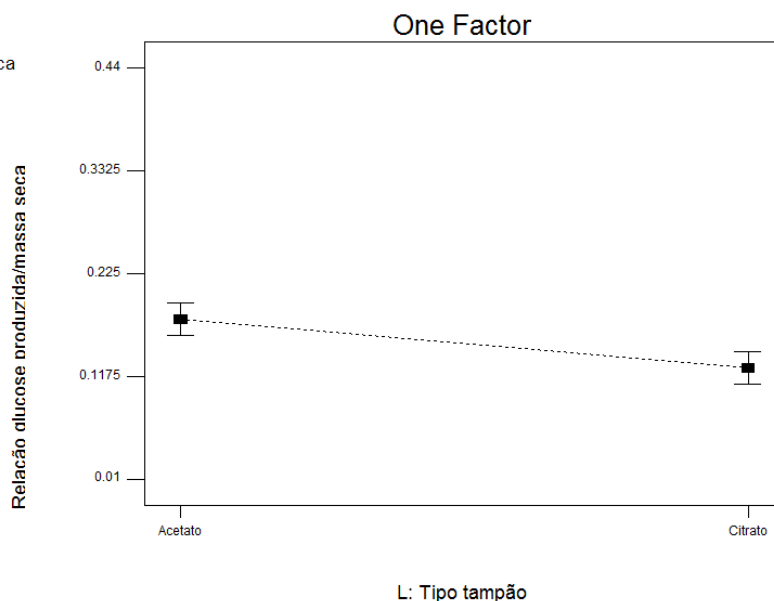


Figura 5.34 – Representação gráfica da influência do tipo de tampão na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada

Design-Expert® Software

Proporção glucose produzida/massa seca

X1 = H: Agitação

Actual Factors

A: pH = 5.25

B: Temperatura = 42.50

C: Conc. tampão = 130.00

D: Conc celulasas = 25.50

E: Conc b-glucosidase = 150.50

F: Volume reaccional = 3.75

G: Tempo = 72.00

J: Conc. substrato = 7.25

K: Conc. PEG 4000 = 0.11

L: Tipo tampão = Acetato

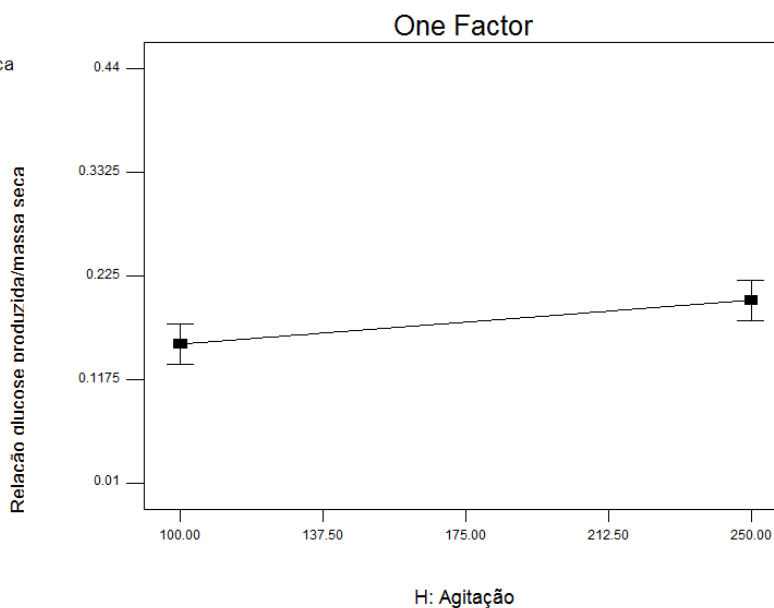


Figura 5.35 – Representação gráfica da influência da agitação na relação massa de glucose produzida/massa seca de giesta pré-tratada

Da análise estatística anterior e por observação dos gráficos relativos à influência das variáveis sobre a resposta, pode verificar-se que a concentração de celulasas (figura 5.32) é o factor que apresenta maior efeito sobre a libertação de glucose a partir da giesta pré-tratada, levando a uma libertação de glucose de cerca de quatro vezes superior quando se aumenta a temperatura do nível inferior (-1) ao superior (+1).

O pH (figura 5.29) e a temperatura de incubação (figura 5.30) mostraram o mesmo padrão em termos dos efeitos sobre a conversão de celulose a glucose, que para a esteva pré-tratada, verificando-se um aumento de cerca de 1,7 vezes na resposta com o aumento da temperatura de 30°C para 50°C. A concentração de tampão (figura 5.31), tal como o tempo, mostrou ser significativa para a conversão de celulose a glucose.

A agitação (figura 5.35) demonstrou ter um efeito positivo sobre a relação massa de glucose libertada em função da massa seca de substrato, que pode ser justificada por uma melhoria da transferência de massa e acessibilidade das enzimas ao substrato.

As diferenças observadas entre as variáveis que influenciam a conversão da celulose para a giesta e para a esteva pré-tratadas, podem ser devidas à variabilidade em termos de composição e estrutura das duas matérias-primas, salientando-se o elevado teor de extractáveis da esteva.

5.2.3. APLICAÇÃO DO DESENHO EXPERIMENTAL “CENTRAL COMPOSITE DESIGN” À HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Para a optimização do processo de hidrólise enzimática da giesta e esteva pré-tratada por aplicação da metodologia de resposta de superfície, foram seleccionadas as variáveis: concentração de celulasas, temperatura, pH, tempo e concentração de PEG 4000. A concentração de celulasas foi seleccionada por ser a variável que apresentou maior efeito para as duas matérias-primas. A temperatura, pH e tempo de hidrólise por terem influência na conversão de celulose e estarem descritas na literatura como sendo dependentes entre elas [39], verificando-se que tempos mais prolongados de hidrólise, a temperatura considerada óptima é mais baixa que para tempos mais curtos. A concentração de PEG 4000 adicionada à mistura reaccional também foi testada pelo acentuado efeito positivo que demonstrou para o estudo efectuado com a esteva pré-tratada. Os restantes parâmetros foram mantidos constantes como apresentado na tabela 5.11.

Tabela 5.11 – Parâmetros que foram mantidos constantes para os ensaios relativos ao CCD

Parâmetros	Valor experimental
Concentração de tampão (mM)	50
Concentração β -glucosidase (CBU/g peso seco)	0
Volume reaccional (mL)	3
Agitação (rpm)	250
Concentração de substrato (% p/V)	5
Tipo de tampão	Citrato

Na tabela 5.12 pode observar-se a matriz do desenho experimental com as respectivas respostas (relação de massa de glucose produzida em função da massa seca de substrato)

experimental e prevista. Foi utilizada a versão 7.1.4. do “Design Expert” da State Ease Inc, para a regressão e análise gráfica dos resultados obtidos. A significância dos coeficientes foi avaliada pelo teste de Fisher e o ajuste das funções foi feito pelo método de regressão Backward.

Na tabela 5.13 podem analisar-se os dados correspondentes à análise da variância (ANOVA) para o modelo experimental correspondente aos ensaios da hidrólise enzimática de esteva pré-tratada.

Tabela 5.12 - Matriz do desenho experimental e respectivas respostas experimental e prevista para a hidrólise enzimática realizada com esteva pré-tratada

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Conc. celulasas (FPU/g peso seco)	Conc PEG 4000 (g/g peso seco)	Tempo (h)	Resposta experimental	Resposta prevista ^a
1	30	6	60	0.14	72	0.181	0.195
2	30	4	21	0.4	25	0.062	0.035
3	30	6	60	0.4	25	0.060	0.103
4	50	6	21	0.14	72	0.217	0.204
5	30	6	60	0.14	72	0.189	0.195
6	40	5	40.5	0.27	95.5	0.295	0.269
7	40	5	40.5	0.27	48.5	0.211	0.194
8	50	6	21	0.4	25	0.122	0.112
9	40	5	40.5	0.27	1.5	0.010	0.051
10	30	4	60	0.14	25	0.113	0.100
11	50	4	60	0.14	72	0.314	0.299
12	40	5	79.5	0.27	48.5	0.272	0.237
13	40	5	40.5	0.53	48.5	0.222	0.210
14	40	5	1.5	0.27	48.5	0.033	0.074
15	30	4	21	0.4	25	0.063	0.035
16	50	4	60	0.4	25	0.227	0.207
17	40	5	40.5	0.27	48.5	0.203	0.194
18	40	3	40.5	0.27	48.5	0.110	0.145
19	40	5	40.5	0.27	48.5	0.221	0.194
20	50	4	21	0.14	25	0.124	0.109
21	40	5	40.5	0.01	48.5	0.157	0.177
22	50	4	21	0.4	72	0.265	0.234
23	30	6	60	0.4	25	0.092	0.103
24	30	6	21	0.14	25	0.046	0.005
25	30	4	60	0.4	72	0.227	0.225
26	50	4	21	0.4	72	0.237	0.234
27	50	6	60	0.14	25	0.189	0.177

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Conc. celulasas (FPU/g peso seco)	Conc PEG 4000 (g/g peso seco)	Tempo (h)	Resposta experimental	Resposta prevista ^a
28	40	5	40.5	0.27	95.5	0.299	0.269
29	50	6	60	0.4	72	0.296	0.302
30	50	6	60	0.14	25	0.174	0.177
31	30	4	21	0.14	72	0.131	0.127
32	40	5	40.5	0.27	48.5	0.223	0.194
33	20	5	40.5	0.27	48.5	0.089	0.103
34	40	5	79.5	0.27	48.5	0.264	0.237
35	30	6	21	0.4	72	0.101	0.130
36	50	4	21	0.14	25	0.146	0.109
37	50	6	21	0.4	25	0.123	0.112
38	40	3	40.5	0.27	48.5	0.113	0.145
39	50	4	60	0.4	25	0.213	0.207
40	30	4	60	0.4	72	0.227	0.225
41	30	6	21	0.14	25	0.047	0.005
42	40	5	1.5	0.27	48.5	0.030	0.074
43	30	6	21	0.4	72	0.107	0.130
44	40	5	40.5	0.53	48.5	0.216	0.210
45	60	5	40.5	0.27	48.5	0.233	0.284
46	60	5	40.5	0.27	48.5	0.261	0.284
47	50	6	21	0.14	72	0.195	0.204
48	30	4	21	0.14	72	0.128	0.127
49	40	7	40.5	0.27	48.5	0.145	0.118
50	40	7	40.5	0.27	48.5	0.133	0.118
51	30	4	60	0.14	25	0.103	0.100
52	40	5	40.5	0.27	48.5	0.209	0.194
53	50	6	60	0.4	72	0.280	0.302
54	20	5	40.5	0.27	48.5	0.075	0.103
55	50	4	60	0.14	72	0.270	0.299
56	40	5	40.5	0.27	1.5	0.011	0.051
57	40	5	40.5	0.27	48.5	0.221	0.194
58	40	5	40.5	0.01	48.5	0.149	0.177

^a Segundo a equação ajustada para a resposta (relação de massa de glucose produzida em função da massa seca de esteva pré-tratada): $R = -0.6308 + 0.0045 * \text{Temperatura} + 0.1478 * \text{pH} + 0.0041 * \text{Concentração de celulasas} + 0.0639 * \text{Concentração de PEG 4000} + 0.0038 * \text{Tempo} - 0.0154 * \text{pH}^2 - 2.5 \times 10^{-5} * \text{concentração de Celulasas}^2 - 1.5 \times 10^{-5} * \text{Tempo}^2$

Tabela 5.13 – Quadro ANOVA para a resposta relativa à esteva pré-tratada

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p Prob>F
Modelo	0,344675	8	0,043084	58,36652	< 0.0001
A-T	0,098555	1	0,098555	133,5122	< 0.0001
B-pH	0,002147	1	0,002147	2,908122	0.0945
C-Concentração de Celulases	0,082254	1	0,082254	111,429	< 0.0001
D-Concentração de PEG 4000	0,003317	1	0,003317	4,493123	0.0391
E-Tempo	0,141593	1	0,141593	191,8159	< 0.0001
B ²	0,012844	1	0,012844	17,3998	0.0001
C ²	0,004678	1	0,004678	6,337659	0.0151
E ²	0,003729	1	0,003729	5,051061	0.0291
Residual	0,03617	49	0,000738		
Falta de ajuste	0,032377	18	0,001799	14,69957	< 0.0001
Erro	0,003793	31	0,000122		
Total	0,380846	57			

R²=0.9050

O modelo polinomial apresentado para a relação de massa de glucose produzida em função da massa seca de esteva pré-tratada apresenta significado para um nível de significância de 0.01%, com um coeficiente de correlação de 0.9050. Os termos A, C, D, E, B², C² e E² apresentam significado para um nível de significância de 5%. A falta de ajuste do modelo tem um valor de Prob>F menor que 0.0001 o que mostra que apresenta significado, o que significa que o modelo não ajustou. Apesar disso podemos recolher algumas observações relativas ao estudo que nos facilitem a selecção de parâmetros e novos factores a testar, nomeadamente a falta de interacção entre as variáveis, contrariamente ao referido na literatura [39].

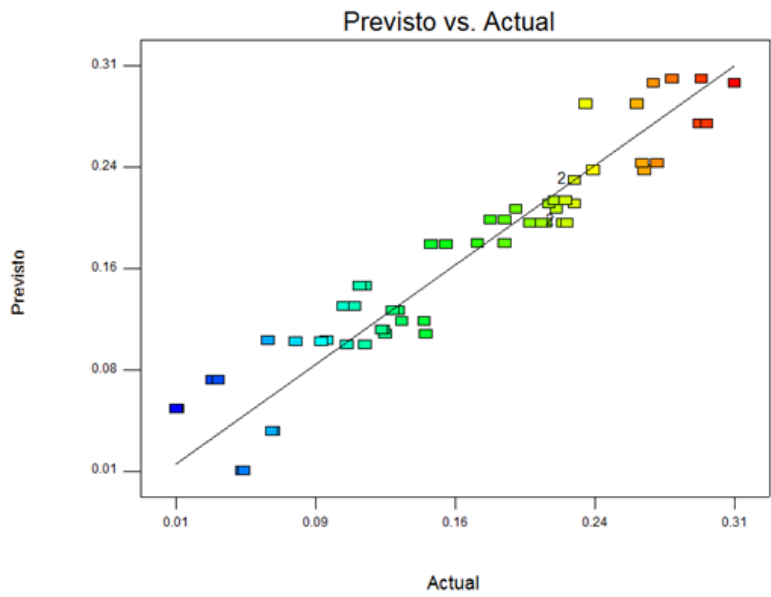


Figura 5.36 – Gráfico dos valores previstos versus os observados para o modelo para a esteva pré-tratada

Tal como observado pela figura 5.36 a dispersão dos pontos relativamente à linha de referência demonstra a fragilidade do modelo.

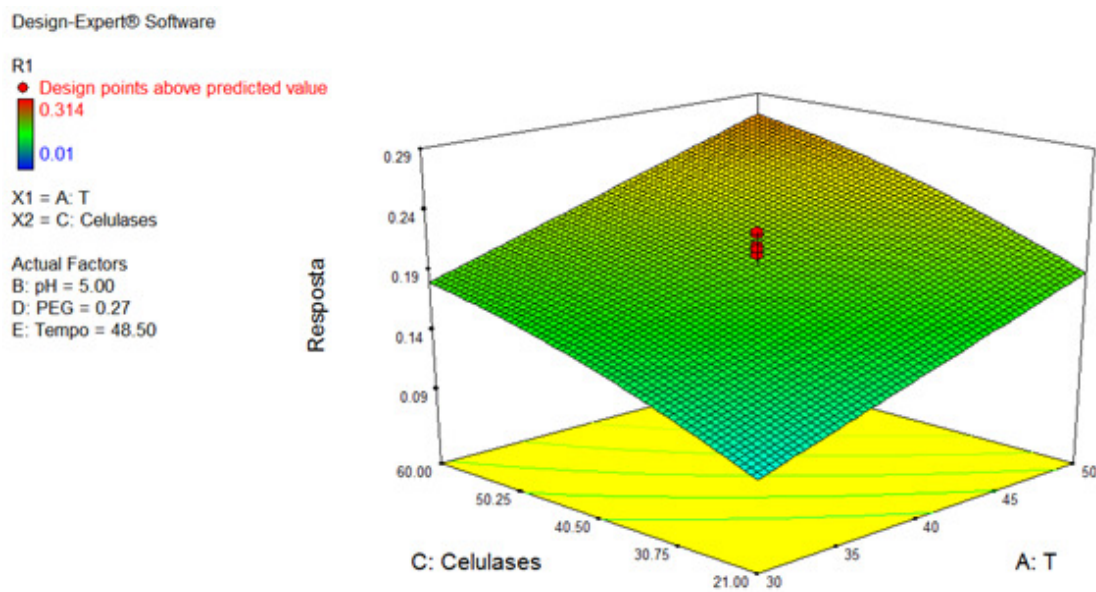


Figura 5.37 – Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e da temperatura, mantendo fixo o pH, a concentração de PEG 4000 e o tempo, para a esteva pré-tratada

Por observação da figura 5.37 verifica-se a acentuada influência da concentração de celulases e da temperatura sobre o valor da resposta, ocorrendo um aumento da libertação de glucose a partir da esteva pré-tratada com o aumento das duas variáveis, verificando-se um máximo da resposta para um nível superior (+1) da temperatura e da concentração de celulases.

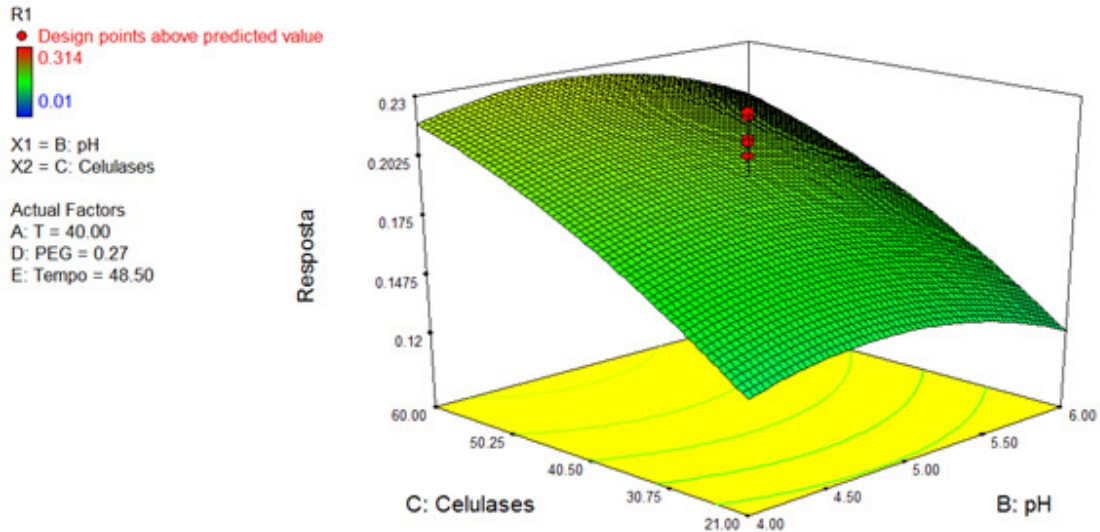


Figura 5.38– Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e do pH, mantendo fixos a temperatura, a concentração de PEG 4000 e o tempo, para a esteva pré-tratada

Na figura 5.38 pode observar-se a influência do pH e da concentração de enzimas, verificando-se que variando o pH do nível inferior (-1) para o superior (+1), verifica-se um aumento na relação de massa de glucose libertada em função da massa seca de giesta pré-tratada até valores de pH de aproximadamente 4.8, ocorrendo posteriormente uma diminuição até pH 6.

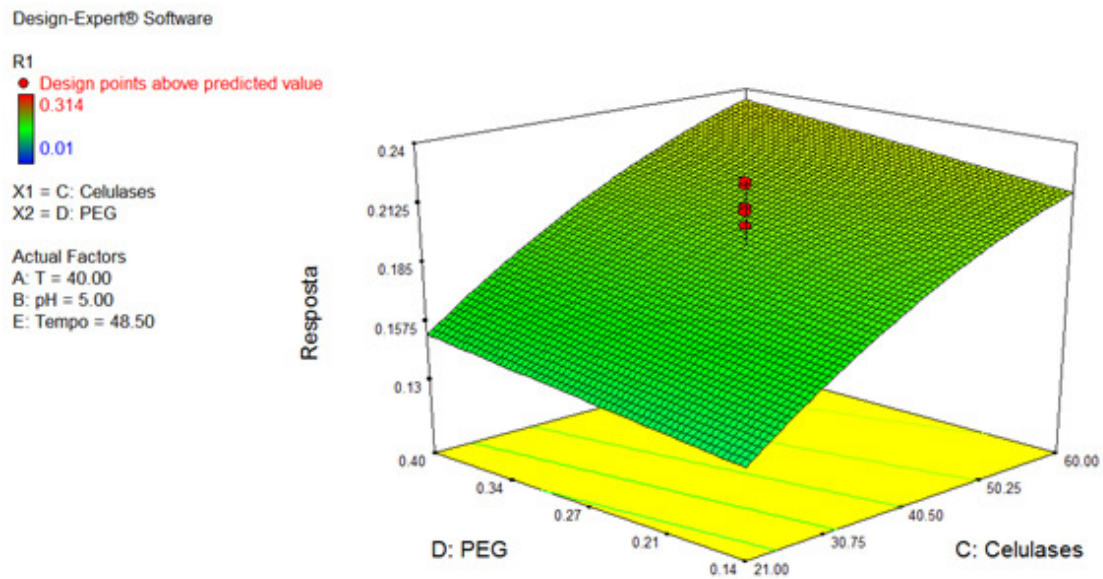


Figura 5.39 – Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e do PEG 4000, mantendo fixo a temperatura, o pH e o tempo, para a esteva pré-tratada

Na figura 5.39 pode verificar-se a influência da concentração de PEG 4000 e da concentração de celulases sobre a relação da massa de glucose libertada em função da massa seca de esteva, observando-se um aumento da resposta por aumento da concentração de PEG 4000, encontrando-se de acordo com a literatura [96], [97].

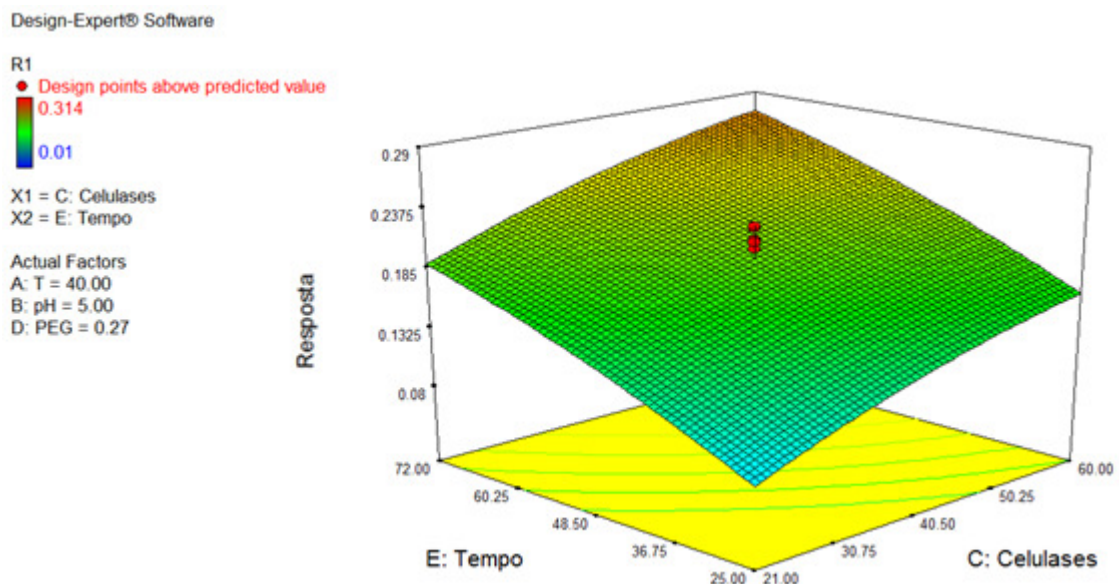


Figura 5.40 - Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e ao tempo, mantendo fixo a temperatura, o pH e a concentração de PEG 4000, para a esteva pré-tratada

Na figura 5.40 pode verificar-se a influência do tempo e da concentração de celulasas sobre a relação da massa de glucose libertada em função da massa seca de esteva, observando-se um aumento da resposta por aumento do tempo e da concentração de celulasas, assim pode considerar-se que as condições testadas e o tempo de incubação não foram suficientes para levar a uma inactivação drástica da actividade enzimática.

Na tabela 5.14 apresenta-se a matriz do desenho experimental e na tabela 5.15 podem analisar-se os dados correspondentes à análise da variância (ANOVA) para o modelo experimental correspondente aos ensaios da hidrólise enzimática de giesta pré-tratada.

Tabela 5.14 – Matriz do desenho experimental e respectivas respostas experimental e prevista para a hidrólise enzimática realizada com giesta pré-tratada

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Conc. celulasas (FPU/g peso seco)	Conc. PEG 4000 (g/g peso seco)	Tempo (h)	Resposta experimental	Resposta prevista ^a
1	30	6	60	0.14	72	0.200	0.223
2	30	4	21	0.4	25	0.081	0.048
3	30	6	60	0.4	25	0.108	0.105
4	50	6	21	0.14	72	0.200	0.237
5	30	6	60	0.14	72	0.163	0.223
6	40	5	40.5	0.27	95.5	0.382	0.315
7	40	5	40.5	0.27	48.5	0.288	0.272
8	50	6	21	0.4	25	0.122	0.119
9	40	5	40.5	0.27	1.5	0.016	0.079
10	30	4	60	0.14	25	0.155	0.168
11	50	4	60	0.14	72	0.238	0.420
12	40	5	79.5	0.27	48.5	0.371	0.318
13	40	5	40.5	0.53	48.5	0.261	0.272
14	40	5	1.5	0.27	48.5	0.028	0.078
15	30	4	21	0.4	25	0.075	0.048
16	50	4	60	0.4	25	0.343	0.302
17	40	5	40.5	0.27	48.5	0.306	0.272
18	40	3	40.5	0.27	48.5	0.172	0.207
19	40	5	40.5	0.27	48.5	0.266	0.272
20	50	4	21	0.14	25	0.183	0.182
21	40	5	40.5	0.01	48.5	0.276	0.272
22	50	4	21	0.4	72	0.378	0.300
23	30	6	60	0.4	25	0.104	0.105
24	30	6	21	0.14	25	0.040	-0.015
25	30	4	60	0.4	72	0.299	0.287

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Conc. celulasas (FPU/g peso seco)	Conc. PEG 4000 (g/g peso seco)	Tempo (h)	Resposta experimental	Resposta prevista ^a
26	50	4	21	0.4	72	0.321	0.300
27	50	6	60	0.14	25	0.214	0.239
28	40	5	40.5	0.27	95.5	0.387	0.315
29	50	6	60	0.4	72	0.334	0.357
30	50	6	60	0.14	25	0.220	0.239
31	30	4	21	0.14	72	0.181	0.167
32	40	5	40.5	0.27	48.5	0.294	0.272
33	20	5	40.5	0.27	48.5	0.104	0.139
34	40	5	79.5	0.27	48.5	0.375	0.318
35	30	6	21	0.4	72	0.058	0.103
36	50	4	21	0.14	25	0.207	0.182
37	50	6	21	0.4	25	0.128	0.119
38	40	3	40.5	0.27	48.5	0.169	0.207
39	50	4	60	0.4	25	0.339	0.302
40	30	4	60	0.4	72	0.297	0.287
41	30	6	21	0.14	25	0.049	-0.015
42	40	5	1.5	0.27	48.5	0.035	0.078
43	30	6	21	0.4	72	0.008	0.103
44	40	5	40.5	0.53	48.5	0.301	0.272
45	60	5	40.5	0.27	48.5	0.362	0.406
46	60	5	40.5	0.27	48.5	0.393	0.406
47	50	6	21	0.14	72	0.232	0.237
48	30	4	21	0.14	72	0.166	0.167
49	40	7	40.5	0.27	48.5	0.124	0.080
50	40	7	40.5	0.27	48.5	0.127	0.080
51	30	4	60	0.14	25	0.157	0.168
52	40	5	40.5	0.27	48.5	0.292	0.272
53	50	6	60	0.4	72	0.344	0.357
54	20	5	40.5	0.27	48.5	0.098	0.139
55	50	4	60	0.14	72	0.441	0.420
56	40	5	40.5	0.27	1.5	0.018	0.079
57	40	5	40.5	0.27	48.5	0.300	0.272
58	40	5	40.5	0.01	48.5	0.282	0.272

^a Segundo a equação ajustada para a resposta (relação de massa de glucose produzida em função da massa seca de esteva pré-tratada): $R = -1.0479 + 0.0067 * \text{Temperatura} + 0.2898 * \text{pH} + 0.0071 * \text{Concentração de celulasas} + 0.0058 * \text{Tempo} - 0.0321 * \text{pH}^2 - 4.9 \times 10^{-5} * \text{concentração de Celulasas}^2 - 3.4 \times 10^{-5} * \text{Tempo}^2$

Tabela 5.15 – Quadro ANOVA para a resposta relativa à giesta pré-tratada

Origem da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de P Prob>F
Modelo	0,674403	7	0,096343	41,76417	< 0.0001
A-Temperatura	0,214482	1	0,214482	92,97635	< 0.0001
B-pH	0,047944	1	0,047944	20,7832	< 0.0001
C- Concentração de Celulases	0,174364	1	0,174364	75,58545	< 0.0001
E-Tempo	0,163917	1	0,163917	71,05703	< 0.0001
B ²	0,055594	1	0,055594	24,0998	< 0.0001
C ²	0,018575	1	0,018575	8,051995	0.0065
E ²	0,019332	1	0,019332	8,38034	0.0056
Residual	0,115342	50	0,002307		
Falta de Ajuste	0,087773	19	0,00462	5,194496	< 0.0001
Erro	0,027569	31	0,000889		
Total	0,789745	57			

$R^2=0.8540$

O modelo polinomial apresentado para a relação de massa de glucose produzida em função da massa seca de esteva pré-tratada apresenta significado para um nível de significância de 0.01%, com um coeficiente de correlação de 0.8540. Os termos A, B, C, E, B², C² e E² apresentam significado para um nível de significância de 5%. A falta de ajuste do modelo tem um valor de Prob>F menor que 0.0001 o que mostra que apresenta significado, o que significa que o modelo não ajustou. Apesar disso podem-se recolher algumas observações relativas ao estudo que nos facilitem a selecção de parâmetros e novos factores a testar, nomeadamente a falta de interacção entre as variáveis, contrariamente ao referido na literatura [39].

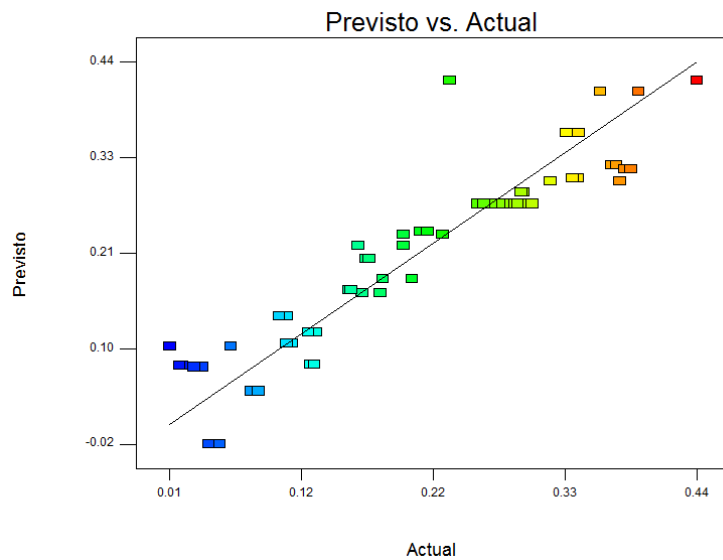


Figura 5.41 – Gráfico dos valores previstos versus os observados para o modelo para a giesta pré-tratada

Tal como observado pela figura 5.41 a dispersão dos pontos relativamente à linha de referência demonstra a fragilidade do modelo.

Design-Expert® Software

R1

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

0.441

0.008

X1 = A: T

X2 = C: Celulases

Actual Factors

B: pH = 5.00

D: PEG = 0.27

E: Tempo = 48.50

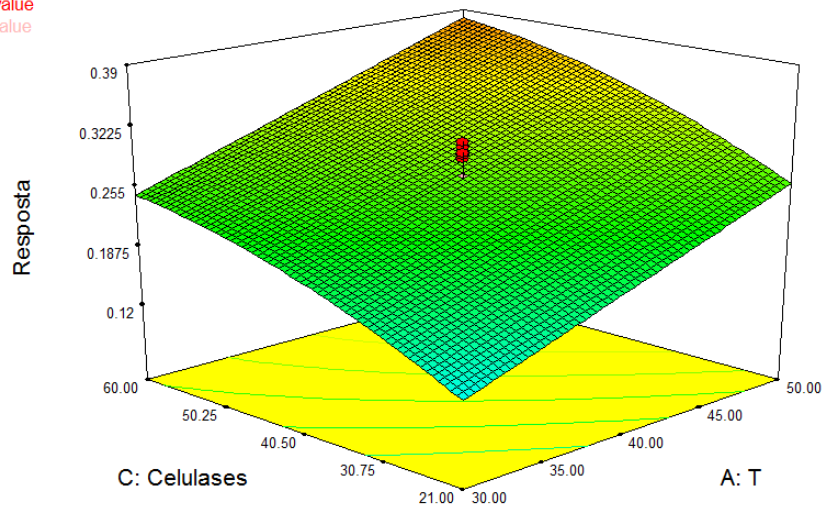


Figura 5.42 – Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e da temperatura, mantendo fixo o pH, a concentração de PEG 4000 e o tempo, para a giesta pré-tratada

Por observação da figura 5.42 verifica-se o mesmo comportamento que foi observado para a esteva pré-tratada, verificando-se um máximo da resposta para um nível superior (+1) da temperatura e da concentração de celulases. Se se considerar uma temperatura de 50°C,

verifica-se um aumento de cerca de 43% na resposta, passando de 21 para 60FPU/g massa seca de giesta pré-tratada em contraposição com os 35% obtidos para a esteva pré-tratada.

Design-Expert® Software

R1
0.441
0.008

X1 = B: pH
X2 = C: Celulases

Actual Factors
A: T = 40.00
D: PEG = 0.27
E: Tempo = 25.00

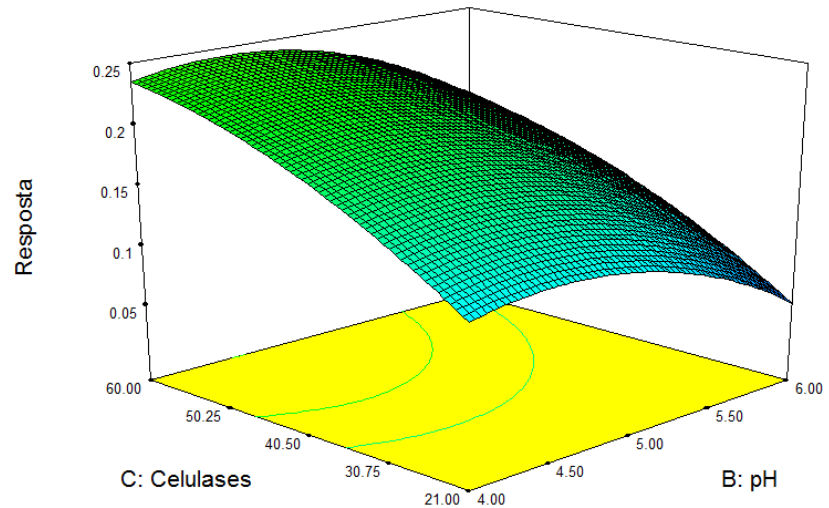


Figura 5.43– Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e do pH, mantendo fixos a temperatura, a concentração de PEG 4000 e o tempo, para a giesta pré-tratada

Na figura 5.43 pode observar-se a influência do pH e da concentração de enzimas, verificando-se uma variação similar à que se verificou para os ensaios com esteva pré-tratada, pois variando o pH do nível inferior (-1) para o superior (+1), observa-se um aumento na relação de massa de glucose libertada em função da massa seca de giesta pré-tratada até valores de pH de aproximadamente 4.5, ocorrendo posteriormente uma diminuição até pH 6.

R1
 0.441
 0.008

X1 = C: Celulases
 X2 = E: Tempo

Actual Factors
 A: T = 40.00
 B: pH = 4.00
 D: PEG = 0.27

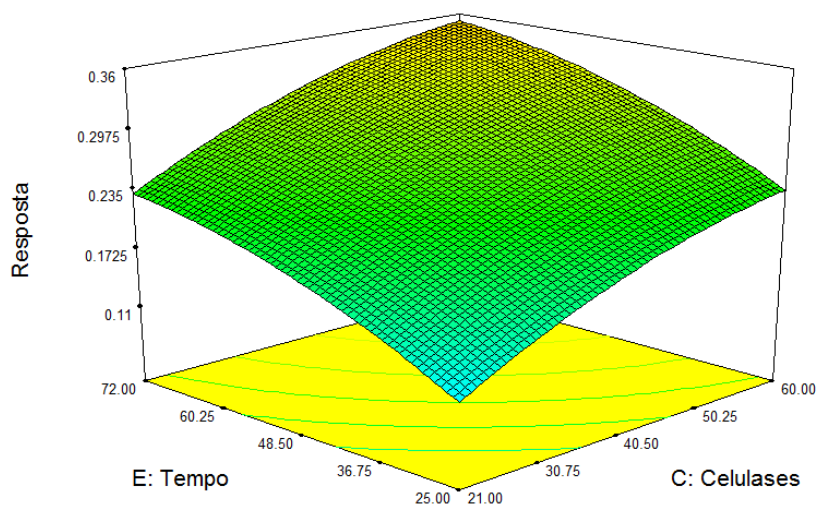


Figura 5.44– Representação gráfica da superfície de resposta para o modelo construído, relativa à concentração de celulases e do tempo, mantendo fixos a temperatura, o pH e a concentração de PEG 4000, para a giesta pré-tratada

Na figura 5.44 pode verificar-se a influência do tempo e da concentração de celulases sobre a relação da massa de glucose libertada em função da massa seca de giesta, idêntica à observada para a esteva pré-tratada.

È de salientar que a variável concentração de PEG 4000 foi removida do modelo polinomial por não apresentar significância.

5.2.4. CONCLUSÕES

De forma global, relativamente aos resultados obtidos neste capítulo, podem retirar-se algumas conclusões.

A avaliação preliminar das diferentes variáveis permitiu um conhecimento do comportamento da reacção de hidrólise enzimática perante a avaliação individual de cada parâmetro, permitindo definir os intervalos a estudar no desenho experimental de Plackett-Burman.

A metodologia factorial Plackett-Burman, permitiu a selecção dos factores mais importantes na hidrólise enzimática dos substratos pré-tratada, esteva e giesta, permitindo a sua aplicação num método de resposta de superfície utilizado para optimização de processos.

A aplicação das variáveis seleccionadas numa metodologia de resposta de superfície não permitiu o ajuste de um modelo estatístico ao processo, mas poderá ter dado algumas indicações acerca de alterações passíveis de serem efectuadas em novos ensaios,

nomeadamente a eliminação da variável concentração de PEG 4000 dos ensaios de hidrólise enzimática com giesta pré-tratada.

A utilização de diferentes substratos mostrou um comportamento semelhante, quando se aplicou a metodologia de resposta de superfície, para os parâmetros pH, temperatura, concentração de celulasas e tempo, no entanto, a concentração de PEG 4000, não se mostrou estatisticamente significativa para a aplicação em giesta pré-tratada quando em comparação com a esteva. Este facto pode ser justificado pela diferença do teor em lenhina dos dois substratos, isto tomando em consideração que a diminuição da ligação inespecífica das celulasas à lenhina por adição de PEG está descrita como sendo devida a uma ligação do polímero à lenhina e diminuição dos locais disponíveis e acessibilidade das enzimas [96], [97].

CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os estudos realizados ao longo deste trabalho permitiram aprofundar conhecimentos relativos a algumas das etapas envolvidas no processo de produção de etanol a partir de biomassa lenhocelulósica, nomeadamente a produção de celulasas e a hidrólise enzimática.

Em primeiro lugar estudou-se a influência da adição de sistemas tamponados ao meio de cultura usado em *Trichoderma reesei* Rut C30 para produção de celulasas, tal como, a sua influência na morfologia do fungo e produção enzimática. Neste passo foram estudados parâmetros como pH, concentração do tampão e diferentes sistemas tamponados.

Os resultados deste estudo sugerem que a morfologia fúngica é significativamente dependente da adição de diferentes sistemas tamponados ao meio de cultura, verificando-se uma clara transição nas culturas de *Trichoderma reesei* Rut C30 de formas menos agregadas para formas em “pellet”, em função dos sistemas tamponados usados e das respectivas concentrações e pH. Tendo-se ainda verificado que o tipo de morfologia desenvolvida afectava a produção de celulasas.

A actividade enzimática mais elevada sobre papel de filtro foi obtida aquando da suplementação do meio de cultura com tampão succinato 100mM, pH 4.8, o que correspondeu à obtenção de uma morfologia dispersa.

A hidrólise enzimática é um processo complexo, influenciado por diversos parâmetros. O estudo dos parâmetros que influenciam a hidrólise enzimática, foi efectuado por realização de ensaios preliminares e através do método de desenho experimental de Plackett-Burman. Através dos ensaios preliminares, verificou-se que os seguintes factores afectavam a hidrólise da esteva pré-tratada: estado do substrato, pH, concentração de tampão, tempo de reacção, agitação, temperatura, concentração de celulasas e β -glucosidase (de forma mais reduzida), utilização de Tween 20 ou PEG 4000 e adição de outras enzimas como xilanases. A adição de Tween 20 ou PEG 4000 mostrou ser benéfica para redução ou eliminação da ligação irreversível das celulasas à lenhina e consequente inibição enzimática, sendo que o PEG 4000 aumenta a relação da massa de glucose produzida em função da massa seca de substrato em cerca de duas vezes quando se adicionam concentrações superiores a 0.1g/g de peso seco ao meio reaccional. Os resultados obtidos com o PEG são superiores aos obtido com Tween 20.

Para o mesmo substrato quando se aplica o método de Plackett-Burman existe alteração das variáveis que apresentam influência significativa sobre a relação de glucose produzida em função da massa seca. Comparando com a giesta pré-tratada, as variáveis que demonstraram influência sobre a resposta divergem das para a esteva, talvez pela variabilidade da composição existente entre os dois substratos.

Finalmente, a método “Central composite design” não permitiu a optimização e validação dos ensaios realizados devido à falta de ajuste do modelo, talvez por introdução de erros experimentais no decurso de uma catálise heterogénea e usando volumes muito pequenos.

Será importante como trabalho futuro estudar a possibilidade de aumento a escala da produção de celulasas e verificar se a influência dos sistemas tamponados ocorre somente em termos de manutenção de pH ou provoca alterações em termos de produção.

Em termos da otimização do processo de hidrólise, se se considerar que o método “Central composite design” é um método considerado preciso, deverá ver-se como uma hipótese de trabalho futuro a sua nova aplicação em condições experimentais diferentes. Poderá ainda ser importante a utilização de uma outra resposta para verificação do ajuste do modelo, por exemplo a determinação dos açúcares redutores, que por comparação com a concentração de glucose, poderá indicar a existência de inibição pelo produto na reacção

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hahn-Hagerdal, B., M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Liden, and G. Zacchi, *Bioethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today*. Trends Biotechnol, 2006. 24(12): p. 549-56.
2. Zaldivar, J., J. Nielsen, and L. Olsson, *Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration*. Appl Microbiol Biotechnol, 2001. 56(1-2): p. 17-34.
3. Rass-Hansen, J., H. Falsig, B. Jorgensen, and C. H. Christensen, *Bioethanol: fuel or feedstock?* Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2007. 82(4): p. 329-333.
4. Wigley, T.M., *The climate change commitment*. Science, 2005. 307(5716): p. 1766-9.
5. Galbe, M. and G. Zacchi, *A review of the production of ethanol from softwood*. Appl Microbiol Biotechnol, 2002. 59(6): p. 618-28.
6. Lin, Y. and S. Tanaka, *Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006. 69(6): p. 627-42.
7. Hamelinck, C.N., G. van Hooijdonk, and A.P. Faaij, *Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term*. Biomass & Bioenergy, 2005. 28: p. 384-410.
8. Directiva 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 8 de Maio de 2003.
9. Decreto-Lei n.º 62/2006 do Ministério da Economia e Inovação de 21 de Março de 2006.
10. Farrell, A.E., R. J. Plevin, B. T. Turner, A. D. Jones, M. O'Hare, D. M. Kammen, *Ethanol can contribute to energy and environmental goals*. Science, 2006. 311(5760): p. 506-8.
11. Saez, J.C., D. J Schell, A. Tholudur, J. Farmer, J. Hamilton, J. A. Colucci, and J. D. McMillan, *Carbon mass balance evaluation of cellulase production on soluble and insoluble substrates*. Biotechnol Prog, 2002. 18(6): p. 1400-7.
12. Cardona, C.A. and O.J. Sanchez, *Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities*. Bioresour Technol, 2007. 98(12): p. 2415-57.
13. Lynd, L.R., *Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy*. Annual Review of Energy and the Environment, 1996. 21: p. 403-465.
14. Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple, and M. Ladisch, *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*. Bioresour Technol, 2005. 96(6): p. 673-86.
15. Sun, Y. and J. Cheng, *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Bioresour Technol, 2002. 83(1): p. 1-11.
16. Duff, S.J.B. and W.D. Murray, *Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review*. Bioresource Technology, 1996. 55(1): p. 1-33.
17. Dien, B.S., M.A. Cotta, and T.W. Jeffries, *Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status*. Appl Microbiol Biotechnol, 2003. 63(3): p. 258-66.
18. Jeffries, T.W. and Y.S. Jin, *Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts*. Appl Microbiol Biotechnol, 2004. 63(5): p. 495-509.

19. Gray, K.A., L. Zhao, and M. Emptage, *Bioethanol*. *Curr Opin Chem Biol*, 2006. 10(2): p. 141-6.
20. Mussatto, S.I. and I.C. Roberto, *Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review*. *Bioresour Technol*, 2004. 93(1): p. 1-10.
21. Palmqvist, E. and B. Hahn-Hagerdal, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification*. *Bioresource Technology*, 2000. 74(1): p. 17-24.
22. Palmqvist, E. and B. Hahn-Hagerdal, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition*. *Bioresource Technology*, 2000. 74(1): p. 25-33.
23. Klinke, H.B., A.B. Thomsen, and B.K. Ahring, *Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004. 66(1): p. 10-26.
24. Taherzadeh, M.J. and K. Karimi, *Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review*. *BioResources*, 2007. 2(4): p. 707-738.
25. Sanchez, O.J. and C.A. Cardona, *Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks*. *Bioresour Technol*, 2007.
26. Lynd, L.R., van Zyl, W. H., McBride, J. E., and Laser, M., *Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update*. *Curr Opin Biotechnol*, 2005. 16(5): p. 577-83.
27. Zhang, Y.H.P. and L.R. Lynd, *Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004. 88(7): p. 797-824.
28. Pauly, M. and K. Keegstra, *Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels*. *Plant J*, 2008. 54(4): p. 559-68.
29. Rowell, R.M., Pettersen, R., Han, J. S., Rowell, J. S., Tshabalala, M. A., "Cell Wall Chemistry" em Rowell, R. M. "Handbook of wood chemistry and wood composites". 2005: Taylor & Francis.
30. Perez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T., and Martinez, J., *Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview*. *Int Microbiol*, 2002. 5(2): p. 53-63.
31. Lynd, L.R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., and Pretorius, I. S., , *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002. 66(3): p. 506-77, table of contents.
32. Tengerdy, R.P. and G. Szakacs, *Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation*. *Biochemical Engineering Journal*, 2003. 13(2-3): p. 169-179.
33. Doran-Peterson, J., D.M. Cook, and S.K. Brandon, *Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol*. *Plant J*, 2008. 54(4): p. 582-92.
34. Saha, B.C., *Hemicellulose bioconversion*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003. 30(5): p. 279-91.
35. Kumar, R., S. Singh, and O.V. Singh, *Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008.

36. Percival Zhang, Y.H., M.E. Himmel, and J.R. Mielenz, *Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies*. Biotechnol Adv, 2006. 24(5): p. 452-81.
37. Cherry, J.R. and A.L. Fidantsef, *Directed evolution of industrial enzymes: an update*. Current Opinion in Biotechnology, 2003. 14(4): p. 438-443.
38. Kirk, O., T.V. Borchert, and C.C. Fuglsang, *Industrial enzyme applications*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. 13(4): p. 345-351.
39. Tengborg, C., M. Galbe, and G. Zacchi, *Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood*. Biotechnol Prog, 2001. 17(1): p. 110-7.
40. Viikari, L., Alapuranen, M., Puranen, T., Vehmaanpera, J., and Siika-Aho, M., *Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2007. 108: p. 121-45.
41. Xiong, H.R., von Weymarn, N., Leisola, M., and Turunen, O., *Influence of pH on the production of xylanases by Trichoderma reesei Rut C-30*. Process Biochemistry, 2004. 39(6): p. 729-733.
42. Juhasz, T., A. Egyhazi, and K. Reczey, *beta-Glucosidase production by Trichoderma reesei*. Appl Biochem Biotechnol, 2005. 121-124: p. 243-54.
43. Olsson, L., Christensen, T. M. I. E., Hansen, K. P., and Palmqvist, E. A., *Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by Trichoderma reesei Rut C-30*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. 33(5): p. 612-619.
44. Klyosov, A.A., *Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation*. Biochemistry, 1990. 29(47): p. 10577-85.
45. Henrissat, B., T.T. Teeri, and R.A.J. Warren, *A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants*. Febs Letters, 1998. 425(2): p. 352-354.
46. Nogawa, M., Goto, M., Okada, H., and Morikawa, Y., *L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus Trichoderma reesei*. Current Genetics, 2001. 38(6): p. 329-334.
47. Teeri, T.T., *Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases*. Trends in Biotechnology, 1997. 15(5): p. 160-167.
48. Barr, B.K., Hsieh, Y. L., Ganem, B., and Wilson, D. B., *Identification of two functionally different classes of exocellulases*. Biochemistry, 1996. 35(2): p. 586-592.
49. Withers, S.G., *Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases*. Carbohydrate Polymers, 2001. 44(4): p. 325-337.
50. Palonen, H., F.Tjernelid, G.Zacchi, and M.Tenkanen, *Adsorption of Trichoderma reesei CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin*. J Biotechnol, 2004. 107(1): p. 65-72.
51. Linder, M. and T.T. Teeri, *The roles and function of cellulose-binding domains*. Journal of Biotechnology, 1997. 57(1-3): p. 15-28.

52. Suurnakki, A., Tenkanen, M., Siika-Aho, M., Niku-Paavola, M. L., Viikari, L., and Buchert, J., *Trichoderma reesei cellulases and their core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp*. Cellulose, 2000. 7(2): p. 189-209.
53. Lee, J., *Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol*. J Biotechnol, 1997. 56(1): p. 1-24.
54. Spencer-Martins, I., I. Sá-Nogueira, "Biologia Microbiana" em *Biologia – Fundamentos e Aplicações*. 2003, Lisboa: Lidel –Edições Técnicas, Lda.
55. Domingues, F.C., *Produção e recuperação de celulases do Trichoderma reesei*. 2001, Tese de Dissertação de Doutoramento, Universidade da Beira Interior: Covilhã.
56. Buckland, B.C. and M.D. Lilly, "Fermentation – An Overview", em *Biotechnology*. 2nd ed. Vol. 3. 1993, Germany: H-J.Rhem and G.Reed.
57. Tortora, G., B. Funke, and C. Case, *Microbiology: An Introduction*. Sixth Edition ed. 1997, California: Addison Wesley Longman, Inc.
58. Prescott, L.M., J.P. Harley, and D.A. Klein, *Microbiology*. 4th edition ed. 1999, USA: WCB McGraw-Hill.
59. Papagianni, M., *Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes*. Biotechnol Adv, 2004. 22(3): p. 189-259.
60. Merivuori, H. and J.A. Sands, *Effects of alcohol and temperature on secretion by Trichoderma*, em *Trichoderma reesei cellulases – Biochemistry, Genetics, Physiology and Application, Proceedings of a Symposium held at the Technical University of Vienna from September 14 to 16, 1989*. 1990.
61. Sternberg, D., *Production of Cellulase by Trichoderma*. Biotechnology and Bioengineering, 1976(6): p. 35-53.
62. Kadam, K.L. and W.J. Keutzer, *Enhancement in Cellulase Production by Trichoderma-Reesei Rut-C30 Due to Citric-Acid*. Biotechnology Letters, 1995. 17(10): p. 1111-1114.
63. Juhasz, T., Szengyel, Z., Szijarto, N., and Reczey, K., *Effect of pH on cellulase production of Trichoderma reesei RUT C30*. Appl Biochem Biotechnol, 2004. 113-116: p. 201-11.
64. Gunjekar, T.P., S.B. Sawant, and J.B. Joshi, *Shear deactivation of cellulase, exoglucanase, endoglucanase, and beta-glucosidase in a mechanically agitated reactor*. Biotechnol Prog, 2001. 17(6): p. 1166-8.
65. Reczey, K., Szengyel, Z., Eklund, R., and Zacchi, G., *Cellulase production by T-reesei*. Bioresource Technology, 1996. 57(1): p. 25-30.
66. Liming, X. and S. Xueliang, *High-yield cellulase production by Trichoderma reesei ZU-02 on corn cob residue*. Bioresour Technol, 2004. 91(3): p. 259-62.
67. Wen, Z., W. Liao, and S. Chen, *Production of cellulase/beta-glucosidase by the mixed fungi culture of Trichoderma reesei and Aspergillus phoenicis on dairy manure*. Appl Biochem Biotechnol, 2005. 121-124: p. 93-104.
68. Wen, Z., W. Liao, and S. Chen, *Production of cellulase by Trichoderma reesei from dairy manure*. Bioresour Technol, 2005. 96(4): p. 491-9.

69. Bailey, M.J. and J. Tahtiharju, *Efficient cellulase production by Trichoderma reesei in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy*. Appl Microbiol Biotechnol, 2003. 62(2-3): p. 156-62.
70. Haapala, R., E.Parkkinen, P. Suominen, and S. Linko, *Production of endo-1,4-beta-glucanase and xylanase with nylon-web immobilized and free Trichoderma reesei*. Enzyme and Microbial Technology, 1996. 18(7): p. 495-501.
71. Reese, E. and A. Maguire, *Surfactants as Stimulants of Enzyme Production by Microorganisms*. APPLIED MICROBIOLOGY, 1969: p. 242-245.
72. Velkovska, S., M.R. Marten, and D.F. Ollis, *Kinetic model for batch cellulase production by Trichoderma reesei RUT c30*. J Biotechnol, 1997. 54(2): p. 83-94.
73. Domingues, F.C., J. A.Queiroz, J. M.Cabral, and L. P. Fonseca, *The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by Trichoderma reesei Rut C-30*. Enzyme Microb Technol, 2000. 26(5-6): p. 394-401.
74. Suto, M. and F. Tomita, *Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi*. J Biosci Bioeng, 2001. 92(4): p. 305-11.
75. Mandels, M., F.W. Parrish, and E.T. Reese, *Sophorose as an inducer of cellulase in Trichoderma viride*. J Bacteriol, 1962. 83: p. 400-8.
76. Kubicek, C.P., R. Messner, C. Fritscher; S. Strauss, E. M. Kubicek-Pranz, *Regulatory aspects of formation and secretion of cellulases by Trichoderma reesei*. Trichoderma reesei cellulases – Biochemistry, Genetics, Physiology and Application, Proceedings of a Symposium held at the Technical University of Vienna from September 14 to 16, 1989. 1990.
77. Bhat, M.K. and S. Bhat, *Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications*. Biotechnol Adv, 1997. 15(3-4): p. 583-620.
78. Li, Z.J., V. Shukla, A. P. Fordyce, A. G. Pedersen, K. S. Wenger, and M. R. Marten, *Fungal morphology and fragmentation behavior in a fed-batch Aspergillus oryzae fermentation at the production scale*. Biotechnol Bioeng, 2000. 70(3): p. 300-12.
79. Justen, P., G. C. Paul, A. W. Nienow, and C. R. Thomas, *Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity*. Biotechnology and Bioengineering, 1996. 52(6): p. 672-684.
80. Cui, Y.Q., J. N. W. Ouweland, R. G. J. M. van der Lans, M. L. F. Giuseppin, and K. C. A. M. Luyben, *Aspects of the use of complex media for submerged fermentation of Aspergillus awamori*. Enzyme and Microbial Technology, 1998. 23(1-2): p. 168-177.
81. Pazouki, M. and T. Panda, *Understanding the morphology of fungi*. Bioprocess Engineering, 2000. 22(2): p. 127-143.
82. Vechtlifshitz, S.E., S. Magdassi, and S. Braun, *Pellet Formation and Cellular Aggregation in Streptomyces-Tendae*. Biotechnology and Bioengineering, 1990. 35(9): p. 890-896.
83. Papagianni, M. and M. Mattey, *Morphological development of Aspergillus niger in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level*. Application

- of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology.* Microb Cell Fact, 2006. 5: p. 3.
84. Carlsen, M., A. B. Spohr, J. Nielsen, and J. Villadsen, *Morphology and physiology of an alpha Amylase producing strain of Aspergillus oryzae during batch cultivations.* Biotechnology and Bioengineering, 1996. 49(3): p. 266-276.
 85. Lecault, V., N. Patel, and J. Thibault, *Morphological characterization and viability assessment of Trichoderma reesei by image analysis.* Biotechnol Prog, 2007. 23(3): p. 734-40.
 86. Pan, X., D. Xie, N. Gilkes, D. J. Gregg, and J. N. Saddler, *Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content.* Appl Biochem Biotechnol, 2005. 121-124: p. 1069-79.
 87. vanWyk, J.P.H., *Cellulase adsorption-desorption and cellulose saccharification during enzymatic hydrolysis of cellulose materials.* Biotechnology Letters, 1997. 19(8): p. 775-778.
 88. Yang, B., D.M. Willies, and C.E. Wyman, *Changes in the enzymatic hydrolysis rate of Avicel cellulose with conversion.* Biotechnol Bioeng, 2006. 94(6): p. 1122-8.
 89. Singh, A., P.K.R. Kumar, and K. Schugerl, *Adsorption and Reuse of Cellulases during Saccharification of Cellulosic Materials.* Journal of Biotechnology, 1991. 18(3): p. 205-212.
 90. Zhu, L., J. P. O'Dwyer, V. S. Chang, C. B. Granda, and M. T. Holtzapple, *Structural features affecting biomass enzymatic digestibility.* Bioresour Technol, 2007.
 91. Mansfield, S.D., C. Mooney, and J.N. Saddler, *Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis.* Biotechnol Prog, 1999. 15(5): p. 804-816.
 92. Ohgren, K., R. Bura, J. Saddler, and G. Zacchi, *Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover.* Bioresour Technol, 2007. 98(13): p. 2503-10.
 93. Cullis, I.F., J.N. Saddler, and S.D. Mansfield, *Effect of initial moisture content and chip size on the bioconversion efficiency of softwood lignocellulosics.* Biotechnol Bioeng, 2004. 85(4): p. 413-21.
 94. Kaar, W.E. and M.T. Holtzapple, *Benefits from Tween during enzymic hydrolysis of corn stover.* Biotechnology and Bioengineering, 1998. 59(4): p. 419-427.
 95. Yang, B. and C.E. Wyman, *BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates.* Biotechnol Bioeng, 2006. 94(4): p. 611-7.
 96. Borjesson, J., R. Peterson, and F. Tjerneld, *Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition.* Enzyme and Microbial Technology, 2007. 40(4): p. 754-762.
 97. Borjesson, J., M. Engqvist, B. Sipos, and F. Tjerneld, *Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose.* Enzyme and Microbial Technology, 2007. 41(1-2): p. 186-195.

98. Miller, G.L., *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry, 1959. 31(3): p. 426-428.
99. Ghose, T.K., *Measurement of Cellulase Activities*. Pure and Applied Chemistry, 1987. 59(2): p. 257-268.
100. Haaland, P.D., *Experimental Design in Biotechnology*. Vol. 105. 1989, New York: Marcel Dekker, Inc.
101. Ahuja, S.K., G.M. Ferreira, and A.R. Moreira, *Application of Plackett-Burman design and response surface methodology to achieve exponential growth for aggregated shipworm bacterium*. Biotechnol Bioeng, 2004. 85(6): p. 666-75.
102. Domingues, F.C., J. A. Queiroz, J. M. S. Cabral, and L. P. Fonseca, *Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of Trichoderma reesei growing on soluble carbon source*. Biotechnology Letters, 2001. 23(10): p. 771-775.
103. Figueiredo, R., *Estudos de otimização da produção de celulases a partir do fungo Trichoderma reesei Rut C30*. 2004, Tese de Licenciatura, Universidade da Beira Interior: Covilhã.
104. Lejeune, R., J. Nielsen, and G.V. Baron, *Influence of Ph on the Morphology of Trichoderma-Reesei Qm-9414 in Submerged Culture*. Biotechnology Letters, 1995. 17(3): p. 341-344.
105. Tengborg, C., M. Galbe, and G. Zacchi, *Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood*. Enzyme Microb Technol, 2001. 28(9-10): p. 835-844.
106. Brown, L. and R. Torget, *Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Laboratory analytical procedure #009*. 1996: NREL.
107. Xiao, Z., R. Storms, and A. Tsang, *Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity*. Biotechnol Bioeng, 2004. 88(7): p. 832-7.
108. Kim, D.W. and Y.G. Hong, *Ionic strength effect on adsorption of cellobiohydrolases I and II on microcrystalline cellulose*. Biotechnology Letters, 2000. 22(16): p. 1337-1342.
109. Chen, M., J. Zhao, and L. Xia, *Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars*. Carbohydrate Polymers, 2007. 71(3): p. 411-415.
110. Xu, Z., Q. H. Wang, Z. H. Jiang, X. X. Yang, Y. Z. Ji, *Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw*. Biomass & Bioenergy, 2007. 31(2-3): p. 162-167.
111. Eriksson, T., J. Borjesson, and F. Tjerneld, *Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose*. Enzyme and Microbial Technology, 2002. 31(3): p. 353-364.
112. Berlin, A., V. Maximenko, N. Gilkes, J. Saddler, *Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis*. Biotechnol Bioeng, 2007. 97(2): p. 287-96.