

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO DA HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR POR FUNGOS FILAMENTOSOS**



MARINA PAGANINI MARQUES

**Dissertação de Mestrado
2010**

Araraquara - SP
2010

MARINA PAGANINI MARQUES

ESTUDO DA HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR POR FUNGOS
FILAMENTOSOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química-
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado

Araraquara
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

M357e	Marques, Marina Paganini Estudo da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar por fungos filamentosos / Marina Paganini Marques. – Araraquara : [s.n], 2010 77 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Sandra Regina Pombeiro Sponchiado 1. Biotecnologia. 2. Cana-de-açúcar – Bagaço. 3. Fungos filamentosos. I. Título.
-------	---

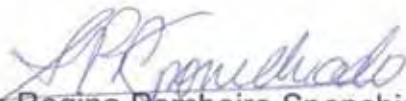
Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

MARINA PAGANINI MARQUES

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 30 de março de 2010.

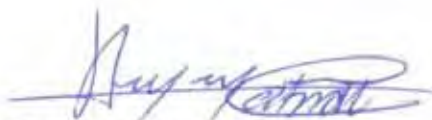
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Sandra Regina Pombeiro Sponchiado (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Rubens Monti
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Hamilton Cabral
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto

*Dedico este trabalho aos meus Pais e minha irmã Natália
pela força recebida nos momentos mais difíceis.
Ao meu cachorro Marley que me deixava extremamente
feliz mesmo quando estava desanimada.
Amar-vos-ei eternamente!*

AGRADECIMENTOS

Á Deus que me deu saúde e força para vencer mais esta etapa em minha vida possibilitando conhecer um dos lados mais maravilhoso do ser humano: o compartilhamento de conhecimento.

A Nossa Senhora de Fátima que intercedeu por mim para que eu estivesse aqui realizando este trabalho.

A Profa. Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado pela amizade, dedicação, carinho e principalmente paciência nesta etapa tão importante da minha vida.

A minha amiga Eliane que me incentivou a estar aqui.

Em especial as minhas amigas Fátima e Tais que além da amizade sempre me ajudaram durante os momentos mais difíceis.

Aos companheiros de laboratório Juliana, Carla, Tatiana, Gustavo, Tarcísio, Zilda por tudo que me ensinaram e me ajudaram.

A minha amiga Carol por estar ao meu lado sempre dando apoio.

Ao amigo Waldenir pela ajuda e principalmente pelos momentos de descontração.

Aos amigos que Deus colocou em minha vida desde sempre Thiago, Janaina, Tânia, Natália, Erika, Aline e Mariana.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

*“Tua caminhada ainda não terminou...
A realidade te acolhe dizendo que pela frente
o horizonte da vida necessita de tuas palavras
e do teu silêncio.*

*Não faças do amanhã o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.
Teus passos ficaram. Olhes para trás...
mas vá em frente pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te”.*

- Charles Chaplin -

RESUMO

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é o principal subproduto das indústrias de açúcar e álcool no Brasil e em função da sua abundância e baixo custo poderia ser usado para aumentar a produção de etanol, fornecendo vantagens econômicas e ambientais. A hidrólise enzimática é um caminho promissor para obter açúcares de BCA, mas a baixa acessibilidade enzimática da celulose nativa é a chave do problema neste processo. Por este motivo, o pré-tratamento da biomassa é exigido para remover a lignina e a hemicelulose. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos capazes de produzir grandes quantidades de enzimas celulolíticas utilizando o BCA como substrato com pré-tratamento térmico e termo-ácido. As espécies fúngicas selecionadas para este estudo foram: *Aspergillus nidulans* (mutante melanizado), *Trichophyton terrestre* e *Aspergillus niger*. Para o cultivo em estado sólido, o bagaço pré-tratado foi inoculado com micélios ou esporos dos fungos e incubados a temperatura ambiente durante 15, 30 e 60 dias. A eficácia da hidrólise microbiana foi avaliada em relação ao açúcar total (AT), ao açúcar redutor (AR), as concentrações de fenol (Fe) e a atividade das enzimas celulolíticas (celulase, avicelase e CMCase). Os resultados mostraram que a quantidade de AT, AR e Fe foi mais elevada quando os fungos foram crescidos sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido comparado ao BCA com pré-tratamento térmico. Dentre os fungos estudados, o filtrado da cultura do *A. niger* crescido sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido por 60 dias pode ser usado como o meio fermentativo para a produção de etanol devido a uma elevada concentração açúcar redutor (1,16% m/v ou 11,6 g.L⁻¹) e de baixas concentrações de fenol (0,003% m/v ou 0,03 g.L⁻¹). O nível o mais elevado de celulase, correspondendo a 0,74 UI.mL⁻¹, foi obtido na cultura de *A. nidulans* após 15 dias de crescimento. Para CMCase e avicelase, a atividade máxima foi obtida respectivamente pelos fungos *A. niger* (0,43 UI.mL⁻¹) e pelo *T. terrestre* (0,2 UI.mL⁻¹) após 60 dias de crescimento. Assim, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que é possível usar o BCA pré-tratado como substrato para a produção de enzimas celulolíticas a partir de fungos, com baixo custo, que seria economicamente viável a bioconversão de resíduos lignocelulósicos ao etanol.

Palavras-chave: Biotecnologia. Cana-de-açúcar – Bagaço. Fungos filamentosos.

ABSTRACT

The sugar bagasse cane (SCB) is the major by-product of the sugar and alcohol industries in Brazil and in function of its abundance and low cost could be used to increase ethanol production, providing economic and environmental advantages. Enzymatic hydrolysis is a promising way for obtaining sugars from SCB, but the low enzymatic accessibility of the native cellulose is a key problem in this processes. For this reason, the pretreatment of biomass is required to remove lignin and hemicellulose. The main objective of this work was to evaluate the biotechnological potential of filamentous fungi to produce large amounts of cellulolytic enzymes using thermal- and/or acid- pretreated SCB as substrate. The selected fungal species for this study were: *Aspergillus nidulans* (melanized mutant), *A. niger* and *Trichophyton terrestre*. For cultivation in solid state, the pretreated bagasse was inoculated with mycelia or spores of the fungi and incubate at room temperature during 15, 30 and 60 days. The effectiveness of the microbial hydrolysis was evaluated in terms of total sugar (TS), reducing sugar (RS) and phenol (Phe) concentrations and also activity of cellulolytic enzymes (cellulase, avicelase and CMCase). The results showed that the amount of TS, RS and Phe was higher when the fungi grown on acid- and thermal-pretreated SCB compared to thermal-pretreated SCB. Among fungi studied, the filtrate of *A. niger* culture grown on acid- and thermal-pretreated SCB for 60 days could be used as fermentative medium for production of ethanol due to presence of high concentration of reducing sugar (1,16% m/v or 11,6 g.L⁻¹) and low amounts of phenol (0,003% m/v or 0,03 g.L⁻¹). The highest level of cellulase, corresponding to 0,74 IU.mL⁻¹, was obtained in the *A. nidulans* culture after 15 days of growth. For CMCase and avicelase, the maximum activity was exhibited respectively by the fungi *A. niger* (0,43 IU.mL⁻¹) and *T. terrestre* (0,2 IU.mL⁻¹) after 60 days of growth. Thus, the results obtained in this work showed that it is possible to use pretreated SCB as substrate for the production of fungal cellulolytic enzymes with low cost, which would make economically feasible the bioconversion of lignocellulosic residues to ethanol.

Keywords: Biotechnology. Sugarcane - Bagasse. Filamentous fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Família de Novos Produtos derivados da cana de açúcar	21
Figura 2 -	Ilustração esquemática morfológica da célula, parede secundária e a relação da lignina, hemicelulose, e celulose na parede secundária da célula. Diâmetro da célula de aproximadamente 25 μm . S1-S3, paredes secundárias da célula; P, parede primária; M.L., lamela média	24
Figura 3 -	Esquema da associação celulose-hemicelulose-lignina na parede celular vegetal: (A) vista transversal e (B) vista longitudinal	24
Figura 4 -	Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular	25
Figura 5 -	Reações de hidrólise da celulose. R e R' são as semi-cadeias do polímero de celulose. A ligação em ziguezague representa a ligação β -D (1,4) glicosídica	26
Figura 6 -	Representação do hemiacetal (a) e do aldeído (b) do grupo terminal redutor. R é a semi-cadeia do polímero de celulose	26
Figura 7 -	Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos	29
Figura 8 -	Representação esquemática da hidrólise da celulose amorfa e cristalina, com as enzimas atuando de modo não complexado (A) e complexada (B). Os quadrados escuros representam as regiões terminais redutoras e os quadrados em brancos terminais não redutores. Celulose, enzimas e produtos hidrolisados, não estão em escala	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Curva padrão da antrona para determinação de Açúcar Total	40
Gráfico 2 -	Curva padrão da glicose para determinação de Açúcar Redutor	41
Gráfico 3 -	Curva padrão do fenol para determinação de compostos fenólicos	42
Gráfico 4 -	Quantidade de AT presente na cultura após crescimento dos fungos <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. pullulans</i> , <i>Penicillium sp.</i> e <i>T. terrestre</i> (inoculados por esporos ou micélios) sobre o BCA com pré-tratamento térmico e cultivados por 15 e 30 dias à temperatura ambiente	46
Gráfico 5 -	Quantidade de AR presente na cultura após crescimento dos fungos <i>A. niger</i> , <i>T. terrestre</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>Penicillium sp.</i> e <i>A. pullulans</i> (inoculados por esporos ou micélios) sobre o BCA com pré-tratamento térmico e cultivados por 15 e 30 dias à temperatura ambiente	47
Gráfico 6 -	Quantidade de Fenol presente na cultura após crescimento dos fungos <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. pullulans</i> , <i>Penicillium sp.</i> e <i>T. terrestre</i> (inoculados por esporos ou micélios) sobre o BCA com pré-tratamento térmico e cultivados por 15 e 30 dias à temperatura ambiente	49
Gráfico 7 -	Quantidade de AT presente na cultura após crescimento dos fungos <i>A. niger</i> , <i>T. terrestre</i> e <i>A. nidulans</i> (inoculados por esporos ou micélios) sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido e cultivados por 15, 30 e 60 dias à temperatura ambiente	52

Gráfico 8 -	Quantidade de AR presente na cultura após crescimento dos fungos <i>A. niger</i> , <i>T. terrestre</i> e <i>A. nidulans</i> (inoculados por esporos ou micélios) sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido e cultivados por 15, 30 e 60 dias à temperatura ambiente	54
Gráfico 9 -	Quantidade de Fenol presente na cultura após crescimento dos fungos <i>A. niger</i> , <i>T. terrestre</i> e <i>A. nidulans</i> (inoculados por esporos ou micélios) sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido e cultivados por 15, 30 e 60 dias à temperatura ambiente	56
Gráfico 10 -	Cinética das enzimas Celulase Total, CMCase e Avicelase após cultivo dos fungos <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> e <i>T. terrestre</i> por 15 dias sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido	58
Gráfico 11 -	Atividade da enzima Celulase Total produzida pelos fungos <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> e <i>T. terrestre</i> , quando inoculados com esporos ou micélios sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido e cultivados por 15, 30 e 60 dias à temperatura ambiente	59
Gráfico 12 -	Atividade da enzima CMCase produzida pelos fungos <i>A. niger</i> , <i>T. terrestre</i> e <i>A. nidulans</i> , quando inoculados com esporos ou micélios sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido e cultivados por 15, 30 e 60 dias à temperatura ambiente	60
Gráfico 13 -	Atividade da enzima Avicelase produzida pelos fungos <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> e <i>T. terrestre</i> , quando inoculados com esporos ou micélios sobre o BCA com pré-tratamento termico e termo-ácido e cultivados por 15, 30 e 60 dias à temperatura ambiente	62
Gráfico 14 -	Atividade das enzimas celulase, CMCase e avicelase da cultura do fungo <i>A. nidulans</i> , suplementado com solução de sais e tartarato de amônio	64

Gráfico 15 - Atividade das enzimas celulase, CMCase e avicelase da cultura do fungo *T. terrestre*, suplementado com solução de sais e tartarato de amônio **66**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos para hidrólise enzimática	31
Tabela 2 -	Avaliação do pré-tratamento termo-ácido do BCA em relação às concentrações de Açúcar Total, Açúcar Redutor e Fenol	50
Tabela 3 -	Atividade das enzimas celulase, CMCase e avicelase, após o cultivo dos fungos <i>A. nidulans</i> e <i>T. terrestre</i> sobre o BCA (com pré-tratamento térmico e termo-ácido) e com ou sem suplementação com solução de sais e fonte de nitrogênio	68

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A.nidulans</i> -	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. niger</i> -	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. pullulans</i> -	<i>Aspergillus pullulans</i>
AR -	Açúcar redutor
AT -	Açúcar total
BCA -	Bagaço de Cana-de-Açúcar
°C -	Graus Celsius
CMCase -	Carboximetilcelulase
CPT -	com pré-tratamento
DNS -	ácido 3,5-dinitrosalicílico
Fe -	Fenol
FPase -	<i>Filter Papers</i> (atividade enzimática da celulase)
FPU/g -	<i>Filter Papers Units</i> (atividade de celulases totais) por grama
FPU/mL -	<i>Filter Papers Units</i> (atividade de celulases totais) por mililitro
g/g -	gramas por gramas
g/L -	gramas por Litro
HCl -	Ácido Clorídrico
HMF -	Hidroximetilfurfural
H₃PO₄ -	Ácido fosfórico
hs -	Horas
INO -	Inositol
MEL1 -	Mutante Melanizado de <i>Aspergillus nidulans</i>
mg/L -	miligramas por litro
NaOH -	Hidróxido de Sódio
nº -	Número
rpm -	Rotações por minuto
SPT -	sem pré-tratamento
<i>T. terrestre</i> -	<i>Trichophyton terrestre</i>
U/g -	unidades por grama
U/mL -	unidades por mililitro
UI/mL -	unidades internacionais por mililitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1.	Bagaço de cana-de-açúcar	22
2.2.	Estrutura da parede celular vegetal	23
2.2.1.	Celulose	25
2.2.2.	Hemiceluloses	28
2.2.3.	Lignina	28
2.3.	Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	29
2.3.1.	Tipos de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	30
2.4.	Hidrólise enzimática da celulose	32
2.4.1.	Endoglicanases	33
2.4.2.	Exoglicanases	33
2.4.3.	β -glicosidades	33
2.5.	Celulases fúngicas	34
3.	OBJETIVOS	36
4.	MATERIAL E MÉTODO	37
4.1.	Micro-organismos	37
4.2.	Meios de cultura	37
4.3.	Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar: térmico e termo-ácido	38
4.4.	Cultivo dos fungos sobre o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado	39
4.5.	Cultivo dos fungos sobre o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado: efeito da suplementação do meio com solução de sais e fonte de nitrogênio	39
4.6.	Dosagem de açúcar total	40
4.7.	Dosagem de açúcar redutor	41
4.8.	Dosagem de fenol	42
4.9.	Determinação da enzima celulase total	43
4.10.	Determinação da enzima avicelase	43

4.11.	Determinação da enzima carboximetilcelulase (CMCase)	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1.	Avaliação da hidrólise do BCA (com pré-tratamento térmico) após cultivo dos fungos: quantificação de AT, AR e Fenol	45
5.2.	Pré-tratamento termo-ácido do bagaço de cana-de-açúcar	50
5.3.	Avaliação da hidrólise do BCA após cultivo dos fungos: efeito do pré-tratamento (térmico e termo-ácido)	51
5.3.1.	Quantificação de AT, AR e Fenol	51
5.3.2.	Determinação da atividade das enzimas celulase, CMCase e avicelase	57
5.3.3.	Determinação da atividade das enzimas celulolíticas após cultivo dos fungos sobre o BCA (com ou sem pré-tratamento ácido): efeito da suplementação do meio com fonte de nitrogênio	63
6.	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado uma potência mundial em produção agrícola, principalmente cana de açúcar, respondendo por mais de 50% da produção mundial de etanol. Neste sentido, o Brasil apresenta um potencial favorável à geração de biomassa, como o bagaço da cana de açúcar que juntamente com os subprodutos agroindustriais provenientes do processamento de grãos, poderia ser utilizado como matéria prima industrial para produção de açúcares solúveis e principalmente de etanol.

A indústria sucro-alcooleira vem realizando pesquisas para o aproveitamento de seus resíduos (vinhaça, melaço e o bagaço de cana) em diferentes áreas, pois os produtos de base biotecnológica possuem enorme potencial de crescimento da demanda devido principalmente a dois motivos fundamentais: alto custo dos processos de recuperação de produtos químicos com alto nível de toxicidade e as restrições de mercado a produtos que agredam o meio ambiente e o homem.

Em relação ao bagaço da cana, as suas principais aplicações são como fonte direta e indireta de produção de energia e/ou como insumo ou matéria-prima. No primeiro caso refere-se ao seu uso em caldeiras para a geração de calor e energia elétrica e também para a produção de etanol combustível. No segundo caso, o bagaço pode ser utilizado como fonte para obtenção de fibra para polpa de celulose, para fabricar componentes compensados, alimento animal, furfural e outros produtos químicos (Figura 1).

Neste sentido, o uso adequado do bagaço daria um enorme valor a este material, trazendo benefícios econômicos e ecológicos. Do ponto de vista econômico, ter-se-ia um aumento em cerca de duas vezes no rendimento de produção de etanol. Segundo estudos realizados pela Dedini S/A Indústrias de Base (Empresa situada em Piracicaba), 80 toneladas de cana limpa processada produzem cerca de 6.400 litros de bioetanol enquanto que 96 toneladas de cana integral (incluindo bagaço e palha) renderiam 12.050 litros de bioetanol (Seminário Internacional de Biocombustíveis, 2006). Por outro lado, também resolveria um problema ecológico, pois reduziria a poluição causada pela queima do bagaço na geração de energia e/ou evitaria o descarte deste material na natureza (KILICASLAN et al., 1999; NEUREITER et al., 2002).

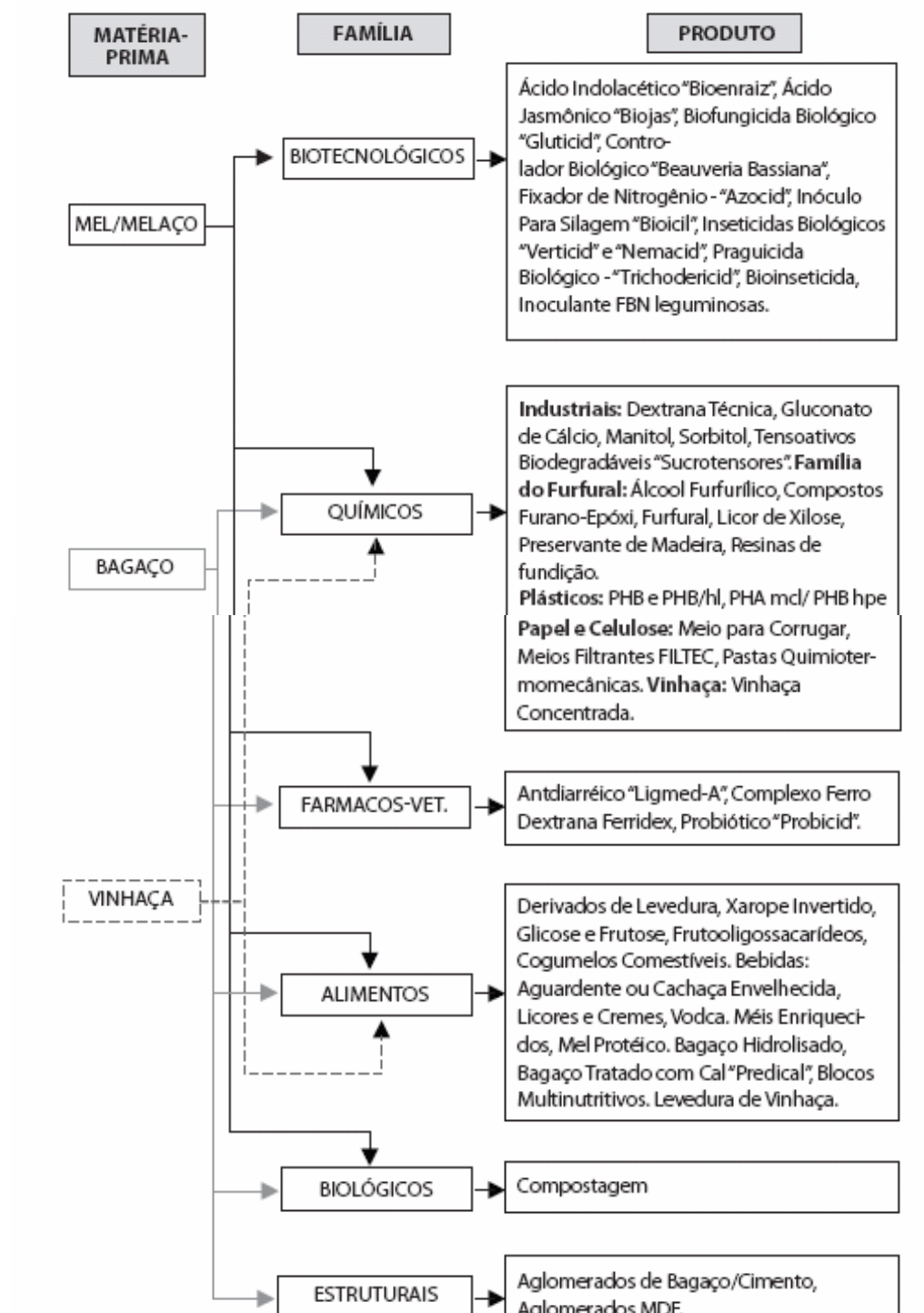


Figura 1 - Família de Novos Produtos derivados da cana de açúcar (Fonte: <http://www.iel.org.br/livro-cana>, 2005).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

No Brasil, a produção de etanol com a utilização da cana de açúcar como matéria prima teve início em 1975, com o programa nacional do álcool. A produção de cana-de-açúcar no ano de 2003 foi de $2,6 \times 10^8$ toneladas de cana-de-açúcar com 324 usinas que processam a matéria prima para produção de açúcar e álcool (BORRERO et al., 2003). Como resíduo, existe o bagaço de cana de açúcar, com sua origem após a extração por pressão do suco da cana-de-açúcar e geralmente queimado na própria linha de produção para a geração de energia elétrica ou para aquecimento da água. O Brasil produziu em torno de $4,36 \times 10^7$ toneladas de resíduo de cana-de-açúcar no biênio de 2005/2006 (GRAMINHA et al., 2007).

O bagaço de cana-de-açúcar tem na sua constituição aproximadamente 50% de celulose e o restante dividido igualmente entre lignina e hemicelulose e baixo teor de cinza na sua constituição (SOCCOL; VANDENBERGH, 2003). Com o objetivo de melhorar o rendimento do bagaço de cana-de-açúcar como substrato para o cultivo de fungos, a utilização de tratamentos químicos como ácido clorídrico tem sido utilizada (PANDEY et al., 2000).

A utilização do bagaço de cana-de-açúcar é efetuada tanto em cultivos em meio submerso ou em meio sólidos. Entre os metabólitos produzidos utilizando o bagaço como substrato estão as celulasas, lignases, xilanase, etanol, produção de aromas, ácido cítrico, dentre outros. Além disso, o bagaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado como suporte para o crescimento de micro-organismos, permitindo condições aeróbias homogêneas de crescimento (PANDEY et al., 2000).

2.2. ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR VEGETAL

A estrutura da parede celular vegetal é subdividida em parede primária (P), parede secundária (S1, S2 e S3) e parede terciária (T). Essas camadas (P, S1, S2, S3 e T) são compostas predominantemente por celulose com espessura da ordem de 5 μm e as células encontram-se separadas pela lamela média (LM), que é uma camada fina (máximo 1 μm de espessura), composta por elevada concentração de lignina. A parede primária (P) é a camada mais fina da parede celular e a primeira a ser depositada nas células (menor do que 0,1 μm de espessura) (FENGEL; WEGENER, 1989).

A celulose e as hemiceluloses predominam na região da parede celular enquanto que a lignina se distribui por toda a estrutura, apresentando máxima concentração na lamela média. A distribuição da celulose, hemicelulose e lignina varia consideravelmente entre essas camadas (FENGEL; WEGENER, 1989).

A Figura 2 mostra as várias camadas da parede celular e ilustra como a lignina envolve as células.

A Figura 3 apresenta o esquema da associação dos três principais componentes na parede celular vegetal: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose existe na forma de microfibrilas, e os microcapilares que circundam a armação da parede celular são preenchidos com hemicelulose e lignina. A Figura (A) mostra a vista transversal, isso ocorre quando a seção é perpendicular ao eixo longitudinal da fibra e a Figura (B) mostra a vista longitudinal em relação ao comprimento da fibra (FENGEL; WEGENER, 1989).

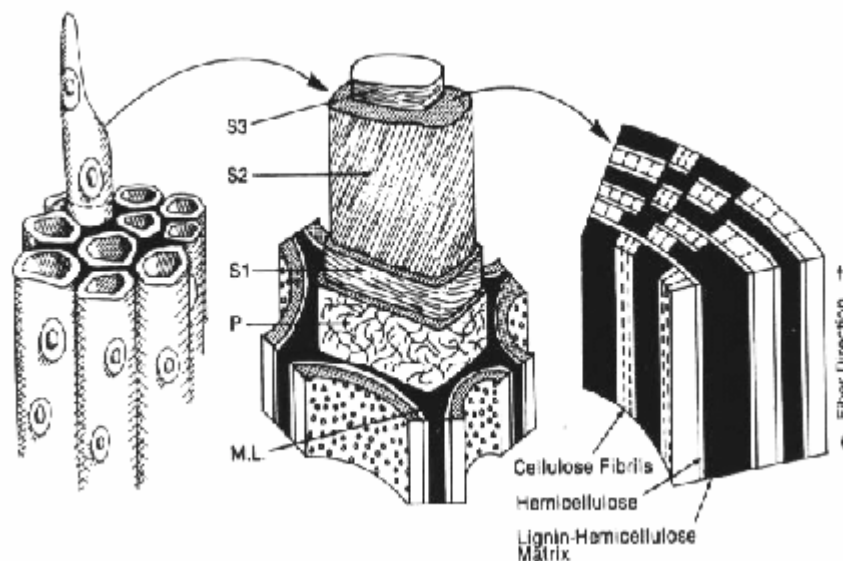


Figura 2: Ilustração esquemática morfológica da célula, parede secundária e a relação da lignina, hemicelulose, e celulose na parede secundária da célula. Diâmetro da célula de aproximadamente 25 μm . S1-S3, paredes secundárias da célula; P, parede primária; M.L., lamela média (KIRK; CULLEN, 1998).

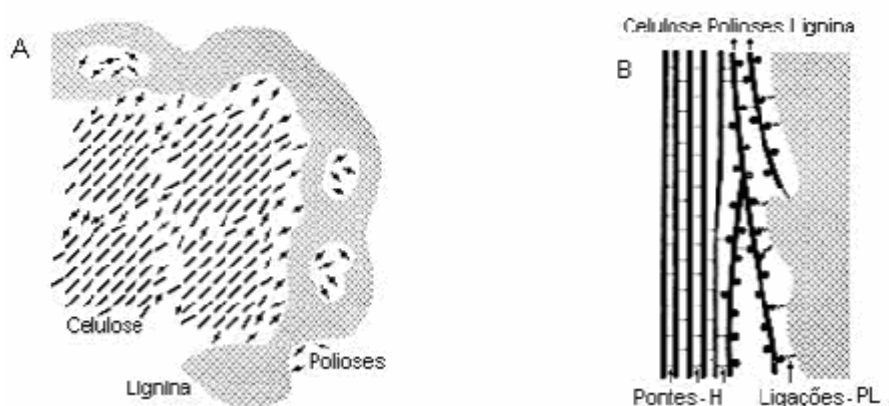


Figura 3: Esquema da associação celulose-hemicelulose-lignina na parede celular vegetal: (A) vista transversal e (B) vista longitudinal (FENGEL; WEGENER, 1989). Ligações-PL, ligações poliose – lignina.

A hemicelulose liga-se através de ligações de hidrogênio as microfibrilas da celulose, dando assim forma a uma rede que fornece a espinha dorsal estrutural da parede celular da planta. A presença da lignina em algumas paredes celulares dá uma força adicional, e fornece a resistência às pestes e às doenças. A celulose e a

hemicelulose são fontes potenciais de açúcares fermentescíveis (HINMAN *et al.*, 1989; HO *et al.*, 1998; TAHERZADEH *et al.*, 1999; SREENATH; JEFFRIES, 2000). A presença da lignina na parede celular, entretanto, impede a hidrólise enzimática dos carboidratos.

2.2.1. CELULOSE

A celulose, respondendo isoladamente por aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera, é a fonte mais abundante deste elemento base dos componentes orgânicos. Está presente em todas as plantas, desde árvores altamente desenvolvidas até em organismos mais primitivos e seu conteúdo nestas espécies varia de 20 a 99%. A estrutura física e morfológica nativa da celulose é complexa, e os detalhes da estrutura são dificilmente determinados experimentalmente (O'SULLIVAN, 1997). Este polímero natural é um homopolissacarídeo linear cuja unidade repetitiva é a celobiose ou anidroglicose sindiotática (Figura 4) que é formada por anéis de β -Dglicopiranosose unidas por ligações do tipo β -D (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, proporcionando assim um crescimento linear da cadeia macromolecular levando a uma elevada massa molecular, considerável grau de cristalinidade, insolubilidade em água e estrutura rígida.

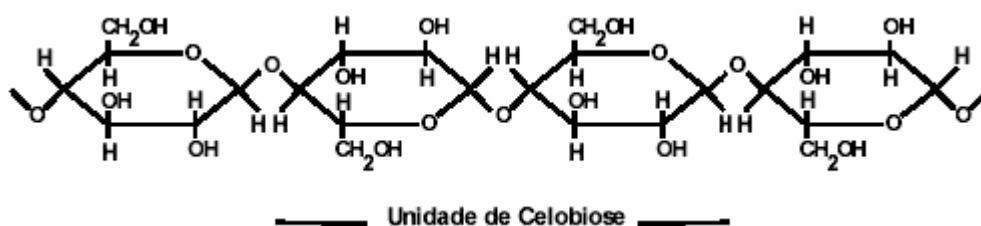


Figura 4: Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular (FENGEL; WEGENER, 1989).

O comprimento da cadeia varia entre 100 a 14000 resíduos conforme a origem da celulose. Da hidrólise da celulose obtêm-se polímeros menores, oligossacarídeos com cadeias terminais redutoras e não redutoras (Figura 5) que, após hidrólises mais extensas, decompõem-se dando origem a celobiose (dissacarídeo redutor) e a glicose.

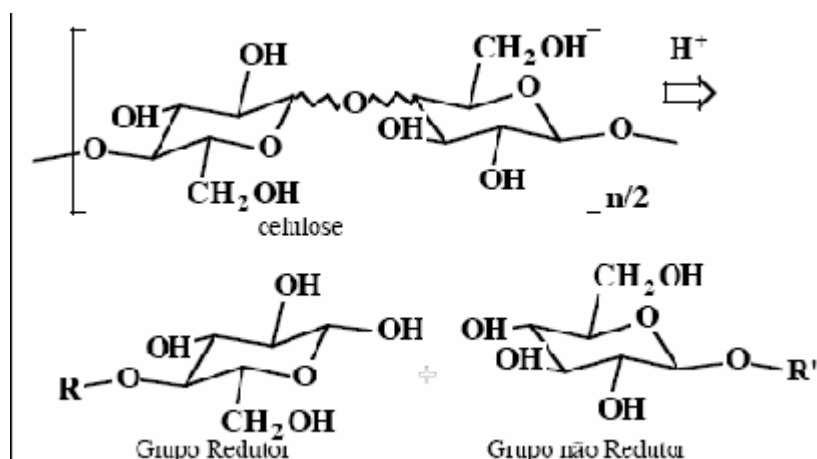


Figura 5: Reações de hidrólise da celulose. R e R' são as semicadeias do polímero de celulose. A ligação em zig-zag representa a ligação β -D (1,4) glicosídica.

A cada quebra da ligação β -D (1,4) glicosídica há a formação de uma cadeia redutora e outra não redutora. Apesar das duas extremidades da cadeia serem grupos hidroxílicos, o grupo C₁-OH terminal da cadeia redutora é um grupo aldeído hidratado, derivado da formação do anel piranose por ligação intramolecular hemiacetal (Figura 6). Este grupo tem poder redutor, ao contrário do grupo alcoólico C₄-OH terminal (grupo não redutor).

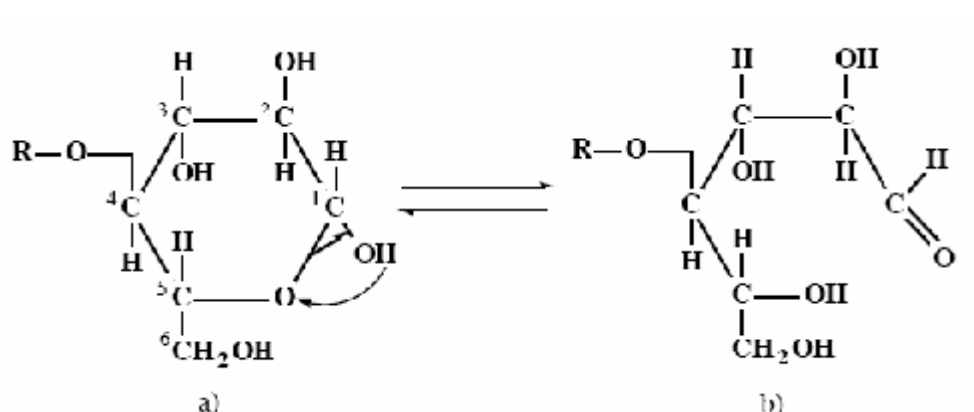


Figura 6: Representação do hemiacetal (a) e do aldeído (b) do grupo terminal redutor. R é a semi-cadeia do polímero de celulose.

Apesar da sua simplicidade química, a diversidade de origem e dos processamentos tecnológicos subsequentes a que a biomassa celulósica é sujeita conduz a uma complexa gama de formas físicas de celulose. A descrição destes substratos inclui propriedades como o tamanho, a forma, a porosidade, o grau de polimerização, a área superficial, a associação com compostos não celulósicos, a conformação molecular e cristalinidade, sendo todos eles relevantes para o processo de hidrólise (BEGUIN; AUBERT, 1994). As estruturas da celulose podem ser definidas em termos de três níveis organizacionais (ATALLA *et al.*, 1993).

O primeiro é definido pela sequência de ligações covalentes, correspondendo a um homopolímero de anidroglicose com ligações β -D (1,4).

O segundo nível descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, e é caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos, e pelas ligações de hidrogênio intramoleculares.

O terceiro nível define a associação das moléculas formando agregados com uma determinada estrutura cristalina. Muitos estudos sobre a hidrólise enzimática consideram a existência da celulose nativa em duas formas extremas: amorfa e cristalina. As duas formas ocorrem em proporções características em celulosas de diferentes origens, e o ataque enzimático pode ser preferencial num dos tipos de estrutura (GAMA, 1996). As moléculas de celulose tendem a formar ligações hidrogênio intramoleculares (entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes). O primeiro tipo de interação é responsável por certa rigidez das cadeias unitárias e o segundo pela formação da fibra vegetal (FENGEL; WEGENER, 1989). Devido às suas fortes ligações de hidrogênio, a celulose é praticamente insolúvel em água e em solventes orgânicos comuns (HON, 1996). As fibras de celulose, quando colocadas em contato com a água e certos solventes orgânicos, sofrem intumescimento.

A extensão do intumescimento da celulose pode ser intercristalino ou intracristalino. No primeiro caso o agente intumescedor penetra nas regiões desordenadas (amorfas) da microfibrila de celulose e nos espaços entre elas. O caso mais comum de intumescimento intercristalino é o inchamento da celulose em água. No segundo caso o agente intumescedor penetra nas regiões ordenadas (cristalinas) das microfibrilas. O intumescimento intracristalino pode ser efetuado pelo uso de soluções concentradas de ácidos e bases fortes e de soluções de alguns sais (D.ALMEIDA, 1988).

A principal vantagem da celulose quando comparada com derivados de petróleo, por exemplo, é sua grande disponibilidade, uma vez que ela provém de matéria-prima renovável.

2.2.2. HEMICELULOSES

As hemiceluloses, também chamada de polioses, estão intimamente associadas à celulose na parede da célula vegetal e são compostas por diferentes unidades de açúcares formando cadeias ramificadas (FENGEL; WEGENER, 1989). Estas diferentes unidades de açúcares são compostas por glicose, manose e galactose (hexoses) além da xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de vegetais. As hemiceluloses apresentam-se na forma de homopolímeros como, por exemplo, a xilana, formada por xiloses ou heteropolímeros como, por exemplo, a glico-manana formada por glicose e manose. As madeiras moles (coníferas) apresentam maior proporção de galactoglico-mananas do que de xilanas, enquanto as madeiras duras (folhosas) são ricas em xilanas. O teor de hemicelulose em diferentes tipos de vegetais é bastante variável, com um valor médio de 20%.

As hemiceluloses se encontram no bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 25 a 27% e quando sofrem hidrólise ácida podem ser decompostas em xilose, arabinose, ácido urônico e furfural (PATURAU, 1989). O principal açúcar encontrado nas hemiceluloses do bagaço é a xilose (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.2.3. LIGNINA

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos. É uma substância que vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa. A lignina representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico. O acoplamento das unidades fenilpropano não ocorre de forma regular e repetitiva, o que é atribuído ao mecanismo da biossíntese da lignina. Esta se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinâmílicos precursores:

álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.3. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar é relativamente resistente à hidrólise o que torna difícil a sua utilização como uma fonte de carboidrato para produtos químicos e combustíveis. A menos que um excesso muito grande de enzimas seja usado, a digestibilidade enzimática da celulose na biomassa nativa é baixa (< 20% de rendimento). A cristalinidade da celulose, área de superfície acessível, proteção da celulose pela lignina, o caráter heterogêneo das partículas da biomassa, e o fato da celulose estar revestida pela hemicelulose contribuem para a resistência da biomassa lignocelulósica a hidrólise (RYDHOLM, 1965; WENZEL, 1970; HSU *et al.*, 1980; HSU, 1996; CHANG; HOLTZAPPLE, 2000). Em vista disso, resíduos agrícolas requerem um pré-tratamento para aumentar a digestibilidade da biomassa e fazer com que a celulose torne-se mais acessível às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis (CHANG *et al.*, 1998). O objetivo do pré-tratamento é quebrar o elo da lignina e romper a estrutura cristalina da celulose (Figura 7) de modo que as enzimas hidrolíticas possam penetrar e causar a hidrólise.

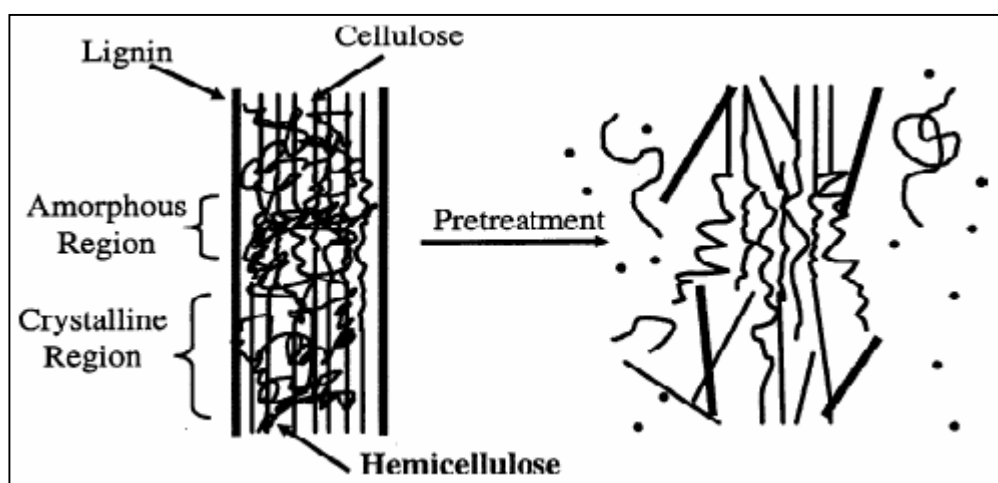


Figura 7: Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado por HSU *et al.*, 1980).

O pré-tratamento resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, realizada através da solubilização e/ou pela degradação parcial da hemicelulose e da lignina. Isto conduz ao fracionamento dos três componentes e leva à abertura da estrutura da celulose (PANDEY *et al.*, 2000).

Um pré-tratamento eficaz é caracterizado por diversos critérios: evitar a necessidade de reduzir o tamanho das partículas da biomassa, limitar a formação dos produtos da degradação que inibem o crescimento dos micro-organismos fermentativos, minimizar a demanda de energia (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1999). Estas propriedades, junto com outras, incluindo o baixo custo do reagente de pré-tratamento, a possibilidade de ser reciclável e a geração de co-produtos de alto valor agregado são uma base de comparação para as várias opções de pré-tratamento (LADISCH *et al.*, 1983, LYND *et al.*, 1996; DELGENES *et al.*, 1996; WYMAN, 1995b, 1999; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

O pré-tratamento tem sido visto como uma das etapas do processo mais caras na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis. Assim, a escolha do método é de fundamental importância para melhorar a eficiência e baixar o custo do processo de produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar (LEE *et al.*, 1994; LYND *et al.*; 1996; MOSIER *et al.*, 2003 a, b).

2.3.1 TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA

O pré-tratamento do bagaço de cana pode ser realizado por métodos físicos, químicos e biológicos (Tabela 1). A hidrólise ácida, usando ácidos diluídos como sulfúrico, hidrocloreto ou ácido acético e uma temperatura por volta de 100-150°C, é um dos métodos aplicados para obtenção de açúcares fermentáveis a partir do BCA. Durante os processos de hidrólise do BCA catalisada por ácidos, não somente se obtém os açúcares (xilose, glicose e arabinose), mas também uma série de produtos da decomposição da hemicelulose (tais como furfural e HMF) que podem atuar como inibidores potenciais da fermentação. Por este motivo, o hidrolisado obtido precisa ser processado antes de ser usado como meio de fermentação.

Tabela 1: Métodos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos para hidrólise enzimática (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996).

Métodos	Operações (fatores) que ocasionam mudança na estrutura do substrato	Tipo de mudança	Referências
Físico	Moagem e trituração (bola, energia vibratória, rolo duplo, pressão, martelo); radiação (raios de elétrons, raios γ , micro-ondas); altas temperaturas (pirólises, explosão a vapor).	Aumento da área superficial e tamanho dos poros da partícula, diminuição do grau de polimerização.	AZUMA <i>et al.</i> (1985), KOULLAS <i>et al.</i> (1992), RAMOS <i>et al.</i> (1993b).
Químico	Bases, ácidos, gases, agentes oxidantes e redutores, solventes orgânicos.	Deslignificação, diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose associada com o inchaço da amostra, aumento da porosidade.	FARID <i>et al.</i> (1983), SZCZODRAK <i>et al.</i> (1986), BES <i>et al.</i> (1989).
Biológico	Bolor branco (<i>Pleurotus</i> , <i>Pycnoporus</i> , <i>Ischnoderma</i> , <i>Phlebia</i> , etc.).	Deslignificação e redução do grau de polimerização da celulose e hemicelulose.	ROLZ <i>et al.</i> (1986), MES-HARTREE <i>et al.</i> (1987)

Em geral, os métodos utilizados visam aumentar a concentração de açúcares, detoxificar e neutralizar os ácidos provenientes do processo. A concentração do hidrolisado é feita por evaporação, pois, não só água, com também uma pequena quantidade de inibidores (tais como ácido acético, furfural e HMF) são removidos (CARVALHO *et al.*, 2002; MARTÍNEZ *et al.*, 2002). O método de destoxificação por absorção em carvão pode remover vários inibidores presentes no hidrolisado (GONG *et al.*, 1993; RODRIGUES *et al.*, 2003). No método de neutralização, é comum adicionar produtos químicos que neutralizam os ácidos dos hidrolisados formando sais, os quais podem ser retirados por filtração (ALVES *et al.*, 1998; ALVES *et al.*, 2002). Quando é usado H_3PO_4 , o sal formado, após a neutralização com NaOH, é o fosfato de sódio, o qual pode permanecer no hidrolisado para ser utilizado pelo micro-organismo (GAMÉZ *et al.*, 2006). Finalmente, os hidrolisados processados devem ser suplementados com outros nutrientes, como nitrogênio, minerais e vitaminas, para serem favoráveis à fermentação alcoólica. No entanto,

estes procedimentos tornam a hidrólise ácida um processo lento e com alto custo. Neste sentido, a hidrólise enzimática do material lignocelulósico mostra-se mais vantajosa, porque é conduzida em condições suaves (pH 4,8 e temperatura 45-50°C), não apresenta problemas de corrosão nos equipamentos e o rendimento de monossacarídeos (75 a 85%) é comparável aos da hidrólise ácida (50 a 70%) (DUFF e MURRAY, 1996).

Ao contrário dos catalisadores comuns, as enzimas apresentam uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, não requerendo assim métodos de detoxificação, bem como tratamento de efluentes, gerando assim um produto limpo com diminuição de custos (SEGEL, 1975).

2.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE

A ação da enzima para hidrólise efetiva da celulose nativa requer uma operação seqüencial das enzimas endoglucanases (antes denominadas C_x), exoglucanases (C_y) e celobiasas (β -glicosidase). A endoglucanase é uma endoenzima que rompe aleatoriamente a cadeia de celulose, por exemplo a carboximetilcelulase (CMCase). A enzima é capaz de quebrar a molécula de celulose no meio da cadeia para criar finais não redutores para subsequente ação da exoenzima. A exoglucanase é uma enzima que rompe as unidades a partir do final da cadeia, por exemplo, a Avicelase. Esta enzima é a principal responsável pela produção de celobiose a partir da celulose cristalina. A β -glicosidase é uma enzima específica para celobiose tendo como produto final a glicose. As enzimas endo e exoglucanases atuando juntas, podem solubilizar a celulose nativa em celobiose (duas moléculas de glicose), e este efeito é denominado sinergismo. Nenhuma das duas enzimas isoladamente são capazes de realizar a hidrólise (WOOD & McCRAE, 1994).

2.4.1. ENDOGLICANASES

Endo-1,4- β -D-glicana glicanohidrolase: São também conhecidas como endo- β -1,4 glicanases e carboximetilcelulases. Catalizam a hidrólise interna de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose aleatoriamente, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e consequentemente novas cadeias terminais. Seu substrato natural é a celulose e a xiloglicana. Atuam somente na porção amorfa da celulose, sendo que sua atividade diminui conforme o encurtamento da cadeia de celulose (BHAT; BHAT, 1997; LYND *et al.*, 2002; PERCIVAL ZHANG *et al.*, 2006).

2.4.2. EXOGLICANASES

Atuando de maneira progressiva, em porções redutoras e não redutoras das cadeias da celulose, podendo liberar tanto glicose (glicanohidrolases) ou celobiose (celobiohidrolases) como produtos principais. São capazes de atuar sobre a celulose microcristalina, encurtando as cadeias do polissacarídeo. Duas classificações são utilizadas para definir este tipo de atividade enzimática. As 1,4- β -D-glicana glicanohidrolase ou exo- β -glicosidase, são responsáveis pela remoção sucessiva de unidades de D-glicose em 1,4- β -D-glicanas. Já as 1-4- β -celobiohidrolase denominadas também por exoglicanase, catalisam a hidrólise das ligações β -1,4-D glicosídicas na celulose e celotetraose, liberando celobiose (BHAT; BHAT, 1997; LYND *et al.*, 2002). Possuem ação limitada sobre substratos como Carboximetilcelulose (CMC) e Hidroxietilcelulose (HEC) (SINGH; HAYASHI, 1995).

2.4.3. β -GLICOSIDASES

Necessárias para hidrolisar oligossacarídeo de cadeia curta e celobioses solúveis em glicose (BHAT; BHAT, 1997; LYND *et al.*, 2002). Perde sua atividade com o aumento da extensão da cadeia de celulose (SINGH; HAYASHI, 1995). Efetua a hidrólise de resíduos terminais de β -D-glicose em oligossacarídeos (BHAT; BHAT, 1997; LYND *et al.*, 2002).

2.5. CELULASES FÚNGICAS

Produzida por uma diversidade de micro-organismos em condições de anaerobiose e aerobiose e temperaturas, as celulases são fundamentais para a obtenção de açúcares a partir da celulose como fonte de carbono e importantíssimas para a reciclagem do elemento carbono na biosfera (SILVA & BRANDELLI, 2007).

A necessidade da degradação da celulose, presente na parede dos vegetais em condições naturais, faz com que os micro-organismos secretem enzimas com três formas de ação. O processo de clivagem das ligações β -1,4 da celulose é efetuado por enzimas celulásicas, atuando de modo complexado, denominado celulosomos, no caso de bactérias anaeróbias (DESVAUX, 2005) ou não complexada, no caso de fungos e também bactérias aeróbias (Figura 8) (LIND et al., 2002; BHAT; BHAT, 1997).

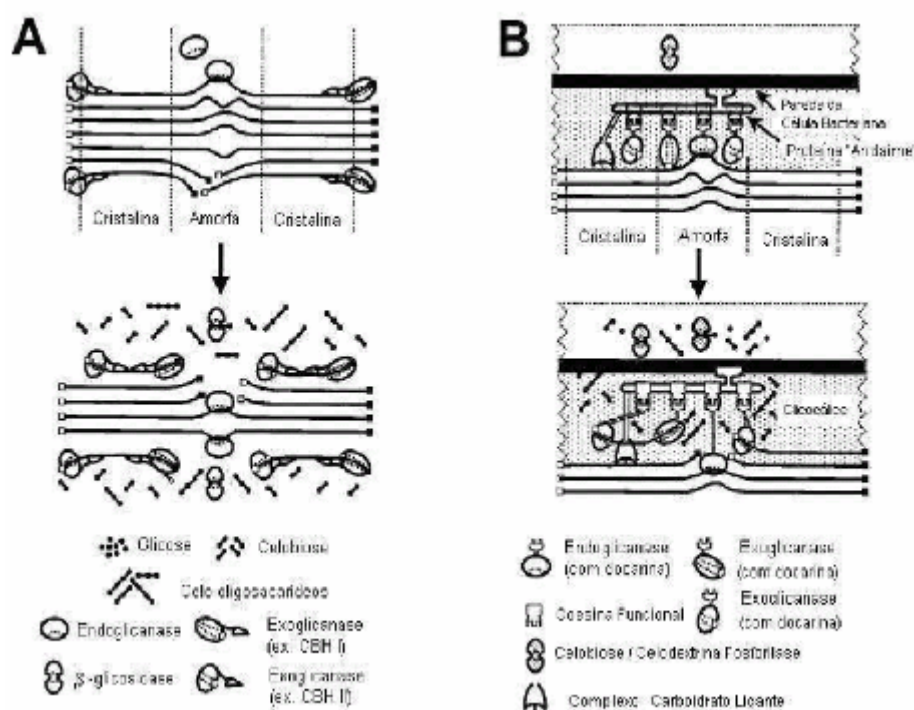


Figura 8: Representação esquemática da hidrólise da celulose amorfa e cristalina, com as enzimas atuando de modo não complexado (A) e complexado (B). Os quadrados escuros representam as regiões terminais redutoras e os quadrados em brancos terminais não redutores. Celulose, enzimas e produtos hidrolisados, não estão em escala (adaptado de LYND et al., 2002; SILVA & BRANDELLI 2007).

Vários estudos têm sido realizados para identificar micro-organismos capazes de produzir um complexo enzimático adequado para fazer a hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar.

O interesse nos fungos filamentosos se deve a sua capacidade de decompor diferentes substratos, que é explorada gerando produtos ou processos, como o isolamento de enzimas, a biodegradação de resíduos, fermentação em estado sólido de resíduos (GRIMM et al., 2005).

Os fungos mostram-se promissores como produtores de celulase e xilanase, destacando: *Trichoderma reesei* (também denominado *Trichoderma viride*), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum* (também denominado *Chrysosporium lignorum*), *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*, *Aspergillus* sp, *Schizophyllum* sp, *Chaetomium* sp (BISARIA; GHOSE, 1981) e *Humicola* sp (DA SILVA et al., 1994).

Fungos termófilos também estão sendo pesquisados, devido a sua capacidade de secretar enzimas que degradam a celulose em temperaturas mais elevadas e possuem melhor estabilidade térmica (MAHESHWARI et al., 2002).

Neste sentido, a exploração da diversidade microbiana em relação à capacidade de degradar resíduos agrícolas tem despertado interesse de várias pesquisas na área biotecnológica pelo fato que a produção de enzimas hemicelulolíticas pode variar em função da espécie de micro-organismo (http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/news-pes_ufrj070813.php).

Embora os micro-organismos tenham uma grande importância no meio ambiente, como componentes fundamentais das cadeias alimentares e dos ciclos biogeoquímicos e também em processos biotecnológicos, visando a obtenção de produtos de interesse industrial, como antibióticos (estreptomicina, penicilina), alimentos (queijo, iogurte, vinagre), bebidas (vinho, cerveja), ácidos orgânicos (cítrico e fumárico), álcoois (etanol) e enzimas (amilase, celulasas), estima-se que menos de 5% dos micro-organismos existentes na biosfera tenham sido caracterizados. Em relação aos fungos, considera-se que o número total de espécies descritas seja de 72.000, isto corresponderia aproximadamente a 10% do número estimado em cerca de 1.500.000 (COLWELL, 1997; BULL et al., 2000).

No entanto, as maiores das espécies conhecidas foram isoladas de habitats terrestres, sendo que menos de 500 espécies foram originadas de oceanos e estuários (PIVKIN, 2000). No Brasil, o ambiente marinho também tem sido pouco

explorado em relação a sua diversidade ecológica. Levando-se em conta a grande extensão da zona costeira brasileira, o número de fungos marinhos brasileiros reportados corresponde apenas 25% do número total do continente americano (BOOTH, 1979). Em razão disto, os fungos marinhos representam uma fonte inexplorada de organismos potencialmente importantes em processos biotecnológicos.

3. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico de algumas espécies de fungos isolados do litoral paulista, para hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar em relação a produção de enzimas celulolíticas e açúcares fermentáveis, visando a obtenção de etanol a partir de material lignocelulolítico. Para atingir tal objetivo, as etapas deste trabalho foram:

- 1) Selecionar espécies fúngicas capazes de hidrolisar o bagaço de cana de açúcar;
- 2) Avaliar o pré-tratamento térmico e termo-ácido do bagaço de cana-de-açúcar;
- 3) Avaliar a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar em relação à concentração de açúcares totais, redutores e fenol na cultura após crescimento dos fungos;
- 4) Quantificar enzimas celulolíticas (celulase, CMCase e avicelase) produzida pelos fungos após crescimento sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido;
- 5) Avaliar o efeito da suplementação de fonte de nitrogênio na atividade das enzimas celulolíticas produzidas após o crescimento dos fungos sobre o BCA com e sem pré-tratamento ácido.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. MICRO-ORGANISMOS

Os fungos utilizados no presente trabalho foram um mutante melanizado de *Aspergillus nidulans* (MEL 1), *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium sp.* e *Trichophyton terrestre* que estão estocados no laboratório de Fungos Filamentosos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química de Araraquara (UNESP). Para obtenção do inóculo (esporo ou micélio), os fungos foram crescidos em meio Sabouraud, por 7 dias à temperatura ambiente ou em Meio Mínimo durante 4 dias em estufa a 37°C, no caso do MEL1.

4.2. MEIOS DE CULTURA

O meio utilizado para o crescimento da linhagem do fungo *Aspergillus nidulans* MEL 1 foi o meio mínimo descrito por Cove (1966), com a seguinte composição:

Solução de Sais (descrita abaixo)..... 10 mL

Solução de Elementos Traços (descrita abaixo)..... 1 mL

Ágar.....15 g

Água Destilada até completar 1000 mL

Acertar o pH para 6,8

Após autoclavagem a 121,1 °C (1kgf/cm²) por 20 minutos, foram adicionados ao meio fontes de carbono (glicose 55 mM) e nitrogênio (nitrato 70 mM), e o requerimento nutricional específico para linhagem MEL 1, inositol (20 µg/mL).

A solução de sais, preparada segundo Cove (1966), apresenta a seguinte composição:

Fosfato de potássio monobásico..... 14 gr

Fosfato de potássio bibásico 6,86 gr;

Cloreto de potássio 1,0 gr

Sulfato de magnésio1,0gr

Água destilada até completar 100 mL.

A solução de elementos traços, descrita por Cove (1996), é constituída por:

Borato de sódio decahidratado.....	40 mg
Sulfato de cobre pentahidratado.....	400 mg
Sulfato de ferro heptahidratado.....	532 mg
Sulfato de manganês monohidratado.....	292 mg
Molibdato de sódio bihidratado.....	800 mg
Sulfato de zinco heptahidratado.....	8 mg
Água destilada até completar 100 mL.	

O meio utilizado para o crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium sp.* e *Trichophyton terrestre* foi o meio Sabouraud com a seguinte composição:

Dextrose.....	40 g
Peptona.....	10 g
Ágar.....	15 g
Água Destilada até completar 1000 mL	

Acertar o pH para 5,6

O meio foi autoclavado a 121,1 °C (1kgf/cm²) durante 20 minutos.

4.3. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: TÉRMICO E TERMO-ÁCIDO

O pré-tratamento térmico do BCA foi realizado da seguinte maneira: ao BCA seco e triturado (1g) foi adicionado 10 mL de água destilada e submetido a 122° C por 30 minutos em autoclave. Após isto, adicionou-se 10 mL de água destilada esterilizada e os frascos foram agitados a 150 rpm durante 60 minutos.

Para avaliar a hidrólise termo-ácida do BCA foi utilizado o ácido clorídrico em três concentrações (HCl 0,5, 1 e 2,5%), seguindo metodologia proposta por CHANDEL et al., (2007). No pré-tratamento termo-ácido, ao BCA seco e triturado (1g) foi adicionado 10 mL da solução de HCl (0,5, 1 e 2,5%) e submetido a 122° C por 30 minutos em autoclave. Após isto, adicionou-se 10 mL de água destilada esterilizada e os frascos foram agitados a 150 rpm durante 60 minutos. O material contido em cada Erlenmeyer foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1 e o extrato

bruto foi transferido para frascos âmbar e armazenados em freezer (-20°C) para posterior análises de Açúcares Totais, Açúcares Redutores e Fenol.

4.4. CULTIVO DOS FUNGOS SOBRE O BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO

Para o cultivo em estado sólido, o BCA (com pré-tratamento térmico e termo-ácido) foi inoculado com micélios (4 quadrados medindo 0,7mm²/quadrado) ou suspensão de esporos (10⁸ esporos/mL) dos fungos estudados e incubados à temperatura ambiente por 15, 30 e 60 dias. Após cada período de incubação, adicionou-se 100 mL de água destilada esterilizada e em seguida os frascos foram agitados a 150 rpm durante 60 minutos. O material contido em cada Erlenmeyer foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1 e o extrato bruto foi transferido para frascos âmbar e armazenados em freezer (-20°C) para posterior análises de Açúcares Totais, Açúcares Redutores, Fenol e enzimas celulolíticas. Também foram realizados experimentos utilizando o BCA (com pré-tratamento térmico e termo-ácido), possuindo as mesmas condições de cultivo, porém sem a inoculação do fungo, denominado controle abiótico.

4.5. CULTIVO DOS FUNGOS SOBRE O BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO COM SOLUÇÃO DE SAIS E FONTE DE NITROGÊNIO

Para o cultivo em estado sólido, o BCA (com pré-tratamento térmico e termo-ácido) foi inoculado apenas com suspensão de esporos (10⁸ esporos/mL) dos fungos estudados e incubados à temperatura ambiente por 5, 7, 15, 30 e 60 dias. Após cada período de incubação, adicionou-se 100 mL de água destilada estéril e em seguida os frascos foram agitados a 150 rpm durante 60 minutos. O material contido em cada Erlenmeyer foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1 e o extrato bruto foi transferido para frascos âmbar e armazenados em freezer (-20°C) para posterior análises das enzimas celulolíticas.

4.6. DOSAGEM DE AÇÚCAR TOTAL

O conteúdo de açúcares totais nos extratos brutos foi determinado através do método da Antrona, conforme descrito por VILLELA et al., (1973). A reação da antrona se baseia na ação hidrolítica e desidratante do ácido sulfúrico 95% sobre os carboidratos. Quando a reação é levada a efeito as ligações glicosídicas são quebradas e os açúcares simples desidratados para furfural ou hidroximetilfurfural. Essas substâncias se condensam com a antrona dando um produto de coloração azul petróleo, o qual é quantificado em 620 nm. Para a dosagem do açúcar total, 1000µl da amostra diluída 10x juntamente com 2,0 mL do reagente antrona 2% foram mantidos durante 15 minutos em temperatura ambiente e posteriormente foram feitas as leituras de absorbância das amostras no comprimento de onda 620 nm. O branco foi preparado adicionando-se 1000µl de água no lugar da amostra.

A quantificação de açúcar total foi feita utilizando-se um coeficiente de absortividade igual a $2,4303 \text{ (mg/mL.cm)}^{-1}$ obtida a partir da curva padrão de glicose (Gráfico 1).

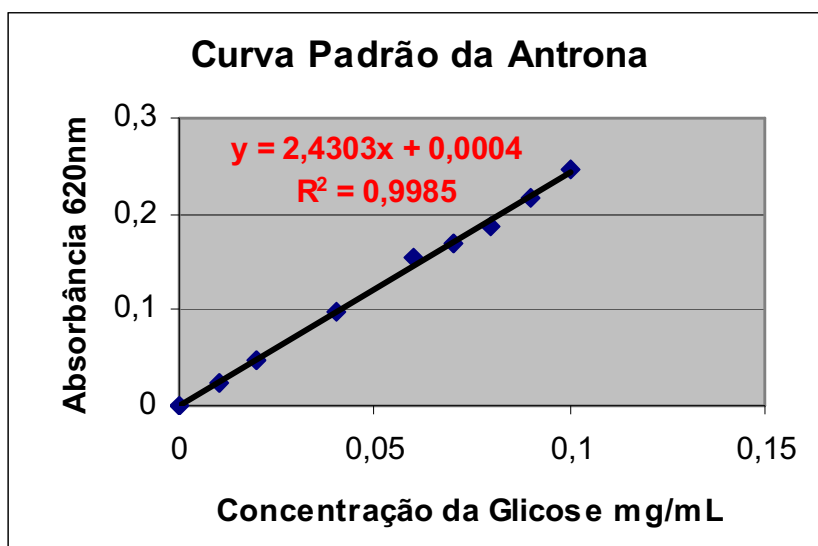


Gráfico 1: Curva padrão da antrona para determinação de Açúcar Total

4.7. DOSAGEM DE AÇÚCAR REDUTOR

O conteúdo de açúcares redutores foi determinado através do método do DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico), descrito por MILLER (1959), o qual é baseado na formação de um composto colorido, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que é medido espectrofotometricamente a 546 nm.

Para a dosagem do açúcar redutor, em 1,5 mL da amostra foi adicionado 2,0 mL do reagente DNS. O branco foi preparado adicionando-se 1,5 mL de água no lugar da amostra. Os tubos foram transferidos para banho de água fervente (100°C) por 5 minutos. Em seguida, foram transferidos para banho de gelo para resfriamento, e posteriormente foram feitas pelas leituras de absorbância a 546nm das amostras.

A quantificação de açúcar redutor presente no hidrolisado foi feita utilizando-se um coeficiente de absorvidade igual a $1,5193 \text{ (mg/mL.cm)}^{-1}$ obtida a partir da curva de padrão de glicose. (Gráfico 2)

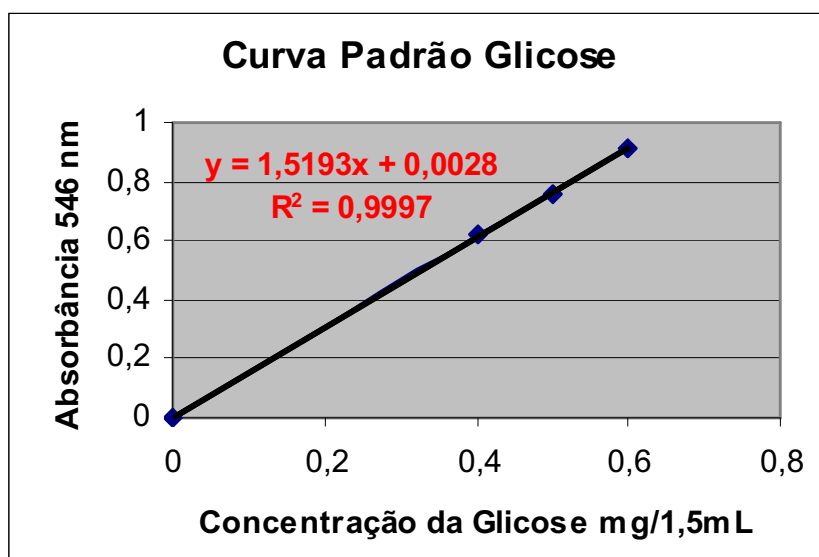


Gráfico 2: Curva padrão da glicose para determinação de Açúcar Redutor.

4.8. DOSAGEM DE FENOL

O processo de hidrólise ácida do bagaço da cana-de-açúcar pode resultar na formação de compostos tóxicos provenientes da degradação de hexoses e pentoses e/ou da lignina, como os compostos aromáticos, fenólicos e aldeídicos.

O procedimento de análise de compostos fenólicos foi feito de acordo com o método descrito por SINGLETON et. al., (1999). Em 0,1 mL de amostra, foram adicionados 6,0 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 4 minutos em repouso, foram adicionados 1,5 mL da solução de carbonato de sódio a 20% e o volume da amostra completado para 10mL com água destilada. As amostras foram deixadas em repouso por 2 horas em temperatura ambiente e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 760 nm. O branco foi feito substituindo o volume da amostra pelo mesmo volume de água destilada, mantendo os demais reagentes.

A quantificação de compostos fenólicos presentes no hidrolisado utilizou um coeficiente de absorvidade igual a **117,88** (mg/mL.cm)⁻¹ obtida a partir da curva padrão (**Gráfico 3**).

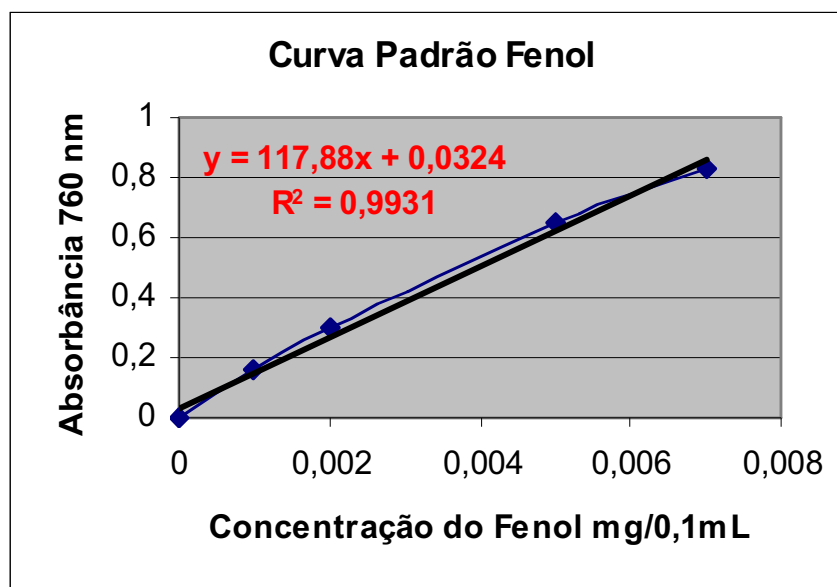


Gráfico 3: Curva padrão do fenol para determinação de compostos fenólicos.

4.9. DETERMINAÇÃO DA ENZIMA CELULASE TOTAL

A atividade da celulase total foi avaliada seguindo a metodologia descrita por MANDELS et. al., 1974, utilizando-se como substrato papel de filtro Whatman nº 1.

Em tubos de ensaio foram adicionados 1,0 mL de tampão citrato de sódio 0,05M pH 5, uma fita de papel de filtro Whatman nº 1 (1X6cm) e 0,5 mL do extrato enzimático. As amostras foram agitadas em vortex e incubadas por 30 minutos em a 50° C sob agitação. Após este período, adicionou-se 2,0 mL do reagente DNS nos respectivos tubos e estes foram transferidos para banho de água fervente por 5 minutos. Em seguida, foram transferidos para banho de gelo para resfriamento, e a quantidade de AR foi determinada pela medida da absorbância a 546nm. Também foram preparados os tubos controle: Branco da enzima (sem substrato) e Branco do substrato (sem enzima). Uma unidade da enzima (FPU) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de açúcar redutor por minuto a 50° C usando o coeficiente de absorvidade igual a 2,5292 (mg/mL.cm)⁻¹.

4.10. DETERMINAÇÃO DA ENZIMA AVICELASE

A atividade da avicelase foi avaliada seguindo a metodologia descrita por MANDELS et. al., 1974, utilizando-se como substrato o avicel.

Em tubos de ensaio foram adicionados 1,0 mL da solução de avicel (1%) preparada em tampão acetato de sódio 0,1M pH 4,8 e 1,0 mL do extrato enzimático. Após 30 minutos a 50°C sob agitação, a quantidade de AT foi determinada pelo método descrito por Dubois et. al. (1956), adicionando-se 1,0 mL de Fenol 5% e 5.0 mL de Ácido Sulfúrico concentrado. Os tubos foram mantidos em repouso por 10 minutos, posteriormente agitados e realizadas as leituras de absorbância em 485 nm. Também foram preparados os tubos controle: Branco da enzima (sem substrato) e Branco do substrato (sem enzima). Uma unidade da enzima (UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de açúcar redutor por minuto a 50° C usando o coeficiente de absorvidade igual a 7,5014 (mg/mL.cm)⁻¹.

4.11. DETERMINAÇÃO DA ENZIMA CARBOXIMETILCELULASE (CMCase)

A atividade da carboximetilcelulase foi avaliada seguindo a metodologia descrita por MANDELS *et. al.*, 1974, utilizando-se como substrato a carboximetilcelulose 1%.

Em tubos de ensaio contendo 0,5 mL da solução de carboximetilcelulose (1%) preparada em tampão citrato de sódio 0,05M pH 5,0 foi adicionado 0,5 mL do extrato enzimático e incubou-se a 50°C sob agitação por 30 minutos. Após este período adicionou-se 2,0 mL do reagente DNS e os tubos foram transferidos para banho de água fervente por 5 minutos. Em seguida, foram transferidos para banho de gelo para resfriamento, e posteriormente foram feitas as leituras de absorbância em 546 nm. Também foram preparados os tubos controle: Branco da enzima (sem substrato) e Branco do substrato (sem enzima). Uma unidade da enzima (UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1μmol de açúcar redutor por minuto a 50° C usando o coeficiente de absorvidade igual a 1,9531 (mg/mL.cm)⁻¹.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE DO BCA (COM PRÉ-TRATAMENTO TÉRMICO) APÓS CULTIVO DOS FUNGOS: QUANTIFICAÇÃO DE AT, AR E FENOL

Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a hidrólise do BCA em relação à quantidade de AT, AR e Fe presente na cultura após o crescimento dos fungos *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium sp.* e *Trichophyton terrestre*, quando inoculados por esporos ou micélio, sobre o BCA (com pré-tratamento térmico).

O **Gráfico 4** mostra a quantidade de AT presente na cultura dos fungos após 15 e 30 dias de crescimento sobre o BCA com pré-tratamento térmico. Analisando o efeito do tipo do inóculo, observa-se que as diferenças foram pequenas, sendo que para a maioria dos fungos a inoculação por esporos apresentou melhores resultados. Também se verificou que para todos os fungos, exceto o *A. pullulans*, houve um aumento na quantidade de AT após 15 e 30 dias de crescimento, comparado ao controle abiótico. Este resultado pode ser devido à hidrólise do BCA, o que resultou em uma maior liberação de AT. Para o fungo *A. pullulans* ocorreu uma diminuição na quantidade de AT após 15 dias de crescimento, indicando que este fungo utilizou cerca de 50% do açúcar presente no início cultura para o seu crescimento. No entanto, após 30 dias, houve um aumento na quantidade de AT comparado à cultura de 15 dias. Dentre os fungos estudados, os mais promissores foram o *A. nidulans*, *A. niger* e *T. terrestre*, pelo fato de que a quantidade de AT, após 30 dias de crescimento, foi quase o dobro da quantidade inicial (controle).

Os resultados referentes ao AR presente na cultura após o crescimento dos fungos estão apresentados no **Gráfico 5**. Como observado a inoculação dos fungos por esporos ou micélio não afeta de maneira considerável a quantidade de AR presente na cultura. Os resultados também mostram que para todos os fungos estudados, exceto *T. terrestre*, ocorreu uma diminuição na quantidade de AR

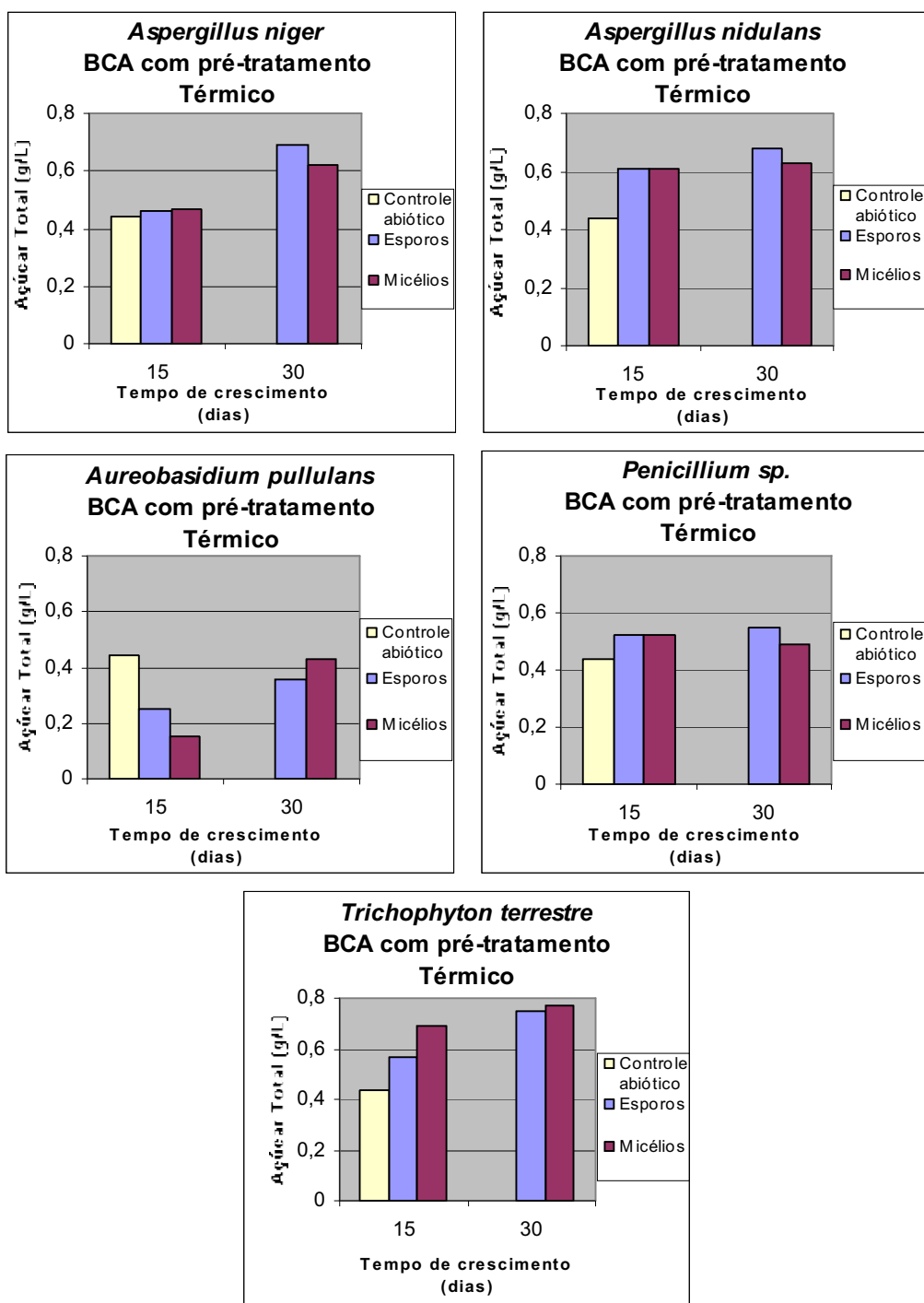


Gráfico 4: Quantidade de AT presente na cultura após crescimento dos fungos *A. niger*, *A. nidulans*, *A. pullulans*, *Penicillium sp.* e *T. terrestre* (inoculados por esporos ou micélios) sobre o BCA com pré-tratamento térmico e cultivados por 15 e 30 dias à temperatura ambiente.

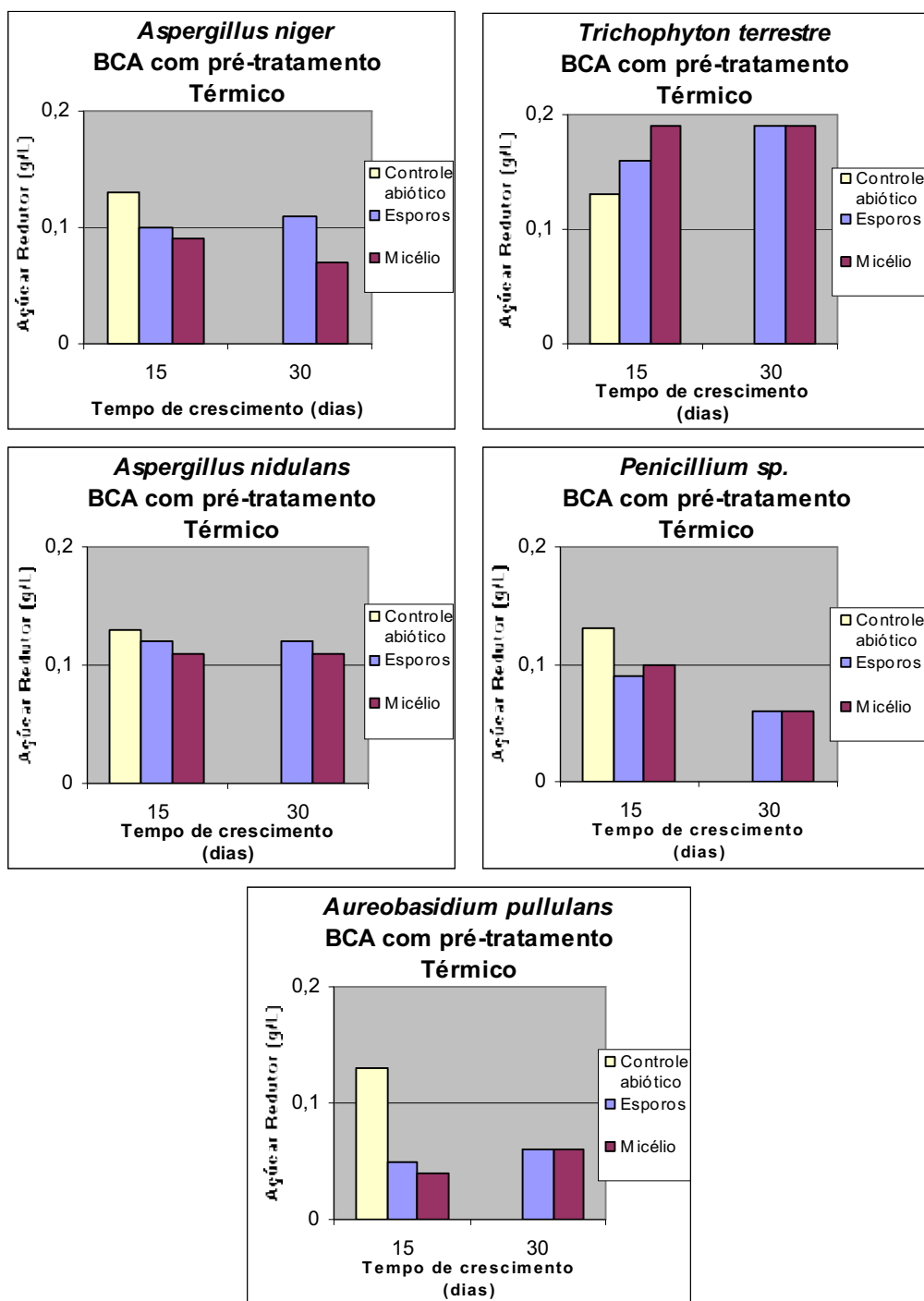


Gráfico 5: Quantidade de AR presente na cultura após crescimento dos fungos *A. niger*, *T. terrestre*, *A. nidulans*, *Penicillium sp.* e *A. pullulans* (inoculados por esporos ou micélios) sobre o BCA com pré-tratamento térmico e cultivados por 15 e 30 dias à temperatura ambiente.

comparado ao controle abiótico, o que sugere que os fungos estão utilizando o açúcar presente na cultura para o seu crescimento. No caso do fungo *T. terrestre* observa-se que a quantidade de AR se manteve igual ao controle, após 15 e 30 dias de crescimento.

A análise da presença de fenol na cultura dos fungos, após 15 e 30 dias de crescimento, está mostrada no **Gráfico 6**. Como mencionado para AT e AR, a quantidade de fenol presente nas culturas dos fungos independe do tipo do inóculo (esporos ou micélios). Comparando-se os fungos, observa-se que em todas as culturas (*A. niger*, *A. nidulans*, *A. pullulans*, *Penicillium sp.* e *T. terrestre*), houve um aumento da quantidade de fenol em relação ao controle abiótico principalmente após 30 dias de crescimento, sugerindo que estes fungos não conseguem metabolizar o fenol liberado após a hidrólise do BCA. Pela análise de AR e Fenol foi possível verificar que, dentre os fungos estudados, o filtrado da cultura do *T. terrestre*, crescido por 15 dias sobre o bagaço com pré-tratamento térmico, apresenta a maior concentração de açúcar redutor (em torno de 0,2 g/L) e uma baixa concentração de fenol (aproximadamente 0,007 g/L), podendo ser considerado um meio fermentativo apropriado para a produção de bioetanol por leveduras.

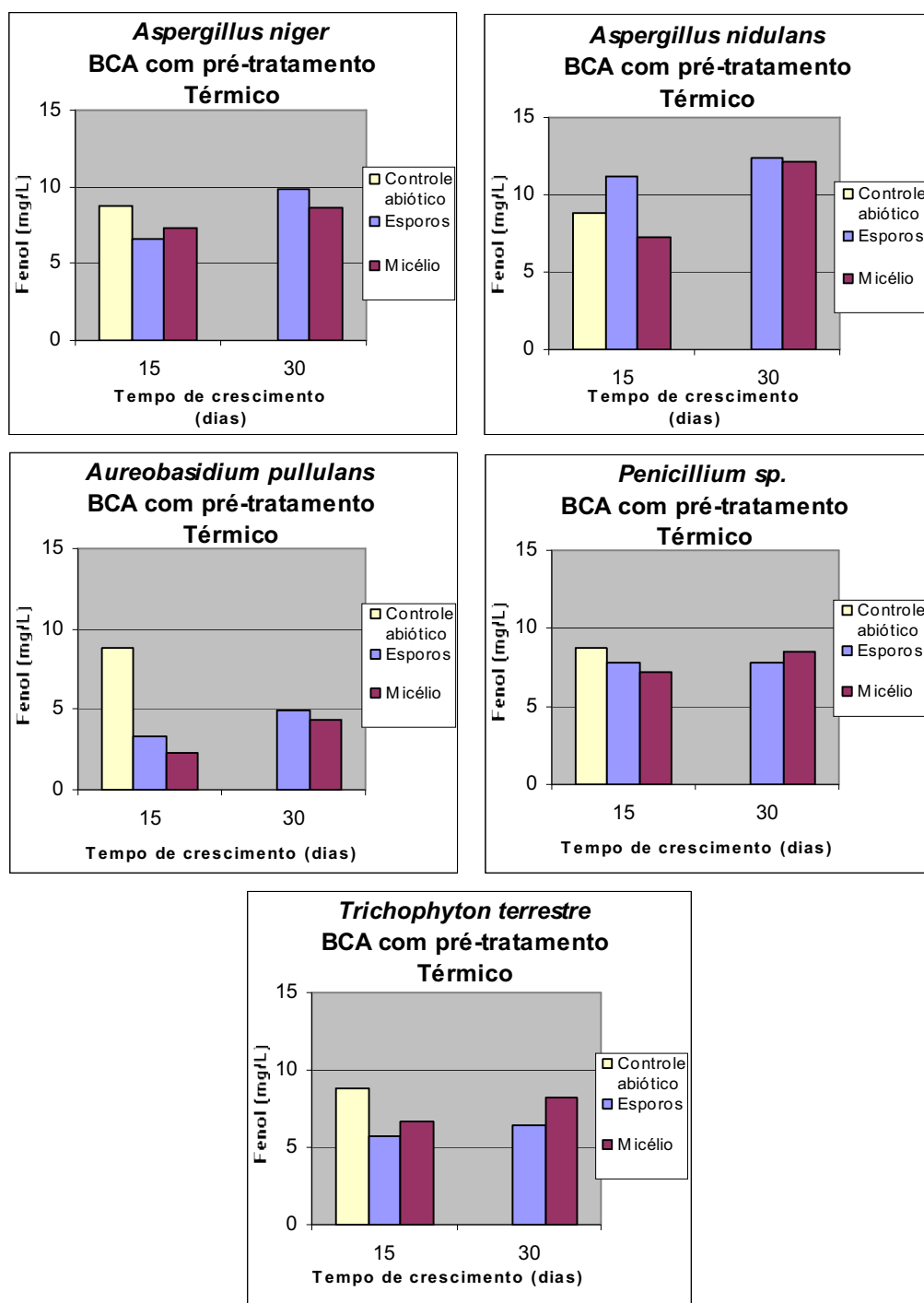


Gráfico 6: Quantidade de Fenol presente na cultura após crescimento dos fungos *A. niger*, *A. nidulans*, *A. pullulans*, *Penicillium sp.* e *T. terrestre* (inoculados por esporos ou micélios) sobre o BCA com pré-tratamento térmico e cultivados por 15 e 30 dias à temperatura ambiente.

5.2. PRÉ-TRATAMENTO TERMO-ÁCIDO DO BCA

Para otimizar a hidrólise termo-ácida do BCA foram testadas três concentrações de HCl (0,5; 1,0 e 2,5%) e também a pré-incubação do BCA na solução ácida por 16 hs antes da autoclavagem. Os resultados obtidos, apresentados na **Tabela 2** mostram que o aumento da concentração de HCl proporcionou um maior hidrólise do BCA como pode ser observado pelo aumento da concentração de açúcar redutor (AR), que foi da ordem de 44 vezes em comparação com o controle (pré-tratamento térmico). O mesmo comportamento foi observado para o açúcar total (AT). No entanto, em relação ao fenol, observa-se uma diminuição da sua concentração proporcionalmente ao aumento da concentração do ácido. Em relação à pré-incubação do BCA, não foi observado diferenças consideráveis nas concentrações de AT, AR e Fenol.

A escolha da concentração ideal de HCl, para realizar o pré-tratamento do BCA, deve levar em conta a condição que permite uma maior liberação de AR e uma pequena concentração de fenol. Para isto, foi calculada a eficiência da hidrólise ácida do BCA, que segundo Gámez et. al. (2006), é obtida pela razão entre as concentrações de açúcar redutor (como a glicose) e de inibidores (como o fenol). Como podemos observar na **Tabela 2** a concentração de 2,5% de HCl resultou em maior eficiência, sendo que a pré-incubação de 16 h na solução ácida não resultou em um aumento considerável na eficiência. Nos experimentos subsequentes, o pré-tratamento ácido do BCA foi feito com HCl 2,5%.

TABELA 2: Avaliação do pré-tratamento ácido do BCA em relação as concentrações de AT, AR e Fenol

[HCl]%	Pré-Incubação	AT (g/L)	AR (g/L)	Fenol (g/L)	² E (g/g)
0,5	-----	1,7	5,3	0,0275	192,73
	16h	2,0	5,9	0,0282	209,22
1	-----	2,6	5,8	0,0239	242,68
	16h	2,7	7,1	0,0274	259,12
2,5	-----	5,6	8,4	0,0234	358,97
	16h	5,4	9,2	0,0248	370,97
¹ Controle (Pré-tratamento Térmico)	-----	0,45	0,19	0,0069	27,54
	16h	0,43	0,22	0,0069	31,88

¹Controle: BCA + H₂O + Autoclave

²E(g/g): Eficiência do Tratamento Ácido = ([AR]final / [Fenol]final)

5.3. AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE DO BCA APÓS CULTIVO DOS FUNGOS: EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO (TÉRMICO E TERMO-ÁCIDO)

De acordo com as análises de AT, os fungos *A. niger*, *A. nidulans* e *T. terrestre* mostraram-se possíveis promissores como produtores das enzimas celulolíticas e, portanto, foram utilizados para avaliar o efeito do pré-tratamento (térmico e termo-ácido) do BCA.

5.3.1. QUANTIFICAÇÃO DE AT, AR E FENOL

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade dos fungos *A. niger*, *A. nidulans* e *T. terrestre* em hidrolisar o BCA (com pré-tratamento térmico e termo-ácido) através da análise de AT, AR e Fenol presente na cultura, após 15, 30 e 60 dias de crescimento dos fungos.

O **Gráfico 7** mostra a quantidade de AT presente na cultura dos fungos crescidos sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido. Pelos resultados obtidos verifica-se que a quantidade de AT foi maior (cerca de 10 vezes) para todos os fungos que cresceram sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido, comparado com as culturas crescidas sobre o BCA com pré-tratamento térmico. Este resultado sugere que as enzimas celulolíticas produzidas pelos fungos estudados estão conseguindo hidrolisar mais facilmente o BCA com pré-tratamento termo-ácido. De acordo com a literatura, este pré-tratamento promove uma desorganização do material lignocelulolítico do BCA, facilitando a ação das enzimas (SUN & CHENG, 2001).

Com os dados mostrados no **Gráfico 7** também se observa que o tempo de cultivo afetou a quantidade de AT presente na cultura. Para todos os fungos estudados, a maior quantidade de AT foi obtida após 60 dias de crescimento, o que correspondeu a um aumento de cerca de 6 a 8 vezes em relação ao tempo de 15 dias. Este resultado parece indicar que os fungos estão produzindo as enzimas celulolíticas e o máximo desta produção ocorreu após 30 dias de cultivo.

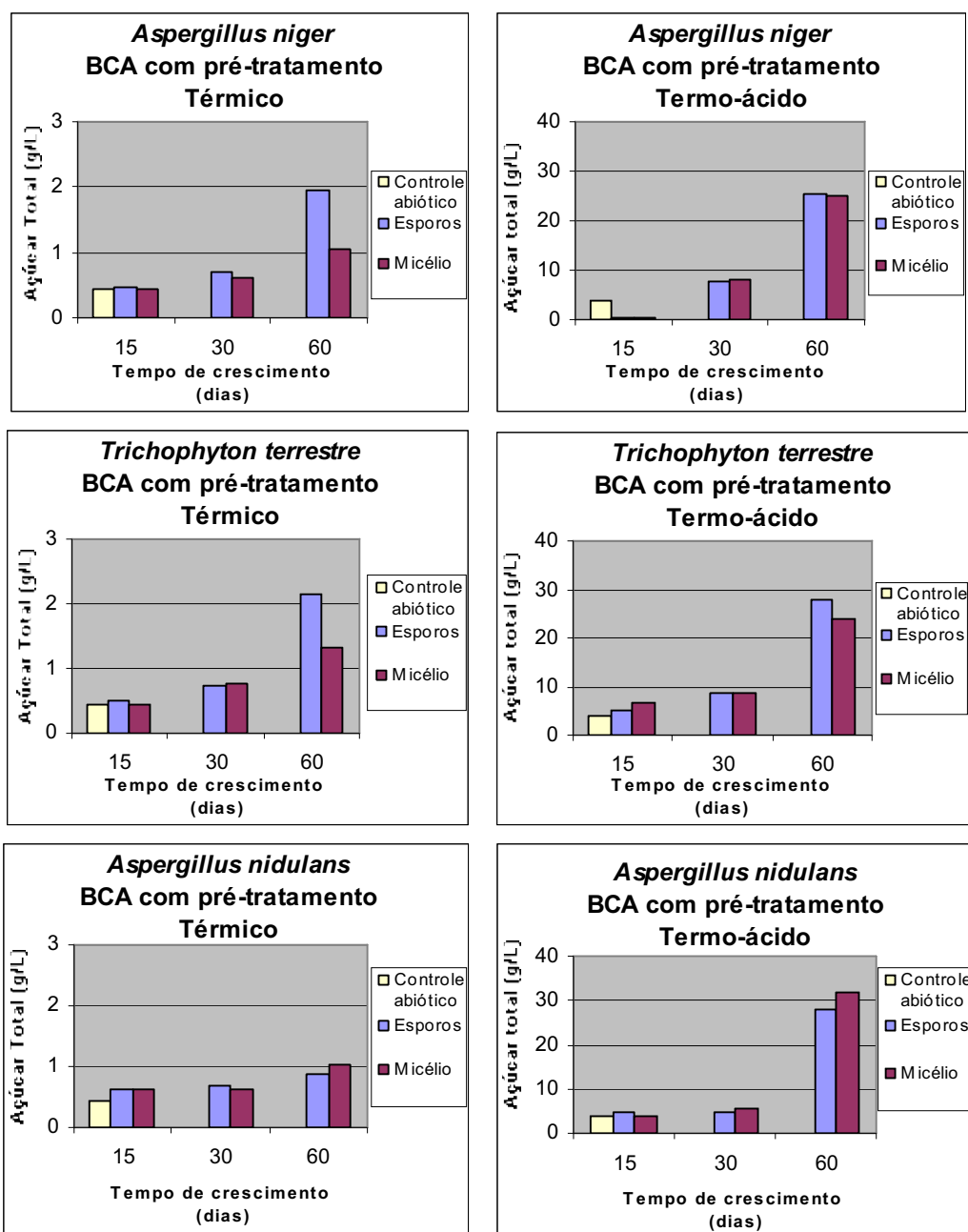


Gráfico 7: Quantidade de AT presente na cultura após crescimento dos fungos *A. niger*, *T. terrestre* e *A. nidulans* (inoculados por esporos ou micélios) sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido e cultivados por 15, 30 e 60 dias à temperatura ambiente.

Em relação ao tipo do inóculo, as diferenças foram pequenas, sendo que para alguns fungos a inoculação por esporos apresentou níveis mais altos de AT.

Resultados muito semelhantes foram obtidos em relação a quantidade de AR presente na cultura dos fungos crescidos sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido, como mostrado no **Gráfico 8**. A quantidade de AR também foi maior na cultura crescida sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido, comparada com o cultivo sobre o BCA com pré-tratamento térmico, provavelmente devido a uma melhor ação das enzimas. Dentre os fungos estudados, o *A. niger* e o *T. terrestre* apresentaram o dobro de AR após 60 dias de cultivo, sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido o que pode estar relacionada a uma maior produção das enzimas celulolíticas.

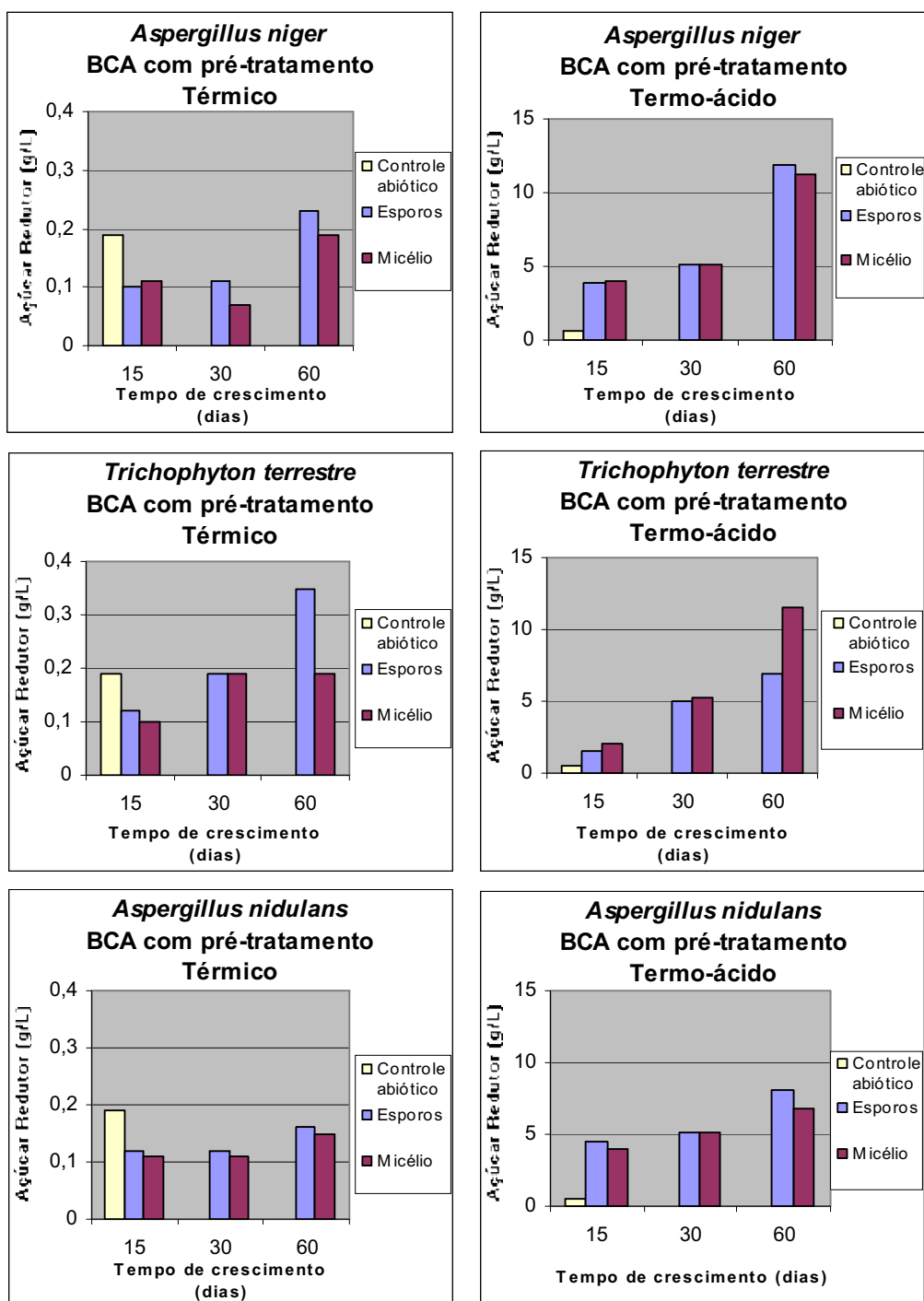


Gráfico 8: Quantidade de AR presente na cultura após crescimento dos fungos *A. niger*, *T. terrestre* e *A. nidulans* (inoculados por esporos ou micélios) sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido e cultivados por 15, 30 e 60 dias à temperatura ambiente.

O **Gráfico 9** mostra que durante o crescimento dos fungos ocorreu uma maior liberação de fenóis nas culturas crescidas sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido comparado com o cultivo sobre o BCA com pré-tratamento térmico. Isto provavelmente ocorreu devido ao pré-tratamento termo-ácido promover uma hidrólise parcial do BCA, a qual libera compostos fenólicos. Para a maioria dos fungos estudados, exceto para o fungo *A. nidulans*, crescido sobre o BCA com pré-tratamento térmico, a quantidade de fenol também aumentou em função do tempo de cultivo. Este resultado pode ser indicativo da hidrólise do BCA pelas enzimas celulolíticas produzidas pelos fungos, após 30 dias de crescimento. Como mencionado anteriormente, a inoculação por esporos ou micélios também tem um pequeno efeito sobre a quantidade de fenol presente na cultura.

De acordo com a análise de AR e Fenol, podemos sugerir que o filtrado da cultura do fungo *A. niger*, crescida por 60 dias sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido, poderia ser utilizado como meio fermentativo para a produção de bioetanol por leveduras em função da alta concentração de AR (12g/L) e baixa concentração de fenol (0,03g/L).

Os resultados obtidos também mostraram que os fungos *A. niger*, *A. nidulans* e *T. terrestre* podem ser considerados potenciais produtores das enzimas celulolíticas. Porém, para confirmar esta suposição, foi realizada a determinação da atividade das enzimas celulase, CMCase e avicelase.

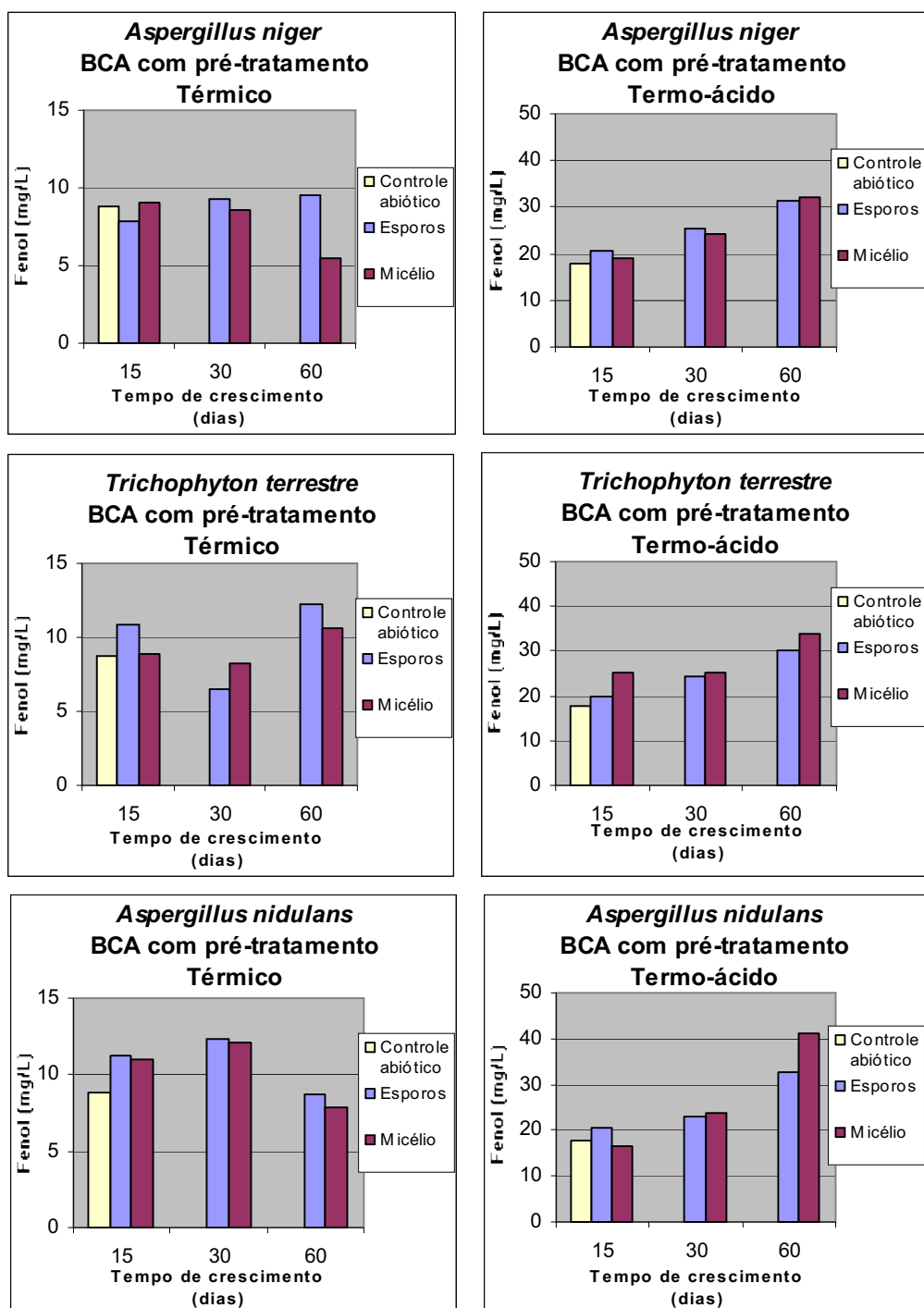


Gráfico 9: Quantidade de Fenol presente na cultura após crescimento dos fungos *A. niger*, *T. terrestre* e *A. nidulans* (inoculados por esporos ou micélio) sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido e cultivados por 15, 30 e 60 dias à temperatura ambiente.

5.3.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS CELULASE, CMCase E AVICELASE

Para a determinação da atividade enzimática foi necessário, primeiramente, determinar o tempo de reação do ensaio, no qual a velocidade de formação do produto deve ser constante. Pelos resultados da cinética enzimática, mostrados no **Gráfico 10**, podemos considerar que o tempo de 30 minutos de reação parece o mais adequado para quantificar a atividade das enzimas celulase total, CMCase e avicelase na cultura dos fungos *A. niger*, *A. nidulans* e *T. terrestre*. Estes resultados também mostram que as enzimas celulolíticas, como CMCase e avicelase, estão sendo inibidas pelo produto final da reação, a glicose.

O **Gráfico 11** mostra a atividade da enzima celulase total nas culturas dos fungos *A. niger*, *A. nidulans* e *T. terrestre* crescidos sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido por diferentes tempos. Analisando o efeito do pré-tratamento termo-ácido do BCA na atividade celulásica, verifica-se que a maior atividade enzimática foi obtida quando o fungo cresceu sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido. Nesta condição, o tipo do inóculo (esporos ou micélios) teve pouca influência sobre a atividade enzimática. Em relação ao tempo de cultivo, os resultados mostram que a atividade enzimática foi maior após 15 dias de crescimento para todos os fungos estudados, quando crescidos sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido. Este aumento foi de 11,2; 16,5 e 18,5 vezes (respectivamente para os fungos *T. terrestre*, *A. niger* e *A. nidulans*) quando comparado com o BCA com pré-tratamento térmico. Considerando os fungos estudados, o *A. nidulans* mostrou-se o mais promissor como produtor de celulases devido a maior atividade enzimática, atingindo 0,74 FPU/mL após 15 dias de crescimento sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido.

A atividade CMCase nas culturas dos fungos *A. niger*, *A. nidulans* e *T. terrestre* crescidos por 15, 30 e 60 dias sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido está mostrado no **Gráfico 12**. Para esta enzima o tipo de inóculo afetou a atividade enzimática, pois as diferenças foram consideráveis tanto para o cultivo sobre o BCA com pré-tratamento térmico ou termo-ácido para todos os fungos estudados.

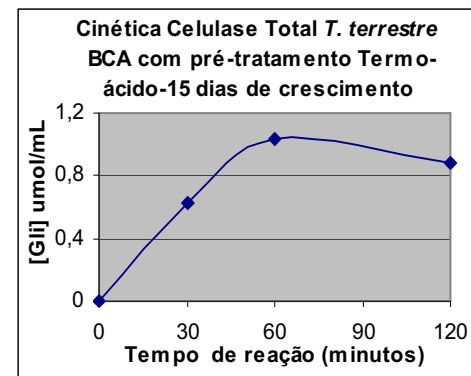
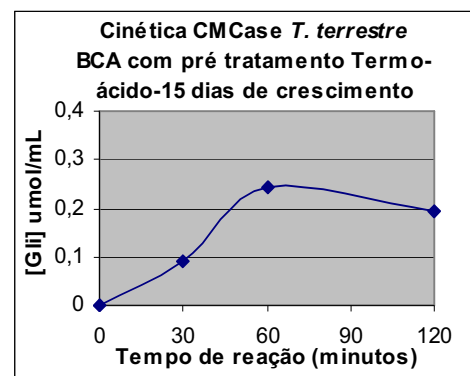
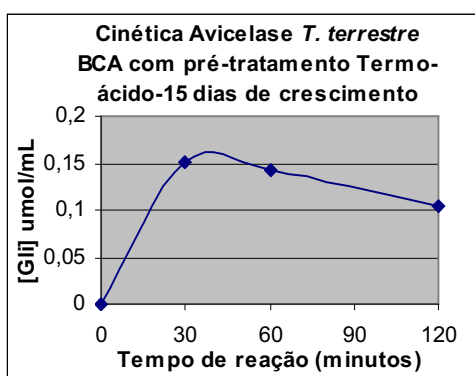
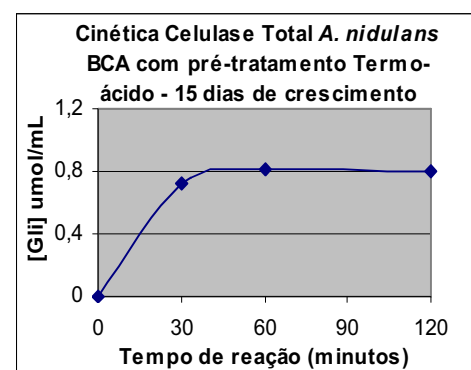
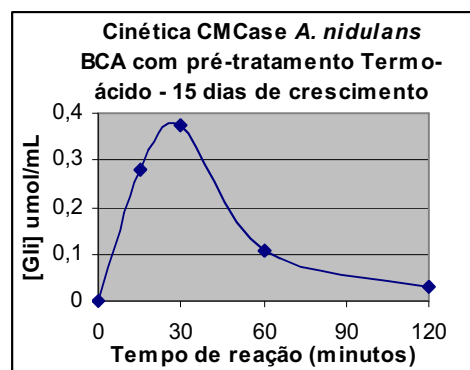
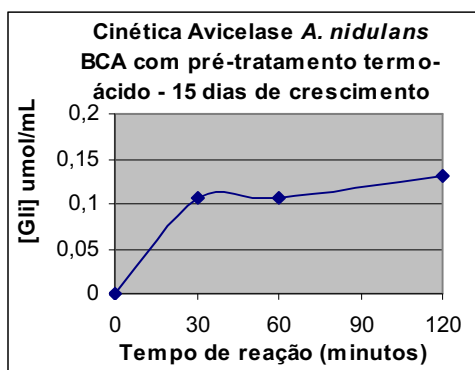
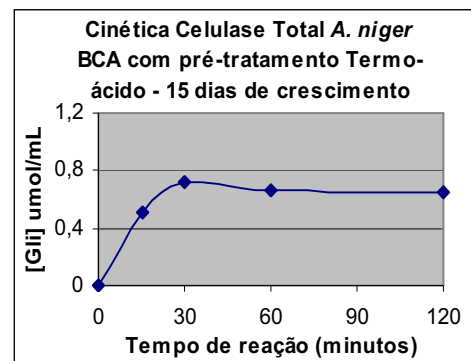
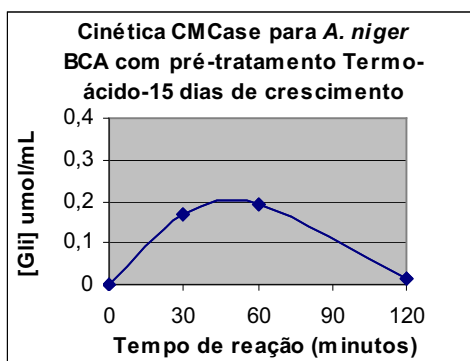
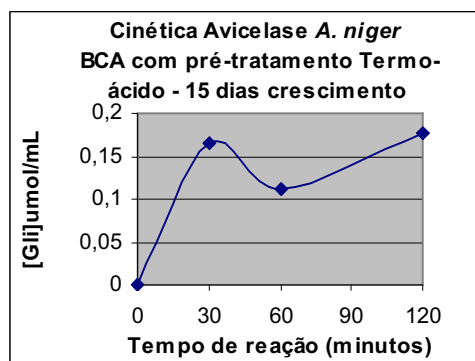


Gráfico 10: Cinética das enzimas celulase total, CMCase e Avicelase após cultivo dos fungos *A. niger*, *A. nidulans* e *T. terrestre* por 15 dias sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido.

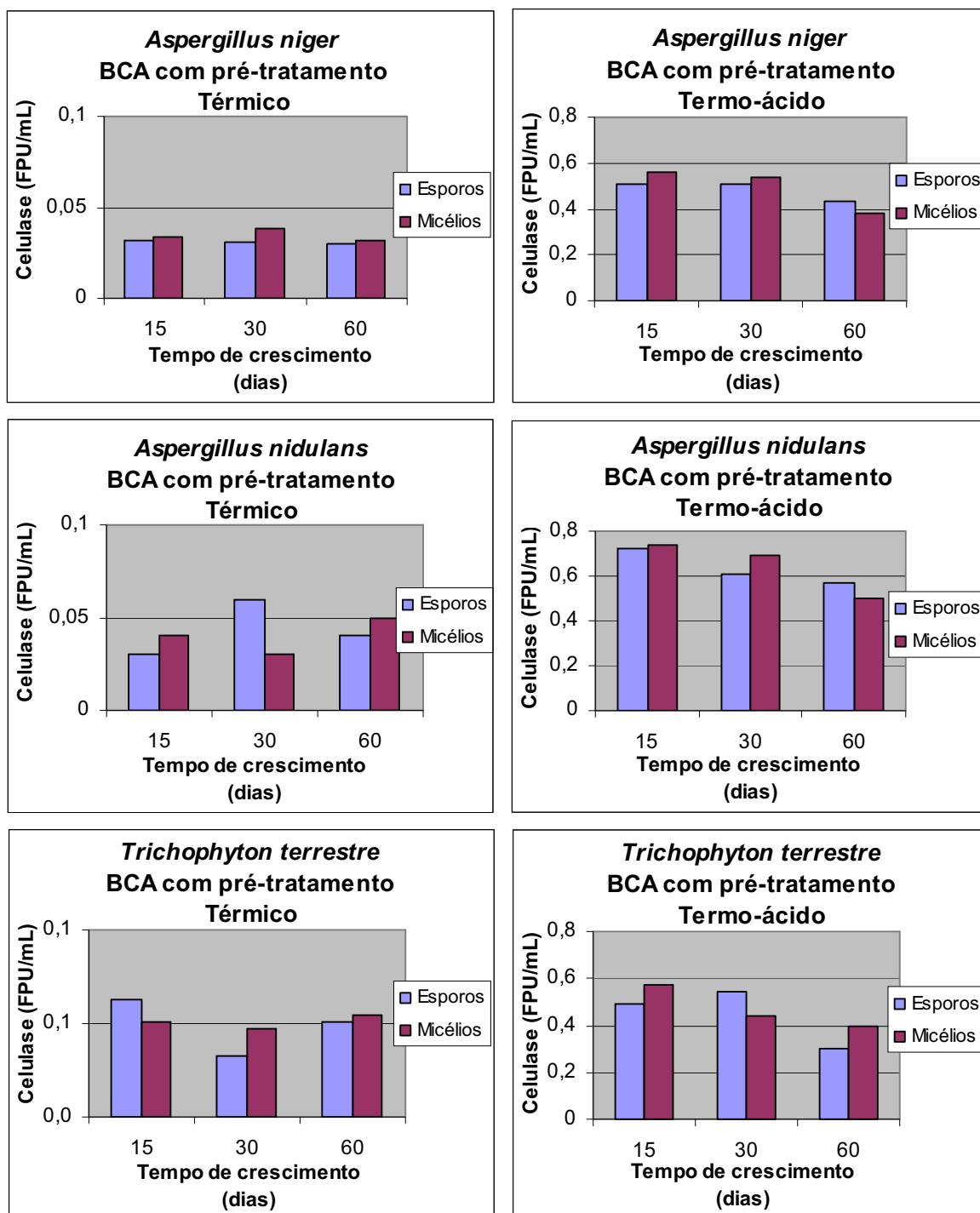


Gráfico 11: Atividade da enzima Celulase Total produzida pelos fungos *A. niger*, *A. nidulans* e *T. terrestre*, quando inoculados com esporos ou micélios sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido e cultivados por 15, 30 e 60 dias à temperatura ambiente.

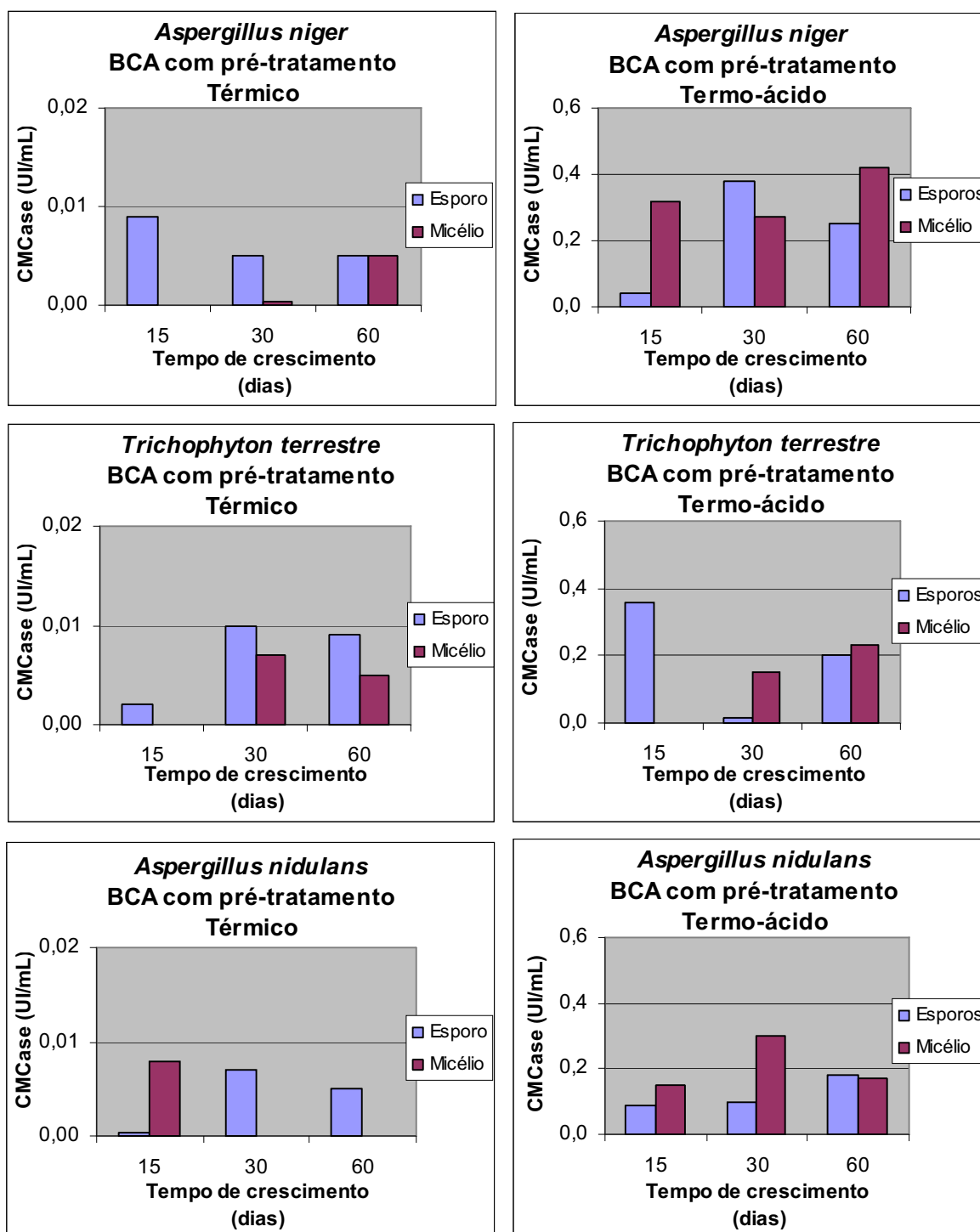


Gráfico 12: Atividade da enzima CMCase produzida pelos fungos *A. niger*, *T. terrestre* e *A. nidulans*, quando inoculados com esporos ou micélios sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido e cultivados por 15, 30 e 60 dias à temperatura ambiente.

Em relação ao tempo de cultivo observa-se que as atividades enzimáticas variaram em função do fungo estudado e do pré-tratamento do BCA. Para todos os fungos estudados, a atividade da CMCase também foi maior no BCA com pré-tratamento termo-ácido.

Nesta condição, podemos observar que para os fungos *A. nidulans* e *A. niger* a maior atividade enzimática foi obtida, respectivamente, após 30 e 60 dias de crescimento quando os fungos foram inoculados por micélios. Para o fungo *T. terrestre*, a maior atividade da enzima foi conseguida quando o fungo foi inoculado por esporos e cultivado por 15 dias quando inoculado por esporos. Considerando estes tempos de cultivo, podemos observar que o aumento foi de 0,3 e 42 vezes respectivamente para os *A. nidulans* e *A. niger* e de 180 vezes para o fungo *T. terrestre*, quando comparamos a atividade enzimática nas culturas do BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido. Portanto, o fungo *A. niger* apresentou a maior atividade CMCase (0,42 UI/mL) quando cultivado sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido por 60 dias a partir do inóculo por micélios.

O **Gráfico 13** apresenta os resultados referentes à atividade da enzima avicelase, presente nas culturas dos fungos *A. niger*, *A. nidulans* e *T. terrestre* crescidos sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido. Para todos os fungos estudados, a atividade desta enzima também foi maior quando o fungo cresceu sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido. No entanto, observa-se que a atividade avicelase destes fungos variou em função do tempo de cultivo e do tipo do inóculo. Para os fungos *A. nidulans* e *T. terrestre*, a maior atividade enzimática (0,2 UI/mL para ambos os fungos) foi obtida após 60 dias de cultivo sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido, quando a inoculação foi feita por esporos. No fungo *A. niger*, a maior atividade enzimática (0,13 UI/mL) foi conseguida após 15 dias de crescimento sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido e também inoculado por esporos. Analisando o efeito do pré-tratamento termo-ácido do BCA na atividade avicelase para estes tempos de cultivo, verifica-se que o aumento da atividade enzimática foi de 2,16; 4,0 e 3,33 vezes, respectivamente para os fungos *A. niger*, *A. nidulans* e *T. terrestre* crescidos sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido.

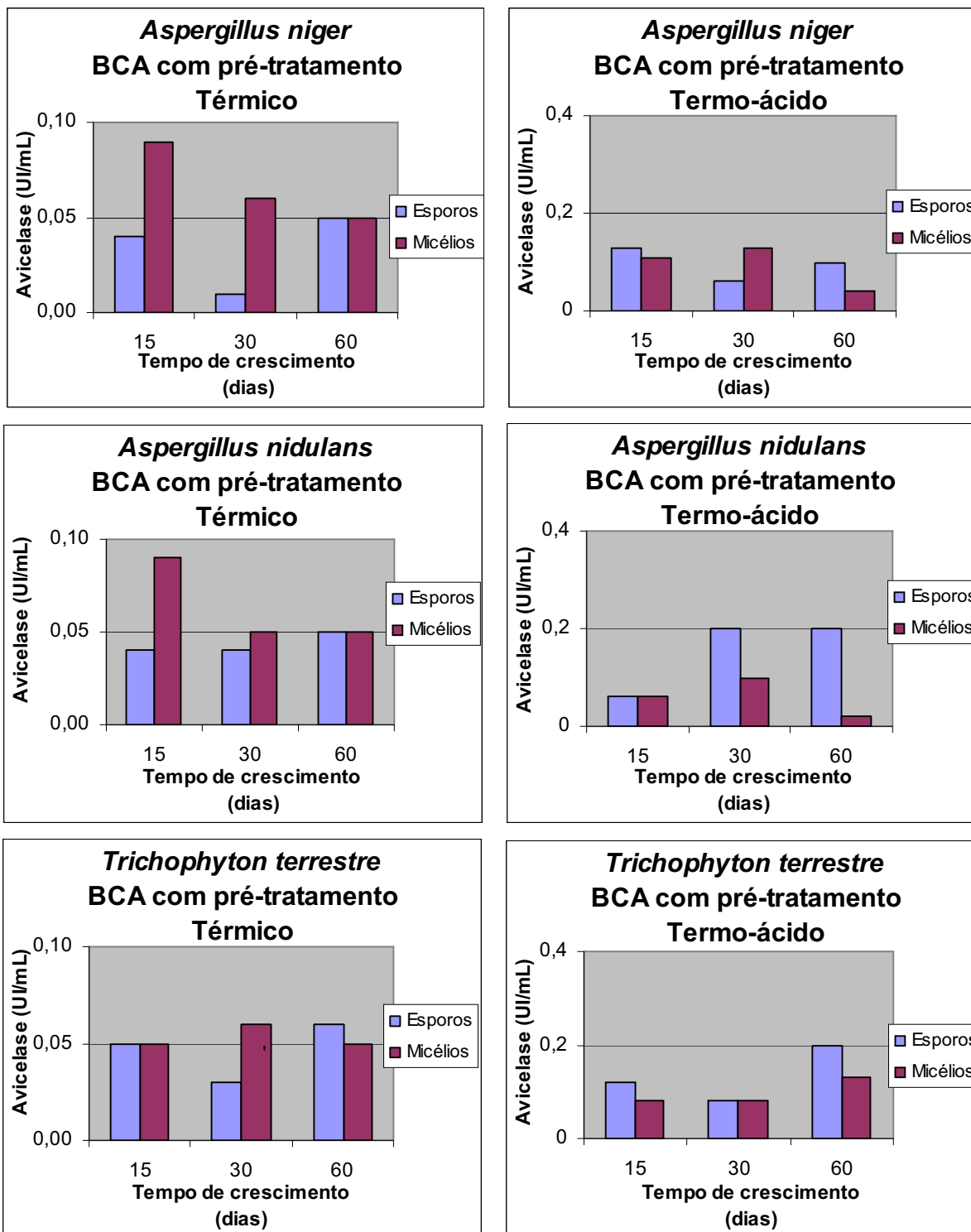


Gráfico 13: Atividade da enzima Avicelase produzida pelos fungos *A. niger*, *A. nidulans* e *T. terrestre*, quando inoculados com esporos ou micélios sobre o BCA com pré-tratamento termico e termo-ácido e cultivados por 15, 30 e 60 dias à temperatura ambiente.

Com estes resultados podemos considerar os fungos *A. nidulans* e *T. terrestre* como promissores para a produção da enzima avicelase, pois a atividade enzimática atingiu 0,2 UI/mL para ambos os fungos inoculados por esporos e crescidos sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido por 60 dias. Portanto, com os resultados obtidos, foi possível confirmar que os três fungos estudados são promissores fontes das enzimas celulolíticas quando crescidos sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido.

5.3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS APÓS CULTIVO DOS FUNGOS SOBRE O BCA (COM OU SEM PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO): EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO COM FONTE DE NITROGÊNIO

Este estudo foi realizado para avaliar a influência da presença de uma fonte de nitrogênio (tartarato de amônio) e de sais na produção das enzimas celulolíticas pelos fungos *A. nidulans* e *T. terrestre*, crescidos sobre o BCA com pré-tratamento térmico e termo-ácido.

O **Gráfico 14** mostra a atividade das enzimas celulase, CMCase e avicelase da cultura do fungo *A. nidulans*, crescido sobre o BCA (com pré-tratamento térmico e termo-ácido) por 5, 7, 15, 30 e 60 dias em meio suplementado com solução de sais e tartarato de amônio. De acordo com os resultados, o pré-tratamento termo-ácido do BCA não proporcionou um aumento na atividade das enzimas celulase, avicelase e CMCase, diferente dos resultados obtidos anteriormente em meio não suplementado com fonte de nitrogênio e com pH de cultivo não ajustado em 5 (Gráfico 11,12 e 13). Este resultado pode ser devido à presença de algum inibidor produzido durante a hidrólise termo-ácida do BCA. Com os resultados obtidos podemos considerar que a condição que resultou em maior atividade das enzimas celulolíticas pelo fungo *A. nidulans* foi cultivo por 30 dias sobre o BCA com pré-tratamento térmico e suplementado com solução de sais e tartarato de amônio, cujos valores máximos foram 0,44, 0,01 e 0,17 UI/mL respectivamente para as enzimas celulase, CMCase e avicelase.

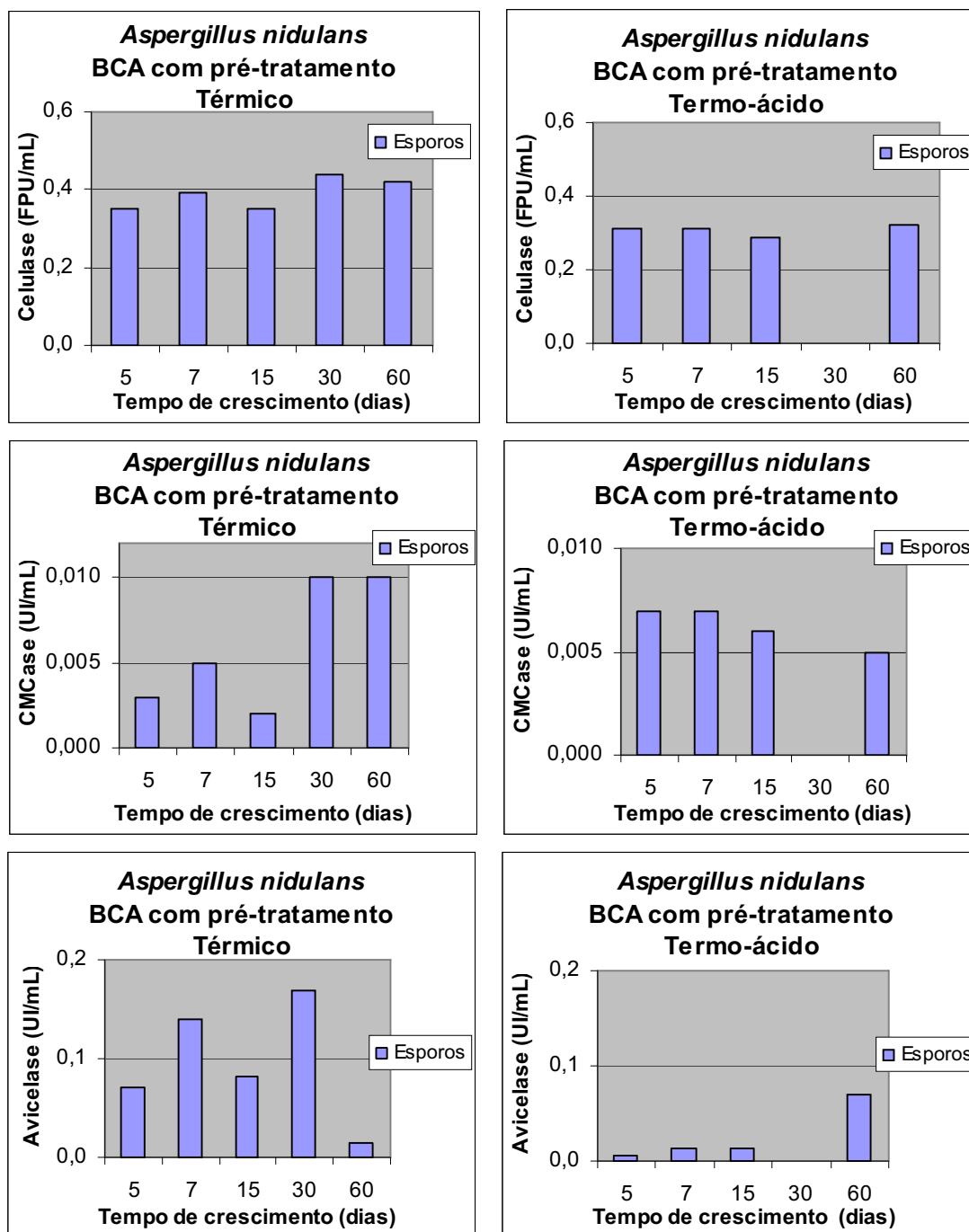


Gráfico 14: Atividade das enzimas celulase, CMCase e avicelase da cultura do fungo *A. nidulans*, suplementado com solução de sais e tartarato de amônio.

Os resultados referentes às atividades das enzimas celulolíticas para o fungo *T. terrestre* estão apresentados no **Gráfico 15**. Como pode ser observado, o comportamento foi muito semelhante àquele descrito para o fungo *A. nidulans*, pois as maiores atividades das enzimas celulolíticas foram obtidas também sobre o BCA com pré-tratamento térmico suplementado com solução de sais e tartarato de amônio. No entanto, houve variação no tempo de crescimento necessário para atingir os valores máximos das enzimas, sendo de 30, 5 e 60 dias respectivamente para celulase, CMCase e avicelase.

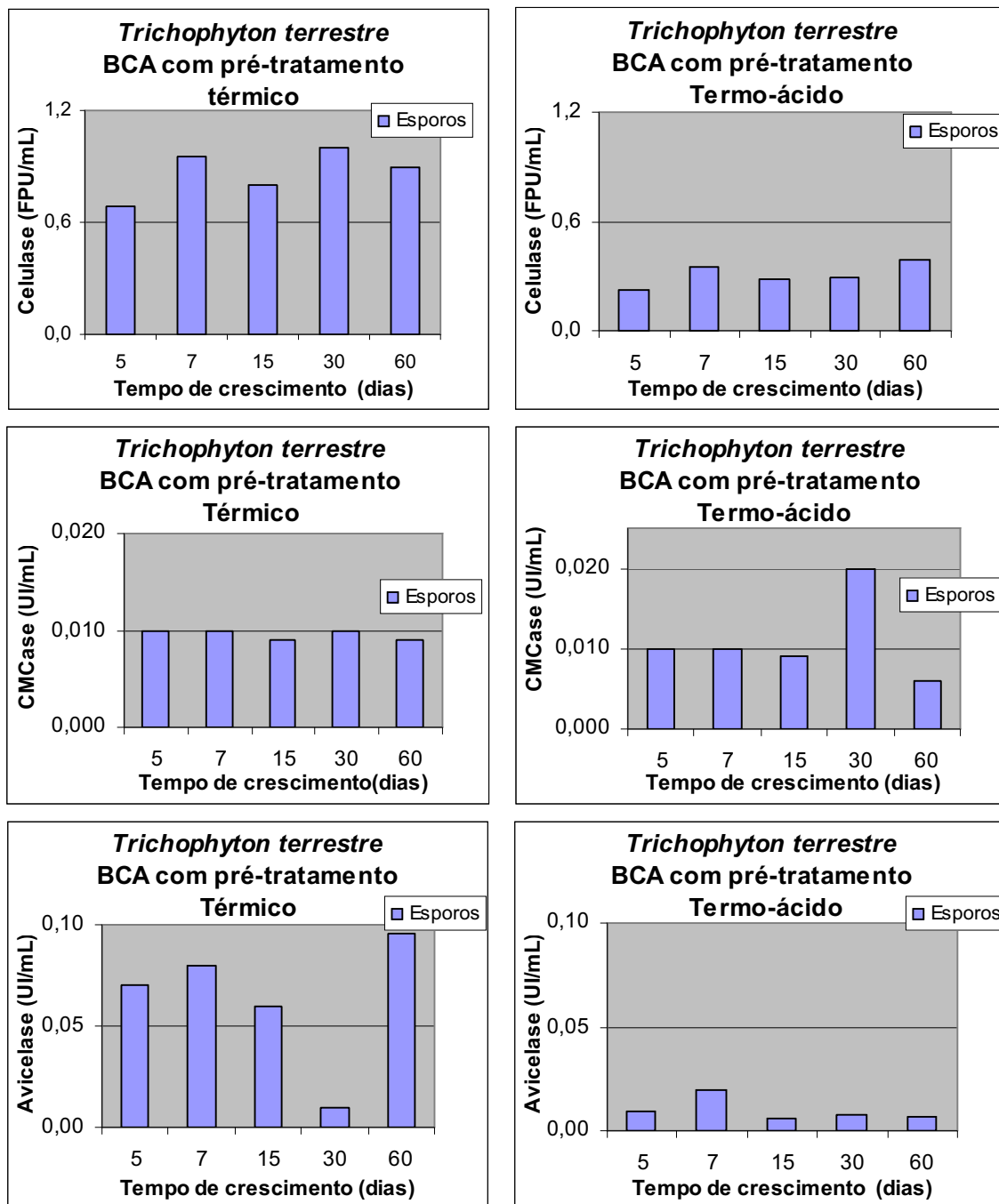


Gráfico 15: Atividade das enzimas celulase, CMCase e avicelase da cultura do fungo *T. terrestris*, suplementado com solução de sais e tartarato de amônio.

Para comparar os resultados referentes a atividade das enzimas nas diferentes condições de cultivo, foi montada a **tabela 3** que reúne os resultados da atividade das enzimas celulase, CMCase e avicelase, após o cultivo dos fungos *A. nidulans* e *T. terrestre* sobre o BCA (com pré-tratamento térmico e termo-ácido) e com ou sem suplementação do meio com solução de sais e fonte de nitrogênio. Como pode-se verificar a atividade das enzimas celulolíticas foi maior nas culturas crescidas sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido e não suplementadas com solução de sais e tartarato de amônio. Este resultado pode ser explicado em função do pH do filtrado, após o cultivo dos fungos nestas condições. Como pode ser observado, parece existir uma correlação positiva entre as menores atividades enzimáticas e o pH maior que 5,5, embora o pH 4,8 seja considerado o pH ótimo para atividade das enzimas celulolíticas para a maioria dos fungos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os fungos *A. nidulans* e *T. terrestre* apresentaram atividade celulolítica maior quando crescidos sobre o bagaço com pré-tratamento termo-ácido, mas não suplementado com fonte de nitrogênio. Para o *A. nidulans* os valores foram 0,74 FPU/mL para celulase total e 0,30 UI/mL para CMCase após respectivamente 15 e 30 dias de crescimento. Para o *T. terrestre*, os valores obtidos foram 0,57 FPU/mL e 0,36 UI/mL respectivamente para as enzimas celulase total e CMCase, quando o fungo cresceu por 15 dias.

A comparação destes resultados com a literatura é dificultada devido às diferenças no tipo de substrato, de microrganismo e das condições de cultivo utilizadas. Menezes et al., 1991 obtiveram valores próximos a 0,25 U/mL para a celulase total de *A. niger*, utilizando bagaço de cana pré-tratado com NaOH 4%. Farinas et al., 2008, também estudando o mesmo fungo, relataram que a atividade da celulase total foi inferior a 0,5 FPU/g quando o fungo cresceu sobre o bagaço de cana sem pré-tratamento. Por outro lado, Chandra et al., 2007 obtiveram valores máximos de atividade FPAse de 2,9 FPU/g e da CMCase de 3,24 U/g para o fungo *A. niger* crescido sobre farelo de trigo. Silva et al., 2005 mostraram que a produção de avicelase e CMCase do fungo *Thermoascus aurantiacus*, crescido sobre o bagaço de cana, foi 0,6 U/mL e 3 U/mL respectivamente. Grigorevski-Lima (2009) avaliando a produção de enzimas celulolíticas de *A. fumigatus* obtiveram níveis de 47 FPU/g após 3 dias de crescimento sobre bagaço de cana.

TABELA 3: Atividade das enzimas celulase, CMCase e avicelase, após o cultivo dos fungos *A. nidulans* e *Trichophyton* sobre o BCA (com e sem pré-tratamento ácido) com ou sem suplementação com solução de sais e tartarato de amônio como fonte de nitrogênio.

Fungo	BCA	Suplementação	pH	Celulase		CMCase		Avicelase	
				Atividade (FPU/mL)	Tempo (dias)	Atividade (UI/mL)	Tempo (dias)	Atividade (UI/mL)	Tempo (dias)
<i>A. nidulans</i>	SPT	-----	5,8	0,06	30	0,01	15	0,09	15
		Sais+NH ₄	6,4	0,44	30	0,01	30	0,17	30
	CPT	-----	1,3	0,74	15	0,30	30	0,20	60
		Sais+NH ₄	5,5	0,31	5	0,007	7	0,07	60
<i>T. terrestre</i>	SPT	-----	5,9	0,06	15	0,01	30	0,06	60
		Sais+NH ₄	5,7	0,09	30	0,01	5	0,09	60
	CPT	-----	1,4	0,57	15	0,36	15	0,2	60
		Sais+NH ₄	5,6	0,39	60	0,02	30	0,02	7

Para o fungo *A. nidulans*, Bagga e Sandhu, 1987 obtiveram valores máximos para celulase total e CMCase respectivamente 0,35 FPU/mL e 3 U/mL, quando o fungo cresceu sobre bagaço de cana deslignificado. Em relação ao fungo *Trichophyton terrestre* não há relatos na literatura sobre a produção de enzimas celulolíticas.

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que é possível a produção de enzimas celulolíticas a partir do cultivo dos fungos *A. nidulans* e *T. terrestre* sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido, não requerendo a sua neutralização como também a suplementação do meio com solução de sais e fonte de nitrogênio. Estes resultados mostram-se muito interessantes uma vez que representam uma economia de custo para a produção das enzimas celulolíticas de fungos, as quais seriam utilizadas para hidrolisar o BCA, possibilitando a utilização deste subproduto agroindustrial para a produção do bioetanol.

6.0 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- Dentre os fungos estudados os fungos *A. niger*, *A. nidulans* e *T. terrestre* mostraram-se como promissores produtores das enzimas celulolíticas em função do aumento da quantidade de AT liberado após 30 dias de cultivo.
- A hidrólise do BCA usando HCl 2,5% resultou em maior eficiência, ou seja, uma maior produção de AR em relação ao Fenol, sendo que a pré-incubação de 16 h na solução ácida não resultou em um aumento considerável deste parâmetro.
- Analisando a cultura dos fungos crescidos sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido, observou-se que o filtrado da cultura do fungo *A. niger* (crescida por 60 dias) poderia ser utilizado como meio fermentativo para a produção de bioetanol por leveduras em função da alta concentração de AR (12g/L) e baixa concentração de fenol (0,03g/L).
- A avaliação da atividade das enzimas celulolíticas mostrou que os fungos *A. nidulans* e *T. terrestre* apresentaram maior atividade celulolítica quando crescidos sobre o bagaço com pré-tratamento termo-ácido em comparação ao BCA com pré-tratamento térmico.
- A suplementação do BCA (com e sem pré-tratamento) com solução de sais e tartarato de amônio, como fonte de nitrogênio, resultou em uma redução na atividade das enzimas celulolíticas.

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que é possível a produção de enzimas celulolíticas a partir do cultivo dos fungos *A. nidulans* e *T. terrestre* sobre o BCA com pré-tratamento termo-ácido, não requerendo a sua neutralização como também a suplementação do meio com solução de sais e fonte de nitrogênio. Estes resultados mostram-se muito interessantes uma vez que representam uma economia de custo para a produção das enzimas celulolíticas de fungos, as quais seriam utilizadas para hidrolisar o BCA, possibilitando a utilização deste subproduto agroindustrial para a produção do bioetanol.

REFERÊNCIAS

- ALVES, L. A.; VITOLO, M.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of *Candida guilliermondii* as a function of different treatments of sugarcane bagasse hydrolysate employing experimental design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 403-413, 2002.
- ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; SILVA, S. S.; PRATA, M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 89-98, 1998.
- ATALLA, R. H.; HACKNEY, J. M.; UHLIN, I.; THOMPSON, N. S. Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. **International Journal Biology Macromolecular**, v.15, n. 2, p. 109-112, 1993.
- BAGGA, P. S.; SANDHU, D. K. Cellulase formation by *Aspergillus nidulans*. **Journal Fermentation Technology**, v. 65, p. 635-642, 1987.
- BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v.13, p. 25-58, 1994.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620, 1997.
- BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 3, p. 90-104, 1981.
- BOOTH, T. Strategies for study of fungi in marine and marine influenced ecosystems. **Reviews Microbiology**, v. 10, p. 123-138, 1979.
- BORRERO, M. A. V.; PEREIRA, J. T. V.; MIRANDA, E. E. An environmental management method for sugar cane alcohol production in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, p. 287-299, 2003.
- BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; CONVERTI, A.; VITOLO, M.; FELIPE, M. G. A.; ROBERTO, I. C.; SILVA, M. B.; MANCHILHA, I. M. Used of immobilized *Candida* yeast cells for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 489-496, 2002.

CHANDEL, A. K.; KAPOOR, R. K.; KUHAD, R. C.; SINGH, A. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947-1950, 2007.

CHANDRA, M. S.; VISWANATH, B.; REDDY, B. R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid sate fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 323-328, 2007.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p. 5-37, 2000.

CHANG, V. S.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, p. 135-159, 1998.

COLWELL, R. K. **User's guide to estimate S5 statistical**: estimation of species richness and shared species from samples. [S.l: s.n.], 1994-1997. Version 5.0.1. p. 22.

COVE, D. J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 113, p. 51-56, 1966.

DALMEIDA, M. L. O. **Celulose e papel**: tecnologia de fabricação da pasta celulósica. 2. ed. São Paulo: Senai, 1988. 992 p.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbiological Technology**, v. 19, p. 220-225, 1996.

DESVAUX, M. The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 373-385, 2005.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 1-33, 1996.

FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Disponível em: <http://www.cnpdia.embrapa.br/publicacoes/download.php3?file%3DBPD22_2008.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2010.

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

GAMA, F. M. P. **Mecanismo bioquímico da ação de celulases de *Trichoderma reesei***. 1996. 112 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 1996.

GÁMEZ, S.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Manufacture of fermentable sugar solutions from sugar cane bagasse hydrolyzed with phosphoric acid at atmospheric pressure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4172-4177, 2006.

GONG, C. S.; CHEN, C. S.; CHEN, L. F. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolyzate for ethanol production by yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 39-40, p. 83-88, 1993.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R. da; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, n. 12, p. 1-22, 2008.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; VINHA, F. N. M. da; SOUZA, D. T.; BISPO, A. S. R.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R.; NASCIMENTO, R. *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, p. 321-329, 2009.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 69, p. 375-384, 2005.

HINMAN, N. D.; WRIGHT, J. D.; HOAGLAND, W. Xylose fermentation: an economic analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 20-21, p. 391-410, 1989.

HO, N. W. Y.; CHEN, Z.; BRAINARD, A. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective co-fermentation of glucose and xylose. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1852-1859, 1998.

HON, D. N. S. (Ed.). **Chemical modification of lignocellulosic materials**. New York: Marcel Dekker, 1996. 370 p.

HSU, T. A.; LADISCH, M. R.; TSAO, G. T. Alcohol from cellulose. **Chemical Technology**, v. 10, n. 5, p. 315-319, 1980.

HSU, T. A. Pretreatment of biomass. In: WYMAN, C. E. (Ed.). **Handbook on bioethanol, production and utilization**. Washington , DC: Taylor & Francis, 1996. v. 1, cap. 10, p. 179-195.

KILICASLAN, I.; SARAC, H. I.; ÖZDEMİR, E.; ERMIS, K. Sugar cane as an alternative energy source for Turkey. **Energy Conversion and Management**, v. 40, p. 1-11, 1999.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by wood degrading fungi. In: YOUNG, R. A; AKHTAR, M. (Ed.). **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 273-307.

LADISCH, M. R.; LIN, K. W.; VOLOCH, M. Process considerations in enzymatic hydrolysis of biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, p. 82-102, 1983.

LEE, D.; YU, A. H. C.; WONG, K. K. Y. Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45-46, p. 407-415, 1994.

LYND, L. R.; CUSHMAN, J. H.; NICHOLS, R. J. Fuel ethanol from cellulosic biomass. **Science**, v. 251, p. 1318-1323, 1991.

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57-58, p. 741-761, 1996.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, K. M. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MANDELS, M.; HONTZ, L.; NYSTROM, J. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 16, p. 1471-1493, 1974.

MARTÍNEZ, E. A.; VILLARREAL, M. L. M.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; SOLENZAL, A. I. N.; CANILHA, L.; MUSSATTO, S. I. Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 3, n. 5, p. 295-301, 2002.

MENEZES, T. J. B.; HENNIES, P. T. Influência do pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com peróxido alcalino e hidróxido de sódio no sistema celulolítico de *A. niger*. **Coletânea do ITAL**, v. 21, n. 2, p. 213-219, 1991.

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

MOSIER, N. S.; HENDRICKSON, R.; WELCH, G. Corn fiber pretreatment scaleup and evaluation in an industrial corn to ethanol facility. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 25th, 2003, Breckenridge. **Abstracts of papers...** Breckenridge: Taylor & Francis, 2003. 6A-04b.

MOSIER, N.; HENDRICKSON, R.; DRESCHER, R.; DIEN, B. S.; BOTHAST, R. J.; WELCH, G.; LADISCH, M. R. Principles and economics of pretreating cellulose in water for ethanol production. In: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY MEETING, 225th, 2003, New Orleans. **Abstracts of papers...** New Orleans: Purdue University, 2003. AGFD – 103a.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Committee on biobased industrial products, biobased industrial products**: priorities for research and commercialization. Washington, DC: National Academy Press, 1999. 143 p.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 49-58, p. 98-100, 2002.

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, p. 171-207, 1997.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PANDEY, A.; SOCOOL, C. R.; NIGAM, P. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARISI, F. Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 38, p. 53-87, 1989.

PATURAU, J. M. **By-products of the cane sugar industry**: an introduction to their industrial utilization. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 1989. 435 p.

PIVKIN, M. V. Filamentous fungi associated with holothurians from the Sea of Japan, off the Primorye Coast of Russia. **Biological Bulletin**, v. 198, n. 1, p. 101-109, 2000.

RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M. Batch xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate at controlled pH values. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 26, p. 103-107, 2003.

RYDHOLM, S. A. **Pulping processes**. New York: Interscience, 1965. p. 3-90.

SEGEL, I. H. **Enzyme kinetics**: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York: Interscience, 1975. 957 p.

SILVA, E. M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A. M. F. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 283-288, 2005.

SILVA, L. A. D.; BRANDELLI, A. Produção de queratinase por *Aspergillus phoenicis* em diferentes meios de cultivo. In: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 2007, Curitiba. **Resumo...** Curitiba: [s. n.], 2007. 1 CD-Rom.

SILVA, R. da; YIM, D. K.; PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Humicola sp* for pulp improvement. **Journal Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 109-111, 1994.

SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial cellulases: protein architecture, molecular properties and biosynthesis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 40, p.1-44, 1995.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteau reagent. **Methods in Enzimology**, v. 299, p.152-178, 1999.

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

SREENATH, H. K.; JEFFRIES, T. W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 253-260, 2000.

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

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass Bioenergy**, v. 10, p. 367-375, 1996.

TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Conversion of dilute-acid hydrolyzates of spruce and birch to ethanol by fedbatch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 69, p. 59-66, 1999.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. 507 p.

WENZEL, H. F. **Chemical technology of wood**. New York: Academic Press, 1970. p. 32-245.

WOOD, T. M.; WILSON, C. A.; McCRAE, S. I. Synergism between components of the cellulase system of the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* and those of the aerobic fungi *Penicillium pinophilum* and *Trichoderma koningii* in degrading crystalline cellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 41, p. 257-261, 1994.

WYMAN, C. E. Economic fundamentals of ethanol production from lignocellulosic biomass. In: SADDLER, J. N.; PENNER, M. H. (Ed.). **Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates**. Washington, DC: American Chemical Society, 1995. p. 272-290. (ACS Symposium Series, 618).

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