SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) USANDO EXTRATO ENZIMÁTICO

CLAUDIO LIMA DE AGUIAR

Engenheiro Industrial Químico

Orientador: Prof. Dr. **TOBIAS JOSÉ BARRETO DE MENEZES**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de Concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro - 1998

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Aguiar, Claudio Lima de

Sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) usando extrato enzimático / Claudio Lima de Aguiar. - - Piracicaba, 1998.
77 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Aspergilo 2. Bagaço de cana-de-açúcar 3. Celulase 4. Celulose 5. Glicosidade
6. Sacarificação

CDD 633.61

DEDICO

Ao meus pais, LAUCIRO e IZABEL pelo incentivo e apoio em todos os momentos e que fizeram um sonho tornar realidade.

À RENATA, minha esposa, por sua compreensão e participação quase que ativa neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por mais essa etapa na minha vida.

Ao Prof. Dr. Tobias José Barreto de Menezes pela orientação e incentivo à elaboração deste trabalho e oportunidade desta especialização profissional.

Ao Prof. Dr. Jorge Horii pelo incentivo e pela amizade durante a execução deste trabalho.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em particular aos docentes, equipe técnica e companheiros do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição pelas ajudas prestadas ao longo deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro concedido através da bolsa de estudo.

À Destilaria Capuava (Piracicaba/SP) pelo fornecimento da matéria-prima, na forma de bagaço de cana, usada nesse trabalho.

Aos meus irmãos e à família Brancalion pela presença amiga.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 A matéria-prima e seus componentes estruturais.....	5
3.1.1 Celulose.....	9
3.1.2 Hemicelulose.....	12
3.1.2.1 Xilanas.....	13
3.1.2.2 Mananas.....	14
3.1.3 Lignina.....	15
3.2 Degradação dos componentes lignocelulósicos.....	19
3.2.1 Susceptibilização da fibra vegetal ao tratamento físico e/ou químico.....	19
3.2.2 Fontes de carbono na indução à síntese de enzimas celulolíticas.....	23
3.2.3 Decomposição da estrutura celulósica por via enzimática.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Microrganismos.....	37
4.2 Bagaço de cana-de-açúcar.....	37
4.3 Extratos celulolíticos.....	38
4.4 Meios de cultura.....	38

4.4.1	Meio de manutenção de <i>Aspergillus niger</i> IZ-09.....	38
4.4.2	Meios líquidos para produção de celulase.....	39
4.4.2.1	Com diferentes fontes de carbono.....	39
4.4.2.2	Com papel de filtro de alta pureza.....	39
4.5	Preparação do bagaço de cana-de-açúcar.....	40
4.5.1	Moagem.....	40
4.5.2	Pré-tratamentos químicos.....	41
4.6	Influência da temperatura na atividade e estabilidade do extrato bruto de celulase total.....	42
4.7	Delineamentos experimentais.....	43
4.7.1	Planejamento fatorial para avaliar a influência do nível de purificação do extrato celulolítico e da temperatura na sacarificação de bagaço de cana.....	43
4.7.2	Planejamento fatorial para avaliar o efeito da FPase e β -glicosidase na sacarificação de bagaço de cana.....	44
4.8	Determinações analíticas.....	45
4.8.1	Determinação da porcentagem de sacarificação do bagaço de cana.....	45
4.8.2	Determinação do teor de celulose no bagaço de cana.....	46
4.8.3	Determinação do teor de lignina no bagaço de cana de cana.....	47
4.8.4	Deteminação da atividade de FPase.....	48
4.9	Análise estatística.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49

5.1	Porcentagem de celulose e lignina presentes no bagaço de cana utilizados.....	49
5.2	Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de FPase.....	50
5.3	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da FPase do extrato fúngico.....	53
5.4	Efeito da temperatura e do tipo de extrato celulolítico na sacarificação de bagaço de cana.....	56
5.5	Influência da FPase e β -glicosidase sobre a sacarificação de bagaço de cana.....	59
6	CONCLUSÕES.....	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

SACARIFICAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.) USANDO EXTRATO ENZIMÁTICO

Autor: CLAUDIO LIMA DE AGUIAR

Orientador: Prof. Dr. TOBIAS J. BARRETO DE MENEZES

RESUMO

Com objetivo de estudar a sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado e não tratado, diversos experimentos foram conduzidos para avaliar a influência do tipo de enzima (preparado comercial de *Trichoderma viride* e extrato de cultura fúngica de *Aspergillus niger*) e da temperatura de trabalho na porcentagem de sacarificação. Nenhuma diferença foi observada entre a celulase da cultura fúngica e o preparado comercial quando foram aplicadas com a mesma atividade. O estudo da influência da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima do extrato fúngico mostrou que embora a atividade tenha alcançado valor máximo de 0,44 UI/mL, à 60 °C, a estabilidade foi baixa nesta temperatura. Contudo, a 50 °C a atividade enzimática foi menor, de 0,33 UI/mL, mas a estabilidade foi maior. Dentre os pré-tratamentos empregados no bagaço, aquele que incluiu o hidróxido de sódio, ácido fosfórico e vapor propiciou maior susceptibilidade do que o tratamento com apenas hidróxido de sódio e a testemunha (sem tratamento). A adição de preparado comercial de β -glicosidase aumentou a porcentagem de sacarificação. Porcentagem de sacarificação máxima de 59,5% foi obtida com o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácidos e vapor utilizando preparados comerciais de *T. viride* e de β -glicosidase nas concentrações de 0,04 e 0,004 g por grama de bagaço respectivamente.

HYDROLYSIS OF SUGARCANE (*Saccharum* spp.) BAGASSE USING ENZYMATIC EXTRACT

Author: CLAUDIO LIMA DE AGUIAR

Adviser: Prof. Dr. TOBIAS J. BARRETO DE MENEZES

SUMMARY

With the aim of studying the enzymatic hydrolysis of treated and non-treated sugarcane bagasse, several experiments were carried out in order to evaluate the influence of the type of enzyme (commercial preparation of *Trichoderma viride* and fungal extract of *Aspergillus niger*) and the temperature. No difference was observed between the fungal extract and the commercial preparation when used with the same activity. The study of the influence of the temperature on the activity and stability of the enzymatic fungal extract showed that although at 60 °C the activity reached a maximum value of 0.44UI/mL the stability was lower at this temperature. However, at 50°C the enzymatic activity was lower (0.33UI/mL), but the thermal stability was higher. Of the bagasse pre-treatments, that which included sodium hydroxide, phosphoric acid and steam resulted in higher enzymatic susceptibility than in that treated with only sodium hydroxide and in the control (non-treated). The addition of a commercial preparation of β -glucosidase increased the saccharification. A maximum saccharification of 59.5% was obtained in the bagasse treated with soda, acid and steam, using commercial preparations of *T. viride* and β -glucosidase at concentrations of 0.04 and 0.004 g/g of bagasse, respectively.

1 INTRODUÇÃO

O problema que o acúmulo de grandes quantidades de resíduos provoca à natureza, só poderia ser minimizado se esses resíduos pudessem ser convertidos em produtos de maior valor agregado. A maior conscientização dos consumidores da necessidade da preservação do meio ambiente faz com que as empresas dêem devida atenção a esse assunto. Na medida que a conservação dos recursos naturais e a proteção do meio ambiente vão se tornando uma questão de crescente importância, abre-se o caminho para uma pesquisa mais intensa voltada para uma tecnologia alternativa. Em decorrência da produção de álcool etílico a partir da cana-de-açúcar, avalia-se que, da quantidade de bagaço processado e utilizado para alimentar as fornalhas das destilarias autônomas há um excedente de aproximadamente 30%, que poderia ser utilizado para sacarificação e posterior fermentação.

A bioconversão de compostos residuais das agroindústrias têm sido extensivamente estudada devido às possibilidades de obtenção de compostos de maior valor agregado. Dentre os muitos resíduos das

agroindústrias, destaca-se o bagaço de cana-de-açúcar. Contudo, apreciável volume é vendido a preço simbólico para indústrias de suco de laranja, mas poderia ter outro destino, convertendo-o a produtos de interesse sócio-econômico. Na Figura 1, são mostrados alguns dos produtos que podem ser obtidos a partir da conversão de um resíduo celulósico, como o bagaço de cana-de-açúcar.

No entanto, os materiais celulósicos, como bagaço de cana, apresentam vários problemas em relação à susceptibilidade à hidrólise. Problemas como a estreita associação entre a celulose e a lignina e outros polissacarídeos da parede celular. O complexo lignina-celulose torna o material celulósico difícil de ser digerido, pois a lignina age como uma barreira, impedindo o ataque enzimático aos componentes da parede celular do bagaço. Quanto maior a quantidade de lignina menor será a digestibilidade dos materiais lignocelulósicos.

Portanto, o tratamento do substrato é o pré-requisito essencial para aumentar a susceptibilidade dos materiais lignocelulósicos à ação enzimática. Dentre os muitos tratamentos propostos na literatura mundial, o tratamento com hidróxido de sódio (NaOH) sob pressão tem sido utilizado com êxito, sendo que outros pré-tratamentos podem ser utilizados. A matéria-prima tratada é convenientemente utilizada como substrato para desenvolvimento de fungos como, *Aspergillus niger*, conseqüentemente produção de enzimas celulolíticas, que são utilizadas na conversão da matriz celulósica a açúcares redutores.

Figura 1 - Possíveis produtos obtidos de um resíduo lignocelulósico

A preocupação ambiental, provocada pelo acúmulo de resíduos, possibilita o uso de enzimas como um sistema não agressor, visto que, as enzimas constituem-se de sistemas naturais e sua degradação libera aminoácidos facilmente absorvidos pela natureza. Além do mais, as enzimas são catalisadores muito eficientes e, ao contrário, dos catalisadores inorgânicos, são específicas, reduzindo o número de subprodutos indesejáveis, comuns nas catálises inorgânicas, além de atuarem sob pressão atmosférica e condições amenas de temperatura e pH. Desta forma, os processos enzimáticos poderão se tornar mais viáveis economicamente, devido aos menores custos em equipamentos menos exigentes em termos de resistência ao calor, pressão e corrosão.

Considerando-se a possibilidade de uso do bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de compostos de interesse econômico torna-se interessante avaliar alguns fatores que influenciam a sacarificação da celulose deste resíduo.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi produzir extrato celulolítico de *Asperillus niger* estudando a influência da fonte de carbono na produção de enzima e o efeito da temperatura na sua atividade e estabilidade. O potencial de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar tratado e não tratado foi então avaliado pela utilização do extrato fúngico em comparação com preparado comercial de *Trichoderma viride*, complementado ou não com preparado comercial de β -glicosidase.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A matéria-prima e seus componentes estruturais

Em geral, as culturas agrícolas produzem uma quantidade de sobras muito maior do que a parte utilizada para fins alimentícios ou industriais. Cerca de 95% da produção agrícola são constituídos de palhadas ou resíduos industriais (Sales et al., 1987). Resíduos orgânicos são abundantes e podem ser utilizados para produção de glicose e produtos derivados e estima-se que $1,8 \times 10^{12}$ toneladas de celulose são biossintetizadas anualmente (Alfani & Cantarella, 1987).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das espécies com maior taxa de assimilação fotossintética e, conseqüentemente, capacidade para produzir biomassa contendo açúcar, amido, proteínas e lignocelulose. A importância dos derivados da lignocelulose tem aumentado cada vez mais e, progressivamente alcançado um nível comparado ao do açúcar (Hernandez Ramirez, 1988).

Segundo Dueñas et al. (1995) o bagaço de cana-de-açúcar é uma fonte de baixo custo contendo 75% de celulose e hemicelulose hidrolisáveis que podem ser convertidas à produtos mais nobres, tais como alimentação animal ou combustível, ou poderia ser usado como substrato para produção de celulase. Para Carvalho (1990) o bagaço de cana pode ser empregado como matéria-prima em aplicações que não constituem uso industrial propriamente dito. Entre as aplicações mais promissoras destacam-se a formulação de ração animal para criação de gado de corte em regime de confinamento e a obtenção de compostos fertilizantes. Assim, durante a entressafra da carne, quando há escassez de pastos, existe a disponibilidade do excedente de bagaço nas usinas e destilarias, podendo ser empregado na produção de ração animal. Entretanto, o bagaço *in natura* é um alimento de baixa digestibilidade sendo necessário passar o resíduo por alguma espécie de tratamento, que pode ser de natureza química e/ou física. A utilização agrícola de bagaço, através de uso imediato ou com prévia decomposição em diferentes proporções, melhorariam a condição física do solo e a liberação dos nutrientes para os sistemas radiculares da cana-de-açúcar. A compostagem proporciona a formação de um produto semelhante à torta de filtro, após um período de 95 dias de maturação do material.

Além do bagaço de cana, outros materiais como, polpa de madeira, algodão, palha, papel, sabugo, poderiam ser explorados em grande escala através da hidrólise enzimática. A sacarificação da celulose permitiria o uso da glicose, obtida pelo processo hidrolítico, na alimentação ou outros produtos obtidos por via biotecnológica. No Brasil, são diversos os subprodutos e resíduos com potenciais de uso (Vitti, 1988). Para Lahr Filho

et al. (1996), o Brasil, é um país privilegiado quanto ao aproveitamento dos subprodutos obtidos no processamento da cana, devido ao grande volume gerado. Carvalho (1997) responsabiliza o lançamento do PROÁLCOOL em 1975/76, pelo crescimento constante da produção de cana-de-açúcar e, conseqüentemente, o inevitável acúmulo de resíduos.

Como matéria-prima industrial, a quantidade de bagaço de cana utilizada ainda não é grande, apesar das possibilidades. Entre os possíveis processos de aproveitamento pode-se citar a sua utilização para a produção de papel e celulose, furfural, metanol, etanol, produtos oriundos da hidrólise do bagaço. As perspectivas do uso do bagaço de cana podem ser divididas em dois grupos: como matéria-prima industrial ou como insumo energético (Russomano, 1987).

Na Tabela 1, são mostradas as composições químicas típicas dos principais materiais lignocelulósicos, indicando que o bagaço de cana apresenta valores médios próximos às outras fontes lignocelulósicas, o que torna viável seu uso em função da disponibilidade desta fonte, nas usinas e destilarias brasileiras.

Tabela 1. Composições químicas típicas de diferentes fibras vegetais.

Componente (%)	Madeira dura (<i>Eucaliptus</i>)	Madeira mole (<i>Pinus</i>)	Bagaço de cana	Palha de milho
Celulose	34 - 38	40 - 45	30 - 39	45
Hemicelulose	20 - 25	10 - 13	24 - 30	35
Lignina	20 - 29	26 - 34	18 - 22	15
Cinzas	0,3 - 1,2	0,2 - 0,8	1 - 4	4,5

Fonte: Carvalho (1981)

A composição do bagaço é influenciada pela variedade da cana, sua maturidade, métodos de colheita e eficiência da unidade de moagem da usina e/ou destilaria (Hernandez Ramirez, 1988; César & Silva, 1993), e pode também apresentar variações quando este tiver sido submetido a pré-tratamentos químicos e/ou físicos, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Composição de bagaço de cana em diversos tipos de pré-tratamentos.

Componente (%)	Bagaço lavado e moído*	Bagaços pré-tratados			
		Álcali* (NaOH)	Álcool e éter	EDTA*	Auto-hidrólise (200 °C; 20 min.)**
celulose	31	38	37	38	45
hemicelulose	21	24	24	23	25,8
lignina	7,5	6,2	5,7	5,0	19,8
cinzas	2,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. valores não determinados

Fonte: * Menezes & Hioshii (1982), ** Targonski (1985)

Camargo (1990) afirma que o bagaço de cana é composto

basicamente de três polímeros naturais: celulose, hemicelulose e lignina, em uma proporção de 50:30:20, respectivamente. Playne (1983) afirma que bagaço de cana contém, em relação à sua matéria seca, cerca de 40% celulose, 27% de hemicelulose, 20% lignina e 13% de substâncias solúveis em água.

A fibra vegetal é um substrato único para microrganismos porque contém excepcionalmente grande quantidade de celulose na forma de microfibrilas que está ligada à outras duas frações poliméricas; hemiceluloses e lignina (Tsuneda & Thorn, 1995).

Convém neste momento, descrever algumas características de cada componente da fibra vegetal.

3.1.1 Celulose

Celulose é o principal componente da parede celular de todas as plantas. Na fibra do algodão há 98%, no linho 80%, na juta 65%, na madeira 50%, na palha de cereais 45% e no bagaço de cana 39% (Gutierrez, 1997). O fato de que é insolúvel em água, solventes orgânicos e soluções alcalinas somando-se ainda sua resistência aos efeitos de agentes oxidantes, distingue a celulose do restante dos componentes químicos. Quimicamente, celulose é definida como um homopolímero de D-glicose (Hernandez Ramirez, 1988). Ou ainda, celulose é um polissacarídeo formado por unidades do monossacarídeo β -D-glicose, que se ligam entre si através dos carbonos 1 e 4, dando origem a um polímero linear (Whistler & Corbett, 1957; Halliwell, 1965 e Fengel & Wegener, 1989).

As moléculas de celulose tendem a formar pontes de hidrogênio intra e intermoleculares. O primeiro tipo de interação é responsável por uma certa rigidez das cadeias unitárias e o segundo pela formação da fibra vegetal, ou seja, as moléculas de celulose se alinham, formando as microfibrilas, as quais formam as fibrilas que, por sua vez, se ordenam para formar as sucessivas paredes celulares da fibra. As fibras são constituídas de regiões cristalinas (altamente ordenadas) e amorfas (desordenadas). Na região cristalina, a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (adsorção de solvente). A resistência à tração na região cristalina é quinze vezes o valor apresentado na região amorfa, onde a fibra tem sua maior flexibilidade (Carvalho, 1981).

A Figura 2 mostra a estrutura genérica de um fragmento de celulose, enquanto que na Figura 3 é mostrada a formação da fibra de celulose.

Figura 2 - Estrutura genérica de fragmento celulósico (Carvalho, 1981).

Figura 3 - Formação da fibra celulósica (Carvalho, 1981)

As cadeias de celulose são longas e compostas por fibrilas densamente empacotadas (Fengel & Wegener, 1989). Este empacotamento é devido à presença de pontes de hidrogênio entre as moléculas de celulose, mas certa porção molecular não apresenta configuração ordenada, apresentando cadeias interligadas de maneira caótica formando a celulose amorfa (Fengel & Weneger, 1989; Gutierrez, 1997).

3.1.2 Hemicelulose

O nome hemicelulose foi proposto por Schulze em 1891 para designar os polissacarídeos extraídos de plantas com solução alcalina (Gutierrez, 1997). Hemicelulose constitui-se de uma série de polissacarídeos não celulósicos de baixo peso molecular, intimamente associados à celulose, cuja composição tem as seguintes características em comum: são solúveis em solventes orgânicos como etanol, reagem com ácidos e são decompostos em açúcares e furfural. Estas propriedades a distingue analiticamente de outros componentes químicos do bagaço. O polissacarídeo predominante no bagaço é o tipo xilana, que apresenta cadeia polimérica curta, peso molecular viscosimétrico médio dentro de uma faixa de 10000 a 20000 e proporção de 25 a 27% (Janes, 1969; Woodward, 1984; Dekker, 1985 e Hernandez Ramirez, 1988). Segundo Palma (1993), é considerado o segundo polissacarídeo mais importante da parede celular de vegetais.

A hemicelulose é composta normalmente de dois a seis açúcares diferentes, com um grau de polimerização de aproximadamente 200 (Bastawde, 1992). Empiricamente, segundo Thompson (1983), pode-se classificar estes açúcares como glicanas, xilanas, mananas, galactanas e galacturanas. Acrescenta-se que as diferenças da hemicelulose em relação à celulose estão na composição básica e na estrutura, na capacidade de se dissolver em base forte e também pelo fato da hemicelulose ser mais facilmente hidrolisada por ácidos. Palma (1993), ressalta que os açúcares da fração hemicelulósica são recuperados com maior facilidade que a glicose da fração celulósica, pois a velocidade de hidrólise da hemicelulose é maior devido a sua estrutura ser mais acessível aos processos físicos, químicos e enzimáticos.

As hemiceluloses mais comuns da biomassa são xilanas e mananas e serão mencionadas separadamente, levantando-se suas características particulares.

3.1.2.1 Xilanas

São polissacarídeos formados por cadeias lineares de unidades de xilose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Em geral, a cadeia de xilana apresenta em intervalos irregulares, grupos de ácido 4-o-metilglicurônico ligados a unidades de xilose, através de ligação glicosídica α -1,2. A maioria destas xilanas isoladas possui uma proporção média de dez unidades de xilose para uma de ácido glicurônico. O grau médio de polimerização do esqueleto de xilanas situa-se entre 100 e 200, dependendo

da espécie e do modo de isolamento (Carvalho, 1981). A Figura 4, mostra a estrutura molecular da xilana (Whistler & Corbett, 1957).

Figura 4 - Estrutura molecular de um fragmento de xilana (Whistler & Corbett, 1957)

3.1.2.2 Mananas

São polissacarídeos formados por uma cadeia linear de unidades de manose e glicose ligadas entre si por ligações do tipo β -1,4. As mananas por vezes são chamadas por glicomananas que formam cadeias muito pouco ramificadas. Em geral, a proporção entre as unidades de manose e glicose está entre 1,5 a 2 para 1, sendo seu grau médio de polimerização de 60 a 70 (Carvalho, 1981). Na Figura 5, está representada a estrutura molecular da manana (Whistler & Corbett, 1957).

Figura 5 - Estrutura molecular de um fragmento de manana (Whistler & Corbett, 1957)

3.1.3 Lignina

Lignina é o terceiro componente mais importante do bagaço, cerca de 20 a 22%, incluindo uma série de polímeros amorfos, reticulados com um alto peso molecular sendo basicamente de natureza fenólica (Hernandez Ramirez, 1988). A Figura 6, representa a estrutura de lignina, proposta por E. Adler (Fengel & Weneger, 1989). Este componente da fibra confere rigidez à parede da célula, agindo como um agente permanente de ligação entre as células, gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e dobra. Responsabiliza-se essas características à composição da lignina, que é formada por precursores como: álcool trans-sinapílico, álcool trans-coniferílico e álcool trans-para-cumárico (Milagres, 1994). A Figura 7, mostra as estruturas químicas dos precursores da molécula de lignina. Tecidos lignificados resistem ao ataque de microrganismos, impedindo a penetração de enzimas destruidoras da parede celular. A lignina está concentrada principalmente nos espaços entre as paredes das células adjacentes (lamela média) e na camada S₂ da parede celular onde é

depositada durante a lignificação dos tecidos vegetais, embora alguma lignina está também depositada em outras camadas. É formada pela polimerização desidrogenativa de álcoois p-hidroxicinâmicos. Por exemplo, a lignina guaiacil-siringil-p-hidroxifenólica, a qual é encontrada em gramíneas, como a cana-de-açúcar, é composta de uma mistura de polímeros desidrogenados de álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumarílico (Chahal, 1991). A lignificação da parede celular é obviamente um fator muito importante que contribui para a resistência natural dos vegetais à decomposição fúngica (Chahal, 1991). A Figura 8 ilustra esquematicamente a estrutura de uma célula lignificada (Jurasek et al., 1987). A estrutura intracristalina torna a fibra vegetal altamente resistente a qualquer ataque microbiano (Tsuneda & Thorn, 1995).

Além disso, celulose ocorre naturalmente associada com hemiceluloses e lignina, que é particularmente difícil de ser degradada, e sua associação com celulose reduz muito a acessibilidade de celulasas ao polissacarídeo (Cuskey et al., 1983).

Figura 6 - Modelo estrutural molecular para a lignina segundo E. Adler
(Fengel & Weneger, 1989)

Figura 7 - Precursores da molécula de lignina (Milagres, 1994)

Figura 8 - Apresentação esquematizada da estrutura lignocelulósica da fibra vegetal (Jurasek, 1987; Da Silva et al., 1997)

3.2 Degradação dos compostos lignocelulósicos

3.2.1 Susceptibilidade da fibra vegetal ao tratamento físico e/ou químico

Em razão da presença muito grande de grupos hidroxílicos (OH) na molécula de celulose, esta possui polaridade e atrai água de soluções aquosas. Quando a fibrila celulósica adsorve água ela apresenta um aumento de dimensões, principalmente no seu diâmetro. Esta variação dimensional é chamada inchamento (“swelling”). O inchamento geralmente ocorre devido a penetração de água entre as microfibrilas das regiões amorfas da celulose, sendo chamado de inchamento intercrystalino, entretanto, a água pode penetrar também entre as microfibrilas das regiões cristalinas, causando o chamado inchamento intracrystalino. Se uma fibra de celulose completamente seca é exposta a uma atmosfera com umidade relativa de 100%, seu diâmetro pode aumentar aproximadamente de 20 a 25%, devido à absorção de água. O intumescimento intercrystalino da celulose também pode ser causado por substâncias orgânicas, tais como: metanol, etanol, anilina, benzaldeído e nitrobenzeno. Normalmente, quanto maior a polaridade do agente empregado maior a extensão do intumescimento. Dos agentes citados, a água é a que causa maior intumescimento intercrystalino na celulose, sendo seu poder intumescedor aumentado pela adição de ácidos, de bases ou de sais inorgânicos. O intumescimento intracrystalino pode ser efetuado pelo uso de soluções concentradas de ácidos ou bases e ainda, de soluções de alguns sais

(Barrichelo & Brito, 1985).

Uma vez que a estrutura das fibras celulósicas naturais é bastante heterogênea, é compreensível supor-se que existem regiões de variável acessibilidade aos reagentes químicos. O inchamento da celulose, principalmente o intracristalino, aumenta a acessibilidade dos reagentes e, como consequência a reatividade. Por essa razão em geral, utiliza-se de soluções cáusticas para a indução desse fenômeno. Os pré-tratamentos para inchamento da celulose são práticas usuais na indústria de derivados de celulose, pois isso aumenta a reatividade da celulose. O inchamento intramolecular, expõe as superfícies das fibrilas aos reagentes e, assim cada fibrila reage ao longo de seu comprimento. Há diversos tipos de reações de rompimento da ligação glicosídica, podendo ocorrer pela ação de ácidos, bases, compostos oxidantes, microrganismos e, mesmo, pela ação mecânica. A degradação hidrolítica refere-se à cisão da ligação acetal da cadeia de celulose pela ação de um ácido ou base. Em geral, a hidrólise leva a um aumento no poder de redução da mistura reativa devido ao aumento do número de grupos redutores (Barrichelo & Brito, 1985).

Devido à natureza lignocelulolítica da maioria dos resíduos, eles necessitam de algum tratamento físico, químico ou biológico para melhorar o aproveitamento do seu conteúdo energético e de nutrientes. Um dos processos mais antigos empregados para deslignificar os resíduos celulósicos consiste em umidificá-los com solução de hidróxido de sódio (Sales et al., 1987).

Com um tratamento químico (ácido ou alcalino) mais brando, pode-se reduzir os efeitos indesejáveis da hidrólise da celulose como

formação de diversos subprodutos, porém sua ação possibilita uma maior acessibilidade ao ataque de extratos enzimáticos como o complexo celulolítico, sendo considerado como um pré-tratamento da celulose.

O tratamento do bagaço de cana com solução de hidróxido de cálcio a 2% apresentou bons resultados na susceptibilidade da celulose ao ataque de linhagens de *Aspergillus* sp. quando Gupta & Madamwar (1997) examinaram a produção enzimática neste substrato. Van Walsum et al. (1996) utilizaram um tratamento com água (220 °C, 5 MPa e 120 s) para acondicionar bagaço de cana, predispondo as fibras celulósicas à hidrólise enzimática e simultânea fermentação a etanol. O hidrolisado produzido, segundo os autores, mostrou leve inibição à fermentação alcoólica. Tang et al. (1996) afirmam que as mudanças na cristalinidade, distribuição dos tamanhos de grãos, características morfológicas e grau de polimerização são dependentes, e em grande parte, limitados pelas conformações polimórficas da celulose.

As soluções básicas fortes como, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e hidróxido de cálcio dissolvem consideráveis quantidades de compostos lignocelulósicos à temperatura ambiente. Os polissacarídeos sofrem o maior ataque e a lignina é parcialmente atacada. Aumentando-se a concentração da base ou a temperatura poderá ocorrer hidrólise da celulose (Barrichelo & Brito, 1985).

Bagaço de cana pré-tratado com solução de etilenodiamina a 28% seguido de aquecimento a 121 °C e 15 minutos, propiciou índices de sacarificação de 60% (Menezes & Hioshii, 1982).

Ahn et al. (1995) sugerem que diversos métodos de tratamento da casca de mandioca, tais como modificação alcalina, antioxidantes, fervura rápida, extrusão, uso de celulases fúngicas, são utilizados como processamento prévio à sacarificação do substrato. A aplicação de celulase e β -glicosidase promoveu a digestão dos materiais celulósicos presentes na casca de mandioca, tornando possível a sacarificação do amido.

Para Wyk & Botha (1997) as pontes de hidrogênio são principalmente responsáveis pela dificuldade de degradação da fração cristalina da celulose. Shikata & Nisizawa citados por Wyk & Botha (1997) afirmaram que ambas exo e endoglicanases podem atacar a fração amorfa primeiro seguido pela hidrólise da fração cristalina liberando glicanas solúveis, celobiose e glicose. Resistência da celulose ao ataque da celulase poderia ser relacionado à parâmetros estruturais tais como a fração cristalina, como citado no item 3.1.1, sendo que esta resistência varia de um material celulósico para outro (Wyk & Botha, 1997).

Tem sido mostrado que pré-tratamento do bagaço de cana com ácido fosfórico, aumentou consideravelmente o valor nutricional do bagaço, implicando numa maior susceptibilidade da celulose (Deschamps et al., 1996).

3.2.2 Fontes de carbono na indução à síntese de enzimas celulolíticas

Os resíduos agrícolas podem ser devidamente moídos ou triturados para servir como fonte de nutrientes, principalmente de carbono, em fermentação submersa (Da Silva et al., 1994). A maioria das enzimas comerciais são obtidas por fermentação submersa, uma vez que os métodos modernos de controle de fermentação são mais facilmente adaptadas ao mesmo, obtendo rendimentos maiores e os custos e riscos de contaminação são reduzidos (Fernandes-Salomão et al., 1996).

A quantidade e propriedades das celulasas produzidas por microrganismos dependem das condições de cultivo, sendo que os fatores ambientais influem na produção de celulase e xilanase de diversos fungos celulolíticos. Geralmente, as celulasas são produzidos por cultura de organismos em meio líquido (estacionário, com agitação ou submersos com aeração) (Draetta & Lobo Filho, 1980; Neder, 1992).

Há na natureza, um grande número de espécies de microrganismos que podem hidrolisar a celulose, porém um número bem reduzido consegue degradar o complexo ligno-hemicelulósico (Menezes & Hioshii, 1982). Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria para a produção de celulasas (Novo Nordisk, 1996). Os principais microrganismos produtores de enzimas, como as celulasas e xilanase, são listados a seguir. Celulolíticos: *Trichoderma reesei* (também denominado *Trichoderma viride*), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulvurulentum* (também denominado *Chrysosporum lignorum*), *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*,

Aspergillus sp., *Schizophyllum* sp., *Chaetomium* sp. (Bisaria & Ghose, 1981), *Humicola* sp. (Da Silva et al., 1994). As xilanases são as principais hemicelulases estudadas. Elas são encontradas em várias bactérias tais como as dos gêneros *Bacillus* sp., *Bacteroides* sp., *Ruminococcus* sp., *Clostridium* sp. (Bisaria & Ghose, 1981) e fungos dos gêneros *Myrothecium* sp., *Humicola* sp. e *Penicillium* sp. (Da Silva et al., 1994). Algumas leveduras como as do gênero *Trichosporium* sp. também produzem xilanases e celulasas. Diversos espécies de *Aspergillus* produzem altos níveis de β -glicosidase (Stevens & Payne, 1977).

Diversos substratos são utilizados em diferentes concentrações com o objetivo de se obter grandes quantidades de enzimas celulolíticas por microrganismos. Porém a eficácia de materiais celulósicos como indutores enzimáticos parece depender de sua susceptibilidade ao ataque pelo fungo (Vitti, 1988).

Segundo Lowe et al. (1987), atividades celulolíticas e xilanolíticas têm sido obtidas *in vitro* com papel de filtro e celulose microcristalina produzidas por *Neocallimastix frontalis*. Linardi & Rogana citados por Vitti (1988), compararam a produção do componente C₁ (exo- β -1,4-glicanase), em quatro diferentes meios de cultura (Czapek, Reese, Básico líquido, Eggins), pelo fungo *Trichoderma reesei* QM6a e verificaram que tanto meio Reese como Czapek mostraram-se bons indutores desse componente. Trivedi & Rao citados por Vitti (1988), observaram que açúcares como glicose, sacarose, maltose e arabinose, não induziram a formação de celulase por *Aspergillus fumigatus*. Altos níveis da enzima foram observados quando celulose insolúvel foi usada como fonte de

carbono. Joglekar & Karanth citados por Vitti (1988), citam que o desenvolvimento de *Penicillium funiculosum* UV-49 em algodão, papel de filtro, bagaço de cana e carboximetilcelulose foi pobre e a atividade celulolítica baixa. Porém, Dekker citado por Vitti (1988), observou que as celuloses que não são facilmente hidrolisadas pelas celulasas, como Avicel, algodão, celulose em pó, carboximetilcelulose, parecem ser os melhores substratos para induzir a formação de celulase. Gong & Tsao (1975) observaram que indutores da síntese de celulasas incluem celulose, derivados de celulose, celobiose, soforose e lactose.

A resposta das células fúngicas para diferentes indutores varia dependendo da concentração e tipo do indutor, ou pela presença de glicose ou outros açúcares no meio de crescimento. Os indutores da síntese de celulase tem duas funções, podendo servir como fonte de carbono para o crescimento celular, ou mesmo como indutores da síntese de celulase (Gong & Tsao, 1975).

Atualmente, observa-se em muitos laboratórios, esforço muito grande na procura de enzimas celulolíticas. A partir dos resultados já obtidos, pesquisas estão sendo executadas com o intuito de se obter enzimas mais eficientes afim de viabilizar processos de bioconversão, a um baixo custo, que não agrida o meio ambiente. A produção de celulasas em uma linhagem de fungo celulolítico denominada 5A de *Trichoderma* sp apresenta a característica de rápida excreção do complexo celulolítico que é seguida de uma perda na atividade do filtrado. A perda da atividade constatada em outros fungos pode estar relacionada a presença de inibidores produzidos pelo fungo, como por exemplo, proteases (Dillon & Rogelin, 1988).

Segundo Menezes et al. (1976), a atividade celulolítica de linhagens desenvolvidas em bagaço de cana-de-açúcar foi superior do que quando cultivadas em carboximetilcelulose e papel de filtro, sugerindo que essas linhagens produzem a fração exoglicanase, uma vez que o bagaço era uma celulose *in natura* e não havia recebido qualquer tratamento químico, o que exigiria, portanto, uma ação pela fração pré-hidrolítica exoglicanase antes de ser hidrolisada pelas outras frações endoglicanase e β -glicosidase.

Menezes et al. (1991) obtiveram valores próximos a 0,25 UI/mL de celulase total, que engloba as frações endo e exoglicanase e β -glicosidase, quando utilizaram bagaço de cana pré-tratado com solução de hidróxido de sódio 4%, como fonte de carbono.

Aspergillus oryzae tem sido utilizado na produção de inúmeras enzimas de alto valor industrial. Costa et al. (1997) buscaram uma alternativa de obtenção de enzimas pela utilização de substratos de baixo custo, tais como soja, milho e arroz; porém esses substratos não produziram resultados satisfatórios na produção de celulase quando incubados com *A. oryzae* IMI.

Resíduos lignocelulósicos disponíveis em abundância podem ser excelentes substratos para a produção de celulase e β -glicosidase por fermentação em estado sólido. A co-cultura de *Aspergillus ellipticus* e *Aspergillus fumigatus* em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com solução de hidróxido de cálcio 2% foi favorável à produção de celulase e β -glicosidase após 8 dias de fermentação (Gupta & Madamwar, 1997). Abdel-Nasser et al. (1997) testaram três fungos, *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6359, *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6361 e *Coriolus*

versicolor NRRL 6102 quanto às suas habilidades em produzir xilanase e celulase em resíduos agrícolas tais como bagaço de cana tratado e não-tratado, palha de trigo, espigas de milho, cascas de arroz e celulose em pó. Espigas de milho, palha de trigo e bagaço de cana tratado foram os mais susceptíveis à indução enzimática.

Segundo Kang & Rhee (1995) a atividade específica de endoglicanase de *Cephalosporium* sp. RYM-202 foi superior àquelas encontradas de *Alternaria alternata*, *Aspergillus terreus* e *Trichoderma viride*, mas foi inferior à de *Aspergillus niger*. A partir de *Thermoascus aurantiacus*, um fungo termófilo, por fermentação submersa em meio à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, foram obtidas atividades enzimáticas de 4,2, 3,3, 98 UI/mL para endoglicanase, exoglicanase e xilanase, respectivamente (Milagres et al., 1994).

Em fermentação semi-sólida utilizando-se palha e farelo de trigo como substratos, a produção de celulase por uma linhagem de *Trichoderma* sp. ocorreu após 24 horas (Silva & Dillon, 1988).

Segundo Umikalsen et al. (1997) uma linhagem de *Chaetomium globosum* apresentou bom crescimento e produziu substancial quantidade de celulase em fibras deslignificadas de palma, uma fonte de carbono abundante e de baixo custo. *Chaetomium globosum* produziu um extrato celulolítico cujas atividades de celulase total, endoglicanase e β -glicosidase foram 1,4, 30,8 e 9,8 UI/mL, respectivamente.

Para Vlaev et al. (1997) a máxima produção de celulase foi percebida com 72 horas de fermentação, e xilanase com 96 horas, obtendo-se menor atividade em fibras de sabugo de milho do que em Avicel, devido

possivelmente, à presença de inibidores. O valor da atividade de xilanase na fibra de espiga de milho alcançou 70-80% do valor obtido com Avicel e a atividade de celulase alcançou somente 30% de valor medido com Avicel, sendo as atividades iguais à 3,7 UI/mL para xilanase e 3,4 UI/mL para celulase.

Atividades enzimáticas de 0,4, 2,5, 3,5 e 0,14 U/mL de celulase total, endoglicanase, xilanase e β -xilosidase, respectivamente, foram obtidas por *Aspergillus fumigatus* quando crescido sobre resíduos de grama (*Leptochloa fusca*). *Sporotrichum thermophile* produziu 0,47 U/mL de β -glicosidase. *Chaetomium thermophile*, *Humicola grisea* e *Torula thermophila* tiveram baixas atividades enzimáticas sobre este substrato. Dentre vários substratos lignocelulósicos, palha de grama foi comparável à palha de trigo ou de arroz e foi ainda melhor que bagaço de cana *in natura* para produção enzimática (Latif et al., 1995).

Segundo Rajoka & Malik (1997) a produção média de celulase total por *Cellulomonas biazotea* foi significativamente maior em meios contendo α -celulose ou fibras de grama do que nos meios contendo fibra de algodão, Sigmacell-100 e carboximetilcelulose, atingindo até 18 UI/mL/h a 30 °C.

Após quinze dias de incubação de *Pleurotus sajor caju*, níveis de atividade de celulase total e β -glicosidase iguais a 3,7 UI/g e 0,6 UI/g, respectivamente, foram observados por Bisaria et al. (1997) em palha de arroz.

Bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, em cultura mista de *Trichoderma reesei* LM-UC4 e *Aspergillus phoenicis*, induziu a

produção de celulase total atingindo 13,4 UI/g após 120 horas incubação a 30 °C (Gutierrez-Correa & Tengerdy, 1997).

Dong et al. (1995) obtiveram produção de 1,5 U/mL de celulase total em meio com 0,5% (p/v) de glicose como fonte de carbono, quando utilizou *Trichoderma reesei* Rut C30, *Trichoderma pseudokoningii* S38, *Penicillium decumbens* JU-A10, porém tal produção não foi conseguida com *Aspergillus niger* L22. Quando utilizaram 2% (p/v) de glicose, a produção foi menor, com cerca de 0,05 U/mL. A síntese de celulase está relacionada com a ATP intracelular embora diferentes linhagens tenham diferentes sensibilidades. A síntese de celulase é reprimida se a ATP intracelular exceder a 10^{-7} mg/mL. O acúmulo excessivo de ATP intracelular é a razão essencial para a repressão enzimática.

Adição de leite desnatado em pó ao meio de cultivo aumentou a atividade celulolítica de *Trichoderma reesei*. O aumento de 6,6 vezes na atividade de celulase total foi após 5 dias de incubação, quando comparada ao controle sem suplemento. A atividade de endoglicanase progrediu no mesmo padrão. A atividade de β -glicosidase manteve-se inalterada. A adição de lactose e β -caroteno favoreceu a atividade celulolítica mas com menor efeito. O leite é um nutriente balanceado composto de fatores como proteínas, gordura, carboidrato e vitaminas, sendo que algum desses fatores agem de maneira sinérgica ou isolada contribuindo para o aumento da atividade enzimática (Patil et al., 1995).

Na maioria dos casos, um simples enriquecimento destes compostos com uma fonte de nitrogênio, minerais ou vitaminas é suficiente para produção de quantidades significativas tanto de biomassa microbiana

quanto de atividade enzimática (Bisaria & Ghose, 1981; Elisashvili, 1993).

3.2.3 Decomposição da estrutura celulósica por via enzimática

Segundo Noble & Naidoo (1981), as celulasas são variadas e complexas, e estão principalmente ligadas à parede celular. Em primeiro lugar as celulasas degradam a celulose à carboximetilcelulose, ou celulose “reativa”. A degradação posterior resulta na formação do dímero celobiose que é, finalmente, degradado à glicose, como mostra a Figura 9.

Figura 9 - Degradação da celulose (Noble & Naidoo, 1981).

A degradação biológica, ou por microrganismos, da celulose consiste em uma hidrólise enzimática catalisada pelas celulasas, as quais são enzimas que ocorrem amplamente em fungos e bactérias. Na hidrólise microbiana, o ataque é localizado, devido às moléculas de enzima serem grandes e não poderem se difundir prontamente na celulose (Barrichelo & Brito, 1985). Khandke *et al.* (1989) afirmam que a celulose é degradada por um complexo de enzimas composto, essencialmente, por endoglicanase, exoglicanase e β -glicosidase. O *Aspergillus niger* pode ser considerado uma boa fonte de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas sendo algumas vezes superior aos outros fungos reconhecidamente bons produtores do complexo celulolítico como *Trichoderma viride* (Gokhale, 1986). Há dois caminhos para a realização da hidrólise das biomassas: o enzimático, ainda carente de experiências para a aplicação industrial e o químico ou ácido, já bastante conhecido (Carvalho, 1990).

As três mais importantes enzimas no complexo celulolítico têm sido identificadas como sendo:

- endo- β -1,4-glicanase ou β -1,4-glicanohidrolase (EC. 3.2.1.4) ou comumente chamada por CMCase ou Cx.
- exo- β -1,4-glicanase ou β -1,4-glican celobiohidrolase (EC. 3.2.1.91) ou comumente chamada por Avicelase ou C1.
- β -1,4-glicosidase (EC. 3.2.1.21) ou celobiase.

Por conveniência, os nomes endo-celulase, celobiohidrolase têm, às vezes, sido usados para referirem-se à β -1,4-glicanohidrolase, β -1,4-glicano celobiohidrolase, respectivamente. Em alguns casos, o nome exo-celulase é também usado referindo-se a β -1,4-glicanohidrolase e β -1,4-

glicano celobiohidrolase. Entretanto, a existência de glicanohidrolase no complexo celulase é questionável, já que a contaminação de glicosidase contribuiria para a hidrólise de celobiose a glicose (Gong & Tsao, 1975).

A cristalinidade e a área superficial específica da celulose, a adsorção de celulase sobre o substrato sólido de celulose e o grau de polimerização são importantes parâmetros que governam a hidrólise enzimática da celulose (Ryu & Lee, 1982).

Um fator que deve ser levado em consideração na sacarificação enzimática é a temperatura. Torna-se importante determinar o efeito da temperatura na atividade e estabilidade extrato celulolítico. Zamost et al. (1991) afirmam que o uso de temperaturas elevadas inibe o crescimento microbiano, diminuindo a possibilidade de contaminação microbiana. A taxa de transferência de massa é também maior a altas temperaturas. Porém Whitaker (1994), afirma que mudanças na temperatura afetam reações enzimáticas de vários modos: (1) estabilidade das enzimas; (2) mudanças na solubilidade de gases; (3) pH; (4) afinidade da enzima por ativadores e inibidores; (5) competição das reações; (6) ionização de grupos prototróficos do sistema; (7) afinidade enzima-substrato; (8) velocidade de conversão de substrato a produto e (9) grau de associação de enzima de multipolipeptídios.

A taxa de desnaturação de uma enzima geralmente segue um processo de primeira ordem, tornando possível calcular o tempo necessário para destruir toda atividade enzimática. A temperatura ótima de uma enzima é um parâmetro mais operacional que uma verdadeira característica (Whitaker, 1994; Milagres, 1994). A susceptibilidade da enzima à desnaturação aumenta com o acréscimo do tempo de exposição à

temperaturas elevadas (Manning & Campbell, 1961).

Na Figura 10, é representado um mecanismo genérico de hidrólise enzimática da celulose.

Figura 10 - Mecanismo genérico de hidrólise enzimática da celulose (Phillips & Humphrey, 1983).

Segundo Dueñas et al. (1995) a razão de celulase: β -glicosidase de 1:2 foi favorável para a hidrólise da celulose. Os autores afirmam que a interação sinérgica de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus phoenicis* em fermentação submersa promoveu maior eficiência de degradação

lignocelulolítica que usando unicamente *T. reesei*, provavelmente devido à interação complementar das celulases do *T. reesei* e β -glicosidase do *A. phoenicis* para completa hidrólise do bagaço de cana. Para Latif et al. (1995) a razão de celulase para β -glicosidase deveria ser 1:1,5 para eficiente sacarificação da celulose à açúcares fermentescíveis.

Diferentes resíduos agrícolas incluindo espigas de milho, fibras de juta e bagaço de cana foram usadas num processo hidrolítico. O bagaço de cana foi o que melhor apresentou conversão, com 19,4% de hidrólise (Gokhale et al., 1998).

Sacarificação de 54,3% de palha de arroz pré-tratado com hidróxido de sódio 4% e 1 atm por 60 minutos, foi obtida por Kaur et al. (1998) quando usou celulase total (1,3 UI/mL) de *Trichoderma reesei*. Gokhale et al. (1998) encontrou um grau de hidrólise de 19,4% usando 22 UI/mL de xilanase de levedura sobre bagaço de cana a 52-53 °C e pH 4,5.

Para Gacesa & Hubble (1991), muitas enzimas usadas em processos industriais requerem somente um mínimo de purificação e em alguns casos seu extrato bruto pode se usado como catalisador.

Segundo Santos et al. (1985) a hidrólise enzimática ou ácida de resíduos celulósicos para a produção de álcool parece ser muito promissora, obtendo-se conversão da celulose em glicose de 55% pelo processo de hidrólise ácida, enquanto no enzimático é de 80%. Lee et al. (1995) utilizando materiais lignocelulósicos alcançaram níveis de hidrólise de 60 a 70%, com atividade enzimática 20 UI/g celulose. Mes-Hartree et al. (1987) utilizando 5% de celulose comercial alcançaram cerca de 52% de conversão do substrato em açúcares redutores sendo 45,5% de glicose, quando

utilizaram celulase total de *Trichoderma harzianum* E58 com uma atividade de 15 UI/g celulose a 45 °C por 48 horas de incubação. Menezes & Hioshii (1982) obtiveram índice de sacarificação de 35% com bagaço de cana pré-tratada com solução hidróxido de sódio 4% a 121 °C, e afirmam que índices inferiores a 10% foram alcançados com o bagaço do tratamento alcalino sem aquecimento.

Convém ressaltar que novas técnicas de decomposição das fibras vegetais têm sido apresentadas atualmente. O uso de vapor supercrítico, na decomposição de celulose foram conduzidos em reator de fluxo numa escala de temperatura de 290 a 400 °C e 25 MPa, alcançando índices de hidrólise de 75% em vapor supercrítico obtiveram glicose, frutose e oligômeros (celobiose, celotriose, celotetraose) como produtos finais (Sasaki et al., 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi o fungo filamentoso *Aspergillus niger* IZ-09, proveniente da Micoteca do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, que foi desenvolvido e mantido em meio Czapek-Dox-Ágar (Neder, 1992) por aproximadamente sete dias em estufa a 30 °C.

4.2 Bagaço de cana-de-açúcar

Foram utilizadas amostras de bagaço de cana-de-açúcar provenientes da Destilaria Capuava, Piracicaba/SP e da destilaria piloto “Prof. Juvenal Mendes de Godoy” do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição/ESALQ, sendo o material conservado em congelador, tipo *freezer* horizontal, a -10 °C.

4.3 Extratos celulolíticos

As enzimas empregadas foram, uma preparação comercial de celulase (Celluclast[®] 1,5 L) e uma preparação comercial de β -glicosidase (Novozym[®] 188), fornecidas pela Novo Nordisk e um extrato bruto de celulase (FPase) obtido em laboratório, a partir do cultivo de *Aspergillus niger* IZ-9 em meio de Mandels-Weber (1969).

4.4 Meios de cultura

Foram utilizados basicamente os meios de Czapek-Dox-Ágar (Neder, 1992) e de Mandels-Weber (1969), para crescimento fúngico e produção do extrato fúngico de FPase.

4.4.1 Meio de manutenção de *Aspergillus niger* IZ-09

A composição do meio de cultivo Czapek-Dox-Ágar usado para obtenção de esporos de *Aspergillus niger* IZ-9 foi o seguinte: glicose (30,0 g), nitrato de sódio (3,0 g), sulfato de magnésio heptahidratado (0,5 g), cloreto de potássio (0,5 g), sulfato ferroso heptahidratado (0,01 g), hidrogenofosfato dipotássico (1,0 g), ágar-ágar (13,0 g) e água destilada (q.s.p. 1000 mL); corrigir pH para $7,3 \pm 0,1$, quando necessário.

4.4.2 Meios líquidos para produção de FPase

4.4.2.1 Com diferentes fontes de carbono

Para avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de FPase em *Aspergillus niger* IZ-09 foram utilizados os meios de Czapek-Dox-Ágar e de Mandels-Weber, onde foram adaptados para receber as diferentes fontes de carbono. Ao meio de Czapek-Dox-Ágar foram adicionadas: (a) glicose e (b) glicose e bagaço de cana moído. Ao meio de Mandels-Weber foram adicionadas: (c) bagaço de cana pré-tratado com solução de hidróxido de sódio 4% (conforme item 4.5.2 - pré-tratamento I), (d) lactose e (e) papel de filtro Whatman nº1.

4.4.2.2 Com papel de filtro de alta pureza

Para produzir o extrato fúngico de FPase que foi usado na determinação do efeito da temperatura na atividade e estabilidade da FPase, foi elaborado o meio de cultura de Mandels-Weber modificado, substituindo-se a glicose por papel de filtro picado, como fonte de carbono e indutor da síntese celulolítica. A composição salina básica compreendeu: hidrogenofosfato dipotássico (2,0 g/L), sulfato de amônio (1,4 g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (0,3 g/L), cloreto de cálcio (0,3 g/L), sulfato ferroso heptahidratado (5 mg/L), sulfato de manganês monohidratado (1,56 mg/L), sulfato de zinco heptahidratado (1,4 mg/L), cloreto de cobalto (2,0

mg/L), proteose peptona (1,0 g/L), Tween 80 (1,0 mL/L). O meio foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos.

4.5 Preparação do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana foi preparado para promover maior acessibilidade do extrato enzimático à celulose presente na fibra vegetal.

4.5.1 Moagem

O bagaço *in natura* foi submetido à sucessivas lavagens com água corrente para remoção de impurezas provenientes tanto do processo de moagem (açúcares residuais) como do processo de colheita (sílica, terra e outras impurezas) bem como, inibidores (componentes fenólicos e furfural). Consecutivas lavagens com água destilada foram feitas até o desaparecimento completo da coloração da água, sendo, em seguida, seco em estufa a 65 °C, durante 4 horas. O bagaço seco, foi moído em moinhos de facas para se obter frações de granulometria reduzida sendo a seleção granulométrica feita em peneiras vibratórias de 200 *mesh*.

4.5.2 Pré-tratamentos químicos

O pré-tratamento do bagaço de cana foi realizado para aumentar a sua susceptibilidade à ação de enzimas celulolíticas. A escolha baseou-se na praticidade e eficiência (Menezes et al., 1976; Menezes & Hioshii, 1982; Menezes et al., 1991; Menezes & Hennies, 1991). Os pré-tratamentos foram: **pré-tratamento I**: uma parte do bagaço de cana lavado e moído (200 *mesh*) foi tratado com 20 partes de solução de hidróxido de sódio a 4% em autoclave a 121 °C por 30 minutos. O material recuperado por filtração foi então lavado com água destilada até a neutralidade e seco em estufa a 65°C até massa constante; **pré-tratamento II**: parte do bagaço obtido do pré-tratamento I antes da neutralização com lavagens sucessivas, foi neutralizado com ácido fosfórico xaroposo e filtrado. O material recuperado foi então seco em estufa a 65 °C até massa constante. Uma parte deste bagaço obtido foi adicionado com uma parte de água destilada e autoclavados a 121 °C por 30 minutos. A suspensão obtida foi filtrada e o material sólido seco a 65 °C até massa constante.

4.6 Influência da temperatura na atividade e estabilidade do extrato fúngico de FPase

A temperatura ótima foi determinada incubando-se o extrato fúngico com 50 mg de papel de filtro Whatman nº1, por 1,0 hora, às temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70 °C. A estabilidade térmica foi determinada pré-incubando-se o extrato bruto nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70 °C por 30, 60, 120, 180 e 240 minutos. Após incubação, foram transferidas para banho de gelo para interromper a reação. A atividade enzimática foi determinada pelo método de Mandels (1974), e a taxa de inativação enzimática foi determinada pela equação de primeira ordem, obtida através das expressões abaixo, onde V_0 é a velocidade reacional inicial e V é a velocidade reacional num dado tempo t .

$$\log V = \frac{-K}{2,303} \times t + \log V_0$$

$$t_{1/2} = \frac{0,692}{K}$$

A constante **K** foi calculada a partir dos valores da inclinação da reta ($K/2,303$) através do gráfico semi-log da atividade enzimática pelo tempo. O tempo requerido para reduzir a atividade enzimática em 50% do valor inicial corresponde à meia-vida da reação ($t_{1/2}$), sendo constante para reações de primeira ordem (Brady & Humiston, 1986; Milagres, 1994).

4.7 Delineamentos experimentais

Foram verificadas as influências de diferentes fatores na sacarificação de bagaço de cana a partir de dois planejamentos fatoriais completos.

4.7.1 Planejamento fatorial para avaliar a influência do tipo de extrato celulolítico e da temperatura na sacarificação de bagaço de cana

As influências de dois fatores na sacarificação do bagaço de cana, foram estudadas através de um planejamento fatorial constituído de 2^2 experimentos. A escolha dos fatores e dos níveis foi baseada em estudos preliminares, sendo considerado para este sistema, a influência do tipo de extrato celulolítico (A) e da temperatura (B) na sacarificação do bagaço de cana. Os seguintes níveis foram adotados: tipo de extrato (Celluclast e extrato fúngico) e temperatura (60 e 50 °C). A matriz do experimento é mostrada na Tabela 3. Todos os experimentos foram realizados para dois tipos de pré-tratamento do bagaço (conforme item 4.5.2).

Tabela 3. Variáveis independentes no planejamento experimental 2².

Causas de variação	Níveis	
	Baixo (-)	Alto (+)
A: Tipo de extrato celulolítico*	Fúngico**	Celluclast
B: Temperatura	50 °C	60 °C

* Para os tratamentos de sacarificação foram utilizados valores equivalentes para a atividade de celulase dos extratos celulolíticos e iguais a 0,30 UI/mL.

** O extrato fúngico de FPase foi obtido a partir do cultivo de *Aspergillus niger* IZ-09.

4.7.2 Planejamento fatorial para avaliar o efeito da FPase e β -glicosidase na sacarificação do bagaço de cana

As influências de três fatores na sacarificação do bagaço de cana foram estudadas a partir de um planejamento fatorial constituído de 2³ tratamentos.

Para este experimento foram consideradas as influências de três variáveis: relação FPase/bagaço (A), tipo de bagaço de cana (B) e relação β -glicosidase/bagaço (C). Os seguintes níveis foram adotados: relação FPase/bagaço (0,01 e 0,04 g/g), tipo de bagaço de cana (sem pré-tratamento e pré-tratamento II) e relação β -glicosidase/bagaço (0,000 e 0,004 g/g). A matriz do experimento é representada na Tabela 4. Todos os experimentos foram conduzidos a temperatura constante de 50 °C e 100 rpm de agitação, em movimento circular, em incubador New Brunswick Co., modelo “Controlled Environment Incubator Shaker”.

Tabela 4. Variáveis independentes no planejamento experimental 2³.

Causas de variação	Níveis	
	Baixo (-)	Alto (+)
A: FPase/bagaço	0,01 g/g bagaço	0,04 g/g bagaço
B: tipo de bagaço	sem pré-tratamento	pré-tratamento II
C: β -glicosidase/bagaço	0,000 g/g bagaço	0,004 g/g bagaço

Foram considerados os extratos enzimáticos comerciais: FPase (Celluclast) e β -glicosidase (Novozym); ambas da Novo Nordisk.

Os tipos de bagaços apresentados são: Sem pré-tratamento – bagaço lavado e moido, e Pré-tratamento II – bagaço tratado com solução de hidróxido de sódio a 4%, ácido fosfórico e vapor.

4.8 Determinações analíticas

Foram utilizadas para quantificar a porcentagem de sacarificação da celulose presente no bagaço de cana, e a produção de FPase por *Aspergillus niger* IZ-09.

4.8.1 Determinação da porcentagem de sacarificação do bagaço de cana

A susceptibilidade do bagaço de cana aos extratos enzimáticos foi determinada adicionando-se aos Erlenmeyer de 250 mL, 5 g de bagaço pré-tratado (m.s.), 40 mL de água destilada, 10 mL de solução-tampão citrato de sódio 1,0 M (pH 4,8) contendo 0,01% de solução comercial de Merthiolate (anti-séptico mercurial) e 50 mL do extrato enzimático para o experimento 4.7.1 e níveis recomendados na Tabela 4 para o experimento 4.7.2. Os frascos foram incubados em agitador rotativo a 100 rpm e a

temperatura constante de 50 °C por 24 horas para o experimento 4.7.1 e 72 horas para o experimento 4.7.2. O teor de açúcares redutores no sobrenadante, foi determinado pelo método do DNS (Miller, 1959).

A porcentagem de sacarificação do bagaço foi calculada considerando-se o teor de açúcares redutores formados e o teor de celulose presente no bagaço. Segundo Targonski (1985) a porcentagem de sacarificação pode ser expressa pela equação abaixo, onde 0,952 é o fator de equivalência da glicose a celulose.

$$\text{SACARIFICAÇÃO (\%)} = \frac{(\text{mg açúcares redutores.mL}^{-1} \times 0,952)}{(\text{mg celulose no bagaço.mL}^{-1})} \times 100$$

4.8.2 Determinação do teor de celulose no bagaço de cana

Os teores de celulose nos bagaços utilizados nos experimentos de produção enzimática e de sacarificação foram determinados conforme Updegraff (1969). Foram incubados em banho-maria a 100 °C, 0,2 gramas de bagaço de cana, adicionado de 3 mL de reagente nítrico-acético (composto por 150 mL de ácido acético 80% e 15 mL de ácido nítrico concentrado) por 30 minutos e centrifugado por 10 minutos a 3000 g, sendo o sobrenadante resultante, descartado. Em seguida, foi lavado com 10 mL de água destilada e centrifugado, sendo o sobrenadante também descartado. Ao resíduo foi adicionado 10 mL de ácido sulfúrico a 72%, deixando-se hidrolisar por 1 hora à temperatura ambiente. Do hidrolisado obtido, foi retirado 1,0 mL que foi levado a 100 mL, em balão volumétrico, com água

destilada. Para determinação do teor celulósico, foi adicionado a 1,0 mL da amostra diluída, 8 mL de solução de antrona (0,2 g de reagente antrona para 100 mL de ácido sulfúrico concentrado) e 4 mL de água destilada incubando-se em água fervente por 15 minutos. A leitura espectrofotométrica foi feita contra curva padrão de celulose pura (mg/mL) a 620 nm.

4.8.3 Determinação do teor de lignina no bagaço de cana

Os teores de lignina foram determinados de acordo com Milagres et al. (1994), sendo considerado como lignina o resíduo sólido restante após as hidrólise e pós-hidrólise ácidas do bagaço. Bagaço de cana (2,0 g) foi submetido a uma hidrólise parcial com formação de oligômeros e monômeros, usando ácido sulfúrico a 72%. Em seguida, foi feita a pós-hidrólise com ácido sulfúrico a 4%, de modo a completar a hidrólise, através da conversão total dos oligômeros à monômeros, sendo feita a filtração do conteúdo hidrolisado em papel de filtro previamente tarado. O resíduo foi lavado exaustivamente com água destilada até remover o ácido excedente, sendo mantido em estufa a 105 °C até massa constante.

O teor de lignina foi expresso pela seguinte equação:

$$\text{LIGNINA} = \frac{\text{massa em grama de lignina}}{\text{massa da amostra seca (2 g)}} \times 100$$

4.8.4 Determinação da atividade de FPase

O efeito sinérgico dos componentes exoglicanase, endoglicanase e β -glicosidase que exprime a atividade da FPase foi determinado pelo método descrito por Mandels (1974) usando-se papel de filtro Whatman n°1 como substrato. Meio mililitro de extrato enzimático e 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 foram incubados com uma fita de papel de filtro Whatman n°1 (50 mg) durante 1,0 hora a 50 °C. A quantidade de açúcar redutor produzida, expressos em glicose, foi avaliada pelo método do DNS (Miller, 1959). Uma unidade de atividade de celulase total (FPUI) foi definida como aquela que libera 1,0 μ mol de glicose por minuto a 50 °C.

4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos na sacarificação foram analisados estatisticamente utilizando-se o Sistema de Análise Estatística para Computadores (SANEST) (Zonta & Machado, 1992). Foi feito o teste de Tukey para comparação das médias da sacarificação do bagaço de cana do experimento 4.7.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Porcentagem de celulose e lignina presentes no bagaço de cana utilizados

Na Tabela 5 são apresentados as concentrações de cada fração para os diferentes bagaços pré-tratados e não tratado.

Tabela 5. Porcentagens de celulose e lignina presentes nos bagaços de cana utilizados.

Tipo de bagaço	Frações do bagaço de cana (%)	
	Celulose	Lignina
sem pré-tratamento	37,0	24,6
pré-tratamento I	60,5	10,7
pré-tratamento II	66,5	10,0

Onde: Tipo de bagaço: sem pré-tratamento – bagaço lavado e moído
pré-tratamento I – bagaço pré-tratado com NaOH
pré-tratamento II – bagaço pré-tratado com NaOH, H₃PO₄ e vapor.

Os bagaços pré-tratados foram, em geral, superiores ao bagaço de cana sem pré-tratamento. O pré-tratamento II, que foi composto de três etapas (alcalina, ácida e vapor) apresentou maior teor de celulose, sugerindo maior extração de frações como a lignina, que representa uma barreira física aos extratos enzimáticos (Tabela 5). Aparentemente, as diferenças entre os resultados obtidos pelos pré-tratamentos são pequenas, porém a vantagem do pré-tratamento II está no seu reduzido tempo de processamento do bagaço, visto que a neutralização com ácido fosfórico foi extremamente rápida em relação ao pré-tratamento I, onde a neutralização foi feita com sucessivas lavagens com água destilada.

Diversos pré-tratamentos foram propostos na literatura, embora muitos destes quando aplicados a materiais celulósicos formam substâncias inibidoras do crescimento microbiano, impossibilitando a utilização do hidrolisado nos processos fermentativos.

5.2 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de FPase

A Figura 11 mostra os resultados de atividade de FPase do extrato fúngico obtido das culturas preparadas com diferentes fontes de carbono. Papel de filtro propiciou melhor produção de FPase seguido do bagaço de cana pré-tratado com solução de hidróxido de sódio a 4%. Atividades celulolíticas em torno de 0,44 UI/mL com papel de filtro e de 0,16 UI/mL com bagaço de cana pré-tratado, foram alcançadas após 192 horas de incubação. O papel de filtro Whatman nº1 é composto por mais de 90% de celulose pura, o que possibilita uma maior indução de FPase. Lowe

et al. (1987) aplicando papel de filtro como indutor de celulase obtiveram elevadas taxas de produção celulolítica, porém Menezes et al. (1976) observaram que bagaço de cana foi superior à carboximetilcelulose e papel de filtro na produção de celulase total. Verificou-se no presente trabalho, entretanto, que papel de filtro foi melhor indutor do complexo celulolítico do que bagaço pré-tratado. Possivelmente, o elevado teor de lignina nos resíduos agrícolas, como o bagaço de cana, impede um contato direto da matriz celulósica com o fungo (Cuskey et al., 1983; Menezes & Hennies, 1994).

A utilização da glicose isolada ou acompanhada de bagaço de cana-de-açúcar demonstrou ser inibitório à síntese de celulase, com produção enzimática não superior a 0,033 UI/mL, embora Dong et al. (1995) utilizando 0,5% (p/v) de glicose tivessem obtido 1,5 UI/mL de FPase, mas que foi reduzida quando se utilizou 2% do mesmo substrato. A lactose foi considerada por Gong & Tsao (1975) boa indutora à síntese do complexo celulolítico, porém o experimento revelou que a produção de FPase foi baixa para este substrato com valor máximo de 0,04 UI/mL em 72 horas de fermentação, com leve perda de atividade celulolítica após 96 horas. A baixa produção enzimática nestes substratos também foi notada por Trivedi & Rao citados por Vitti (1988).

Figura 11 - Atividades enzimáticas da celulase total para diferentes fontes de carbono.

5.3 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da FPase do extrato fúngico

As determinações da temperatura ótima e da termoestabilidade de um determinado extrato enzimático constituem práticas recomendáveis quando se deseja utilizá-las em processos enzimáticos. Com esse propósito, foram avaliadas as propriedades térmicas do extrato celulolítico bruto obtido de *A. niger* IZ-09. Verifica-se pela Figura 12 que a atividade enzimática aumenta com o aumento da temperatura até aproximadamente 60 °C, quando a atividade de FPase alcançou valor máximo de 0,44 UI/mL, diminuindo consideravelmente a 70 °C.

A FPase mostrou ser praticamente estável às temperaturas de 30 e 40 °C, com perdas de atividade em torno de 6,3 e 9,4%, e meias-vidas de 1600 e 900 minutos, respectivamente, como pode ser verificado na Figura 13. Marcada inativação térmica foi observada às temperaturas de 60 e 70 °C. Embora a enzima tenha apresentado atividade máxima a 60 °C, não foi tolerante a esta temperatura. À temperatura de 50 °C, a atividade foi pouco menor (0,33 UI/mL), porém a estabilidade a esta temperatura foi maior, com perda de 25% da atividade inicial apenas, e meia-vida de 720 minutos. Nas temperaturas de 60 e 70 °C, a queda foi de aproximadamente 74%, em média, após 240 minutos.

Figura 12 - Efeito da temperatura na atividade de FPase no extrato fúngico.

Figura 13 - Efeito da temperatura na estabilidade da FPase no extrato fúngico.

Para as condições estudadas, o extrato fúngico de FPase apresentou comportamento semelhante à preparação comercial, em relação ao efeito da temperatura. Este fato pode ser observado, comparando-se as Figuras 12 e 13 com dados técnicos fornecidos pela Novo Nordisk (1996) onde a preparação comercial apresentou atividades máximas a 50 e 60 °C, porém a 60 °C ocorreu perda de 40% da atividade inicial após 30 minutos. Perda de 80% ocorreu a 70 °C . A 50 °C a atividade manteve-se relativamente estável após 30 minutos de incubação.

5.4 Efeito da temperatura e do tipo de extrato celulolítico na sacarificação de bagaço de cana

Foi verificado pelo cálculo dos efeitos do experimento fatorial, que a temperatura mostrou-se o fator mais importante.

Pela Tabela 6 pode ser visto que o fator, tipo de extrato celulolítico, teve menor efeito na sacarificação da celulose presente nos dois tipos de bagaços pré-tratados, com valores absolutos dos efeitos inferiores aos valores calculados para o fator temperatura.

A presença de impurezas no extrato fúngico utilizado neste estudo, não foi capaz de reduzir a capacidade hidrolítica da FPase, o que possivelmente tornaria sua aplicação neste estado, interessante devido à redução nos custos de purificação do extrato enzimático. Gacesa & Hubble (1991) afirmaram que muitas enzimas usadas em processos biotecnológicos requerem leve purificação, ou mesmo o extrato bruto pode ser aplicado mantendo-se a eficiência do processo.

Por outro lado Dillon & Rogelin (1988) constataram perda de atividade enzimática devido à presença de proteases no filtrado. Este fato, parece não ter afetado o extrato bruto obtido de *Aspergillus niger* IZ-09, por ter-se mostrado estável por longo período de uso, sugerindo que não houve excreção de enzimas proteolíticas no extrato bruto de celulase total.

Dentre os pré-tratamentos aplicados ao bagaço de cana lavado e moído, o pré-tratamento com NaOH, H₃PO₄ e vapor, proporcionou maior susceptibilização da celulose à sacarificação enzimática, resultando em maiores conversões de celulose a açúcares redutores (Tabela 7).

Menezes & Hioshii (1982) obtiveram 35% de sacarificação de bagaço de cana pré-tratado com solução de hidróxido de sódio a 4%, seguido por 15 minutos de aquecimento a 120 °C. A atividade enzimática média utilizada foi superior à aplicada ao bagaço de cana neste item, indicando que, possivelmente, maiores índices de sacarificação do bagaço do pré-tratamento II poderiam ser alcançados caso fosse aplicado extrato enzimático mais concentrado.

A porcentagem de sacarificação poderia ser incrementada concentrando-se, portanto, o extrato fúngico. Todavia, diferentes alternativas poderiam ser adotadas para aumentar a atividade de FPase no extrato fúngico, assim como utilizar uma linhagem microbiana geneticamente melhorada. A produção de enzima por fermentação em substrato sólido, mais simples e menos dispendiosa, do que a fermentação submersa, poderia viabilizar ainda mais o processo de sacarificação.

Tabela 6. Valores dos efeitos para o planejamento fatorial 2^2 para os dois bagaços pré-tratados.

	Pré-tratamentos do bagaço	
	I	II
Média geral	16,38	20,68
<i>Efeitos principais*</i>		
A: Tipo de extrato	1,15	5,05
B: Temperatura	13,05	5,55
<i>Efeitos de interação*</i>		
A B	4,65	0,45

* Efeitos com maiores valores absolutos indicam a maior influência do respectivo fator.

Foram considerados os pré-tratamentos: I - NaOH e lavagem com água; II - NaOH, H_3PO_4 e vapor

Tabela 7. Matriz do planejamento fatorial 2^2 e suas porcentagens de sacarificação da celulose do bagaço de cana.

			Sacarificação da celulose (%)	
Tratamentos		Causas de variação	Pré-tratamentos	
n°	Extrato		I	II
1	Fúngico	50	20,0	26,2
2	Celluclast	50	25,8	20,7
3	Fúngico	60	11,6	20,2
4	Celluclast	60	8,1	15,6

5.5 Influência da FPase e β -glicosidase sobre a sacarificação de bagaço de cana

A análise estatística foi realizada para determinar a influência de três fatores sobre a sacarificação da celulose de bagaço de cana. Foram analisados pela análise de variância (ANOVA) os fatores, (A) relação de Celluclast (FPase) para bagaço de cana, (B) tipo de bagaço de cana e (C) relação de Novozym (β -glicosidase) para bagaço de cana, conforme Tabela 4. O Teste de Tukey foi aplicado na comparação de médias das porcentagens de sacarificação obtidas.

A Tabela 8 apresenta o quadro da análise de variância para os três fatores na sacarificação do bagaço de cana.

Tabela 8. Quadro de análise de variância para a sacarificação da celulose de bagaço de cana.

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Soma quadrática média	Valor F
A	1	772,8401672	772,8401672	1950,6254**
B	1	156,2501858	156,2501858	394,3708**
C	1	3289,0229721	3289,0229721	8301,3955**
A*B	1	0,3597897	0,3597897	0,9081 ^{n.s.}
A*C	1	280,5622904	280,5622904	708,1308**
B*C	1	113,4222619	113,4222619	286,2744**
A*B*C	1	6,0027087	6,0027087	15,1507*
RESÍDUO	8	3,1696097	0,3962012	
TOTAL	15	4621,6299855		

Média Geral = 27,475000

Coefficiente de Variação = 2,291%

Foram considerados para os valores F: **Tratamento significativo ao nível de 1%; *Tratamento significativo ao nível de 5% e n.s. Tratamento não significativo.

Dentre os fatores analisados (Tabela 8), verificou-se que foram significativos ao nível de 1% as diferenças de tratamentos e suas interações, exceto a interação entre os fatores A e B não foi significativa para as condições fixadas no experimento.

Tabela 9. Comparação de médias de sacarificação da celulose do bagaço de cana nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	g FPase/g bagaço	Tipo de bagaço	g β -glicosidase/g bagaço	Médias das porcentagens de sacarificação*
08	0,04	pré-tratamento II	0,004	59,50a
04	0,04	pré-tratamento II	0,000	46,41b
07	0,01	pré-tratamento II	0,004	35,71c
03	0,01	pré-tratamento II	0,000	25,66d
02	0,04	sem pré-tratamento	0,000	15,91e
06	0,04	sem pré-tratamento	0,004	15,91e
05	0,01	sem pré-tratamento	0,004	11,27f
01	0,01	sem pré-tratamento	0,000	9,45f

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey, a 1%.

D.M.S (5%) = 2,49

D.M.S. (1%) = 3,33

Pela Tabela 9, pode-se verificar que o tratamento 8, propiciou maior porcentagem de sacarificação, quando foram aplicados sobre bagaço de cana do pré-tratamento II, níveis elevados de FPase e β -glicosidase. Assim, maiores índices de sacarificação foram alcançados com bagaço de cana pré-tratado, sugerindo que o pré-tratamento físico e/ou químico, foi necessário para melhor aproveitamento do conteúdo celulósico do bagaço.

Na Tabela 5 foi mostrado que os bagaços pré-tratados praticamente dobraram seu teor de celulose em relação ao não tratado. Um

raciocínio inverso pode ser feito para a lignina, para a qual os pré-tratamentos reduziram à metade sua concentração.

Os resultados obtidos nas Tabelas 5 e 9, sugerem que o pré-tratamento ao reduzir o teor de lignina possibilitou maior conversão enzimática da fração celulósica. Diversos autores afirmaram que o tratamento do bagaço de cana aumenta a susceptibilidade ao ataque enzimático, ampliando conseqüentemente, a sacarificação da celulose (Menezes & Hioshii, 1982; Barrichelo & Brito, 1985; Sales et al., 1987; Van Walsum et al., 1996 e Gupta & Madamwar, 1997).

A relação FPase:bagaço foi significativa para a sacarificação dos bagaços analisados, atingindo aproximadamente o dobro da sacarificação com nível alto de celulase total, sendo que maiores índices de conversão foram percebidos quando usou-se, nível alto para FPase e bagaço pré-tratado.

A adição de β -glicosidase além da FPase foi significativa quando aplicada sobre o bagaço de cana pré-tratado, embora tenha sido pequeno o aumento na porcentagem de sacarificação. Com bagaço de cana sem pré-tratamento, a influência da presença de β -glicosidase sobre a sacarificação, não foi estatisticamente significativa.

A liberação de celobiose pela ação da celulase total foi, possivelmente, percebida em maior proporção no bagaço de cana pré-tratado, onde as fibras de celulose estão mais expostas à ação do complexo celulolítico. A maior acessibilidade à ação enzimática promoveria a formação de maior número e/ou quantidade de oligômeros. Cuskey et al. (1983) e Tsuneda & Thorn (1995) afirmaram que a associação da celulose

com lignina reduz a acessibilidade do complexo celulolítico, o que poderia explicar a baixa eficiência da β -glicosidase em bagaço de cana sem pré-tratamento.

6 CONCLUSÕES

Dentro das condições em que foi desenvolvido o experimento, pode-se concluir que:

- a. o extrato bruto de celulase fúngica teve comportamento semelhante à preparação comercial, quanto à influência da temperatura na atividade e estabilidade da enzima;
- b. à temperatura de 50 °C, a atividade enzimática da celulase total foi 0,33 UI/mL e sua estabilidade térmica de 720 minutos, conveniente ao processo de sacarificação que em geral é longo;
- c. dentre os pré-tratamentos do bagaço de cana utilizados, destacou-se aquele com solução de hidróxido de sódio 4%, ácido fosfórico concentrado e vapor, promovendo maior acessibilidade da celulose do bagaço, ao ataque enzimático;

- d. a adição de β -glicosidase na sacarificação de bagaço de cana pré-tratado com solução de hidróxido de sódio a 4%, ácido fosfórico concentrado e vapor, aumentou a porcentagem da sacarificação;
- e. dentre os tratamentos estatísticos analisados, o tratamento 8 (0,04 g de celulase total/g bagaço, 0,004 g β -glicosidase/g bagaço e bagaço pré-tratado com solução de hidróxido de sódio a 4%, ácido fosfórico concentrado e vapor, foi o que promoveu maior sacarificação da celulose do bagaço de cana, com valor médio de 59,5%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL-NASSER, N. H.; HELMY, S. M.; EL GAMMAL, A. A.
Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with
white rot fungi. **Polymer Degradation and Stability**, v. 55, n. 7, p.
249-255, 1997.
- AHN, Y. H.; YANG, Y. L.; CHOI, C. Y. Cellulases as an aid to enhance
saccharification of cassava root. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 5, p.
547-550, 1995.
- ALFANI, F.; CANTARELLA, M. In: SIDWICK, J. M.; HOLDOM, R. S.
(Ed.) **Biotechnology of waste treatment and exploitation**.
Chichester: Ellis Horwood, 1987. p. 256.
- BARRICHELO, L. E. G.; BRITO, J. O. **Química da madeira**. Piracicaba:
Centro Acadêmico “Luiz de Queiroz”, 1985. 126 p.
- BASTAWDE, K. B. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of
action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p.
353-368, 1992.

- BISARIA, R.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P. Utilisation of agro-residues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p.5-8, 1997.
- BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme Microbiology and Tecnology**, v. 3, p. 90-104, 1981.
- BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E. Cinética química. In: BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E. (Ed.) **Química Geral**. Rio de Janeiro: LTC, 1986. cap. 2, p. 453-487.
- CARVALHO, C. A. Aproveitamento do bagaço de cana. In: CONSERVAÇÃO DE ENERGIA NA INDÚSTRIA DO AÇÚCAR E ÁLCOOL, São Paulo, 1990. São Paulo: IPT, 1990. 796 p.
- CARVALHO, L. C. C. A cana-de-açúcar no contexto atual; aspectos técnicos, econômicos e ambientais. In: SEMANA DE CANA-DE-AÇÚCAR DE PIRACICABA, 2, Piracicaba, 1997. **Anais**. Piracicaba, 1997. p. 16-28.
- CARVALHO, M. R. de (Ed.) **Celulose e papel: tecnologia de fabricação do papel**. 2. ed. São Paulo: IPT/SENAI, 1981. v. 1.
- CÉSAR, M. A. A.; SILVA, F. C. **A cana-de-açúcar como matéria-prima para a indústria sucroalcooleira**. Piracicaba: Centro Acadêmico “Luiz de Queiroz”, 1993. 108 p.
- CHAHAL, D. S. Lignocellulosic wastes: biological conversion. In: MARTIN, A. M. (Ed.) **Bioconversion of waste materials to**

- industrial products.** London and New York: Elsevier Applied Science, 1991. cap. 12, p. 373-400.
- COSTA, C. J.; MEDEIROS, N.; SILVA, N. L.; LIMA FILHO, J. L.; DA SILVA, M. P. C. Utilização de meios nutritivos regionais no cultivo de *Aspergillus oryzae*, para a produção de amilase, celulase, lipase e protease. In: CONGRESSO NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5, 1997. **Anais.** Recife: UFPe, 1997.
- CUSKEY, S. M.; MONTENECOURT, B. S.; EVENLEIGH, D. E. Screening for cellulolytic mutants. In: WISE, D. L. (Ed.) **Liquid Fuel Development.** New York: CRC Press, 1983. cap. 2, p. 31-48.
- DA SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim da SBCTA**, v.31, n. 2, p. 249-260, 1997.
- DA SILVA, R.; 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.
- DEKKER, R. F. H. The enzymatic hydrolysis of biomass. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 2, Maringá, 1985. **Resumos.** Maringá: UEM, 1985.
- DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced ruminal digestion. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57, n. 12, p. 171-182, 1996.

- DILLON, A. J. P.; ROGELIN, R. Enriquecimento de mutantes proteases negativos em linhagens de fungos celulolíticos. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 15, Piracicaba, 1988. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1988. p. 57.
- DONG, W.; YINBO, Q.; PEIJI, G. Regulation of cellulase synthesis in micellial fungi: participation of ATP and cyclic AMP. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 6, p. 593-598, 1995.
- DRAETTA, I. S.; LOBO FILHO, M. Celulases de basidiomicetos: purificação e caracterização. **Coletânea do ITAL**, v. 11, p. 163-184, 1980.
- DUEÑAS, R.; TENGEDY, R. P.; GUTIERREZ-CORREA, M. Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 333-337, 1995.
- ELISASHVILI, V. L. Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher *Basidiomycetes*. **Applied Biotechnology and Microbiology**, v. 29, p. 257-266, 1993.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. New York: Walter de Gryuter, 1989. 613 p.
- FERNANDES-SALOMÃO, T. M.; AMORIM, A. C. R.; CHAVES-ALVES, V. M.; COELHO, J. L. C.; SILVA, D. O.; ARAÚJO, E. L. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 15-18, 1996.

- GACESA, P.; HUBBLE, J. The enzymatic treatment of waste materials. In: MARTIN, A. M. (Ed.) **Bioconversion of waste materials to industrial products**. London and New York: Elsevier Applied Science, 1991. cap. 2, p. 39-61.
- GOKHALE, D. U. Xylanase and beta-xylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 137-138, 1986.
- GOKHALE, D. V.; PATIL, S. G.; BASTAWDE, K. B. Potencial application of yeast cellulase-free xylanase in agrowaste material treatment to remove hemicellulose fractions. **Bioresource Technology**, v. 63, n. 5, p. 187-191, 1998.
- GONG, C. S.; TSAO, G. T. Cellulase and biosynthesis regulation. **Annual Reports on Fermentation Processes**, v. 3, p. 111-139, 1975.
- GUPTA, A.; MADAMWAR, D. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and beta-glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology Process**, v. 13, n. 4, p. 166-169, 1997.
- GUTIERREZ, L. E. **Bioquímica de leveduras**. Piracicaba: ESALQ, 1997. 207 p.
- GUTIERREZ-CORREA, M.; TENGEDY, R. P. Production of cellulase on sugarcane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 665-667, 1997.
- HALLIWELL, G. **Methods of enzymatic analysis**. USA: Verlag Chemie, 1965. 1064 p.

HERNANDEZ RAMIREZ, J. (Ed.) **Handbook of sugar cane derivatives.**

México: ICIDCA/GEPLACEA/UNDP, 1988. 239 p.

JANES, R. L. The chemistry of wood and fibers. In: MacDONALD, R. G.;

FRANKLIN, J. N. **The pulping of wood.** New york: McGraw-Hill, 1969. p. 33.

JURASEK, L.; PAICE, M. G.; YAGUCHI, M.; O'LEARY, S. The catalytic

mechanism of cellulase. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.) **Biomass conversion technology: principles and practice.** Oxford: Pergamon Press, 1987. 211 p.

KANG, M. K.; RHEE, Y. H. Carboxy methyl cellulases active and stable at alkaline pH from alkalophilic *Cephalosporium* sp. RYM-202.

Biotechnology Letters, v. 17, n. 5, p. 507-512, 1995.

KAUR, P. P.; ARNEJA, J. S.; SINGH, J. Enzymic hydrolysis of rice straw by crude cellulase from *Trichoderma reesei*. **Bioresource**

Technology, v. 66, n. 3, p. 267-269, 1998.

KHANDKE, K. M.; VITHAYATHIL, P. J.; MURTHY, S. K. Purification of xylanase, β -glucosidase, endocellulase and exocellulase from a

thermofilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. **Archives of Biochemistry**, p. 491-500, 1989.

KLING, S. H.; CARVALHO NETO, C.; FERRARA, M. A.; TORRES, J. C.

R.; MAGALHÃES, D. B.; RYU, D. D. Y. Enhancement of enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse by steam explosion pretreatment.

Biotechnology and Bioengineering, v. 29, p. 1035-1039, 1987.

- LAHR FILHO, D.; GHIRALDINI, J. A.; ROSSEL, C. E. V. Estudos de otimização da recuperação de biomassa de levedura em destilarias. In: WORKSHOP: Produção de biomassa de levedura; utilização em alimentação humana e animal, Campinas: ITAL, 1996. p. 59-67.
- LATIF, F.; RAJOKA, M. I.; MALIK, K. A. Production of cellulases by thermophilic fungi grown on *Leptochloa fusca* straw. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 343-348, 1995.
- LEE, D.; YU, A. H. C.; SADDLER, J. N. Evaluation of cellulase recycling strategies for the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 45, p. 328-336, 1995.
- LOWE, S. E.; THEODOROU, M. K.; TRINCI, A. P. J. Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n. 6, p. 1216-1223, 1987.
- MANDELS, M. **Production and application of cellulase.** USA. Laboratory Procedures. USA: Army Natick Laboratories, 1974. 22 p.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.
- MANNING, G. B.; CAMPBELL, L. L. Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. I. Crystallization and some general properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 236, p. 2952-2957, 1961.
- MENEZES, T. J. B.; DE LAMO, P. R.; ARAKAKI, T. Produção do complexo celulolítico C₁, C_x por microrganismos. **Coletânea do**

- ITAL, v. 7, p. 91-96, 1976.
- 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.
- MENEZES, T. J. B.; HENNIES, P. T. Sistema celulolítico de *Aspergillus niger* em substrato sólido de bagaço de cana-de-açúcar tratado. **Coletânea do ITAL**, v.24, n. 1, p. 75-89, 1994.
- MENEZES, T. J. B.; HIOSHII, S. H. Efeito do tratamento do bagaço de cana na extensão da hidrólise da celulose. **Coletânea do ITAL**, v. 12, p. 123-135, 1982.
- MENEZES, T. J. B.; MAKINO, Y.; GRILLO, R. L. M. Produção de celulase: efeitos do tratamento do bagaço de cana-de-açúcar na produção de celulase. **Coletânea do ITAL**, v. 21, n. 1, p. 29-44, 1991.
- MES-HARTREE, M.; HOGAN, C. M.; SADDLER, J. N. Recycle of enzymes and substrate following enzymatic hydrolysis of steam-pretreatment aspenwood. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 558-564, 1987.
- MILAGRES, A. M. F. Produção de xilanases por *Penicillium janthinellum* e aplicação das enzimas no branqueamento de polpas kraft. Campinas, 1994. 137 p. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual de Campinas.
- MILAGRES, A. M. F.; BORGES, L.; AGUIAR, C. L. Degomagem de rami para fins têxteis utilizando extratos enzimáticos. In: SEMINÁRIO DE

- HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 4, Maringá, 1994.
Anais. Maringá: UEM, 1994. p. 261-269.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- NEDER, R. N. **Microbiologia**: manual de laboratório. São Paulo: NOBEL, 1992. 138 p.
- NOBLE, W. C.; NAIDOO, J. **Os microrganismos e o Homem**. São Paulo: EPU/EDUSP, 1981. 81 p. (Coleção Temas de Biologia, 17).
- NOVO NORDISK. **Celluclast® 1,5 L**: ficha técnica. 1996.
- PALMA, M. B. Influência da agitação e da aeração na atividade de xilanases de *Penicillium janthinellum*. Viçosa, 1993. 89 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
- PATIL, S. G.; PATIL, B. G.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Supplementation with skim milk enhances the cellulolytic activity of fungi. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 6, p. 631-634, 1995.
- PHILLIPS, J. A.; HUMPHREY, A. E. Process biotechnology for the conversion of biomass into liquid fuels. In: WISE, D. L. (Ed.) **Liquid Fuel Development**. New York: CRC Press, 1983. cap. 4, p. 65-95.
- PLAYNE, M. J. Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 426-433, 1983.

- RAJOKA, M. I.; MALIK, K. A. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 1, p. 21-27, 1997.
- RUSSOMANO, V. H. **Introdução à administração de energia na indústria**. São Paulo: Pioneira/EDUSP, 1987. 262 p.
- RYU, D. D. Y.; LEE, S. B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of structural properties of cellulose on hydrolysis kinetics. **Enzyme Engineering**. New York: Plenum Press, 1992. p. 325-333.
- SALES, A. M.; SALVA, T. J. G.; MENEZES, T. J. B. Incorporação de biomassa fúngica em resíduos agroindustriais por fermentação submersa. **Coletânea do ITAL**, v. 17, n. 2, p. 141-146, 1987.
- SANTOS, A. L. L.; SHIROSE, I.; ARRUDA, S. M. Influência de alguns fatores na produção de celulase e xilanase pelo fungo *Rhizopus* sp. **Coletânea do ITAL**, v. 15, p. 1-22, 1985.
- SASAKI, M.; KABYEMELA, B.; MALALUAN, R.; HIROSE, S.; TAKEDA, N.; ADSCHIRI, T.; ARAI, K. Cellulose hydrolysis in subcritical and supercritical water. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 13, n. 8, p. 261-268, 1998.
- SILVA, D. M.; DILLON, A. J. P. Produção de celulasas em fermentação semi-sólida por uma linhagem de *Trichoderma* sp. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 15, 1988. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1988.

- STEVENS, B. J. H.; PAYNE, J. Cellulase and xylanase production by yeast of the genus *Trichosporon*. **Journal of Genetic Microbiology**, v. 100, p. 381-393, 1977.
- TANG, L. G.; HON, D. N. S.; PAN, S. H.; ZHU, Y. Q.; WANG, Z.; WANG, Z. Z. Evaluation of microcrystalline cellulose: changes in ultrastructural characteristics during preliminary acid hydrolysis. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 59, n. 6, p. 483-488, 1996.
- TARGONSKI, Z. Alkali process for enhancing susceptibility of autohydrolysed beech sawdust to enzymatic hydrolysis. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 7, p. 126-128, 1985.
- THOMPSON, N. S. Hemicellulose as a biomass resource. In: SOLTES, J. (Ed.) **Journal Wood and Agricultural Residues**; research on use for feed, fuels and chemicals. New York: Academic Press, 1983. p. 101-119.
- TSUNEDA, A.; THORN, R. G. Interactions of wood decay fungi with other microorganisms, with emphasis on the degradation of cell walls. **Canadian Journal of Botanic**, v. 73, n. 1, p. 1325-1333, 1995.
- UMIKALSON, M. S.; ARIFF, A. B.; SHAMSUDDIN, Z. H.; TONG, C. C.; HASSAN, M. A.; KARIN, M. I. A. Production of cellulase by a usild strain of *Chaetomium globosum* using delignified oil palm empty-fruit-bunch fibre as susbstrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, n. 5, p. 590-595, 1997.

- UPDEGRAFF, D. M. Semimicro determination of cellulose in biological materials. **Analytical Biochemistry**, v. 32, p. 420-424, 1969.
- VAN WALSUM, G. P.; ALLEN, S. G.; SPENCER, M. J.; LASER, M. S.; ANTAL, M. J.; LYND, L. R. Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57, n. 14, p. 157-170, 1996.
- VITTI, L. S. S. Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus* sp e seus mutantes isolados de bagaço de cana. Piracicaba, 1988. 108 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- VLAEV, S. D.; DJEJEVA, G.; RAYKOVSKA, V.; SCHÜGERL, K. Cellulase production by *Trichoderma* sp. grown on corn fibre substrate. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 7, p.561-565, 1997.
- WHISTLER, R. L.; CORBETT, W. M. Polysaccharides. In: PIGMAN, W. (Ed.) **The carbohydrates, chemistry, physiology**. New York: Academic Press Inc., 1957. cap. 12, p. 641-708.
- WHITAKER, J. R. Effect of temperature on rates of enzyme catalyzed reactions. In: **Principles of Enzymology for the Food Science**. New York: Marcel Dekker, 1994. 2. ed., p. 301-328.
- WOODWARD, J. Xylanases: functions, properties and applications. In: WISEMAN, A. (Ed.) **Topics in enzyme and fermentation biotechnology**. 1984. p. 9-30.

- WYK, J. P. H.; BOTHA, A. C. Hydrolysis of cellulose materials during successive treatment with cellulase from *Penicillium funiculosum*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 687-689, 1997.
- ZAMOST, B. L.; NIELSEN, H. K.; STARNES, R. L. Thermostable enzymes for industrial applications. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, p. 71-82, 1991.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. SANEST: Sistema de Análise Estatística para Computadores. Piracicaba: SEI, 1992. (software)