

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS CELULOLÍTICOS DO
CERRADO BRASILEIRO PARA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Autor: Andreza de Mello Lopes
Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico de
Souza Castro

Rio Verde - GO
Fevereiro – 2015

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS CELULOLÍTICOS DO
CERRADO BRASILEIRO PARA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Autor: Andreza de Mello Lopes
Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico de
Souza Castro

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em Agroquímica no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - *Câmpus* Rio Verde.

Rio Verde - GO
Fevereiro - 2015

L864b Lopes, Andreza de Mello
Bioprospecção de fungos celulolíticos do cerrado brasileiro para hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. - Andreza de Mello Lopes. - Rio Verde. – 2015.
53 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal Goiano - Câmpus Rio Verde, 2015.

Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza

Bibliografia

1. Enzimas. 2. Fungos. 3. Hidrólise. I. Título
II. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde.

CDD: 622.6692

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS CELULOLÍTICOS DO
CERRADO BRASILEIRO PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
DE BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Autora: Andreza de Mello Lopes
Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 12 de fevereiro de 2015.


Prof. Dr. Ubirajara Coutinho
Filho
Avaliador externo
UFU


Prof. Dr. Fábio Henrique
Dyszy
Avaliador interno
IF Goiano/RV


Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro
Presidente da banca
IF Goiano/RV

Metade de mim
Agora é assim
De um lado a poesia, o verbo, a saudade
Do outro a luta, a força e a coragem pra chegar no fim
E o fim é belo e incerto...
depende de como você vê
O novo, o credo, a fé que você deposita em você
e só.

“O Teatro Mágico”

AGRADECIMENTOS

A Deus e a graça dos dons do Espírito Santo, principalmente pelo dom da fortaleza, quando todos os experimentos falhavam, os reagentes acabavam e os equipamentos estragavam.

Agradeço aos meus pais Antonio Carlos e Aparecida, por todo o carinho e mesmo não entendendo o que eu faço, me apoiam e incentivam.

Ao meu irmão, Eduardo e minha cunhada, Raianne pelo apoio.

Ao meu namorado lindo e forte; Artur, pela constante presença, valiosas sugestões e por todo o suporte emocional.

A minha família e amigos dos quais me ausentei ao longo dessa jornada, mas que estavam sempre torcendo pelo meu sucesso e que estarão para sempre comigo.

Ao melhor aluno de iniciação científica João Pedro, por fazer do meu sonho, o seu sonho e se dedicar extremamente neste projeto.

Aos colegas do laboratório de química tecnológica e ao laboratório de microbiologia agrícola, pelo auxílio acadêmico e pelos momentos de descontração que eram verdadeiras fontes de motivação.

Aos meus professores do colégio, da graduação e da pós-graduação, que tanto me incentivaram e sempre acreditaram em meu potencial.

Agradeço ao meu orientador Prof. Carlos Frederico de Souza Castro e meu coorientador por Edson Luiz Souchie, pela oportunidade e confiança, pela orientação e incentivo sempre constante, pelas críticas e sugestões, pela paciência e disposição durante a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica, em especial ao coordenador Prof. Adriano e a secretária Pâmella.

A amiga Daniela, que mais morou sozinha do que comigo.

A minha amiga, colega, irmã, Taís, muito obrigada.

Agradeço a FAPEG, pela concessão da bolsa de mestrado.

Obrigada!

BIOGRAFIA DA AUTORA

Andreza de Mello Lopes, filha de Antonio Carlos Lopes e Aparecida Batista de Mello Lopes, natural de Américo de Campos – SP. Iniciou sua formação profissional no Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde, no ano de 2007, com o curso Técnico em Agricultura. E cinco anos depois, estava formada em Tecnologia em Saneamento Ambiental, Bacharelado em Gestão Ambiental, ambos pelo Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde e especializada em Gestão Ambiental e Sustentabilidade pela Faculdades Integradas de Cassilândia-MS. No início de 2013 ingressou no mestrado em Agroquímica também pelo Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	ix
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Cana-de-açúcar.....	14
2.2 Material lignocelulósico.....	15
2.3 Bagaço de cana-de-açúcar	16
2.3.1 Celulose	17
2.3.2 Hemicelulose.....	18
2.3.3 Lignina.....	18
2.4 Etanol lignocelulósico	20
2.5 Pré-tratamento	21
2.6 Hidrólise enzimática.....	22
2.7 Fungos celulolíticos	23
2.8 Enzimas	24
2.9 Perspectivas enzimática	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
4. OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo geral	34
4.2 Objetivo específico.....	34
CAPÍTULO 1	35
1. INTRODUÇÃO.....	36
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	37
2.1 Coleta, fermentação, isolamento e manutenção	37
2.2 Identificação molecular dos isolados.....	38
2.3 Determinação do perfil enzimático.....	38
2.4 Hidrólise enzimática e fermentação.....	40
3. Resultados e Discussão.....	40

3.1 Isolamento e identificação dos microrganismos	40
3.2 Determinação do perfil enzimático.....	42
3.3 Hidrólise enzimática	45
4. CONCLUSÃO.....	49
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estrutura da celulose.....	17
Figura 2: Precursores básicos da lignina.....	19
Figura 3: Estrutura geral da lignina.....	19
Figura 4: Efeito do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.....	21
 Capítulo 1	
Figura 1: Perfil enzimático dos isolados utilizando papel de filtro Whatman nº 1 como substrato, obtida do cultivo dos fungos isolados do bagaço de cana-de-açúcar. Valores correspondem a média de 3 repetições, convertidos em g L ⁻¹ Glicose.....	42
Figura 2: Perfil enzimático dos isolados utilizando carboximetilcelulose como substrato, obtida do cultivo dos fungos isolados do bagaço de cana-de-açúcar. Valores correspondem a média de 3 repetições, convertidos em g L ⁻¹ Glicose.....	44
Figura 3: Hidrólise enzimática do <i>Paecilomyces parvisporus</i> . Com 72h de hidrólise foi introduzido a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPO4. Em que A. T. F significa após o término da fermentação.....	46
Figura 4: Hidrólise enzimática do <i>Aspergillus fumigatus</i> . Com 72h de hidrólise foi introduzido a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPO4. Em que A. T. F significa após o término da fermentação.....	47
Figura 5: Hidrólise enzimática do <i>Fusarium oxysporum</i> . Com 72h de hidrólise foi introduzido a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPO4. Em que A. T. F significa após o término da fermentação.....	48

ÍNDICE DE TABELA

	Página
Tabela 1: FPU/mL de cada isolado aos 7 dias de incubação.....	46

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

$((C_5H_8O_4)_n)$	Hemicelulose
$((C_6H_{10}O_5)_n)$	Celulose
$(C_7H_4N_2O_7)$	Ácido 3-5 diinitrosalicílico
$(CHOH)_2.COONa.COOK)$	Tartarato Duplo de Sódio e Potássio
μL	Micro litro
%	Porcentagem
$^{\circ}C$	Graus Celsius
β -	Beta
Abs.....	Absorbância
BDA	Batata, dextrose, ágar
C4.....	4 átomos de carbono
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Atividade de Endo-1,4- β -Glucanase
CTAB.....	Brometo de cetilmetilamonio
DNS	Ácido 3-5 diinitrosalicílico
DP.....	Grau de polimerização
FPU	Filter Paper Unit
FPase	Atividade Celulolítica Total
g	Gramas
GO	Goiás
ITS.....	Espaçador transcrito interno
kg	Quilogramas
M	Mol
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NaOH.....	Hidróxido de sódio
NCBI.....	National Center for Biotechnology Information
nm.....	Nanômetros
N ^o	Número
PCR.....	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto

RESUMO

Atualmente, as enzimas são utilizadas na obtenção de diversos produtos, nas mais diversas áreas e novas aplicações estão em constante desenvolvimento. Nesta área, destaca-se a busca por enzimas celulolíticas, capaz de hidrolisar resíduos agroindustriais, liberando açúcares fermentescíveis, utilizáveis em diferentes processos biotecnológicos, entre eles para a produção de etanol de segunda geração. Os fungos filamentosos são um dos principais microrganismos produtores de enzimas celulolíticas e, diante disso, pesquisadores estão realizando programas de triagem, a fim de isolar e identificar fungos capazes de produzir enzimas lignocelulolíticas. O presente trabalho teve como objetivo a bioconversão de bagaço de cana-de-açúcar em açúcares fermentescíveis, utilizando enzimas celulolíticas produzidas por fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar no cerrado brasileiro. Foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar de duas usinas do cerrado brasileiro como fonte para a obtenção dos microrganismos, isolados por meio de diluição seriada e identificados por sequenciamento de DNA genômico, que resultou em 20 espécies fúngicas distintas. Estes fungos foram cultivados por 21 dias e testados quanto ao perfil enzimático utilizando Papel Whatman nº1 (FPase) e Carboximetilcelulose (CMCase) como substrato, seguindo os protocolos de Ghose (1987), Miller (1959) e Mandels & Weber (1969). Os isolados *Paecilomyces parvisporus*, *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium oxysporum* apresentaram os melhores resultados de atividade enzimática com relação aos demais. Os sobrenadantes enzimáticos dos respectivos fungos, com cargas de 10 FPU g⁻¹ e 25 FPU g⁻¹ foram utilizados para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Após um período de 72 horas, os mesmos foram fermentados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPO4. Os resultados da hidrólise enzimática mostraram que as melhores conversões foram obtidas pelo *Paecilomyces parvisporus* com carga enzimática de 10 FPU g⁻¹, obtendo 1,03 g L⁻¹ glicose com 24 h de hidrólise, e *Aspergillus fumigatus*, com carga enzimática de 25 FPU g⁻¹ também com 24 h de hidrólise, atingiu resultados semelhantes de 1,02 g L⁻¹ glicose. No entanto, *Aspergillus fumigatus* obteve o ápice e estabilização de açúcares nas análises de 48 e 72 horas mantendo com 1,09 g L⁻¹ glicose. Os resultados da bioprospecção de fungos celulolíticos do cerrado brasileiro evidencia o potencial industrial da sua microflora para a produção de enzimas e a utilização dos resíduos agrícolas, como bagaço de cana-de-açúcar são aliados na resolução da problemática de biocombustíveis, contribuindo para a diminuição de custos e amenizando os problemas ambientais.

ABSTRACT

Nowadays, enzymes are used to obtain many products in several areas, and new applications are constantly being developed. Mainly, the search for cellulolytic enzymes, which are able of hydrolyzing agroindustrial residues, releasing fermentable sugars, usable in different biotechnological processes, including the second-generation ethanol production. Filamentous fungi are one of the most important producers microorganisms of cellulolytic enzymes and because of this, researchers are conducting screening programs in order to isolate and identify fungi capable of producing lignocellulolytic enzymes. This study aimed the bioconversion of sugarcane bagasse into fermentable sugars using cellulolytic enzymes produced by fungi isolated from sugarcane bagasse in the Brazilian savanna. Sugarcane bagasse at Brazilian savanna from two industries was used as source of microorganisms, isolated by serial dilution and identified by sequencing genomic DNA. It resulted in 20 different fungal species. These fungi were cultured for 21 days and tested for enzymatic profile using Paper whatman nº1 (FPase) and carboxymethylcellulose (CMCase) following the protocols of Ghose (1987), Miller (1959) and Mandels & Weber (1969). The isolates, *Paecilomyces parvisporus*, *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum* showed the best results of enzyme activity compared to the others. The supernatants enzyme of the respective fungi, with loads of 10 FPU g⁻¹ and 25 FPU g⁻¹ were used for the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. After a period of 72h they were fermented by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* YPO4. The results of enzymatic hydrolysis show that the best conversions were obtained by *Paecilomyces parvisporus* with enzyme load of 10 FPU g⁻¹ to obtain 1.03 g L⁻¹ of glucose with 24 h of hydrolysis. And by the *Aspergillus fumigatus* with enzyme load of 25 FPU g⁻¹ also with 24h achieved similar results by hydrolysis of 1.02 g L⁻¹ glucose, obtained the higher level and stabilization analysis of sugars in the 48 and 72 hour keeping up with 1.09 g L⁻¹ glucose. Bioprospection of cellulolytic fungi from Brazilian savanna evidences the industrial potential of its microflora to produce enzymes and the use of agricultural waste such as sugar cane bagasse are allies in resolving the problematic of biofuels, contributing to the reduction of spending and mitigating environmental problems.

1. INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis liberam gases responsáveis pelo efeito estufa, contribuindo para o aquecimento da terra, chuva ácida e doenças respiratórias. Diante da premissa do esgotamento das reservas dos combustíveis fósseis, aliada ao incentivo de desenvolver combustíveis que gerem menos impacto ao meio ambiente, surgem os biocombustíveis.

Na década de 1970, o Brasil iniciou um programa para substituir a gasolina por etanol, a fim de diminuir a dependência nos períodos de instabilidade política e econômica. Conhecido como Pró-Álcool, foi considerado como uma resposta à primeira crise do petróleo. A cana-de-açúcar foi escolhida como a matéria-prima para a produção de etanol, e, como consequência, os estudos agrícolas e tecnológicos foram grandemente intensificados (SOCCOL *et al.*, 2010). Em decorrência, o programa levou o Brasil a ser considerado como um dos maiores produtores de etanol, destacando-se por sua tecnologia avançada, e posição favorável em termos de segurança energética.

No entanto, biocombustíveis como o etanol de cana-de-açúcar trazem consigo questionamentos quanto a segurança alimentar, por causa da competição com áreas de produção de alimentos, e conseqüentemente, a elevação dos preços dos gêneros alimentícios, geração de novos desmatamentos e perda da biodiversidade.

Como afirma Sukumaran e colaboradores (2010), existe uma população enorme para se alimentar e dada a limitada disponibilidade de terras é preciso desenvolver tecnologias de bioetanol, que utilizem matéria-prima a partir da biomassa e que não tenham valor para a alimentação humana ou animal. Conseqüentemente é preciso aumentar a produção de combustíveis, minimizando os impactos ambientais e assegurando a produção de alimentos, sendo alternativa sustentável utilizar os resíduos de produção como fonte de energia.

Dentre estes subprodutos, o bagaço de cana-de-açúcar certamente ocupa posição de grande destaque nas atividades agrícolas brasileiras. Estes resíduos apresentam alto valor energético, seguido de baixo custo de obtenção e conversão. A produção anual de bagaço de cana-de-açúcar atinge enormes cifras. Estima-se que, a cada tonelada de cana moída se obtém entre 250 a 300 Kg de bagaço, levando ao reconhecimento que este resíduo pode ser utilizado na produção de combustível (FURLAN *et al.*, 2012; SILVA, 2010).

Atualmente, a conversão de material lignocelulósico ou biomassa em açúcares fermentáveis para produção de etanol vem sendo considerada como alternativa promissora para aumentar a produção de etanol necessária para atender à demanda mundial (BUCKERIDGE, SANTOS e SOUZA, 2010). Diante do aumento nos preços da gasolina, é provável que etanol lignocelulósico se torne, no futuro, não só mais ecológico, mas também um combustível de transporte mais econômico e atraente (CHOVAU, DEGRAUWE e BRUGGEN, 2013).

Estudos como os de Oliveira e colaboradores (2014), utilizando palha da cana-de-açúcar, e de Cao e Aita (2013), utilizando bagaço de cana-de-açúcar, comprovam o grande potencial desta biomassa para a geração de etanol de segunda geração e tentam determinar qual o melhor processo para essa finalidade. Contudo, a comercialização do etanol lignocelulósico está limitado em grande parte pela deficiência de tecnologias economicamente viáveis e aos custos relacionado as enzimas (SUKUMARAN *et al.*, 2010).

Como afirma Silva (2010), o processo de hidrólise escolhido deve ser economicamente viável, em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado. Dentre as técnicas de hidrólise, a hidrólise enzimática apresenta grandes vantagens, pois, é considerada como a mais promissora tecnologia de hidrólise da celulose (CHOVAU, DEGRAUWE e BRUGGEN, 2013). É um processo que envolve a ação sinérgica entre enzimas celulolíticas; contudo, ainda apresenta alto custo associado a baixa produtividade (ZHANG, HIMMEL e MIELENZ, 2006). Zhang e colaboradores (2006), afirmam que a redução significativa no custo será importante para a utilização comercial em biorrefinarias.

O Brasil apresenta imensa biodiversidade que se acredita compreender 10-20% do total de espécies conhecidas na Terra. Muitos grupos brasileiros estão realizando programas de triagem, a fim de isolar e identificar os microrganismos capazes de produzir enzimas lignocelulolíticas. Estes fungos são capazes de degradar a celulose, hemicelulose e lignina de plantas em decomposição pelo conjunto complexo de enzimas hidrolíticas e excretas oxidativas, como celulases, hemicelulases e ligninases (SOCCOL *et al.*, 2010).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, *Saccharum spp.*, é uma monocotiledônea que pertence a família *Poaceae*. As principais espécies surgiram no continente asiático (Índia e China) e na Oceania (Nova Guiné). No Brasil e no mundo as variedades cultivadas são híbridos multiespecíficos. Esta família tem como características principais o crescimento do caule em colmos, a inflorescência em forma de espiga, as folhas com lâminas sílica em suas bordas e bainha aberta (DIOLA e SANTOS, 2011).

A cana-de-açúcar contém um genoma extremamente complexo, que, por muito tempo, limitou o progresso do seu melhoramento. O metabolismo C4 a torna a espécie eficiente na fixação de carbono, que converte energia radiante em energia química (BORÉM, SILVA e DIOLA, 2011; DIOLA e SANTOS, 2011).

A cana é uma cultura importante para a produção de alimento e energia. Entre as principais características estão sua capacidade de acumular altos níveis de sacarose em seus caules e alto rendimento característico, obtendo a maior produção em tonelada entre as espécies cultivadas (DAL-BIANCO *et al.*, 2012).

O Brasil tem as melhores condições de oferta de terra, clima e tecnologia de produção em grande escala, o que o fez líder mundial na produção de cana, etanol e açúcar (CORTEZ, 2010). Na década de 1970, o Brasil iniciou o programa (Pró-álcool) para substituir a gasolina por etanol e a cana-de-açúcar foi escolhida como a matéria-prima (SOCCOL *et al.*, de 2010).

O lançamento do Pro-Álcool representou a transição, combinando os interesses da agroindústria canavieira, onerados pela queda dos preços do açúcar, e a necessidade de estabilizar a balança após a crise do petróleo, ocorrido na década de 1970. Crises na oferta do etanol também prejudicaram a sua credibilidade e a sua consolidação comercial que só foi superada após a introdução de veículos flex-fuel e com a perspectiva de minimizar as mudanças climáticas (PUERTO RICO, MERCEDES e SAUER, 2010).

A lavoura de cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil tendo um acréscimo na área estimado em cerca de 286,6 mil hectares na temporada 2014/15, equivalendo a 3,3% em relação à safra 2013/14. As áreas destinadas à atividade

sucroalcooleira na safra 2014/15 serão de aproximadamente 9,09803 milhões de hectares, distribuídas entre todos estados produtores. Goiás, com 9,85% (896,06 mil hectares) permanece em segundo lugar, atrás de São Paulo, o maior produtor com 51,43% (4,6788 milhões de hectares) com relação à área plantada (CONAB, 2014).

Contudo, como descreve Balat (2011), o etanol pode ser produzido a partir de diversas matérias-primas, que são classificados em três categorias: matérias-primas contendo sacarose (cana-de-açúcar, beterraba, sorgo doce e frutas), contendo amido (batata-doce, milho, sorgo, trigo, arroz, batata e mandioca) e materiais lignocelulósicos (madeira e palha).

2.2 Materiais lignocelulósicos

Biomassa vegetal, materiais ou resíduos lignocelulósicos, compreendem quaisquer materiais de origem vegetal que, através de bioprocessos, podem fornecer bioenergia. São compostas por vários polissacarídeos, sendo considerada a matéria-prima mais promissora para produção comercial em larga escala de etanol combustível, devido a sua grande disponibilidade e baixo custo (CARDONA e SANCHEZ, 2007).

Por sua vez, os materiais lignocelulósicos podem ser classificados em quatro grupos com base no seu tipo: 1- os resíduos florestais, 2- resíduos sólidos urbanos, 3- resíduos de papel, e 4- resíduos de culturas (BALAT, 2011).

A literatura relata vários artigos sobre a utilização de diversos resíduos lignocelulósicos, como bagaço de cana-de-açúcar (CAO e AITA, 2013), palha de cana-de-açúcar (OLIVEIRA *et al.*, 2014), bagaço de sorgo (SHEN *et al.*, 2012), palha de milho (YANG *et al.*, 2011), palha de arroz (RAN *et al.*, 2012) como fontes promissoras para a produção de etanol de segunda geração.

O aproveitamento da bioenergia contida na biomassa vegetal é uma das mais importantes alternativas para o enfrentamento dos problemas, principalmente nos países tropicais, que por coincidência são os mais pobres e que por isso, não dispõem de recursos e conhecimento para desenvolver alternativas de alta tecnologia. Mesmo os países desenvolvidos estão aplicando grande soma de recursos na pesquisa para o desenvolvimento de plataforma baseada na transformação da biomassa em combustíveis sólidos, líquidos, energia elétrica, biogás, bio-óleo e produtos químicos diversos, porque reduzir a dependência do petróleo é necessidade premente não apenas por razões econômicas, mas principalmente estratégicas e ambientais (MATSUOKA *et al.*, 2012).

A utilização de culturas alimentares para a produção de bioetanol levanta grandes questionamentos, pela necessidade de utilizar os cultivares como fonte de alimento humano e animal (BALAT, 2011). Contudo, é preciso atender a necessidade energética da humanidade sem competir com a produção de alimentos, e é vantajoso o uso de plantas fibrosas, como a cana-de-açúcar.

Conseqüentemente, a aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos ajudaria a solucionar os problemas que sua disposição poderia causar. Contudo, com o progresso das inovações biotecnológicas, principalmente na área de enzimas e tecnologia de fermentação, caminhos estão abertos para a sua utilização (PANDEY *et al.*, 2000).

Diante disso, o uso dos resíduos agrícolas e industriais e a otimização dos bioprocessos estão contribuindo para o aumento da eficiência e redução de custos na produção de enzimas holocelulolíticas em larga escala (SINGHANIA *et al.*, 2010).

2.3 Bagaço de cana-de-açúcar

Para cada tonelada de cana são gerados em torno de 250 a 300 kg de bagaço, segundo alguns autores (BORTOLAZZO, 2011; SILVA, 2010). O bagaço, atualmente, tem diversas aplicações na economia brasileira, sendo, portanto, aplicados na alimentação animal, na indústria de cosméticos, na produção de combustível, na cogeração de energia e na engenharia civil (COSTA e BOCCHI, 2012).

O bagaço, mesmo quando queimado para a produção de calor nas caldeiras, é incapaz de substituir o uso da lenha e restam ainda entre 37 a 50 kg por tonelada de cana-de-açúcar moída. O resíduo da sobra de bagaço preocupa, pois toma espaço e polui. Sendo assim, deve se encontrar a forma de aproveitá-lo (BORTOLAZZO, 2011). E, cerca de dois terços da energia existente na cana-de-açúcar estão contidos no bagaço e na palha, sendo que por meio da técnica de hidrólise é possível utilizá-la (MACHADO, 2009).

Apenas uma parte da biomassa produzida é usada para a produção da bioenergia, sendo que um terço da planta é utilizado para a produção de açúcar, um terço do bagaço gerado é queimado para a produção de eletricidade, e o restante é deixada no campo, o qual é decomposto por microrganismos (SOCCOL *et al.*, 2010).

Segundo Silva (2010), a constituição química do bagaço depende de diversos fatores, entre eles: o tipo de solo e a qualidade da cana, as técnicas de colheita e o

manuseio empregado. O bagaço é um material lignocelulósico que consiste de feixes de fibras e outras estruturas elementares como, vasos parênquima e células epiteliais. Sua composição média é de 50% de umidade, 2% de Brix (sólidos solúveis em água) 46% de fibra (32 – 50% de celulose, 19 – 25% de hemicelulose e 23-32% de lignina) e 2% de cinzas (HAMELINCK, HOOIJDONK e FARAIJ, 2005; PANDEY *et al.*, 2000).

2.3.1 Celulose

A celulose é o principal polímero estrutural da parede celular da planta. Seu conteúdo varia dependendo da espécie, do ambiente, posição, crescimento e maturação. A celulose é um homopolissacarídeo linear que consiste em unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) cujo tamanho é determinado pelo grau de polimerização (DP) que varia de 100 a 2000 DP. Esta natureza de ligação permite que a estrutura de microfibras desenvolva fortes ligações de hidrogênio, intermoleculares e intramoleculares. A figura 1 representa a cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose. As cadeias de celulose formam as fibrilas elementares, caracterizadas por duas regiões: uma região cristalina, que tem a configuração mais ordenada formada por cadeias de celulose unidas por ligações de hidrogênio e força de Van der Waals, e a região amorfa, menos ordenada e mais susceptível a hidrólise (SILVA, 2010; PASANGULAPATI *et al.*, 2012).

Na maioria dos materiais lignocelulósicos, aproximadamente 35-45% da substância seca é celulose. As microfibrilas da celulose têm comprimentos indefinidos e diferentes graus de cristalinidade e são incorporadas numa matriz de gel composta por hemicelulose, lignina e outros polímeros de hidratos de carbono. Microfibrilas da celulose são de grande importância nos tecidos da biomassa, atuam na estrutura da parede celular e representam o principal contribuinte para a resistência mecânica da parede celular e (LIU e SUN, 2010).

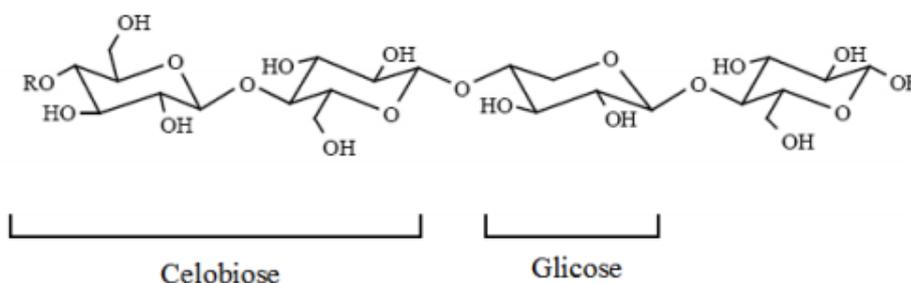


Figura 1: Estrutura da celulose (FENGEL E WEGENER, 1989).

2.3.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um polissacarídeo ramificado composto por diferentes monômeros de açúcar, tais como glicose, xilose, manose, galactose e arabinose e ácidos urônicos (PASANGULAPATI *et al.*, 2012). Com configuração equatorial β - (1 \rightarrow 4), incluem também xiloglucanos, xilanas, mananas e glucomanas e β - (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4) glucanos. Estes tipos de hemiceluloses estão presentes na parede celular de todas as plantas terrestres, exceto para β - (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4) glucanos, que são restritos a ordem das *Poales* e outros grupos. A estrutura da hemicelulose varia muito entre diferentes espécies e contribui no reforço da parede celular através da interação com a celulose, e em alguns episódios, com a lignina (SCHELLER e ULVSKOV, 2010).

Em plantas perenes como a cana-de-açúcar, o principal açúcar da hemicelulose encontrado é a xilana, como ocorre na maioria das matérias-primas vegetais. Mas a arabinose pode contribuir com quantidade significativa dos açúcares de pentoses derivados dos diferentes resíduos agrícolas e de outras culturas (BALAT, BALAT e ÖZ, 2008).

2.3.3 Lignina

A lignina é um dos principais componentes presentes no bagaço de cana-de-açúcar, sendo um polímero resultante do grupo fenilpropanoides, repetidos de forma irregular, que têm sua origem na polimerização desidrogenada do álcool coniferílico. Os polímeros fenilpropanoides que constituem a lignina são altamente condensados e muito resistentes à degradação. A lignina é o mais importante componente não carboidratado da biomassa lignocelulósica. Ela é depositada na rede de carboidratos da parede celular secundária das plantas, durante o seu crescimento. A lignina é formada a partir de três precursores básicos, que são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 2). Este heteropolímero amorfo é constituído de unidades de fenilpropano conectadas por diferentes ligações, como pode ser observado na figura 3 (SILVA, 2010).

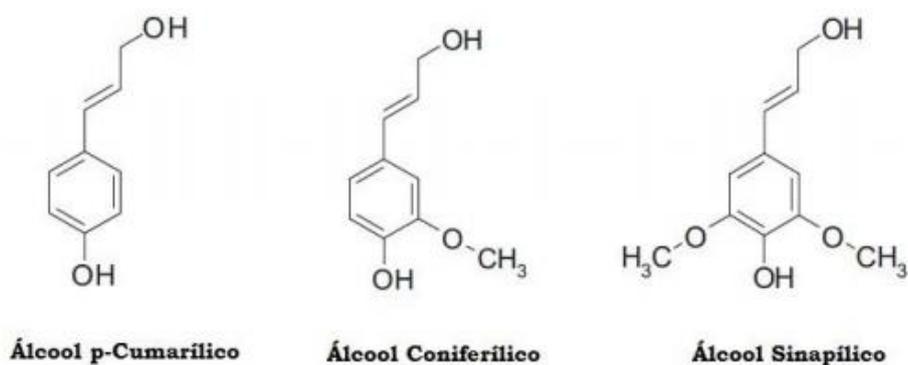


Figura 2: Precursores básicos da lignina.

A lignina em muitos casos é bastante resistente à degradação por vias microbianas ou químicas (BALAT, BALAT e ÖZ, 2008). Por se tratar de polímero natural, existe em todas as plantas terrestres, embora alguns organismos aquáticos possam conter lignina ou componentes do tipo da lignina (LU e RALPH, 2010).

Lignina é o material de cimentação que proporciona elasticidade e resistência mecânica à madeira. É uma macromolécula fenólica com elevado grau de ligações cruzadas entre as unidades de fenilpropano. Esta reticulação torna a lignina mais estável do que a hemicelulose (PASANGULAPATI *et al.*, 2012). Quando a lignina encapsula a celulose, origina um impedimento estérico que a torna menos acessível ao ataque enzimático (HIMMEL *et al.*, 2007).

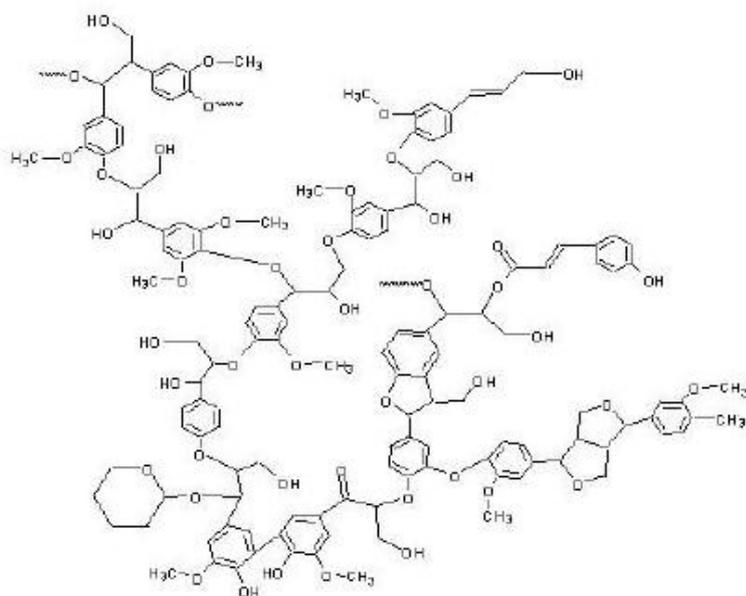


Figura 3: Estrutura geral da Lignina, adaptada por Gómez Rueda, 2010.

2.4 Etanol lignocelulósico

O uso de resíduos agrícolas para a produção de biocombustíveis e produtos químicos alternativos é considerada uma das estratégias mais promissoras para substituir os combustíveis fósseis não renováveis. A maioria dos biocombustíveis é produzida a partir da fermentação de substratos como a cana-de-açúcar e o milho, dando origem ao chamado etanol de primeira geração. Contudo, o etanol de 1ª geração compete diretamente com a produção de alimentos. Por esta razão, mais atenção tem sido dada ao desenvolvimento de biocombustíveis que utilizem resíduos agrícolas, como palhas de arroz, cana, trigo, milho e bagaço de cana. Porém, enquanto os biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de componentes vegetais simples, incluindo a sacarose e amido, a produção de biocombustíveis de segunda geração requer a conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares simples. Para isso é necessário a atuação de misturas enzimáticas, pelas diferentes composições dos resíduos agrícolas (MAITAN-ALFENAS, VISSER E GUIMARÃES, 2015).

No Brasil, o estudo da produção de etanol de segunda geração é voltada principalmente para o uso de bagaço de cana como material celulósico (BARAL, BAKSHI e SMITH, 2012).

A produção do etanol de segunda geração é resultado da decomposição dos polissacarídeos em açúcares simples para a fermentação e a destilação subsequente. A celulose contida na biomassa de caules e folhas é um polissacarídeo composto de 10.000 moléculas de glicose ligadas. Por seu tamanho e estrutura, as moléculas de glicose que compõem a polpa não são fermentáveis por microrganismos, tornando impossível a sua utilização para a produção de etanol com a tecnologia de primeira geração (RAELE *et al.*, 2014).

Para o Brasil preservar sua liderança na tecnologia de produção de etanol, é preciso investir na geração de novas tecnologias. Atualmente, a conversão de material lignocelulósico ou biomassa em açúcares fermentáveis para a produção de etanol é considerada uma alternativa promissora para suprir a demanda (BUCKERIDGE, SANTOS e SOUZA, 2010).

Nos dias de hoje, toda a produção em escala industrial de etanol pertence à primeira geração de biocombustíveis. Entretanto, a tecnologia para produção de etanol de segunda geração existe. Contudo, um dos principais obstáculos para a sua implementação é a combinação de investimentos de alto risco (incluindo riscos

tecnológicos e políticos) com baixos retornos (LENNARTSSON, ERLANDSON e TAHERZADEH, 2014).

É digno de nota que a segunda geração de etanol é quimicamente idêntica à primeira geração. A mudança é apenas no processo, ou seja, o caminho tecnológico para obtê-lo (RAELE *et al.*, 2014).

2.5 Pré-tratamentos

O pré-tratamento é necessário pela forte interação existente entre a celulose, hemicelulose e lignina, e o objetivo deste processo é remover a lignina e a hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material (ORTÍZ e QUINTERO, 2014).

Segundo, Silva (2010), o pré-tratamento de biomassa é um processo chave para tornar estas tecnologias competitivas contra os biocombustíveis produzidos a partir de amido e açúcares facilmente fermentáveis.

A figura 4 é a representação esquemática da ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico. Fonte: (MOSIER *et al.*, 2005)

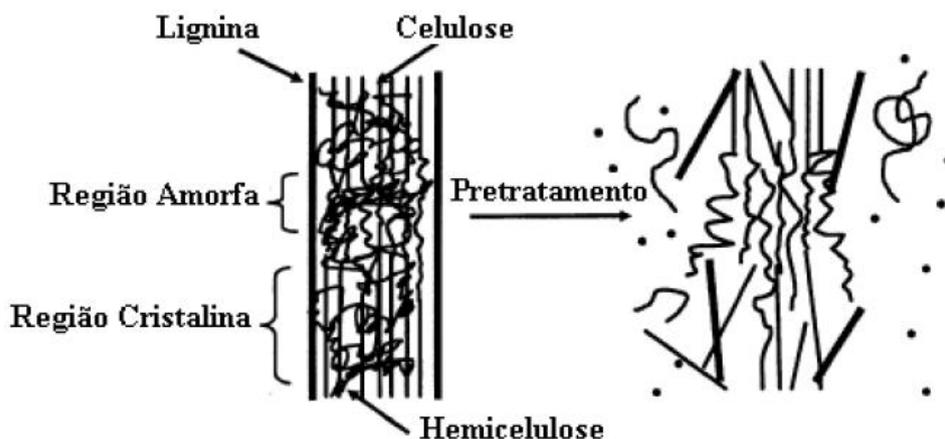


Figura 4: Efeito do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.

Dentre os pré-tratamentos para deslignificação da biomassa, encontram-se os pré-tratamentos mecânicos, físicos (explosão a vapor, termo-hidrólise), químicos (ácidos concentrados ou diluídos), organosolvente, combinados (afex, explosão de CO₂) e o biológicos (SILVA, 2010).

A variedade de características físico-químicas da biomassa celulósica revela a necessidade de tecnologias de pré-tratamento que auxiliem na conversão rápida e eficiente dos polímeros de hidratos de carbono em açúcares fermentescíveis. Métodos de pré-tratamento apropriados melhoraram a hidrólise enzimática da biomassa, por causa da estrutura cristalina da celulose e a estrutura complexa de lignina e hemicelulose. A escolha do pré-tratamento tem efeito sobre o rendimento de açúcar, evitando a degradação de açúcares derivados da hemicelulose e minimizando a formação de inibidores para os passos subsequentes de fermentação. Um processo adequado deverá minimizar o uso de calor e energia (BADIEI *et al.*, 2014), pois, os pré-tratamentos da biomassa e os tratamentos subsequentes contribuem para o custo final. Estratégias que empregam menos etapas podem reduzir os custos e produzir combustíveis e produtos com maior valor agregado e mais rentável (AGBOR *et al.*, 2014).

2.6 Hidrólise enzimática

A biomassa lignocelulósica pode ser hidrolisada em açúcares mais simples, através da hidrólise ácida ou enzimática (POOVAIAH *et al.*, 2014). A hidrólise enzimática é o método mais viável, conveniente e ecologicamente correto para a hidrólise do material lignocelulósico, resultando em rendimentos de açúcar apreciáveis de mais de 90% em condições hidrolíticas otimizados (CHANDEL *et al.*, 2012).

Portanto, a hidrólise enzimática está se tornando uma das formas mais adequadas porque requer menor quantidade de energia e condições ambientais suaves. A desconstrução enzimática da biomassa lignocelulósica é complexa, pois inúmeras características estruturais as tornam muito recalcitrante. Em adição à rede complexa formada pela celulose, hemicelulose e lignina, algumas enzimas podem ser absorvidas pela lignina, diminuindo o rendimento da hidrólise (POOVAIAH *et al.*, 2014).

Os fungos são capazes de degradar a celulose, hemicelulose e lignina das plantas em decomposição por um conjunto complexo de enzimas hidrolíticas e oxidativas, como celulasas, hemicelulasas e ligninasas (SOCCOL *et al.*, 2010). A sacarificação enzimática da celulose é promovida pela ação da endo- β 1,4-glucanase, da exo- β 1,4-glucanase e finalmente da β -glucosidase. Da mesma forma, a sacarificação da hemicelulose requer a ação de diferentes tipos de hemicelulasas como arabinanase, galactanase, mananase e xilanase (SINGH *et al.*, 2014).

López e colaboradores (2013) ressaltam que é essencial identificar as condições de hidrólise ótimas, uma vez que a utilização destas condições pode aumentar consideravelmente o comportamento nos bioprocessos que envolvem conversões simultâneas de matérias-primas agrícolas em açúcares fermentáveis através do emprego da hidrólise enzimática.

2.7 Fungos celulolíticos

Os microrganismos são capazes de degradar holocelulose da parede celular das plantas, através de um conjunto de enzimas que trabalham em sinergismo, denominadas holocelulases (ANDREAUS, FILHO E BOM, 2008). Principalmente quando crescidos em biomassa lignocelulósica.

Dentre os produtores de enzimas, encontram-se os fungos filamentosos e diante disso, muitos grupos brasileiros estão realizando programas de triagem, a fim de isolar e identificar os fungos capazes de produzir enzimas lignocelulolíticas.

Os microrganismos têm sido estudados, incluindo bactérias, fungos e actinomicetos, destacando, os fungos da podridão branca, que recebem considerável atenção por sua capacidade em degradar a lignina de forma seletiva. O pré-tratamento biológico tem o mérito de ser de baixo custo, seguro, favorável ao ambiente e envolver menor consumo de energia (KHUONG *et al.*, 2014).

A ampla disponibilidade de biomassa lignocelulósica, como bagaço de cana ou resíduos agroindustriais estimula a busca de fungos nativos que possam utilizar de forma eficiente esses resíduos. O Brasil possui coleção de diversos fungos, que abrigam material biológico importante que pode e precisa ser explorado, como por exemplo fungos capazes de hidrolisar eficientemente a biomassa e identificar os genes e enzimas com potencial biotecnológico (VALENCIA & CHAMBERGO, 2013).

Contudo, não há registro do número total de espécies de fungos nativos do Brasil que foram identificados ou recolhidos em todo país (VALENCIA & CHAMBERGO, 2013). Entretanto, Lewinsonh e Prado (2005) estimam a existência de mais de 13 mil espécies de fungos conhecidas no Brasil e a previsão de que mais de 150 mil a serem descobertas. Cerca de 100.000 espécies já foram descritas e se estima que possa haver 1,5-5,1 milhões de espécies fúngicas em todo o mundo (HIBBETT *et al.*, 2011).

Existe na natureza grande variedade de microrganismos produtores de celulasas. Dentre os principais produtores estão os fungos filamentosos, principalmente do gênero

Trichoderma e *Aspergillus*. Suas enzimas já são comercializadas, com proporções de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidade distintas, sendo esta última mais baixa no caso do *Trichoderma*, e no caso do *Aspergillus*, a exoglucanase se encontra em menor proporção (HARGREAVES, 2008).

2.8 Enzimas

Os resíduos agroindustriais representam uma importante fonte alternativa para o crescimento microbiano e produção de enzimas industriais. No momento, as celulases e outras enzimas são utilizadas na fabricação de alimentos, cervejaria e vinho, ração animal, têxtil e de lavanderia, indústrias de papel e celulose, bem como na agricultura e para fins de investigação (QAISAR *et al.*, 2014). Além disso, apresentam potencial para o controle de fitopatógenos e na promoção do crescimento vegetal (MACHADO *et al.*, 2012).

O processo de hidrólise enzimática para a produção de etanol lignocelulósico exige o uso de enzimas. As enzimas atualmente são usadas na obtenção de vários produtos e novas aplicações estão em constante desenvolvimento. Devido aos modernos avanços da biotecnologia, hoje, as enzimas podem ser desenvolvidas e utilizadas em processos em que nunca se pensou que poderiam ser aplicadas. As enzimas são catalisadores eficazes, resultando em redução significativa de água e energia e aumento do desempenho econômico e ambiental dos processos de produção (AGOSTINHO *et al.*, 2014).

2.9 Perspectiva enzimática

Segundo Moreira (2013), a aplicação de enzimas holocelulolíticas (celulases, hemicelulases e pectinases) em processos de bioconversão de biomassa lignocelulósica tem elevado o mercado de enzimas.

Diante disso, a busca por estas enzimas vem crescendo rapidamente, tornando-se a força motriz para a pesquisa sobre celulases e xilanases. O investimento público e privado em bioprocessos tem permitido o desenvolvimento de fortes grupos de pesquisa que investigam a biodiversidade fúngica, metagenômica e a descoberta de novas enzimas hidrolíticas ou que possam ajudar na degradação da biomassa lignocelulósica (GOLDMAN e BROWN, 2013).

Atenção especial deve ser dada para o desenvolvimento de misturas enzimáticas, a fim de se determinar quais são os catalisadores enzimáticos importantes e qual a sequência e proporções adequadas da adição destas misturas à biomassa para que se obtenha a perfeita desconstrução da arquitetura da parede celular. Os fungos filamentosos são os microrganismos preferidos pela sua capacidade de produzir e secretar enzimas lignocelulósicos para a degradação da biomassa (VALÊNCIA e CHAMBERGO, 2013).

A produção de soluções multienzimáticas contendo diversas enzimas hidrolíticas tem atraído cada vez mais interesse, por causa de seu potencial para hidrolisar simultaneamente diferentes macromoléculas biológicas (LÓPEZ *et al.*, 2013).

Os estudos buscam determinar quais as enzimas e suas proporções, assim como otimizar o desempenho do consórcio enzimático, sendo de ampla importância para aperfeiçoar a degradação de compostos lignocelulósicos que podem resultar em misturas mais eficientes e menos onerosas.

As celulasas representam atualmente no mundo o terceiro lugar em volume financeiro na comercialização de enzimas industriais, em virtude de suas amplas aplicações no processamento de algodão; reciclagem de papel, na extração de sucos, fabricação de detergentes e aditivos para a alimentação animal. Indubitavelmente, as celulasas podem se tornar o maior comércio de enzimas industriais, se o etanol lignocelulósico produzido a partir de biomassa por via enzimática se tornar um importante combustível para transporte (SINGHANIA *et al.*, 2010).

Vários estudos têm sido feitos na tentativa de reduzir os custos das enzimas, aumentar a taxa de hidrólise por meio de efeitos sinérgicos, reciclar as enzimas, produzir enzimas de alto rendimento, auxiliados pelas tecnologias de biologia molecular. Uma alternativa seria a biomassa mais facilmente degradável, menor tempo de processamento para reduzir o consumo e conseqüentemente o custo das enzimas. Para tornar os processos viáveis, os pré ou pós-tratamentos devem ser projetados para melhorar a taxa de hidrólise enzimática inicial através da redução causada pelo bloqueio da lignina e aumento da adsorção enzimática (LEE *et al.*, 2014).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOR, V., CARERE, C., CICEK, N., SPARLING, R., LEVIN, D. Biomass pretreatment for consolidated bioprocessing (CBP), *Advances in Biorefineries. Biomass and waste supply chain exploitation*, p. 234-258, 2014.

AGOSTINHO, F., BERTAGLIA, A. B., ALMEIDA, C. M. V. B., GIANNETTI, B. F. Influence of cellulase enzyme production on the energetic–environmental performance of lignocellulosic ethanol. *Ecological Modelling*, 2014.

ANDREAUS, J.; FILHO, E. X. F.; BOM, E. P. S. *Biotechnology of holocellulose-degrading enzymes. Biocatalysis and Biomergy*. John Willey & Sons, USA, p. 197-229, 2008.

BADIEI, M., ASIM, N., JAHIM, J. M., SOPIAN, K. Compararison of chemical pretreatment methods for cellulosic biomass. *5th Internacional Conference on chemical, biological and environmental engineering*, v. 9, p. 170-174, 2014.

BALAT, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, v. 52, p. 858–875, 2011.

BALAT, M., BALAT, H., ÖZ, C. Progress in bioethanol processing, *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 34, p. 551-573, 2008.

BARAL, A., BAKSHI, B. R., SMITH, R.L., Assessing resource intensity and renewability of cellulosic ethanol technologies using Eco-LCA. *Environmental Science & Technology*, v. 46, p. 2436–2444, 2012.

BORÉM, A., SILVA, J. A., DIOLA, V., *Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e etanol: tecnologias e perspectivas – 2 ed. rev. e ampl. – Viçosa, MG: Os editores*, 2011.

BORTOLAZZO, N. G, Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado apresentado na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2011.

BUCKERIDGE, M. S., SANTOS, W. D., SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil.. In: Luís Augusto Barbosa Cortez. (Org.). Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Editora Edgard Blucher, p. 365-380, 2010.

CAO, S.; AITA, G. M., Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactant and dilute ammonia treated sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 131, p. 357-364, 2013.

CARDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.

CHANDEL, A. K., GRANDRASEKHAR, G., SILVA, M. B., SILVA, S. S., The realm of cellulases in biorefinery development. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 32, p. 187-202, 2012.

CHOVAU, S., DEGRAUWE, D., BRUGGEN, B. V. D., Critical analysis of techno-economic estimates for the production cost of lignocellulosic bio-ethanol. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 26, p. 307-32, 2013.

CONAB, Companhia nacional de abastecimento. Acomp. safra Bras. cana-de-açúcar, v. 1 – Safra 2014/15, n.2 - Segundo Levantamento, Brasília, p. 1-20, ago. 2014

CORTEZ, L. A. B., Bioetanol de cana-de-açúcar: P & D para a produtividade e sustentabilidade, Luís Augusto Barbosa Cortez, coordenador – São Paulo: Blucher, 2010.

COSTA, W. L. S.; BOCCHI, M. L. M. Aplicações do bagaço da cana-de-açúcar utilizadas na atualidade. *Ciência & Tecnologia, Jaboticabal*, v. 2, n.1, 2012.

DAL-BIANCO, M., CARNEIRO, M. S., HOTTA, C. T., CHAPOLA, R. G., HOFFMANN, H. P., GARCIA, A. A. F., SOUZA, C. M., Sugarcane improvement: how far can we go? *Current Opinion in Biotechnology*, v. 23, p. 265–270, 2012.

DIOLA, V., SANTOS, F., *Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e etanol: tecnologias e perspectivas – 2 ed. rev. e ampl. – Viçosa, MG: Os editores, 2011.*

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

FURLAN, F.F.; COSTA, C.B.B.; FONSECA, G.C.; SOARES, R.P.; SECCHIC, A.R.; CRUZ, A.J.G.; GIORDANO, R.C.; Assessing the production of first and second generation bioethanol from sugarcane through the integration of global optimization and process detailed modeling. *Computers and Chemical Engineering*; v. 43, p. 1–9, 2012.

GOLDMAN, G. H., BROWN, N. A., *Fungal biology in Brazil. Fungal genetics and biology*. v. 60, p 1, 2013.

GÓMEZ RUEDA, S. M., *Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, UNICAMP, Campinas - SP, 2010.*

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

HARGREAVES, P. I. *Bioprospecção de novas celulasas de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana. Dissertação apresentada ao mestrado em tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.*

HIBBETT, D.S., OHMAN, A., GLOTZER, D., NUHN, M., KIRK, P., NILSSON, H.R., Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews - Journal*, v. 25, p. 9, 2011.

HIMMEL, M.E.; DING, S.-Y.; JOHNSON, D.K.; ADNEY, W.S.; NIMTOS, M.R.; BRADY, J.W.; FOUST, T.D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes from biofuels production. *Science*, v. 314, p. 804-807, 2007.

KHUONG, L. D.; KONDO, R.; DE LEON, R.; ANH, T. K.; MEGURO, S.; SHIMIZU, K.; KAMEI, I.; Effect of chemical factors on integrated fungal fermentation of sugarcane bagasse for ethanol production by a white-rot fungus, *Phlebia* sp. MG-60. *Bioresource Technology*, v. 176, p. 33-40, 2014.

LEE, D-S., WI, S. G., LEE, S. J., LEE, Y-G., KIM, Y-S., BAE, H-J. Rapid saccharification for production of cellulosic biofuels. *Bioresource Technology*, v. 158, p. 239-247, 2014.

LENNARTSSON, P. R., ERLANDSSON, P., TAHERZADEH, M. J., Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products, *Bioresource Technology*, v. 165, p. 3–8 , 2014.

LEWINSONH, T. M., PRADO, P. I. How many species are there in Brazil? *Conservation Biology*. v.19, p 619-624, 2005.

LIU, C., SUN, R., Chapter 5 – cellulose. *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose*, p. 131–167, 2010.

LÓPEZ, J. A., LÁZARO, C. C., CASTILHO, L. R., FREIRE, D. M. G., CASTRO, A. M., Characterization of multienzyme solutions produced by solid-state fermentation of babassu cake, for use in cold hydrolysis of raw biomass. *Biochemical Engineering Journal*, v. 77, p. 231–239, 2013.

LU, F., RALPH, J., Chapter 6 – Lignin, Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose, p. 169–207, 2010.

MACHADO, D. S., Seleção de fungos capazes de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré tratado. Dissertação de mestrado apresentado na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2009.

MACHADO, D. F. M., PARZIANELLO, F. R., SILVA, A. C. F. da e ANTONIOLLI, Z. I., *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. Rev. de Ciências Agrárias [online], v.35, n.1, p. 274-288, 2012.

MAITAN-ALFENAS, G. P., VISSER, E. M., GUIMARÃES, V. M., Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products, Current Opinion in Food Science, v. 1, p. 44-49, 2015.

MATSUOKA, S., BRESSIANI, J., MACCHERONI, W., FOUTO, I., Bioenergia de cana. Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e etanol: tecnologias e perspectivas. 2-ed rev e amp – Viçosa, MG. Os editores, p. 547-577, 2011.

MOREIRA, L. R. S., Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*: Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos. Universidade de Brasília. Tese de Doutorado. 2013.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y. Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, v. 96, p. 673-686, 2005.

OLIVEIRA, L. R. M., NASCIMENTO, V. M., GONÇALVES, A. R., ROCHA, G. J. M. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. Industrial Crops and Products, v. 58, p 1-7, 2014.

ORTÍZ, I., QUINTERO, R. Recent advancements in pretreatment technologies of biomass to produce bionergy. *Bionergy Research: Advances and Applications*. p. 57-69, 2014.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P. SOCCOL T, VANETE, VANDENBERGUE, L. P. S., MOHAN, R., Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, issue 1, p. 81-87, 2000.

PASANGULAPATI, V., RAMACHANDRIYA, K. D., KUMAR, A., WILKINS, M., JONES, C. L., HUHNKE, R., Effects of cellulose, hemicellulose and lignin on thermochemical conversion characteristics of the selected biomass, *Bioresource Technology*, V. 114, p, 663–669, June 2012.

POOVAIAH, C. R., NAGESWARA-RAO, M., SONEJI, J. R., BAXTER, H. L., STEWART, STEWART, C. N. Altered lignin biosynthesis using biotechnology to improve lignocellulosic biofuel feedstocks. *Plant Biotechnology Journal*, 2014.

PUERTO RICO, J. A., MERCEDES, S. S. P., SAUER, I. I., Genesis and consolidation of the Brazilian bioethanol: A review of policies and incentive mechanisms, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, Issue 7, p. 1874–1887, september 2010.

QAISAR, S., ZOHRA, R. R., AMAN, A., QADER, S, A. U. Enhanced production of cellulose degrading CMCase by newly isolated strain of *Aspergillus versicolor*. *Carbohydrate Polymers*, v. 104, p.199-203, 2014.

RAELE, R., BOAVENTURA, J. M. G., FISCHMANNA, A. A., SARTURIA, G. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. *Technological Forecasting and Social Change*, v. 87, p.205–223, 2014.

RAN, Y., WANG, Y., LIAO, Q., ZHU, X., CHEN, R., LEE, D., WANG, Y. Wang. Effects of operation conditions on enzymatic hydrolysis of high-slid rice straw. *Int. J. Hydrogen Energy*, v. 37, p. 13660–13666, 2012.

SCHELLER, H. V., ULVSKOV, P. Hemicelluloses. Annual review of plant biology. V. 61, p. 263-89, 2010.

SHEN, F., HU, J., ZHONG, Y., LIU, M. L. Y., SADDLER, J. N., LIU, R. Ethanol production from steam-pretreated sweet sorghum bagasse with high substrate consistency enzymatic hydrolysis. Biomass Bioenergy, v. 41, p. 157–164, 2012.

SILVA, O. G. Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar; trabalho de conclusão de curso em Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, SP, p.46, 2010.

SINGH, S.; PRANAW, K.; SINGH B.; TIWARI, R.; NAIM, L.; Production, optimization and evaluation of multicomponent holocellulase produced by *Streptomyces* sp. ssr-198 Journal of the Taiwan, Institute of Chemical Engineers. v. 45, p. 2379–2386, 2014.

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

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P.; MEDEIROS, A. B.; KARP, S. G.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTASCHALK, L. M.; FERRARA, M. A.; BON DA SILVA, E. P.; MORAES, L. M.; ARAUJO, J DE A.; TORRES, F. A.; Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. Bioresource Technology, v. 101, p. 4820-4825, 2010.

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

VALÊNCIA, E. Y., CHAMBERGO, F. S., Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. Fungal Genetics and Biology. v. 60, p. 9-18, 2013.

YANG, J., ZHANG, X., YONG, Q., YU, S. Three stage enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover at high substrate concentration. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4905–4908, 2011.

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

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo a bioconversão de bagaço de cana-de-açúcar em açúcares fermentescíveis, utilizando enzimas celulolíticas produzidas por fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar no cerrado brasileiro.

4.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar fungos celulolíticos do cerrado brasileiro a partir da cana-de-açúcar;
- Avaliar o perfil enzimático destes microrganismos quanto a capacidade de degradar papel Whatman nº 1 e carboximetilcelulose.
- Realizar a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar utilizando os sobrenadantes enzimáticos dos fungos selecionados;

CAPÍTULO I

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS CELULOLÍTICOS DO CERRADO BRASILEIRO PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR

**Andreza M. Lopes^{a,b,*}, João P. L. Nascimento^{a,b}, Taís L. Silva^a, Carlos F. S. Castro^a,
Edson L. Souchie^b**

^a Departamento de Química Tecnológica, Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde.

^b Departamento de Microbiologia Agrícola, Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde.

BIOPROSPECTION OF CELLULOLYTIC FUNGI FROM BRAZILIAN SAVANNA FOR ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SUGAR CANE BAGASSE

Abstract: Nowadays, enzymes are used to obtain many products in several areas, and new applications are constantly being developed. Mainly, the search for cellulolytic enzymes, which are able of hydrolyzing organic residues, releasing fermentable sugars, usable in different biotechnological processes, including the second-generation ethanol production. Filamentous fungi are one of the leading manufacturers of micro-cellulolytic enzymes. This study aimed the bioconversion of sugarcane bagasse into fermentable sugars using cellulolytic enzymes produced by fungi isolated from sugarcane bagasse at Brazilian Savanna. Twenty different fungal species were isolated. The *Paecilomyces parvisporus*, *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum* showed the best results of enzymatic activity of cellulases (FPase) and endoglucanase (CMCase), compared to the others. The enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse was held for 72 h enzyme loading of 10 FPU g⁻¹ and 25 FPU g⁻¹ of the respective fungi and fermented using yeast *Saccharomyces cerevisiae* YPO4. The best conversions were made by *Paecilomyces parvisporus* with enzyme load of 10 FPU g⁻¹ and the *Aspergillus fumigatus* with enzyme load of 25 FPU g⁻¹. These species can be used in future studies, since they have potential for the development of commercial enzymes.

Key words: enzymes, fungi, hydrolysis

1. INTRODUÇÃO

A utilização de resíduos agrícolas para a produção de biocombustíveis e produtos químicos alternativos é considerada uma estratégia promissora para substituir os combustíveis fósseis, além de não competir diretamente com a produção de alimentos.¹⁷ No Brasil, o estudo para a produção de etanol de segunda geração é voltado principalmente para o uso de bagaço de cana-de-açúcar como material celulósico.³

A biomassa lignocelulósica precisa ser convertida em açúcares mais simples. Indubitavelmente, a hidrólise enzimática é uma das formas mais adequadas, porque requer condições ambientais suaves e menor gasto de energia. A desconstrução da biomassa lignocelulósica é complexa, pois suas inúmeras características estruturais a torna muito recalcitrante.²² A sacarificação enzimática da celulose é promovida pela ação da endo- β 1,4-glucanase, da exo- β 1,4-glucanase e finalmente da β -glucosidase. Da mesma forma, a sacarificação da hemicelulose requer a ação de diferentes tipos de hemicelulases, como a arabinanase, a galactanase, a mananase e a xilanase.²⁵

Segundo Moreira (2013),²⁰ a aplicação de enzimas holocelulolíticas (celulases, hemicelulases e pectinases) em processos de bioconversão de biomassa lignocelulósica tem elevado o mercado de enzimas hidrolíticas. Diante disso, a busca por estas enzimas vem crescendo rapidamente, tornando a força motriz para as pesquisas sobre celulases e xilanases.

O investimento público e privado em bioprocessos tem permitido o desenvolvimento de fortes grupos de pesquisa que investigam a biodiversidade fúngica, metagenômica e a descoberta de novas enzimas hidrolíticas que possam ajudar na degradação da biomassa lignocelulósica.⁹ Dentre os principais produtores de enzimas, encontram-se os fungos filamentosos que são capazes de degradar a celulose, hemicelulose e a lignina através de um conjunto de enzimas hidrolíticas e oxidativas, como celulases, hemicelulases e ligninases.²⁸

A ampla disponibilidade de biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana estimula a busca por fungos nativos que possam utilizar de forma eficiente esse resíduo. O Brasil possui coleção de diversos fungos, que abrigam material biológico importante que pode e precisa ser explorado. Contudo, não há registro do número total de espécies de fungos nativos que foram identificados ou recolhidos em todo o país.²⁹

Os resíduos agroindustriais representam uma importante fonte alternativa para o crescimento microbiano e para a produção de enzimas industriais. No momento, as

enzimas, como as celulases são utilizados na fabricação de alimentos, cervejaria e vinho, ração animal, têxtil e de lavanderia, indústrias de papel e celulose, bem como na agricultura e para fins de investigação.²³

Se o etanol lignocelulósico obtido por via enzimática se tornar um importante combustível de transporte, o comércio das celulases poderá se tornar o maior comércio de enzimas industriais.²⁶

Vários estudos têm sido feitos na tentativa de reduzir os custos das enzimas, aumentar a taxa de hidrólise, reciclar as enzimas, produzir enzimas de alto rendimento.¹⁶ Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a bioconversão de bagaço de cana-de-açúcar em açúcares fermentescíveis, utilizando enzimas celulolíticas produzidas por fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar do cerrado brasileiro.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Coleta, fermentação, isolamento e manutenção.

O isolamento foi conduzido em bagaço de cana-de-açúcar proveniente de duas destilarias do Cerrado Brasileiro, Usina Nova Fronteira BioEnergia S/A – Unidade Boa Vista localizada na Rodovia GO 164, Km 131,5 – Zona Rural – Fazenda Boa Vista em Quirinópolis e Companhia Energética Vale do São Simão localizada na BR 364, Km 270 – Zona Rural - Fazenda Piratininga de Minas — Distrito de Chaveslândia – MG.

Foram utilizadas amostras de bagaços de cana-de-açúcar de duas safras; de dezembro de 2012 e de abril de 2013.

Os procedimentos para o isolamento das cepas fúngicas foram realizados no laboratório de Microbiologia Agrícola, localizado no Instituto Federal Goiano, na Cidade de Rio Verde, Goiás, Brasil. Em um recipiente esterilizado, foram mantidos 25 g de bagaço de cana-de-açúcar, acrescidos de 10 mL de água destilada, sendo homogeneizado e acondicionado em estufa bacteriológica por 30 dias a 28 °C. Posteriormente, 1 g deste material foi diluído em 9 mL de água, que foi submetido a diluições seriadas, transferindo 100 µL para placas de petri contendo meio BDA (Infusão de 200 g de batata, 15 g de ágar, 20 g de dextrose e água q.s.p. 1000 mL). As placas foram incubadas a 28 °C por um período de 7 dias. Após este período, conduziu-se o isolamento, em que colônias individuais foram purificadas. Para a manutenção das

linhagens, as colônias isoladas foram repicadas em frasco de penicilina contendo meio BDA. Após crescidos, foram armazenados em geladeira e renovados mensalmente.

2.2 Identificação molecular dos isolados

A identificação molecular foi realizada no Instituto Biológico de São Paulo, na Cidade de São Paulo, estado de São Paulo, Brasil. Os fungos foram cultivados em pequenas placas de petri de plástico estéril contendo meio BDA. Em uma caixa foram acondicionados e enviados em pacote de entrega rápida. Para a identificação proveu a extração do DNA dos isolados sendo realizada de acordo com método empregando o reagente CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio) descrito por Doyle e Doyle (1991)⁷ a partir do micélio produzido em batata-dextrose e triturado em microtubos com auxílio de pistilo de plástico. As amostras de DNA genômico extraídas foram submetidas à Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para a amplificação da região ITS (internal transcribed spacer) localizada entre os genes codificadores dos RNAs ribossomais 18S e 28S. Os oligonucleotídeos iniciadores para a região ITS foram ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3').³⁰ Os produtos amplificados foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia empregando o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 XL (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas na base de dados GenBank sediada no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), empregando o programa Blastn.¹ A identificação foi baseada na similaridade com sequências de tipos de espécies presentes na base de dados.

2.3 Determinação do perfil enzimático

As determinações dos perfis enzimáticos foram conduzidas nos laboratórios de Microbiologia Agrícola e Química Tecnológica, no Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde – Goiás, Brasil. O perfil enzimático foi estimado pela capacidade hidrolítica do extrato enzimático obtido através da fermentação submersa com bagaço de cana a 1%, sendo que o bagaço de cana-de-açúcar foi previamente moído e peneirado com granulção máxima de 1 mm. Um meio líquido com nutrientes proposto por Mandels &

Weber (1969),¹⁸ foi preparado e autoclavado a 1 atm a 121 °C, por 20 minutos. E em erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 1 g de bagaço de cana-de-açúcar e 100 mL do meio proposto e autoclavados novamente, e então, foi adicionado um disco de micélio dos respectivos fungos na mistura.

Esses materiais foram incubados por 21 dias, a 28 °C, sob agitação a 90 rpm em mesa agitadora. Em intervalos regulares de 7 dias, amostras de 4 mL do extrato enzimático foram retiradas de cada erlenmeyer e transferidos para tubos cônicos de plásticos de 15 mL e então centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação dos perfis enzimáticos.

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada de acordo com Miller (1959),¹⁹ utilizando ácido 3,5-diinitrosalicílico (DNS). O reativo DNS foi preparado da seguinte forma: 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio [(CHOH)₂COONaCOOK] com 16 g de hidróxido de sódio (NaOH) dissolvido em água destilada. Em seguida, adicionou-se 10 g de ácido 3-5 dinitrosalicílico (C₇H₄N₂O₇) (aquecendo se necessário). Por fim, completou-se o volume para 1 litro com água destilada.

A determinação dos açúcares redutores se baseou na dosagem dos açúcares liberados durante a degradação enzimática do substrato papel de filtro Whatman nº 1, para FPase e carboximetilcelulose a 2% para CMCase, ambos baseados no protocolo de Ghose (1987).⁸

Em tubos com capacidade de 25 mL foram colocados 0,5 mL de CMC a 2% ou papel de filtro Whatman nº1, pesando aproximadamente 50 mg, com posterior adição de 0,5 mL de solução tampão de citrato de sódio e 0,5 mL do sobrenadante enzimático. Para o branco reagente, colocou-se somente 1,0 mL tampão citrato de sódio e 0,5 mL de CMC ou 50 mg de papel Whatman nº1. Já para o branco da amostra se empregou 1,0 mL de tampão e 0,5 mL do sobrenadante enzimático.

Os tubos foram incubados em banho-maria a 50°C durante 1 hora. Após o período de incubação, acrescentou-se 3,0 mL de DNS para paralisar a reação. Amostras foram levadas ao banho-maria por 5 minutos a 95 °C para a produção de cor e posteriormente foram colocadas em banho frio, e em seguida foram adicionados 20 mL de água e agitados. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com absorvância de 540 nm. Os valores dos controles da reação foram subtraídos dos valores das absorvâncias obtidas.

2.4 Hidrólise enzimática e fermentação

Em erlenmeyers contendo 100 mL de meio basal Mandels & Weber (1969),¹⁸ foram colocados 1 g do material e 1 disco de micélio fúngico e mantidos por 7 dias em agitação. Após, foram realizadas diluições do sobrenadante enzimático para determinar o FPU que correspondesse a aproximadamente 2 mg de glicose liberados.

Para a hidrólise enzimática foram utilizados 2 g de bagaço, 100 mL de tampão citrato de sódio a 0,05 M e o sobrenadante enzimático correspondente a 10 FPU g⁻¹ e 25 FPU g⁻¹ de bagaço, de acordo com Ghose (1987).⁸ Esse material ficou a 50 °C em agitação, e em intervalos de 0, 1, 6, 12, 24, 48 e 72h alíquotas foram retiradas para a quantificação dos açúcares liberados, utilizando o método DNS.¹⁹

Ao término da mesma, na própria solução da hidrólise, foram adicionados 2% (m/v) de levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPO4 e deixados em estufa a 35 °C por 72 horas. Após esse período quantificou os açúcares redutores pelo método DNS proposto por Miller (1959).¹⁹

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e identificação dos microrganismos

Foram isolados da Usina Nova Fronteira BioEnergia, a partir do bagaço de cana da safra de dezembro de 2012, 9 unidades de fungos da safra de abril de 2013, 11 unidades. Por sua vez, foram isolados da Companhia Energética Vale do São Simão 7 unidades de fungos para o bagaço da safra de abril de 2013 e 5 para o bagaço da safra dezembro de 2012. Foram obtidos, o total de 32 isolados fúngicos visualmente diferentes. Segundo Valência e Chambergo (2013),²⁹ os fungos mais estudados para a degradação da biomassa foram isolados de diversas fontes, sendo uma delas o bagaço de cana-de-açúcar.

A partir da identificação molecular dos 32 isolados fúngicos, foram caracterizadas 20 espécies fúngicas únicas, pertencente a 7 gêneros distintos, compreendendo 6 do gênero *Aspergillus*, 3 *Trichoderma*, 3 *Penicillium*, 3 *Fusarium*, 3 *Paecilomyces*, 1 *Talaromyces*, todos do filo *Ascomycota*, 1 do gênero *Mucor* do filo *Zycomycota*.

O filo *Ascomycota* é o maior filo no reino dos fungos, suas espécies são extremamente variáveis em morfologia e ecologia, são degradadores de materiais orgânicos persistentes, tais como a lignina e queratina, desempenham papel importante no ciclo dos nutrientes. Além disso, muitos *Ascomycetos* participam de associações simbióticas, incluindo micorrizas e líquens.⁵ Este fato vem ao encontro dos resultados obtidos no presente trabalho, pois a maioria dos fungos identificados pertencem a este filo.

Os fungos isolados derivaram nas seguintes espécies: *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium fujikuroi*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium wotroi*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma asperelloides*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus novoparasiticus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces parvisporus*, *Paecilomyces formosus*, *Paecilomyces saturatus*, *Talaromyces stollii* e *Mucor circinelloides*.

Bortolazzo (2011)⁶, em sua dissertação conduziu o isolamento de fungos de bagaço de cana-de-açúcar, proveniente de três destilarias da região de Piracicaba, interior do Estado de São Paulo, resultando na identificação de 2 *Trichoderma*, 2 *Penicillium* e 1 *Aspergillus* e ressaltou a busca de linhagens a partir de bagaço de cana-de-açúcar como fonte potencial para a hidrólise enzimática.

Sandhu e Sidhu (1980),²⁴ isolaram 9 fungos em bagaço de cana em decomposição, sendo *Rhizopus microsporus*, *Mucor pusilius*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma longibrachiatum* e um *Agaric*. As espécies mais comuns foram *A. fumigatus* e *A. terreus*.

Basso e colaboradores (2010),⁴ também identificaram espécies fúngicas isoladas de bagaço de cana-de-açúcar a partir de duas destilarias da região de Piracicaba interior do Estado de São Paulo, que foram o *Paecilomyces variotti*, *Moniliophthora pernicioso*, *Aspergillus fumigatus*, *Acremonium cellulolyticus* e *Penicillium verruculosum*, e testou os mesmos quanto às atividades celulolíticas, os quais mostraram ser bons produtores de enzimas celulolíticas.

Diante disso, os fungos comumente encontrados em bagaço de cana-de-açúcar são fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Todos são gêneros de fungos relatados com capacidade de produzir um sistema completo de enzimas. Contudo, muitas das espécies estudadas neste trabalho não apresentam na

literatura dados indicativos de atividade enzimática. Dessa forma este é um trabalho pioneiro ao explorar novas espécies de microrganismos com capacidade hidrolítica.

3.2 Determinação do perfil enzimático

Vários componentes dos materiais lignocelulósicos podem induzir a produção de celulase. Os resíduos agroindustriais, como bagaço de cana-de-açúcar são boas fontes de carbono para o crescimento do fungo e para a produção de celulases.²⁹ O bagaço de cana-de-açúcar que apresenta em sua composição celulose e hemicelulose que podem ser convertidos em açúcares fermentescíveis.

Os 20 fungos obtidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar foram avaliados quanto a capacidade de liberarem açúcares aos 7, 14 e 21 dias de incubação e os resultados foram convertidos em glicose. Foi feita uma curva de calibração usando glicose em concentrações conhecidas em que se encontrou a equação $\text{Glicose (g L}^{-1}\text{)} = 0,1376 \times \text{Abs} - 0,0119$, com o $R^2 = 0,9955$.

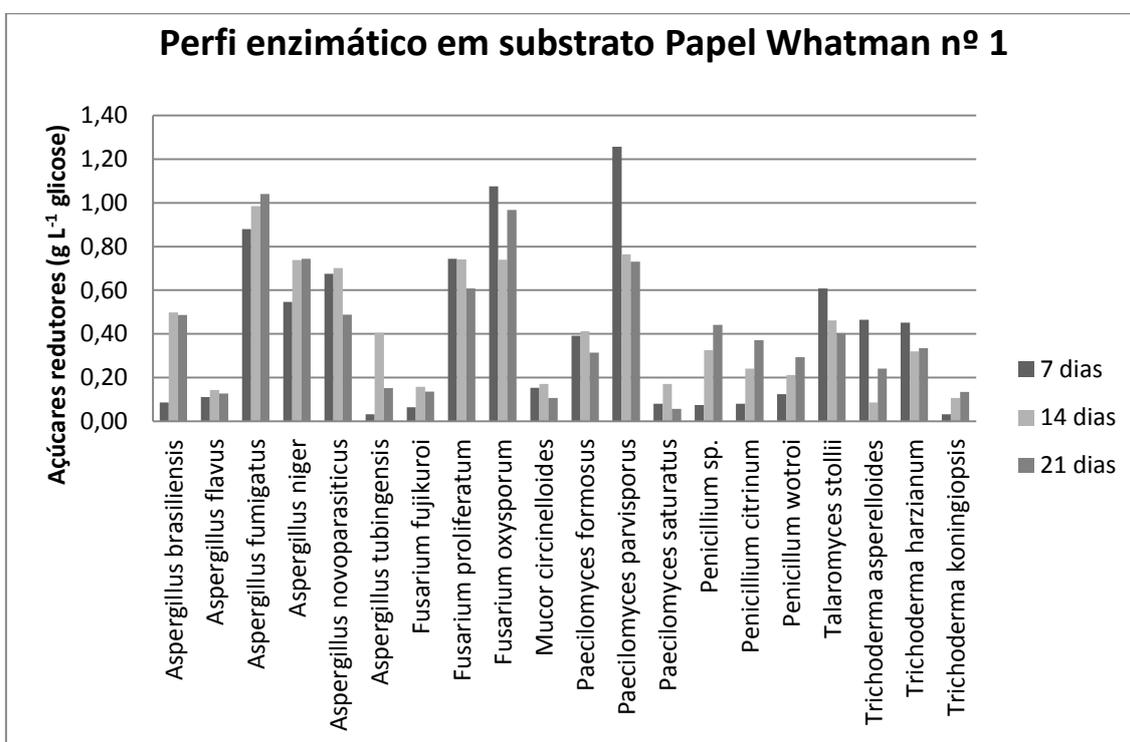


Figura 1 Perfil enzimático dos isolados utilizando papel de filtro Whatman nº 1 como substrato, obtida do cultivo dos fungos isolados do bagaço de cana-de-açúcar. Valores correspondem a média de 3 repetições, convertidos em g L^{-1} glicose

Pode-se observar na figura 1, que o *Paecilomyces parvisporus* se destacou aos 7 dias com 1,26 g L⁻¹ glicose, seguido do *Fusarium oxysporum* (1,08 g L⁻¹ glicose). Aos 14 dias, o isolado *Aspergillus fumigatus* (0,99 g L⁻¹ glicose) foi o mais ativo, seguido do *Paecilomyces parvisporus* (0,76 g L⁻¹ glicose), e muito próximo estavam os fungos, *Fusarium proliferatum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus novoparasiticus* com 0,74; 0,74 e 0,70 g L⁻¹ glicose respectivamente. E aos 21 dias o *Aspergillus fumigatus* atingiu seu maior pico de 1,04 g L⁻¹ glicose, apresentando o maior teor de açúcar, seguido pelo *Fusarium oxysporum* com 0,97 g L⁻¹ glicose, respectivamente.

Não existem trabalhos na literatura quanto ao uso e aplicabilidades referentes ao fungo *Paecilomyces parvisporus*. Um dos objetivos deste trabalho foi o de descobrir novas espécies degradantes de material lignocelulósico. No qual o *Paecilomyces parvisporus* apresentou alta eficiência aos 7 dias com relação aos demais quanto à capacidade celulolítica. Diante disso, comprova-se a previsão de Houbraken e colaboradores (2011),¹² que acredita que novas espécies, como o *Paecilomyces parvisporus* podem ser degradadores eficientes de material lignocelulósico, representando nova fonte de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

As atividades de FPase do *Aspergillus flavus* se mantiveram quase constantes ao longo dos 21 dias, obtendo um dos mais baixos resultados entre os demais. Contudo, para Siqueira (2010),²⁷ o mesmo isolado com três dias de cultivo submerso em fontes de carbono, como o bagaço de cana-de-açúcar produziu valores significativos de celulases, hemicelulases e pectinases.

O que pode ter ocorrido neste caso é que o *Aspergillus flavus*, assim como outros fungos podem não ter se adaptado ao meio e/ou as condições de pH e temperatura, os quais são fatores limitantes na produção de enzimas, como também podem existir cepas com variações de haplótipos. Como ressaltam Andreaus e colaboradores (2009),² quanto mais rápido o fungo se adaptar ao meio, mais rápido irá expressar as enzimas. Os microrganismos são capazes de degradar holocelulose (celulose e hemicelulose) da parede celular das plantas, em função da bateria de enzimas que trabalham em sinergismo, denominadas holocelulases.

Como descrevem Jiang e colaboradores (2011),¹³ o *T. viride* produz a quantidade significativa de exoglucanases e endoglucanases, mas níveis baixos de β-glicosidase, o que resulta na acumulação de celobiose, inibindo a FPase e CMCase, resultando em baixa taxa de hidrólise do substrato. Isso pode ter acontecido com os fungos que apresentaram resultados da FPase e CMCase baixos.

Singhania e colaboradores (2010)²⁶ relatam que importantes espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* produzem um complexo de enzimas celulolíticas com atividade β -glicosidase superior a *Trichoderma reesei*, mas a celulase total (FPase) é relativamente baixa.

Segundo Hargreaves (2008),¹¹ dentre os principais fungos produtores de enzimas estão o *Trichoderma* e *Aspergillus*, e suas enzimas já são comercializadas, com proporções de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidade distintas, sendo esta última mais baixa no caso do *Trichoderma*, e no caso do *Aspergillus*, a exoglucanase se encontra em menor proporção.

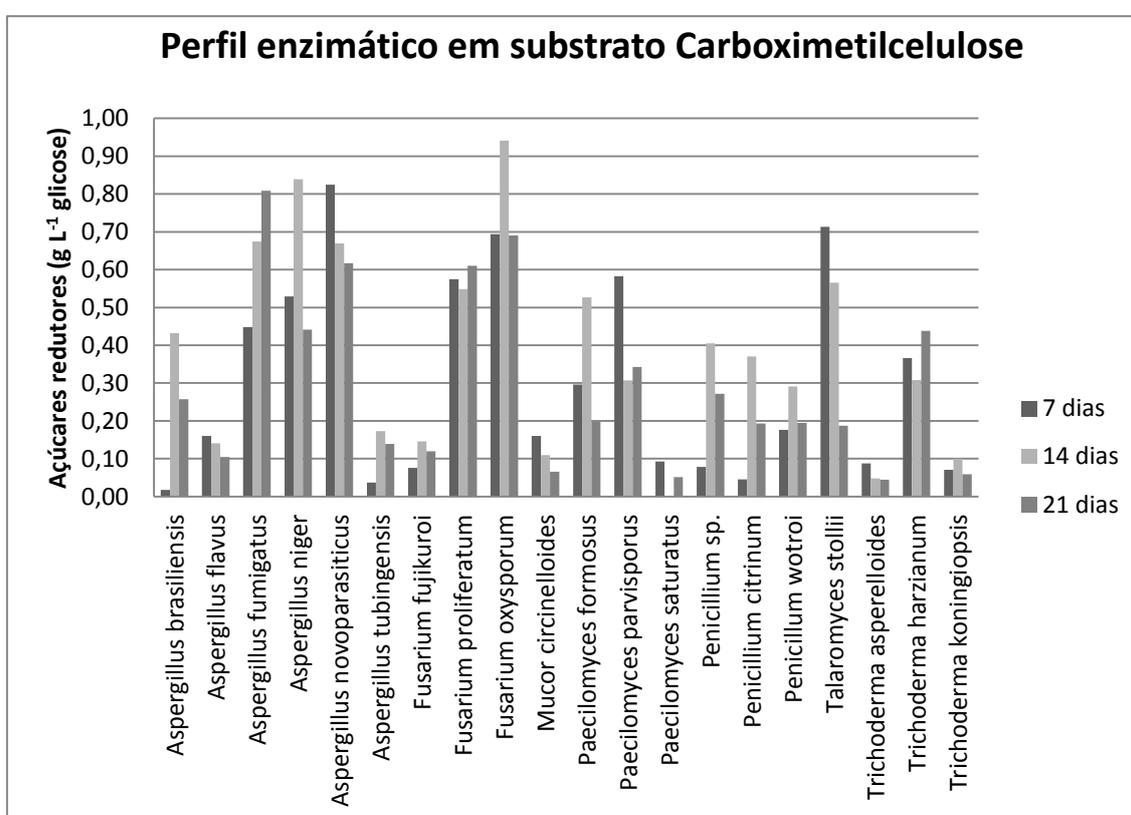


Figura 2. Perfil enzimático dos isolados utilizando carboximetilcelulose como substrato, obtida do cultivo dos fungos isolados do bagaço de cana-de-açúcar. Valores correspondem a média de 3 repetições, convertidos em g L⁻¹ glicose

Como se pode observar na figura 2, o fungo *Aspergillus novoparasiticus* apresentou maior atividade entre os demais aos 7 dias (0,82 g L⁻¹ glicose). Destacando também aos 7 dias, o *Talaromyces stollii* e *Fusarium oxysporum* (0,71 e 0,69 g L⁻¹ glicose respectivamente). O isolado *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger* apresentaram as maiores atividades aos 14 dias (0,94 e 0,84 g L⁻¹ glicose

respectivamente) e o *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium oxysporum*, aos 21 dias (0,81 e 0,69 g L⁻¹ glicose respectivamente).

Os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus novoparasiticus*, *Mucor circimelloides*, *Trichoderma asperelloide* apresentaram comportamentos similares, tendo seu ápice de atividade aos 7 dias e decaindo sucessivamente aos 14 e 21 dias. E, outros como *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces formosus*, *Penicillium sp.*, *Penicillium citrinum* e *Trichoderma koningiopsis* apresentaram seu ápice de atividade aos 14 dias.

Diante dos resultados e concordando com Valência e Chambergo (2013),²⁹ a atividade enzimática, como a CMCase e FPase, é indicativo de que os fungos brasileiros são capazes de digerir os componentes da parede celular das plantas e produzir enzimas quando cultivados em diversos substratos.

Assim, considerando os dados obtidos pelo perfil enzimático foram selecionados os três fungos mais promissores: *Paecilomyces parvisporus*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus fumigatus*.

3.3 Hidrólise enzimática

A partir dos resultados dos perfis enzimáticos de CMCase e FPase, os três fungos que apresentaram melhores resultados foram utilizados para a realização da hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar. A hidrólise enzimática foi realizada utilizando quantidades do caldo enzimático bruto que correspondessem a 10 e 25 FPU g⁻¹ de biomassa dos fungos *Paecilomyces parvisporus*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus fumigatus*.

A dosagem da celulase de 10 FPU g⁻¹ é frequentemente utilizada em estudos de laboratório, pois fornece um perfil de hidrólise com elevados níveis de produção de glicose num tempo razoável (48-72 h), ao custo razoável de enzima.¹⁰ O uso de 25 FPU g⁻¹ foi utilizado para verificar se o tempo de conversão seria mais curto.

Na tabela abaixo, pode-se ver a atividade enzimática dos fungos utilizados na hidrólise enzimática. Todos os procedimentos foram realizados nas mesmas condições, com pH em torno de 4,8, agitação de 90 rpm e a 50°C e simultâneos para que fosse possível a melhor comparação.

Tabela 1. FPU mL⁻¹ de cada isolado aos 7 dias de incubação

Espécie Fúngica	Atividade enzimática FPU mL ⁻¹
<i>Fusarium oxysporum</i>	3,4
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5,2
<i>Paecilomyces parvisporus</i>	4,6

Portanto, o *Aspergillus fumigatus* apresentou a maior atividade enzimática (5,2 FPU mL⁻¹) entre os demais, que conseqüentemente necessitou de menor quantidade de caldo enzimático que correspondesse a 10 e 25 FPU mL⁻¹ (1,92 e 4,8 mL respectivamente). Seguido do *Paecilomyces parvisporus* (4,6 FPU mL⁻¹) em que foram necessários 2,17 e 5,43 mL para 10 e 25 FPU g⁻¹ respectivamente. Por fim o resultado menos expressivo foi do *Fusarium oxysporum* que necessitou de 2,94 mL para 10 FPU g⁻¹ e 7,35ml para 25 FPU g⁻¹.

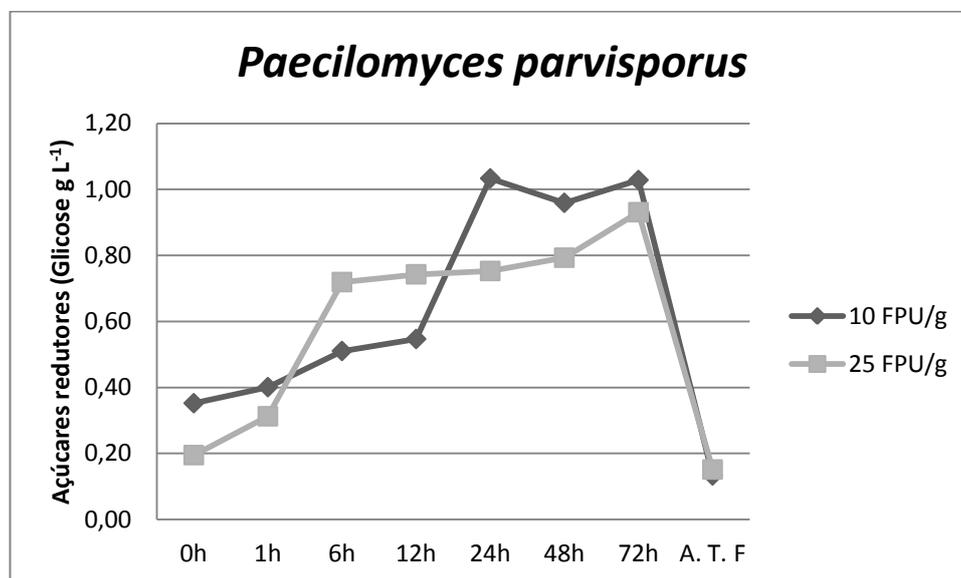


Figura 3. Hidrólise enzimática do *Paecilomyces parvisporus*. Com 72 horas de hidrólise foi introduzido a levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPO4. Em que A. T. F significa após o término da fermentação

Diante dos resultados apresentados na figura 3, pode-se observar que na presença das enzimas do fungo *Paecilomyces parvisporus*, que até então, não apresenta

estudos sobre seu potencial enzimático para bioconversão de biomassa lignocelulósica, obtém-se resultados satisfatórios com a adição de 10 FPU g^{-1} e que a partir de 24 horas de hidrólise observa-se a estabilização nos valores de açúcares, variando de 1,03 $g L^{-1}$ glicose nas 24 horas, caindo levemente para 0,96 $g L^{-1}$ glicose nas 48 horas e retornando para 1,03 $g L^{-1}$ glicose com 72 horas de hidrólise. Na carga enzimática de 25 FPU g^{-1} , a estabilização de hidrólise ocorre mais rapidamente, com cerca de 6 horas de hidrólise produzindo 0,72 $g L^{-1}$ glicose, aumentando levemente nas horas seguintes para 0,74, 0,75, 0,79 $g L^{-1}$ glicose nas 12, 24 e 48 horas e tendo um pequeno salto nas 72 horas para 0,93 $g L^{-1}$ glicose.

Contudo, em ambas as cargas os resultados de açúcares redutores após o término da fermentação são praticamente os mesmos, de 0,013 $g L^{-1}$ glicose para 10 FPU g^{-1} e 0,015 $g L^{-1}$ glicose para 25 FPU g^{-1} . Com isso, observa-se o término da fermentação no qual açúcares redutores presentes após o término da fermentação são equivalentes aos iniciais.

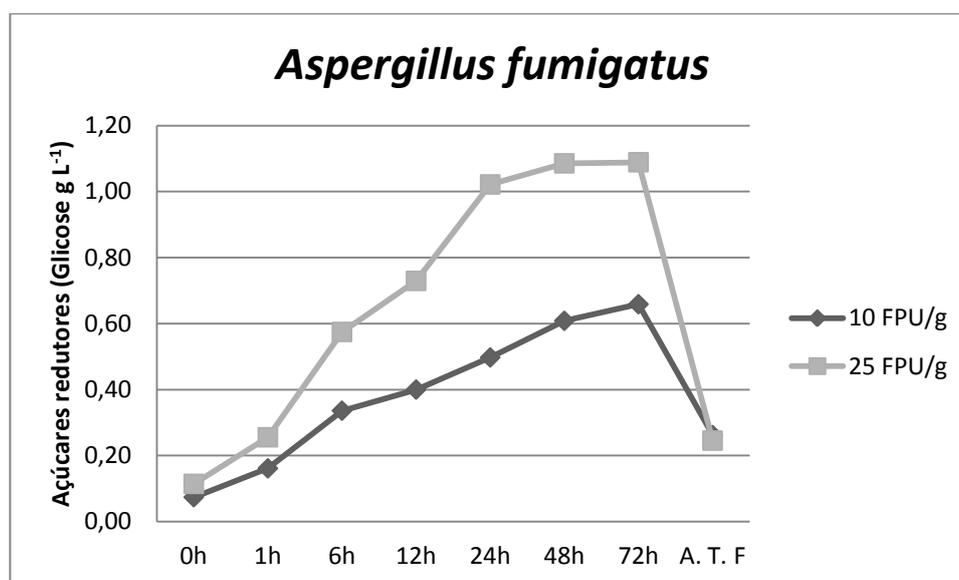


Figura 4. Hidrólise enzimática do *Aspergillus fumigatus*. Com 72h de hidrólise foi introduzido a levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPO4. Em que A. T. F significa após o término da fermentação

Por sua vez, como pode ser observado na figura 4, o *Aspergillus fumigatus*, com a carga enzimática de 25 FPU g^{-1} , os resultados da hidrólise se mostraram superiores aos obtidos com 10 FPU g^{-1} . Conseqüentemente, seria necessário um tempo maior de hidrólise para que os mesmos 10 FPU g^{-1} atingissem os resultados de 25 FPU g^{-1} . A conversão enzimática com a carga de 25 FPU g^{-1} se estabilizou a partir das 24 horas,

com $1,02 \text{ g L}^{-1}$ glicose e se manteve constante com $1,09 \text{ g L}^{-1}$ glicose nas horas seguintes. Enquanto que com 10 FPU g^{-1} , os resultados continuaram aumentando de forma linear, com $0,07$; $0,16$; $0,34$; $0,40$; $0,50$; $0,61$ e $0,66 \text{ g L}^{-1}$ glicose as 0, 1, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. E após o término da fermentação foram encontrados $0,26$ e $0,25 \text{ g L}^{-1}$ glicose para 10 e 25 FPU g^{-1} respectivamente, comprovando a eficiência na conversão de açúcares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPO4.

Jung e colaboradores (2015),¹⁴ utilizando *Penicillium* sp. TG2 testaram suas enzimas em cargas de 5, 10, 15 e 20 FPU g^{-1} e observaram comportamento similar ao encontrado com o *Aspergillus fumigatus* neste trabalho, quanto maior a carga enzimática, maiores foram os resultados de açúcares obtidos.

Quanto ao *Fusarium oxysporum*, pode-se observar na figura 5, o seu comportamento, com 10 FPU g^{-1} apresentou um comportamento linear, enquanto com 25 FPU g^{-1} atingiu seu ápice de liberação de açúcares nas 48 horas, de $0,34 \text{ g L}^{-1}$ glicose e decaiu nas 72 horas para $0,019 \text{ g L}^{-1}$ glicose, o mesmo valor foi encontrado nas 72 horas com a carga enzimática de 10 FPU g^{-1} .

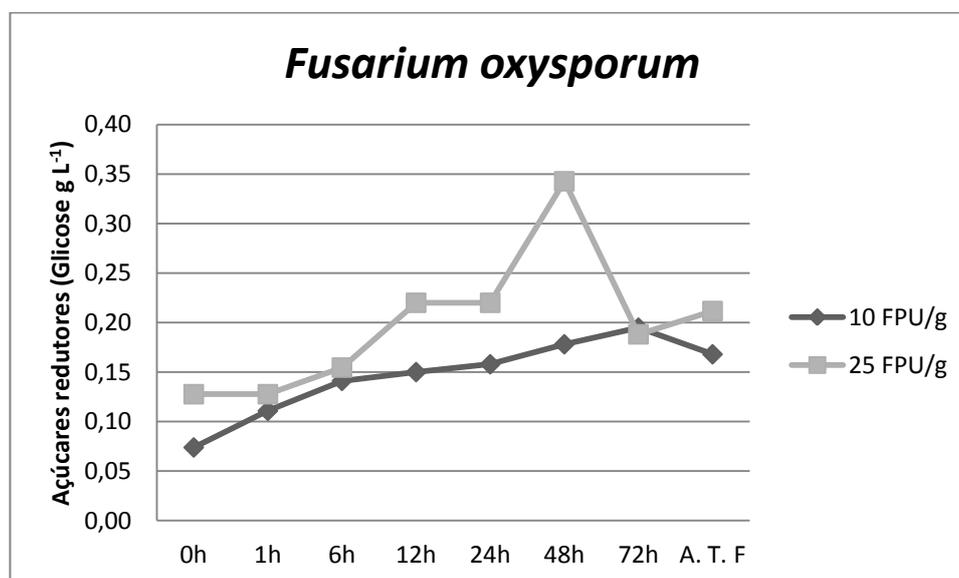


Figura 5. Hidrólise enzimática do *Fusarium oxysporum*. Com 72 horas de hidrólise foi introduzido a levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPO4. Em que A. T. F significa após o término da fermentação

Ressaltando que o *Fusarium oxysporum* apresentou o menor rendimento de caldo enzimático bruto, de $3,4 \text{ FPU mL}^{-1}$. E mesmo sendo adicionando concentrações iguais aos demais fungos de 10 e 25 FPU g^{-1} apresentou o menor rendimento durante a hidrólise enzimática, dentre os fungos testados.

Koppram e colaboradores (2014)¹⁵ descrevem que alguns inibidores, como ácido acético, ácido fórmico, furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e compostos fenólicos podem ser gerados tanto durante o pré-tratamento ou formados pelo próprio material lignocelulósico empregado, sendo, portanto, crucial utilizar microrganismos que sejam tolerantes as altas concentrações de inibidores. Deste modo, a presença de inibidores pode ter afetado a hidrólise enzimática a partir do *Fusarium oxysporum*.

Tanto o *Paecilomyces parvisporus* e quanto o *Aspergillus fumigatus* a partir das 6 horas de hidrólise alcançaram resultados acima do maior resultado encontrado no *Fusarium oxysporum* de 0,34 g L⁻¹ glicose nas 48 horas com carga enzimática de 25 FPU g⁻¹.

E o *Paecilomyces parvisporus* foi o fungo mais rápido com carga enzimática de 10 FPU g⁻¹ a estabilizar a liberação dos açúcares, obtendo 1,03 g L⁻¹ glicose com 24 horas de hidrólise. O *Aspergillus fumigatus*, com carga enzimática de 25 FPU g⁻¹, também nas 24 horas de hidrólise atingiu resultados semelhantes de 1,02 g L⁻¹ glicose, contudo obteve o ápice e estabilização de açúcares nas análises de 48 e 72 horas se mantendo com 1,09 g L⁻¹ glicose.

Ambos apresentaram a conversão de 25% do material lignocelulósico em açúcares, o que está em concordância com outros resultados relatados. Como afirma Ogeda e Petri (2010),²¹ normalmente, as hidrólises enzimáticas permitem o rendimento de produção de açúcares em torno de 20%. Entretanto, usadas em conjunto com etapas de pré-tratamentos, tais rendimentos podem atingir até cerca de 90% dos açúcares disponíveis.

4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, foi possível identificar 20 espécies fúngicas de bagaço de cana-de-açúcar no cerrado brasileiro, os comumente encontrados foram do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Através da determinação do perfil enzimático, observa-se que os mesmos possuem capacidade de produzir enzimas celulolíticas capazes de converter material lignocelulósico em açúcares. Destacando o *Paecilomyces parvisporus*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus fumigatus*. Os resultados da hidrólise enzimática mostram que as melhores conversões foram feitas pelo *Paecilomyces parvisporus* com carga enzimática de 10 FPU g⁻¹ e pelo *Aspergillus fumigatus* com carga enzimática de 25 FPU g⁻¹. Indicando que estas espécies podem ser

utilizadas em estudos futuros, pois apresentam potencial para o desenvolvimento de enzimas comerciais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J.; Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **1990**, 215, 403-410.
2. ANDREAUS, J.; FILHO, E.X.F.; BOM, E.P.S.; *Biotechnology of holocellulose-degrading enzymes*. Biocatalysis and Bionergy. John Willey & Sons, USA, **2009**, p. 197-229.
3. BARAL, A.; BAKSHI, B.R.; SMITH, R.L.; Assessing resource intensity and renewability of cellulosic ethanol technologies using Eco-LCA. *Environmental Science & Technology*, **2012**, 46, 2436–2444.
4. BASSO, T.P.; GALLO, C.R.; BASSO, L.C.; Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **2010**, 45. 1282-1289.
5. BEIMFORDE, C.; FELDBERG, K.; NYLINDER, S.; RIKKINEN, J.; TUOVILA, H.; DÖRFELT, H.; GUBE, M.; JACKSON, D.M.; REITNER, J.; SEYFULLAH, L.J.; SCHMIDT, A.R.; Estimating the Phanerozoic history of the Ascomycota lineages: Combining fossil and molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **2014**, 78, 386–398.
6. BORTOLAZZO, N. G.; Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Brasil, 2011.
7. DOYLE, J.J. e DOYLE, J.L.; A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **1987**, 19, 11-15.
8. GHOSE, T.K.; Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*, Oxford, **1987**, 59, 257-268.

9. GOLDMAN, G.H. e BROWN, N.A.; Fungal biology in Brazil. Fungal genetics and biology, **2013**, 60, 1.
10. GREGG, D.J e SADDLER, J.N.; Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. Biotechnology and Bioengineering. **1996**, 51, 375-383.
11. HARGREAVES, P.I; Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Brasil, 2008.
12. HOUBRAKEN, J.; LO´PEZ-QUINTERO, C.A.; FRISVAD, J.C.; BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; FRANCO-MOLANA, A.E.; SAMSON, R.A.; *Penicillium araracuarensense* sp. nov., *Penicillium elleniae* sp. nov., *Penicillium penarojense* sp. nov., *Penicillium vanderhammenii* sp. nov. and *Penicillium wotroi* sp. nov., isolated from leaf litter. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **2011**, 61, 1462–1475.
13. JIANG, X.; GENG, A.; HE, N.; LI, Q.; New Isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. Journal of Bioscience and Bioengineering, **2011**, 111, 121–127.
14. JUNG, Y.R.; PARK, J.M.; HEO, S-Y.; HONG, W-K.; LEE, S-M.; OH, B-R.; PARK, S-M.; SEO, J-W.; KIM, C.H.; Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. Renewable Energy. **2015**, 76, 66-71.
15. KOPPRAM, R.; TOMAS-PEJO, E.; XIROS, C.; OLSSON, L.; Review: Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. Trends and biotechnology, **2014**, 32, 46-53.
16. LEE, D-S.; WI, S.G.; LEE, S.J.; LEE, Y-G.; KIM, Y-S.; BAE, H-J.; Rapid saccharification for production of cellulosic biofuels. Bioresource Technology, **2014**, 158, 239-247.

17. MAITAN-ALFENAS, G.P.; VISSER, E.M.; GUIMARÃES, V.M.; Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, **2015**, v. 1, 44-49.
18. MANDELS, M. e WEBER, J.; Production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*. **1969**, 95, 391-414.
19. MILLER, G.L.; Use of dinitrosalicylic acid reagent for dermination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, **1959**, 31, 426-428.
20. MOREIRA, L.R.S.; Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, 2013.
21. OGEDA, T.L. e PETRI, D.F.S.; Hidrólise enzimática da biomassa. *Química Nova*, **2010**, 33, 1549-1558.
22. POOVAIAH, C.R.; NAGESWARA-RAO, M.; SONEJI, J.R.; BAXTER, H.L.; STEWART, C.N.; Altered lignin biosynthesis using biotechnology to improve lignocellulosic biofuel feedstocks. *Plant Biotechnology Journal*, **2014**.
23. QAISAR, S.; ZOHRA, R.R.; AMAN, A.; QADER, S.A.U.; Enhanced production of cellulose degrading CMCCase by newly isolated strain of *Aspergillus versicolor*. *Carbohydrate Polymers*, **2014**, 104, 199-203.
24. SANDHU, D.K. e SIDHU, M.S.; The fungal succession on decomposing sugar cane bagasse. *Transactions of the British Mycological Society*, **1980**, 75, 281–286.
25. SINGH, S.; PRANAW, K.; SINGH, B.; TIWARI, R.; NAIM, L.; Production, optimization and evaluation of multicomponent holocellulase produced by *Streptomyces* sp. ssr-198 *Journal of the Taiwan, Institute of Chemical Engineers*, **2014**, 45, 2379–2386.
26. SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; Advancement and comparative profiles in the production technologies

using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, **2010**, 46, 541–549.

27. SIQUEIRA, F. G.; Tese de doutorado. Universidade de Brasília, 2010.
28. SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.; MEDEIROS, A.B.; KARP, S.G.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTASCHALK, L.M.; FERRARA, M.A.; BON DA SILVA, E.P.; MORAES, L. M.; ARAUJO J DE A.; TORRES, F.A.; Bioetanol de lignoceluloses: estado e perspectivas no Brasil. *Bioresource Technology*, **2010**, 101, 4820-4825.
29. VALÊNCIA, E.Y. e CHAMBERGO, F.S.; Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. *Fungal Genetics and Biology*. **2013**, 60, 9-18.
30. WHITE, T. J.; BRUNS. T.; LEE. S.; TAYLOR, J.W.; Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York, **1990**, 315-322.