



# **SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA LINHAGEM FÚNGICA ISOLADA DA AMAZÔNIA PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS CAPAZES DE HIDROLISAR BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

**Marcella Fernandes de Souza**

**Projeto Final de Curso**

**Orientadores**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Suely Pereira Freitas**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elba Pinto da Silva Bon**

**Março de 2013**

# SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA LINHAGEM FÚNGICA ISOLADA DA AMAZÔNIA PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS CAPAZES DE HIDROLISAR BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

*Marcella Fernandes de Souza*

Projeto de Final de Curso submetido ao corpo docente da Escola de Química como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Graduação de Engenharia Química.

Aprovado por:

---

Leda Maria Fortes Gottschalk, D.Sc.

---

Rodrigo Pires do Nascimento, D.Sc.

---

Rosalie Reed Rodrigues Coelho, D.Sc.

Orientado por:

---

Suely Pereira Freitas, D.Sc.

---

Elba Pinto da Silva Bon, Ph.D.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil  
Março de 2013

Souza, Marcella Fernandes de.

Seleção e avaliação de uma linhagem fúngica isolada da Amazônia para a produção de enzimas capazes de hidrolisar biomassa lignocelulósica/ Marcella Fernandes de Souza. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2013.

x, 51 p.; il.

(Projeto Final) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2013.

Orientadores: Suely Pereira Freitas e Elba Pinto da Silva Bon

1. Fungos filamentosos. 2. Produção de enzimas. 3. Hidrólise. 4. Projeto Final (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Suely Pereira Freitas e Elba Pinto da Silva Bon. I. Título.

**"Procure ser um homem de valor,  
em vez de ser um homem de sucesso."**

**Albert Einstein**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Professora Elba P. S. Bon, por ter me recebido em sua equipe de braços abertos e por acreditar em mim, abrindo muitas portas para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço também à Professora Suely P. Freitas, pela boa vontade e ajuda durante a orientação.

A toda equipe do Laboratório de Tecnologia Enzimática, por toda ajuda tanto na parte prática quanto na teórica e por tornarem o ambiente de trabalho sempre muito agradável; um agradecimento especial a Ayla Sant'Ana da Silva, por toda a paciência e dedicação, mesmo quando estava do outro lado do mundo.

A meus pais, por todo o amor e por me apoiarem incondicionalmente, me dando confiança para trilhar qualquer caminho.

Aos meus amigos da faculdade, que tornaram a Escola de Química um lugar sempre alegre e que me ajudaram muito para que esses anos fossem tranquilos, sem grandes obstáculos; um agradecimento especial a Mauricio, Helena, Ronaldo, Henrique, Felipe, Daniel e João Henrique.

Aos amigos do GEAMA, que me ajudam a ser uma pessoa melhor a cada dia e me dão tantas oportunidades de trabalho e crescimento; obrigada por encherem minha vida de Arte.

A todos que contribuíram para esse trabalho, muito obrigada.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Graduação em Engenharia Química

## **SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA LINHAGEM FÚNGICA ISOLADA DA AMAZÔNIA PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS CAPAZES DE HIDROLISAR BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

Marcella Fernandes de Souza

Março, 2013

Orientadores: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Suely Pereira Freitas

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elba Pinto da Silva Bon

Reduzir o custo de produção de etanol de segunda geração é o principal desafio para viabilizar o processo em escala industrial. Além da otimização de todas as etapas do processo, este custo pode ser reduzido por meio de seleção e desenvolvimento de linhagens super-produtoras de enzimas, capazes de excretar uma mistura balanceada de celulases e hemicelulases. Neste trabalho, nove fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, isolados da Amazônia, foram cultivados em condições comparativas às do fungo *Trichoderma reesei* RUT C-30, referência para a produção de enzimas celulolíticas. A linhagem 422 destacou-se como a melhor produtora das enzimas estudadas, apresentando atividades enzimáticas superiores às obtidas pelo cultivo do *T. reesei* RUT C-30. Foram realizados, a 50 °C e em condições comparativas, ensaios de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por moinho de bolas e por tratamento hidrotérmico utilizando as enzimas de *T. reesei* RUT C-30 e da linhagem 422, suplementadas com enzimas de *Aspergillus awamori*. Para o bagaço moído em moinho de bolas, o uso das duas preparações resultou em um rendimento em glicose em torno de 80%, com 24 horas de hidrólise. Este mesmo desempenho foi observado para o uso das enzimas do *T. reesei* RUT C-30 no bagaço pré-tratado por tratamento hidrotérmico, entretanto o rendimento em glicose caiu para cerca de 60% para o uso das enzimas da linhagem 422. Os resultados obtidos neste estudo são expressivos devido ao potencial da linhagem selecionada da biodiversidade brasileira em produzir enzimas para a hidrólise enzimática da biomassa em níveis equivalentes aos de uma linhagem industrial já conhecida. Entretanto, ficou evidente que o tipo de pré-tratamento influencia seletivamente o desempenho de diferentes misturas enzimáticas.

# ÍNDICE

INTRODUÇÃO	Página 01
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	Página 02
1.1. COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	Página 02
1.1.1. CELULOSE	Página 02
1.1.2. HEMICELULOSE	Página 03
1.1.3. LIGNINA	Página 04
1.2. HIDRÓLISE DA BIOMASSA	Página 04
1.2.1. HIDRÓLISE DA BIOMASSA COM ÁCIDO CONCENTRADO	Página 04
1.2.2. HIDRÓLISE DA BIOMASSA COM ÁCIDO DILUÍDO	Página 05
1.2.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	Página 06
1.3. PRÉ-TRATAMENTO	Página 09
1.3.1. MOINHO DE BOLAS	Página 09
1.3.2. TRATAMENTO HIDROTÉRMICO	Página 09
1.4. FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE CELULASES	Página 10
1.5. APLICAÇÕES DAS CELULASES	Página 11
1.5.1. INDÚSTRIA DE DETERGENTES	Página 11
1.5.2. INDÚSTRIA TÊXTIL	Página 12
1.5.3. INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA	Página 12
1.5.4. RAÇÃO ANIMAL	Página 12
1.5.5. INDÚSTRIA DE PAPEL	Página 13
1.6. PERSPECTIVAS PARA O BRASIL	Página 13
1.7. OBJETIVOS	Página 14
2. MATERIAIS E MÉTODOS	Página 15
2.1. MICRORGANISMOS, MANUTENÇÃO E PROPAGAÇÃO	Página 15
2.2. CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO E MEIOS DE CULTIVO	Página 16
2.3. ACOMPANHAMENTO DAS FERMENTAÇÕES	Página 16
2.4. ENSAIOS ENZIMÁTICOS	Página 17
2.5. PRÉ-TRATAMENTO	Página 18
2.6. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	Página 18
2.7. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	Página 19
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	Página 20

3.1. PRODUÇÃO DE ENZIMAS	Página 20
3.2. COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS DA LINHAGEM 422 COM A LINHAGEM TRICHODERMA REESEI RUT C-30	Página 22
3.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO PRÉ-TRATADO POR MOINHO DE BOLAS	Página 25
3.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO PRÉ-TRATADO POR TRATAMENTO HIDROTÉRMICO	Página 28
CONCLUSÃO	Página 33
PROJETOS ATUAIS E FUTUROS	Página 35
REFERÊNCIAS	Página 36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação da cadeia de celulose e sua unidade estrutural, a celobiose	Página 02
Figura 2. Organização da estrutura da celulose em fibras, fibrilas e microfibrilas	Página 03
Figura 3. Interação das moléculas de celulose e hemicelulose na parede celular	Página 03
Figura 4. Estrutura da parede celular	Página 04
Figura 5. Esquema simplificado do processo de produção de etanol de segunda geração com hidrólise da biomassa utilizando ácido concentrado	Página 05
Figura 6. Esquema simplificado do processo de produção de etanol de segunda geração com hidrólise da biomassa utilizando ácido diluído	Página 05
Figura 7. Esquema simplificado do processo de produção de etanol de segunda geração com hidrólise enzimática da biomassa	Página 06
Figura 8. Ação conjunta das endoglucanases, exoglucanases e $\beta$ -glicosidases	Página 07
Figura 9. Sequência de mutações desde a linhagem selvagem de <i>Trichoderma reesei</i> QM6a à linhagem mutante de <i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30	Página 10
Figura 10. Crescimento das linhagens de <i>Trichoderma</i> , isoladas na Amazônia, em placas de Petri contendo meio PDA	Página 15
Figura 11. Tipos de bagaços de cana-de-açúcar utilizados nos ensaios de hidrólise enzimática.	Página 18
Figura 12. Comparação dos níveis máximos de atividade de FPase produzida pelas diferentes linhagens de <i>Trichoderma</i> .	Página 20
Figura 13. Comparação dos níveis máximos de atividade de $\beta$ -glicosidase produzida pelas diferentes linhagens de <i>Trichoderma</i>	Página 21
Figura 14. Comparação dos níveis máximos de atividade de xilanase produzida pelas diferentes linhagens de <i>Trichoderma</i>	Página 21
Figura 15. Perfil de atividade das enzimas $\beta$ -glicosidase, FPase e xilanase da linhagem 422 e da linhagem referência <i>T. reesei</i> RUT C-30 durante o cultivo de 7 dias em meio tamponado contendo lactose como fonte de	Página 23

carbono

- Figura 16. Perfil de atividade das enzimas  $\beta$ -xilosidase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase da linhagem 422 e da linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 durante o cultivo de 7 dias em meio tamponado contendo lactose como fonte de carbono Página 24
- Figura 17. Rendimento em glicose obtido ao longo do tempo de hidrólise de bagaço pré-tratado por moinho de bolas com enzimas produzidas pela linhagem 422 e pela linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 Página 26
- Figura 18. Concentração de xilose obtida ao longo do tempo de hidrólise de bagaço pré-tratado por moinho de bolas com enzimas produzidas pela linhagem 422 e pela linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 Página 27
- Figura 19. Rendimento em glicose obtido ao longo do tempo de hidrólise de bagaço pré-tratado por tratamento hidrotérmico com enzimas produzidas pela linhagem 422 e pela linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 suplementadas enzimas produzidas por *Aspergillus awamori* Página 29
- Figura 20. Concentração de xilose obtida ao longo do tempo de hidrólise de bagaço pré-tratado por tratamento hidrotérmico com enzimas produzidas pela linhagem 422 e pela linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 suplementadas com enzimas de *A. awamori* Página 30

# INTRODUÇÃO

---

A contribuição de biocombustíveis líquidos – biodiesel e etanol – no uso mundial de combustíveis tem aumentado a cada ano, com o etanol de cana-de-açúcar correspondendo a 41,5% do combustível utilizado em transporte leve no Brasil em 2010 (REN21, 2011).

Essa tendência é um reflexo da busca mundial por fontes de energia renováveis, motivada não apenas pela necessidade de reduzir o impacto ambiental do uso do petróleo como também pelo seu alto preço e caráter não sustentável do seu uso. O etanol possui octanagem superior à da gasolina e produz menos emissões, sendo por isso considerado mundialmente um bom substituto da gasolina (WYMAN, 1999).

Nas últimas décadas, tem-se observado um crescente interesse no reciclo de resíduos agroindustriais para obtenção de biocombustíveis. As pesquisas reportam que, em geral, o bagaço de cana-de-açúcar é o mais promissor para produção de etanol de segunda geração. O aperfeiçoamento desta tecnologia permitirá o aumento da produtividade da área plantada em etanol sem a necessidade da expansão da fronteira agrícola.

Para a obtenção de etanol de segunda geração a partir de resíduos agroindustriais, é necessário que a biomassa seja sacarificada através de um processo de hidrólise, possibilitando a obtenção de açúcares que podem ser fermentados a etanol.

A hidrólise enzimática ocorre pela atuação das enzimas celulasas e hemicelulasas sobre as cadeias dos polissacarídeos da biomassa, celulose e hemicelulose, respectivamente, liberando açúcares. Essas enzimas são produzidas por microrganismos, com destaque para os fungos filamentosos, que secretam um *pool* enzimático diversificado e complementar, capaz de hidrolisar de forma eficiente os resíduos lignocelulósicos.

# CAPÍTULO 1

---

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico, tendo em sua composição principalmente celulose, hemicelulose e lignina. Somente a celulose e a hemicelulose podem ser hidrolisadas para geração de açúcares.

#### 1.1.1 CELULOSE

A celulose é o componente principal da parede celular das plantas, constituindo cerca de 1/3 da matéria orgânica vegetal (NORKRANS, 1967; CAO e TAN, 2002).

O polímero de celulose é constituído de cerca de 10.000 resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Sua unidade fundamental é a celobiose, um dímero de glicose, como pode ser visto na Figura 1 (Voet e Voet, 2011).

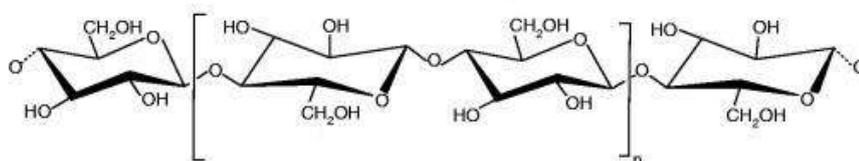


Figura 1. Representação da cadeia de celulose. Entre colchetes está representada sua unidade estrutural, a celobiose (adaptado de BROWN, 2003).

Apesar de sua composição química simples, as cadeias de celulose formam estruturas insolúveis, as microfibrilas, que possuem regiões cristalinas (altamente ordenadas) e regiões amorfas. As microfibrilas interagem entre si através de pontes de hidrogênio, organizando-se em fibrilas maiores que por sua vez formam lamelas,

conferindo resistência à fibra de celulose (BAYER e LAMED, 1992), como ilustra a Figura 2.

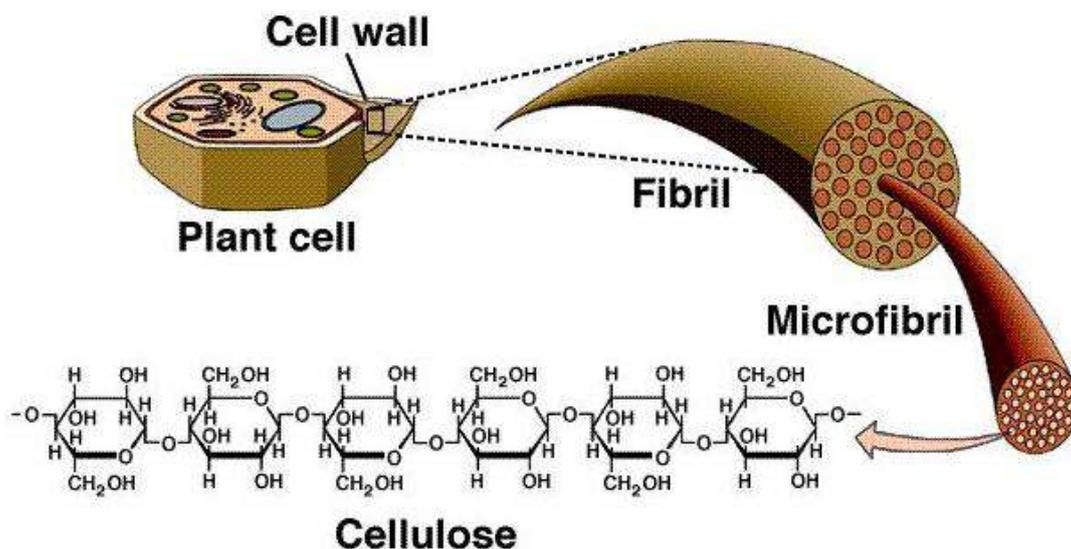


Figura 2. Organização da estrutura da celulose em fibrilas e microfibrilas (retirado de Botany Visual Resource Library, 1998).

### 1.1.2 HEMICELULOSE

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos não-amiláceos e não-celulósicos que podem ser encontrados na parede celular de vegetais superiores (SJÖSTRÖM, 1992; FENGEL e WEGENER, 1989).

As cadeias de hemiceluloses são formadas por pentoses, hexoses e ácidos urônicos, podendo ser constituídas por apenas uma unidade monossacarídica, como as xilanas, ou por mais unidades, como no caso das 4-*O*-metil-glucuronoxilanas, xiloglucanas ou arabinoxilanas (FENGEL e WEGENER, 1989).

A hemicelulose tem papel fundamental na estrutura da parede celular, suportando as microfibrilas de celulose (KIRK e FARRELL, 1987).

### 1.1.3 LIGNINA

A lignina é um heteropolímero complexo, altamente ramificado e de estrutura amorfa. Sua função é criar uma barreira natural à degradação enzimática e microbiana, não sendo hidrolisável (FENGEL e WEGENER, 1989).

A lignina possui em sua composição as subunidades guaiacilo, seringilo e hidrofênolo, que são formadas a partir dos álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumarílico, respectivamente (BOUDET et al., 1995). A lignina não se liga diretamente à celulose, e sim à hemicelulose por meio de ligações covalentes, como pode ser observado na Figura 3.

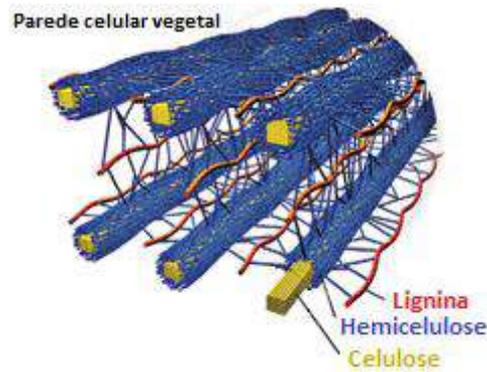


Figura 3. Estrutura da parede celular (adaptado de Genome Management Information System/ORNL)

## 1.2 HIDRÓLISE DA BIOMASSA

A hidrólise da biomassa pode ser realizada quimicamente ou através da atuação de enzimas microbianas. A seguir são descritas as rotas de hidrólise com ácido concentrado, ácido diluído e a rota enzimática.

### 1.2.1 HIDRÓLISE DA BIOMASSA COM ÁCIDO CONCENTRADO

Esse processo consiste na hidrólise da celulose e da hemicelulose em uma única etapa pela ação de soluções de ácidos fortes a baixas temperaturas, alcançando conversões teóricas próximas de 100%. A principal desvantagem dessa rota é a corrosão ocasionada pelo uso de ácidos, gerando a necessidade de equipamentos robustos e aumentando o custo do processo. Além disso, o *downstream* deve incluir as etapas de separação, recuperação e concentração do ácido utilizado (Figura 4). Outra desvantagem associada à hidrólise ácida é a formação de compostos inibidores da etapa de fermentação, como furfural e hidrometilfurfural (VON SIVERS e ZACCHI, 1996).

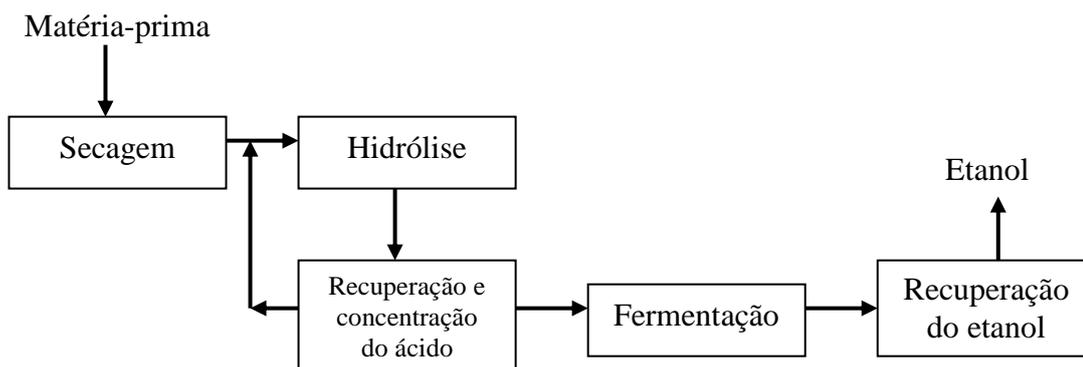


Figura 4. Esquema simplificado do processo de produção de etanol de segunda geração com hidrólise da biomassa utilizando ácido concentrado.

### 1.2.2 HIDRÓLISE DA BIOMASSA COM ÁCIDO DILUÍDO

Nessa rota, ácido diluído é utilizado para hidrolisar a biomassa a açúcares em duas etapas (Figura 5). Inicialmente a hemicelulose é hidrolisada em temperaturas próximas a 190°C. A segunda etapa visa à hidrólise da celulose e tem suas condições otimizadas para tal, com a temperatura acima de 200°C. Estas condições operacionais ocasiona a degradação de partes dos produtos e a formação de inibidores do processo fermentativo (LARSSON et al., 1998).

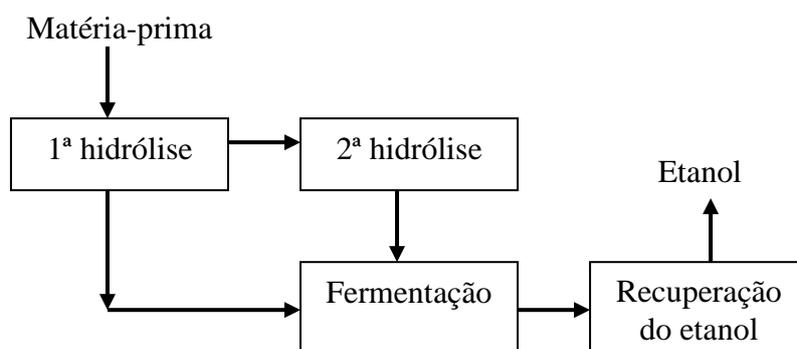


Figura 5. Esquema simplificado do processo de produção de etanol de segunda geração com hidrólise da biomassa utilizando ácido diluído.

### 1.2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Como a hidrólise enzimática ocorre em condições mais brandas do que as empregadas nas hidrólises ácidas, reduzindo assim a formação de subprodutos indesejáveis, esta é a opção de processo mais estudada atualmente.

O processo enzimático de produção de etanol de biomassa pode ser subdividido em 4 etapas principais: i) pré-tratamento, ii) hidrólise, iii) fermentação e iv) destilação (Figura 6). Os microrganismos são essenciais tanto para a produção de enzimas para hidrólise enzimática quanto para a fermentação dos açúcares a etanol.

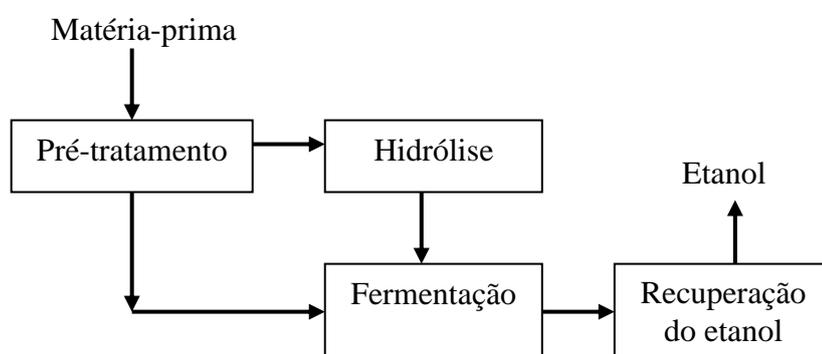


Figura 6. Esquema simplificado do processo de produção de etanol de segunda geração com hidrólise enzimática da biomassa.

Devido à complexidade estrutural da biomassa, a etapa de hidrólise requer o uso de diferentes enzimas atuando de forma sinérgica (BÉGUIN e AUBERT, 1994), denominadas celulasas e hemicelulasas.

As celulasas atuam na sacarificação da celulose, clivando suas ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. Dependendo de seu sítio de atuação, elas podem ser classificadas como endoglucanases (1,4- $\beta$ -D-glicano-4-glicanoidrolase, EC 3.3.1.4), exoglucanases/ celobiohidrolases (1,4-  $\beta$ -D-glicano-celobiohidrolase, EC. 3.2.1.91) ou  $\beta$ -glicosidasas (EC 3.2.1.21) (GHOSH e GHOSH, 1993). A atuação dessas três classes está ilustrada na Figura 7.

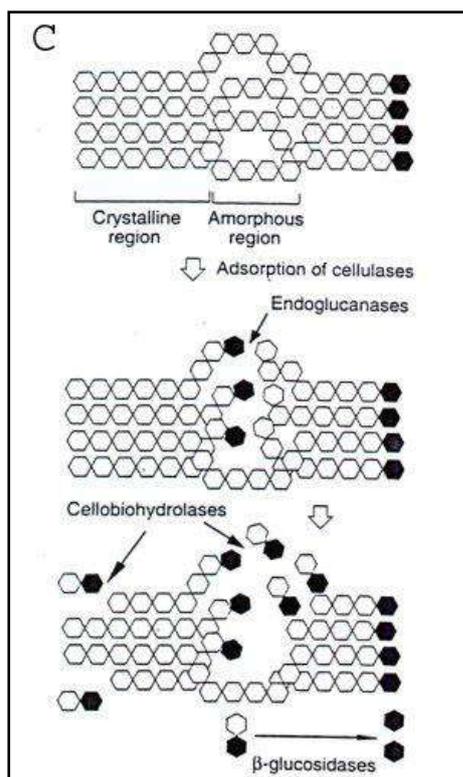


Figura 7. Ação conjunta das endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases (BÉGUIN e AUBERT, 1994). Os hexágonos escuros representam extremidades redutoras.

### ***Endoglucanases***

As endoglucanases atuam de forma randômica, clivando a cadeia de celulose preferencialmente em suas regiões amorfas. Elas são responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico, devido à redução do grau de polimerização e à fragmentação da molécula, gerando celo-oligossacarídeos com diversos tamanhos. A sua ação gera dois novos terminais, um redutor e um não redutor, nos quais as exoglucanases irão atuar posteriormente. A atuação conjunta das endo e exoglucanases é a primeira forma de sinergia existente no processo de hidrólise da celulose (WOOD e McCRAE, 1977; WOODWARD, 1991).

### ***Exoglucanases***

As exoglucanases (também chamadas celobiohidrolases – CBH) atuam nos terminais redutores e não redutores resultantes da ação das endoglucanases, liberando celobiose. Elas são responsáveis pela ruptura física do substrato, aumentando a taxa de hidrólise da celulose – as regiões cristalinas são transformadas em regiões amorfas, deixando o substrato mais exposto às celulases.

A CBH pode ser subdividida em enzimas do tipo I (CBH I – hidrolisam terminais redutores) e enzimas do tipo II (CBH II – hidrolisam terminais não redutores).

### ***β-glicosidasas***

Na hidrólise de material celulósico, a β-glicosidase é uma enzima importante do complexo celulolítico, sendo necessária para a completa degradação de celulose à glicose e reduzindo a inibição das outras celulases pela celobiose (RAMOS et al., 1993). Por causa da sua importância, preparações comerciais de celulases são comumente melhoradas pela adição de β-glicosidase com o objetivo de aumentar sua atividade catalítica.

Uma única enzima do complexo celulolítico não é capaz de hidrolisar a molécula de celulose de forma eficiente, sendo necessária a ação sinérgica de todo o complexo (BÉGUIN e AUBERT, 1994). Comumente, os parâmetros mais importantes quando se avalia a dosagem enzimática para hidrólise são as atividades enzimáticas de FPase (*Filter paper activity*) e de β-glicosidase. A atividade de FPase representa a atividade total de celulases na degradação de uma fita de papel de filtro (GHOSE, 1987).

As hemicelulases, como a xilanase, e outras enzimas acessórias (e.g. α-L-arabinofuranosidase e β-xilosidase) também são necessárias para uma hidrólise eficiente, porém são negligenciadas em muitos estudos que avaliam a eficiência de misturas enzimáticas para a hidrólise da biomassa. Essas enzimas, ao degradarem a hemicelulose, rompem as ligações inter e intracadeias existentes na biomassa, facilitando o acesso das celulases à molécula de celulose (AHAMED e VERMETTE, 2008).

Um dos fatores limitantes na produção de etanol de biomassa é o alto custo de produção dessas enzimas hidrolíticas, o que torna economicamente inviável seu uso em escala industrial (AHAMED e VERMETTE, 2008). Neste contexto, a seleção de microrganismos que se destaquem na produção de um coquetel enzimático com alta atividade celulolítica apresenta-se como uma das soluções para a viabilidade do processo.

## 1.3 PRÉ-TRATAMENTOS

A etapa de pré-tratamento é comumente realizada por processos físicos (mecânicos ou térmicos), químicos ou uma combinação desses dois. Devido à estrutura complexa dos materiais lignocelulósicos, os pré-tratamentos são essenciais para permitir uma hidrólise enzimática eficiente e tem por objetivos a remoção de lignina e hemicelulose, a redução da cristalinidade da celulose e/ou o aumento da porosidade da biomassa sem a produção de inibidores das etapas subsequentes do processo.

Os tratamentos químicos com ácidos e bases foram extensamente estudados. No entanto, eles apresentam diversos problemas, como necessidade de aquisição de equipamentos feitos de materiais resistentes e de uma etapa de neutralização dos xaropes de biomassa e dos efluentes ácidos, além de levarem à formação de inibidores das etapas de sacarificação e fermentação quando ácidos são usados.

Pré-tratamentos mecânicos ou térmicos, substituindo o uso de substâncias químicas, são mais promissores na produção de etanol de segunda geração.

### 1.3.1 MOINHO DE BOLAS

A moagem por moinho de bolas é descrita como um processo mecânico-químico devido a sua eficiência em quebrar as interações químicas entre lignina e hemicelulose após um longo tempo de moagem (TERAMOTO et al., 2008).

Sua principal característica é a redução da cristalinidade da biomassa sem mudanças na composição do material, resultando em um material amorfo que pode ser facilmente degradado pela ação de enzimas hidrolíticas. Silva e colaboradores (2010) obtiveram um perfil de difração de raio-X típico de estrutura amorfa ao analisar amostras de bagaço de cana-de-açúcar tratados por moinho de bolas durante 1 hora.

### 1.3.2 TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

No pré-tratamento hidrotérmico, a biomassa fica em contato com água comprimida durante alguns minutos entre 170 °C e 230 °C.

Dependendo das condições de processo, este tratamento promove a remoção de uma parte significativa da hemicelulose, sendo os açúcares resultantes solubilizados na

fração líquida em diferentes graus de despolimerização. Uma parte da lignina pode ser também removida (SUN e CHENG, 2002). O produto final é uma fração sólida rica em celulose com uma maior digestibilidade do que a biomassa *in natura*.

O processo hidrotérmico é uma opção de pré-tratamento interessante, pois prescinde do uso de reagentes químicos minimizando os problemas de corrosão e reduzindo os custos.

## 1.4 FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE CELULASES

Vários microrganismos, como fungos e bactérias, são capazes de produzir sistemas completos de celulases. Os fungos são os mais estudados devido a sua capacidade de produzir complexos celulolíticos em grande quantidade, sendo os gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Humicola* os melhores produtores.

O gênero *Trichoderma* é relatado como tendo grande potencial de aplicação industrial e biotecnológica (SAMUELS, 1996), sendo a espécie *Trichoderma reesei* a mais estudada para a degradação da celulose. Essa espécie apresenta uma baixa produção de  $\beta$ -glicosidase, o que reduz sua capacidade de hidrolisar o material lignocelulósico a moléculas de glicose eficientemente (WEN, LIAO e CHEN, 2005).

A espécie *T. reesei* foi descoberta durante a 2ª Guerra Mundial. Os soldados perceberam a degradação de suas fardas, barracas e outros objetos feitos de algodão nas Ilhas Salomão e foram iniciadas pesquisas para descoberta do agente degradador. A linhagem *T. reesei* QM6a foi então isolada pelo Dr. Elwyn T. Reese, cujo sobrenome nomeou a nova espécie. Seguiu-se então uma série de melhoramentos por genética clássica utilizando-se reagentes químicos e/ou luz ultravioleta até o isolamento da linhagem *T. reesei* RUT C-30, uma das mais utilizadas em pesquisas científicas (Figura 8).

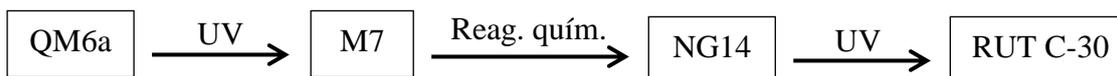


Figura 8. Sequência de mutações desde a linhagem selvagem *Trichoderma reesei* QM6a à linhagem mutante *Trichoderma reesei* RUT C-30.

Com o advento de métodos filogenéticos e moleculares, a taxonomia do gênero *Trichoderma* foi revisada, e atualmente são conhecidas mais de 100 espécies, muitas das quais apresentam capacidade equivalente ou superior de produção de celulases e hemicelulases em comparação com linhagens utilizadas na indústria (KOVÁCS et al., 2008), o que justifica a prospecção permanente de novas linhagens de *Trichoderma* e de outros fungos celulolíticos promissores para fomentar programas de melhoramento genético.

O Brasil possui grande diversidade de espécies microbianas com potencial biotecnológico, mas ainda desconhecidas, e que devem ser exploradas na busca por linhagens superprodutoras de enzimas celulolíticas para a produção de etanol celulósico.

## 1.5 APLICAÇÕES DAS CELULASES

As celulases são enzimas com alto destaque atualmente devido às diversas pesquisas visando a produção de etanol de segunda geração. No entanto, o uso industrial dessas enzimas está consolidado e já existe há décadas. Abaixo são apresentados os principais usos dessa classe de enzimas.

### 1.5.1 PRODUTOS DE LIMPEZA

A atuação das celulases em detergentes se deve a sua capacidade de degradar celulose, possibilitando a remoção das fibrilas dos tecidos de algodão. A maciez do tecido aumenta pela remoção dessas partículas sólidas presas ao algodão (HOSHINO e SUSUMO, 1997).

As celulases destinadas aos produtos de limpeza geralmente provém de espécies de bactérias *Bacillus* ou por fungos do gênero *Humicola*, que são capazes de produzir celulases cujo pH de ação ideal é em torno de 7, apesar delas suportarem valores de pH mais alcalinos.

### 1.5.2 INDÚSTRIA TÊXTIL

As enzimas começaram a se popularizar na indústria têxtil no século XX devido a uma série de vantagens em relação a substâncias químicas sintéticas. O grande

benefício do uso de enzimas é na questão ambiental, já que apresentam maior biodegradabilidade e menor consumo de energia, além de serem mais específicas que suas contrapartes sintéticas.

Entre as enzimas, as celulasas são especialmente usadas. Seu uso no envelhecimento do tecido *denim*, usado na fabricação de calças jeans, é possivelmente o mais bem sucedido processo enzimático da indústria têxtil nos últimos anos. Este processo é feito retirando-se o corante índigo de dentro das fibras, através de uma ação cooperativa entre a hidrólise enzimática e tensão mecânica causada por agitação, criando assim a diferença na densidade de cor nas calças (ANDREAUS et al., 2000).

A maioria das celulasas usada na indústria têxtil é proveniente de fungos e as produzidas por fungos do gênero *Trichoderma* são ainda as mais utilizadas para a maioria dos processos (PERE, 2001).

### 1.5.3 INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

As celulasas são usadas na extração de suco de frutas e óleos de grãos, na clarificação de sucos e vinhos, na extração da proteína de soja, e na extração de ágar, entre outras aplicações na indústria alimentícia. Além de aumentar a eficiência dos processos, as celulasas podem favorecer a qualidade nutritiva dos alimentos ao remover a parede celular de vegetais e frutas, facilitando a liberação do sabor e aroma, enzimas, polissacarídeos e proteínas.

As celulasas mais usadas na indústria de bebidas são as de fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, devido ao seu baixo pH. Celulasas de *Aspergillus niger* também são muito utilizadas.

### 1.5.4 RAÇÃO ANIMAL

A adição de enzimas celulolíticas em rações animais começou nos primeiros anos da década de 1970. No início não houve sucesso, devido ao elevado custo de produção das enzimas em relação ao benefício obtido. Atualmente, com a descoberta de linhagens superprodutoras e com o desenvolvimento de processos mais produtivos, essa aplicação teve sua viabilidade econômica aumentada, tornando a ser alvo de estudos.

As celulasas são utilizadas atuando sinergicamente com as enzimas naturalmente ocorrentes no sistema digestivo dos animais (amilases, proteases e outras glucanases), eliminando fatores anti-nutricionais presentes em grãos e vegetais e aumentando o valor nutritivo dos alimentos (GALANTE et al., 1998). Dessa forma, há um aumento no ganho de peso e uma melhora no funcionamento intestinal dos animais.

#### 1.5.5 INDÚSTRIA DE PAPEL

Muitas enzimas interessam à indústria de papel e celulose, no entanto, as celulasas são as mais utilizadas. Para produzir papel, composto basicamente de fibras de celulose, é preciso picar a madeira, transformá-la em polpa por processos químicos e retirar dessa polpa a hemicelulose, a lignina, certas resinas e outros componentes. Enzimas capazes de realizar algumas dessas tarefas permitem substituir produtos químicos responsáveis por sérios problemas ambientais. Assim, as celulasas mostram-se como uma boa alternativa aos processos químicos no processamento da madeira.

Outra aplicação das celulasas nesta indústria trata-se da reciclagem do papel. O tratamento enzimático do papel reciclado utiliza celulasas alcalinas, que não agem sobre a tinta e sim sobre a celulose, que retêm as partículas de tinta do papel, processo esse chamado destintagem (VYAS e LACHKE, 2003).

### 1.6 PERSPECTIVAS PARA O BRASIL

No terceiro levantamento de safra realizado pela CONAB em dezembro de 2011, a produção de cana-de-açúcar para a safra de 2011/2012 foi estimada em 571,4 milhões de toneladas, sendo 287,6 milhões de toneladas destinadas à produção de etanol (CONAB, 2011). O processamento de uma tonelada de cana-de-açúcar gera em torno de 280 kg de bagaço, ou seja, em 2011 foram geradas em torno de 81 milhões de toneladas de bagaço.

Segundo o rendimento teórico de etanol a partir da celulose presente no bagaço de cana-de-açúcar, 1 kg de bagaço pode ser convertido em 0,24 L de etanol. Assim, dois bilhões de litros a mais de etanol poderiam ser produzidos por ano a partir do bagaço excedente, que representa apenas 10% do bagaço gerado na indústria alcooleira. Cerca de 90% do bagaço gerado é utilizado para a cogeração de vapor e eletricidade através de

sua combustão (MACEDO, 2005). Se as caldeiras de baixa pressão atualmente utilizadas (20 bar) fossem substituídas pelas de alta pressão (até 80 bar), as usinas iriam requerer uma menor quantidade de bagaço para suprir suas necessidades energéticas (COELHO et al., 2006). Com a perspectiva da expansão do cultivo da cana-de-açúcar e o avanço das tecnologias de cogeração, há uma tendência ao aumento dos excedentes de bagaço, que então estariam disponíveis para a produção de etanol de segunda geração, aumentando a estimativa apresentada.

## 1.7 OBJETIVO

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar nove linhagens de fungos filamentosos isolados na Amazônia a fim de selecionar linhagens promissoras para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas para a atuação na hidrólise da biomassa da cana-de-açúcar. Para tal, foram traçados três objetivos específicos:

- Comparar as atividades máximas de FPase,  $\beta$ -glicosidase e xilanase obtidas pelas linhagens estudadas em cultivo submerso com farelo de trigo ou lactose como fonte de carbono;
- Comparar o perfil de produção das melhores linhagens com a linhagem referência *Trichoderma reesei* RUT C-30.
- Comparar o potencial hidrolítico das enzimas produzidas pelas melhores linhagens com o das enzimas da linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 frente a bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por moinho de bolas e por tratamento hidrotérmico.

# CAPÍTULO 2

---

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MICRORGANISMOS, MANUTENÇÃO E PROPAGAÇÃO

Os microrganismos isolados da Amazônia utilizados pertencem ao gênero *Trichoderma*, sendo designados por seus números de acesso: 144, 442, 676, 799, 1111, 256, 810, 358 e 422. A propagação e a obtenção de esporos foram efetuadas através de cultivo em placas de Petri contendo meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) (Figura 9). Suspensões de esporos foram obtidas através de raspagem das placas esporuladas com a adição de solução salina 0,9% estéril. As suspensões foram então centrifugadas e os esporos foram preservados em solução estéril de glicerol 20% a -20°C. Os mesmos procedimentos foram realizados para a linhagem referência *T. reesei* RUT C-30.

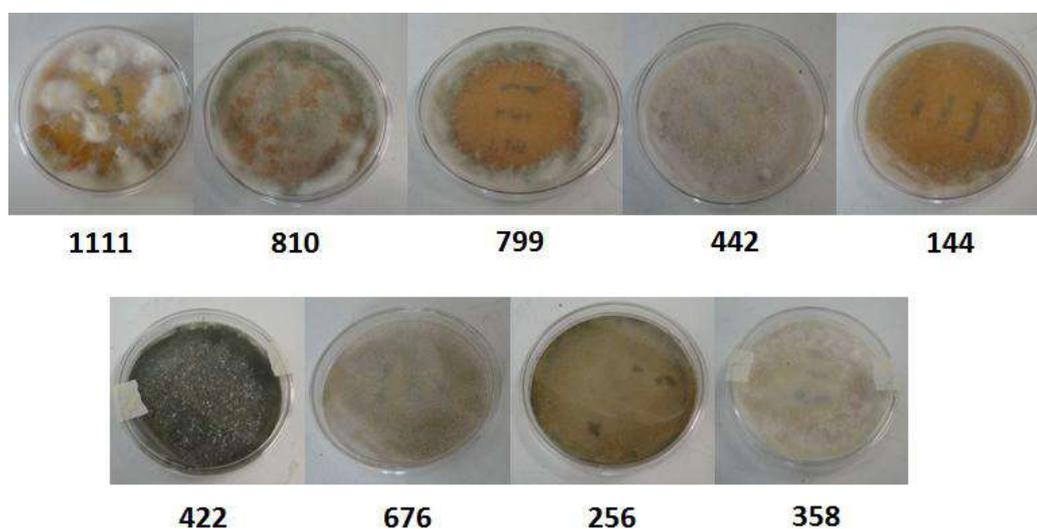


Figura 9. Crescimento das linhagens de *Trichoderma*, isoladas na Amazônia, em placas de Petri contendo meio PDA; os números são referentes ao número de acesso de cada linhagem.

## 2.2 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO E MEIOS DE CULTIVO

Para cada linhagem, foi feito um cultivo para a produção de pré-inóculo em frascos de 500 mL com 100 mL de meio de Mandels (MANDELS, 1969) contendo: 0,3 g/L de ureia, 1,4 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,0 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3 g/L de  $\text{CaCl}_2$ , 0,3 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g/L de extrato de levedura, 0,75 g/L de peptona e 7,5 g/L de avicel. Foram adicionados os seguintes elementos-traço: 5 mg/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 20 mg/L de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 16 mg/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 14 mg/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ . Os meios foram inoculados com 1 mL (1% do volume do meio) de suspensão de esporos e incubados por três dias a 30 °C e 200 rpm em equipamento marca New Brunswick Scientific modelo Innova 44.

Os cultivos para produção das enzimas foram realizados em frascos de 500 mL contendo 100 mL de meio de Mandels adaptado, no qual a concentração de extrato de levedura foi elevada para  $6,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , a peptona foi retirada, foram adicionados  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de milhocina e o avicel foi substituído por lactose ou farelo de trigo em uma concentração de  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Os meios foram inoculados com 10 mL do pré-inóculo (10% volume do inóculo). Os frascos foram incubados por sete dias a 30 °C e 200 rpm em equipamento marca New Brunswick Scientific modelo Innova 44. Nos meios tamponados, o tampão utilizado foi o fosfato de sódio 100 mM, pH 6. Os cultivos foram realizados em triplicata.

## 2.3 ACOMPANHAMENTO DAS FERMENTAÇÕES

Amostras dos sobrenadantes dos cultivos foram retiradas diariamente, do terceiro ao sétimo dias de cultivo, e centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos em centrífuga modelo Beckman Coulter Allegra 6R.

Os sobrenadantes foram utilizados para determinação das enzimas celulolíticas secretadas pelas linhagens e da variação do pH ao longo do cultivo. O pH foi determinado no aparelho Beckman  $\Phi$ 390.

## 2.4 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

A atividade de FPase foi determinada seguindo a metodologia descrita pelo NREL - National Renewable Energy Laboratory (ADNEY e BAKER, 1996), na qual uma unidade de papel de filtro (FPU – *filter paper unit*) é calculada a partir da determinação da diluição da enzima capaz de converter 4% da fita de papel de filtro (2 mg de açúcar redutor equivalente em glicose liberados) após 60 min de reação.

Para a determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidase, foi utilizada a metodologia descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987) com modificações. Foram reagidos 500  $\mu$ L de uma solução 15 mM de celobiose (Sigma código C-7252) com 500  $\mu$ L do extrato enzimático apropriadamente diluído em tampão citrato de sódio, 100 mM, pH 4,8, sendo a concentração de glicose lida em analisador bioquímico (YSI 2700).

A atividade de xilanase foi dosada utilizando 100  $\mu$ L de solução de xilana 1% (tipo *oat spelt*, Sigma código X-0627) e 50  $\mu$ L do extrato enzimático apropriadamente diluído em tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 5,0. A reação foi conduzida a 50 °C por 10 minutos e interrompida pela adição de 300  $\mu$ L de DNS. Os açúcares redutores resultantes foram analisados através do ensaio de DNS (SUMNER, 1925; SUMNER, 1944).

As atividades de  $\beta$ -xilosidase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase foram determinadas utilizando-se 100  $\mu$ L de 10 mM p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo e p-nitrofenil- $\alpha$ -L-furanosídeo, respectivamente, 200  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,5 M pH 5,0, 650  $\mu$ L de água destilada e 50  $\mu$ L da diluição apropriada da enzima. Após incubar a mistura reacional a 50 °C por 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 500  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. A concentração de p-nitrofenol liberada durante a reação foi medida a 400 nm.

Uma unidade de atividade de  $\beta$ -glicosidase, xilanase,  $\beta$ -xilosidase ou  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (UI – unidade internacional) correspondeu à liberação, respectivamente, de 1  $\mu$ mol de glicose, açúcar redutor (equivalente à xilose) ou p-nitrofenol por minuto, em condições de velocidade inicial. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

A concentração de proteínas foi determinada utilizando reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) e albumina de soro bovino como padrão.

## 2.5 PRÉ-TRATAMENTO

As biomassas utilizadas nas hidrólises foram bagaços de cana-de-açúcar pré-tratados por moinho de bolas (MB) e tratamento hidrotérmico (H) (Figura 10). A caracterização dos materiais MB e H foi realizada seguindo procedimento analítico recomendado pelo National Renewable Energy Laboratory (SLUITER et al., 2008), resultando em um conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina correspondente a 41,9%, 25% e 28% para o bagaço MB e 57,5%, 3,7% e 31,4% para o bagaço H, respectivamente.

O tratamento por moinho de bolas foi realizado em um moinho planetário de bolas a 400 rpm em um vaso de 45 mL contendo 7 esferas ( $\varphi = 15$  mm) por 60 minutos.

O tratamento hidrotérmico do bagaço foi conduzido a 190 °C por 12 minutos (realizado pela INBICON, Dinamarca).



Figura 10. Tipos de bagaço de cana-de-açúcar utilizados nos ensaios de hidrólise enzimática. Pré-tratamentos utilizados: moinho de bolas (direita) e tratamento hidrotérmico (esquerda).

## 2.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Para fins comparativos, foram realizados dois ensaios de hidrólise enzimática utilizando-se enzimas produzidas pela linhagem selecionada (422) e pela linhagem referência *T. reesei* RUT C-30. Enzimas produzidas pelo fungo *Aspergillus awamori* foram utilizadas para suplementação de  $\beta$ -glicosidase. Tanto as enzimas de *T. reesei* RUT C-30 quanto as de *A. awamori* foram cedidas pela BIOMM S.A.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e tiveram duração de 72 horas a 50 °C com teor de sólidos de 5% e volume final de 25 mL. A Tabela 1 contém as

condições específicas utilizadas para cada ensaio de hidrólise. As amostras foram analisadas em HPLC para quantificação de açúcares.

**Tabela 1. Carga enzimática e condições de hidrólise**

<b>Substrato</b>	<b>Carga enzimática (FPU/g biomassa)</b>	<b>Carga enzimática (FPU/g glucana)</b>	<b>Rotação (rpm)</b>	<b>Volume final (mL)</b>
<b>Bagaço MB</b>	15	35,8	200	25
<b>Bagaço H</b>	11,5	20	150	50

MB – pré-tratamento por moinho de bolas; H – pré-tratamento hidrotérmico.

Os rendimentos em glicose foram calculados utilizando-se a Equação 1, a partir do conteúdo de celulose obtido pela caracterização da biomassa.

[ 1 ]

[G] – Concentração de glicose

$\alpha$  – Relação celulose/glicose;  $\alpha = 0,9$

f – Porcentagem de celulose

S – Concentração de substrato

## 2.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Os resultados médios de atividade enzimática e de rendimentos e concentrações de açúcares obtidos nas hidrólises foram comparados pelo teste de Fisher LSD ( $p < 0,05$ ) usando o software STATISTICA (v. 7.0).

As barras de erro dos gráficos foram plotadas baseando-se no desvio-padrão das triplicatas realizadas.

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

A análise dos perfis de acúmulo das atividades de FPase, beta-glicosidase e xilanase permitiu identificar os picos das atividades enzimáticas obtidos com todas as linhagens em função do meio e o dia em que os mesmos foram alcançados. (Figuras 11, 12 e 13).

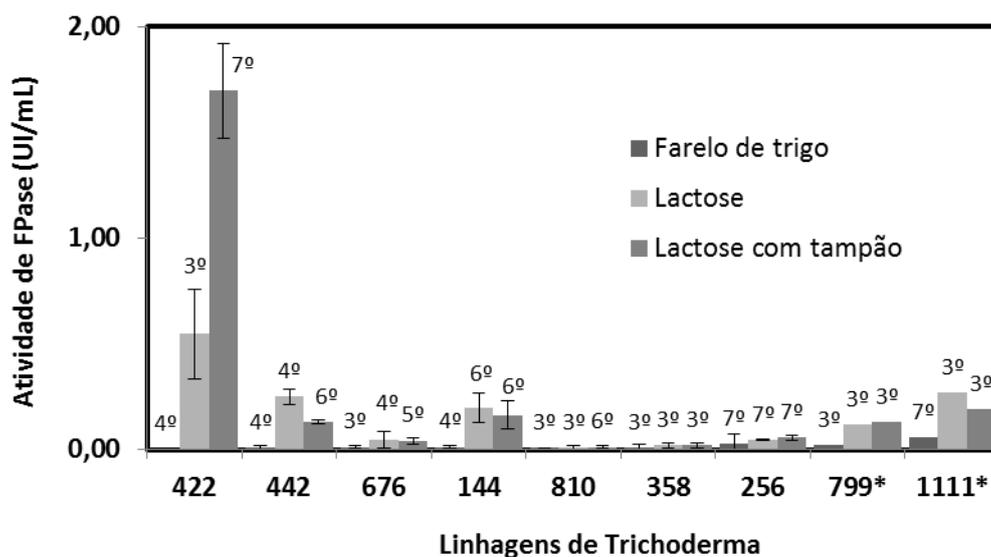


Figura 11. Comparação dos picos de atividade de FPase produzida pelas diferentes linhagens de *Trichoderma*. Os números acima das barras indicam o dia de cultivo em que foi obtida a atividade máxima medida. \*Os cultivos das linhagens 799 e 1111 não foram feitos em triplicata e por isso não apresentam barras de erro.

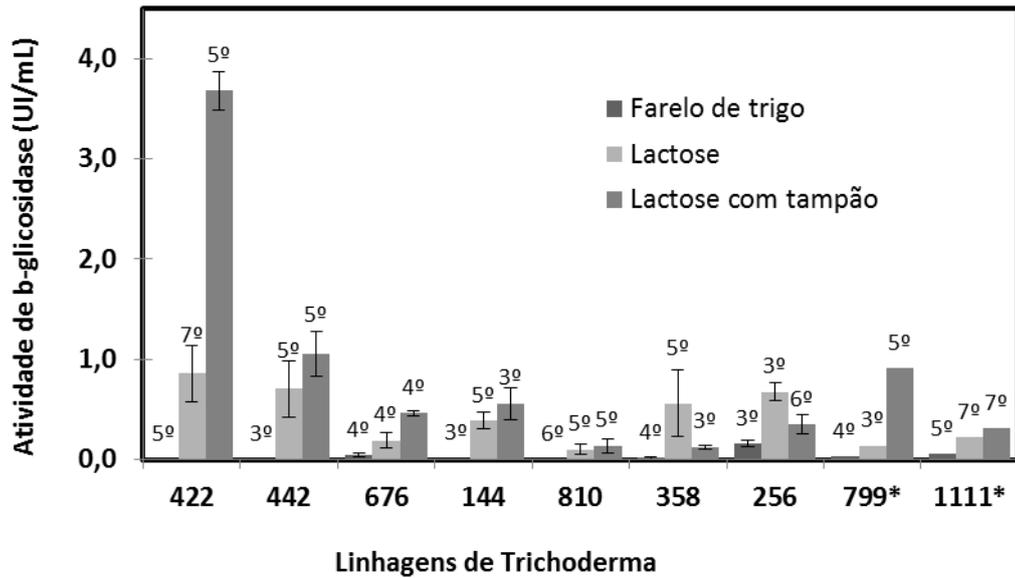


Figura 12. Comparação dos picos de atividade de  $\beta$ -glicosidase produzida pelas diferentes linhagens de *Trichoderma*. Os números acima das barras indicam o dia de cultivo em que foi obtida a atividade máxima medida. \*Os cultivos das linhagens 799 e 1111 não foram feitos em triplicata e por isso não apresentam barras de erro.

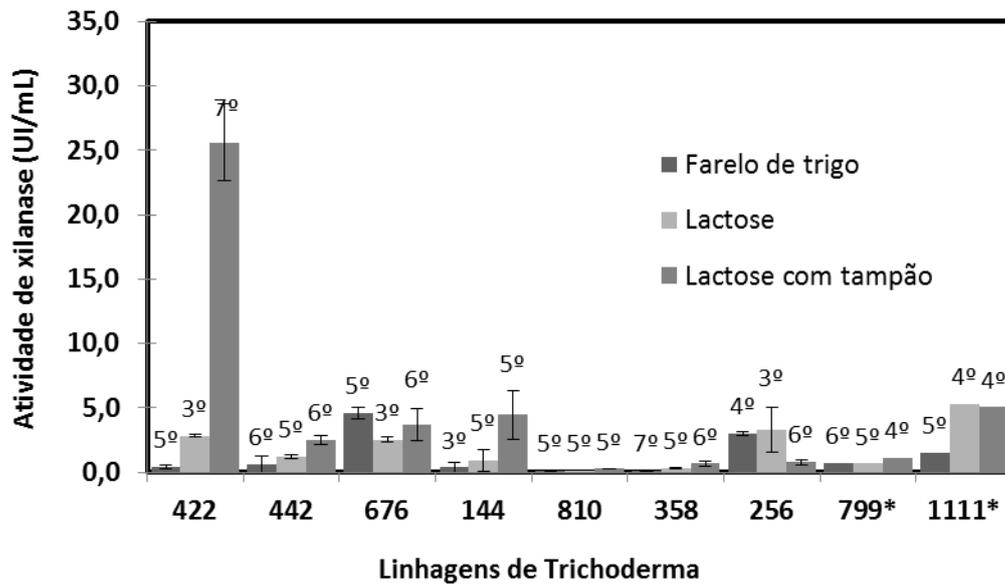


Figura 13. Comparação dos picos de atividade de xilanase produzida pelas diferentes linhagens de *Trichoderma*. Os números acima das barras indicam o dia de cultivo em que foi obtida a atividade máxima medida. \*Os cultivos das linhagens 799 e 1111 não foram feitos em triplicata e por isso não apresentam barras de erro.

A lactose destacou-se como a melhor fonte de carbono para produção de enzimas celulolíticas pelas linhagens estudadas. Esse resultado é condizente com a

literatura, que apresenta a lactose como um bom indutor da produção de celulasas em linhagens de *Trichoderma reesei* (RYU et al., 1979; CHAUDHURI e SAHAI, 1993.; BUSTO et al., 1996; SEIBOTH et al., 2005).

As atividades de FPase (Fig. 11) observadas para oito entre as nove linhagens encontram-se entre 0,01 e 0,25 UI/mL. A linhagem 422 apresentou uma atividade significativamente superior, de acordo com teste de Fisher – LSD ( $p < 0,05$ ), se comparada às outras linhagens testadas, alcançando 1,70 UI/mL no sétimo dia em meio de lactose com tampão. A linhagem 422 apresentou maior valor para a atividade de  $\beta$ -glicosidase (Fig. 12), atingindo o valor de 3,68 UI/mL no quinto dia em meio de lactose com tampão, seguida pela linhagem 442, que atingiu 1,06 UI/mL no quinto dia em meio com lactose, de acordo com teste de Fisher – LSD ( $p < 0,05$ ). Em relação à atividade de xilanase (Fig. 13), a linhagem 422 também apresentou o maior valor, em meio com lactose tamponado, de 24,99 UI/mL, sendo seguida pela linhagem 1111 com 5,50 UI/mL em meio com lactose, após o sétimo e quarto dias de cultivo, respectivamente.

Delabona e colaboradores (2012) encontraram um pico de atividade de FPase de 0,85 FPU/mL para uma linhagem de *Trichoderma harzianum* isolada da Floresta Amazônica cultivada em meio de Mandels com 1% de bagaço pré-tratado com vapor suplementado com sucrose na proporção 3:1. Um máximo de atividade de FPase de 1,4 FPU/mL foi obtido por Whang e colaboradores (2012) no cultivo de uma nova linhagem de *Trichoderma koningii* em meio de Mandels contendo 1% de cellulose como fonte de carbono.

A linhagem 422 apresentou atividades enzimáticas superiores às das outras linhagens testadas e atividade de FPase superior a valores reportados na literatura para linhagens selvagens de *Trichoderma*.

### 3.2 COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS DA LINHAGEM 422 COM A LINHAGEM *TRICHODERMA REESEI* RUT C-30

Foi realizado um novo cultivo em triplicata da linhagem 422 em meio de lactose tamponado, possibilitando a validação dos resultados obtidos na etapa inicial de seleção. A partir da média das atividades obtidas nos quatro cultivos realizados, foi construído o perfil enzimático de produção das três enzimas de interesse do terceiro ao sétimo dias de cultivo.

Devido aos altos valores alcançados pela linhagem 422 em meio de lactose tamponado, seu perfil enzimático foi comparado ao da linhagem *T. reesei* RUT C-30 de forma a avaliar seu potencial como produtora dessas enzimas para fins industriais (Figura 14). Foram construídos adicionalmente os perfis de duas enzimas acessórias que atuam na hidrólise da molécula de hemicelulose:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e  $\beta$ -xilosidase (Figura 15).

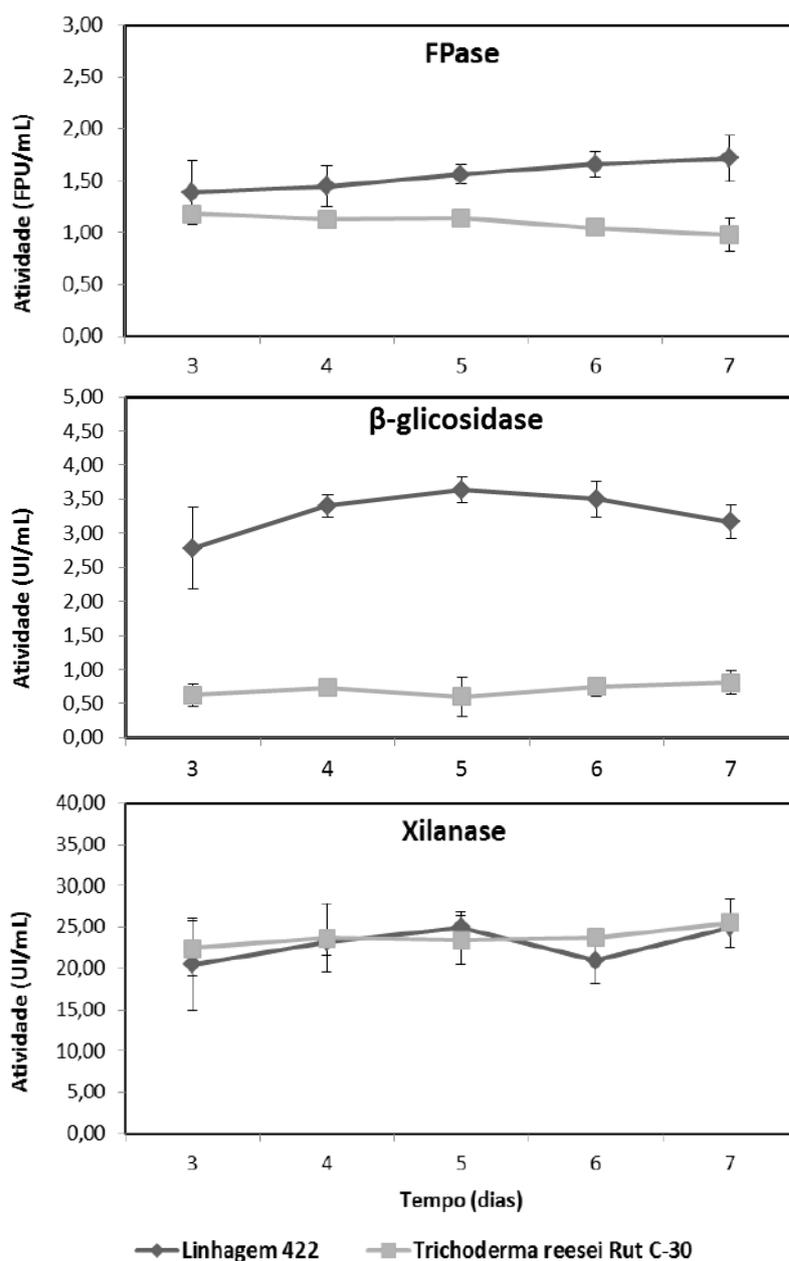


Figura 14. Perfil de atividade das enzimas  $\beta$ -glicosidase, FPase e xilanase da linhagem 422 (losangos) e da linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 (quadrados) durante o cultivo de 7 dias em meio tamponado contendo lactose como fonte de carbono.

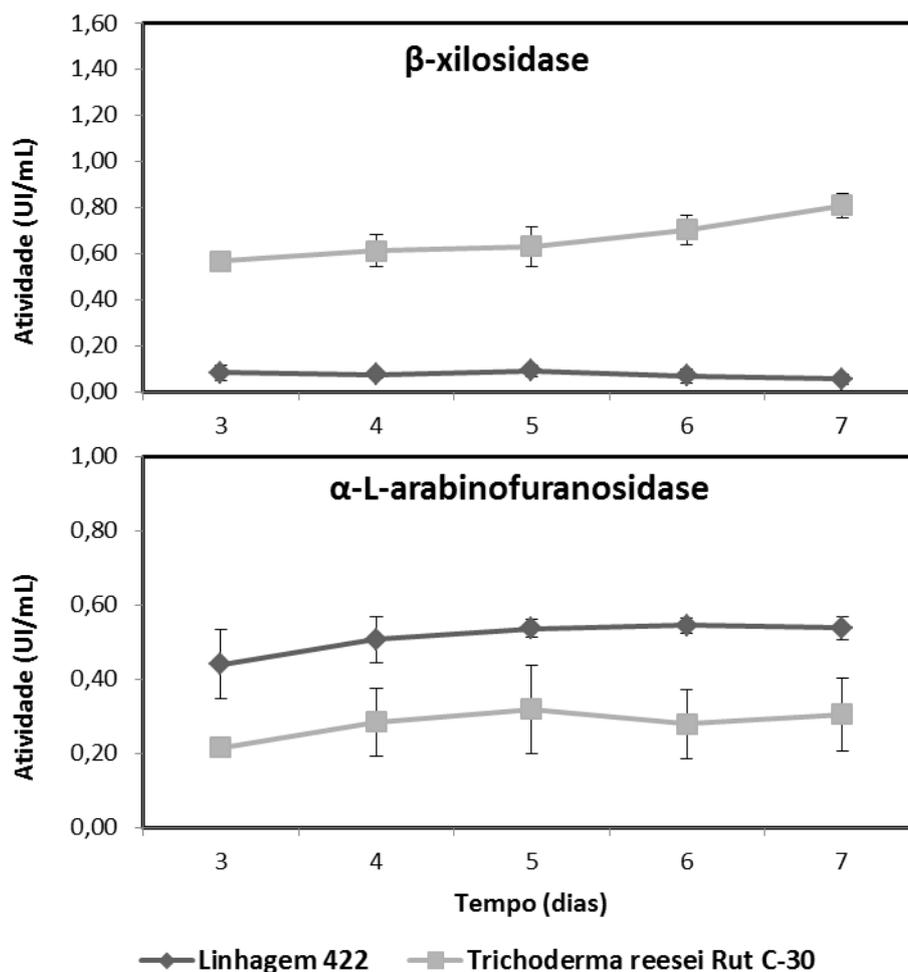


Figura 15. Perfil de atividade das enzimas β-xilosidase e α-L-arabinofuranosidase da linhagem 422 (losangos) e da linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 (quadrados) durante o cultivo de 7 dias em meio tamponado contendo lactose como fonte de carbono.

O pico de atividade de β-glicosidase da linhagem 422 (3,68 UI/mL) foi quatro vezes e meia superior ao obtido no sobrenadante do cultivo da linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 (0,81 UI/mL). O pico de FPase, de 1,70 FPU/mL, foi quase 50% superior ao da linhagem referência *T. reesei* RUT C-30, de 1,18 FPU/mL. Os níveis de xilanase produzidos pelos dois fungos foram estatisticamente iguais de acordo com teste Fisher ( $p < 0,05$ ), e atingiram valores máximos de 24,99 UI/mL pela linhagem 422 e de 25,50 UI/mL pela linhagem *T. reesei* RUT C-30.

A linhagem 422 alcançou níveis superiores de atividade de α-L-arabinofuranosidase em relação à linhagem *T. reesei* RUT C-30 e próximos a zero de β-xilosidase. As atividades específicas máximas dessas enzimas alcançadas pelas duas linhagens foram calculadas, permitindo a comparação com dados da literatura.

Delabona e colaboradores (2012) encontraram atividades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase de 0,12 UI/mg para *T. reesei*, 0,11 UI/mg para *P. echinulatum* e 0,41 UI/mg para uma linhagem de *T. harzianum* isolada na Amazônia, inferiores às encontradas no presente estudo (0,66 UI/mg e 1,17 UI/mg para *T. reesei* RUT C-30 e a linhagem 422, respectivamente). A atividade de  $\beta$ -xilosidase alcançada pela linhagem 422, de 0,18 UI/mg, foi próxima à reportada por Matsuo e colaboradores (1998) para uma espécie de *Thermoascus* (0,2 UI/mL). A atividade específica alcançada pelo *T. reesei* foi quase dez vezes superior (1,7 UI/mg) e comparável ao encontrado por Wakiyama e colaboradores (2008) para a espécie *Aspergillus japonicus* (1,88 UI/mg).

É interessante observar que a linhagem 422 destacou-se como uma boa produtora de  $\beta$ -glicosidase, apresentando uma relação de BGU/FPU ( $\beta$ -glicosidase/FPase) correspondente a 2,16, enquanto a linhagem *T. reesei* RUT C-30 apresentou uma razão de 0,69. Martins e colaboradores (2008) obtiveram 40% de rendimento em glicose na hidrólise da celulose de polpa de papel kraft branqueado usando celulasas de *T. reesei* (Celluclast 1.5) com uma razão BGU/FPU de 0,4. Esse rendimento aumentou para 60% com o uso de uma razão BGU/FPU de 1,14 obtida pela suplementação com a enzima comercial Novozymes 188.

Como a linhagem 422 é capaz de produzir, além dos altos níveis de atividade, uma mistura com uma razão BGU/FPU de  $2,16 \pm 0,23$ , estas enzimas podem ser eficientes para a sacarificação da biomassa pré-tratada.

### 3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO PRÉ-TRATADO POR MOINHO DE BOLAS

Os experimentos de hidrólise foram conduzidos com o intuito de comparar a capacidade hidrolítica das enzimas produzidas pela linhagem 422 e pela linhagem de referência *T. reesei* RUT C-30 e avaliar o efeito do aumento da proporção de  $\beta$ -glicosidade (BGU/FPU) nos rendimentos finais de hidrólise (Figura 16).

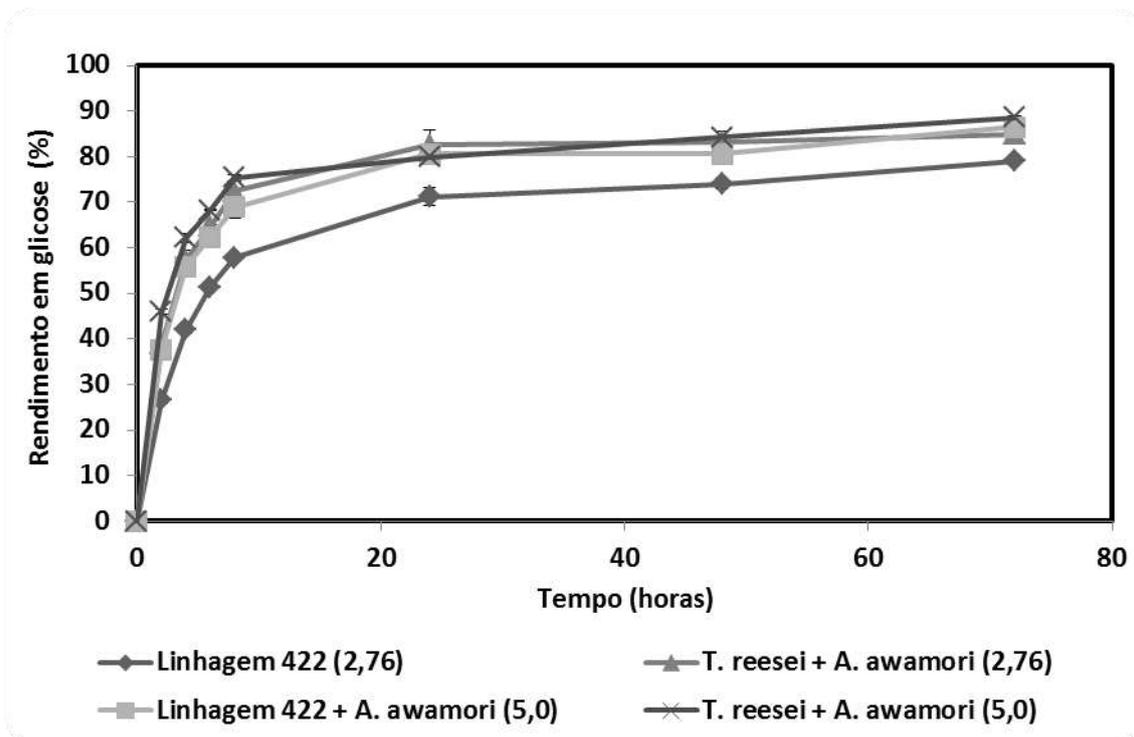


Figura 16. Rendimento em glicose obtido ao longo do tempo de hidrólise de bagaço pré-tratado por moinho de bolas com enzimas produzidas pela linhagem 422 e pela linhagem referência *T. reesei* RUT C-30. Os números em parênteses correspondem à proporção BGU/FPU utilizada, alcançada pela adição de enzimas produzidas por *Aspergillus awamori*.

A mistura enzimática da linhagem 422 apresentou menor rendimento do que a de *T. reesei* RUT C-30 complementada com enzimas de *A. awamori* para a proporção de BGU/FPU igual a 2,76 (78,99 e 84,90%, respectivamente), de acordo com teste de Fisher-LSD ( $p < 0,05$ ). No entanto, os resultados obtidos pelas duas misturas enzimáticas nos ensaios com BGU/FPU igual a 5,0 apresentaram pequena diferença.

Curiosamente, os três ensaios contendo enzimas de *A. awamori* alcançaram rendimentos próximos entre si e superiores ao do ensaio contendo apenas enzimas da linhagem 422, de acordo com teste de Fisher-LSD ( $p < 0,05$ ). Esses resultados podem ser discutidos a partir da análise comparativa dos perfis de concentração de xilose medidos ao longo do tempo de hidrólise apresentados na Figura 17.

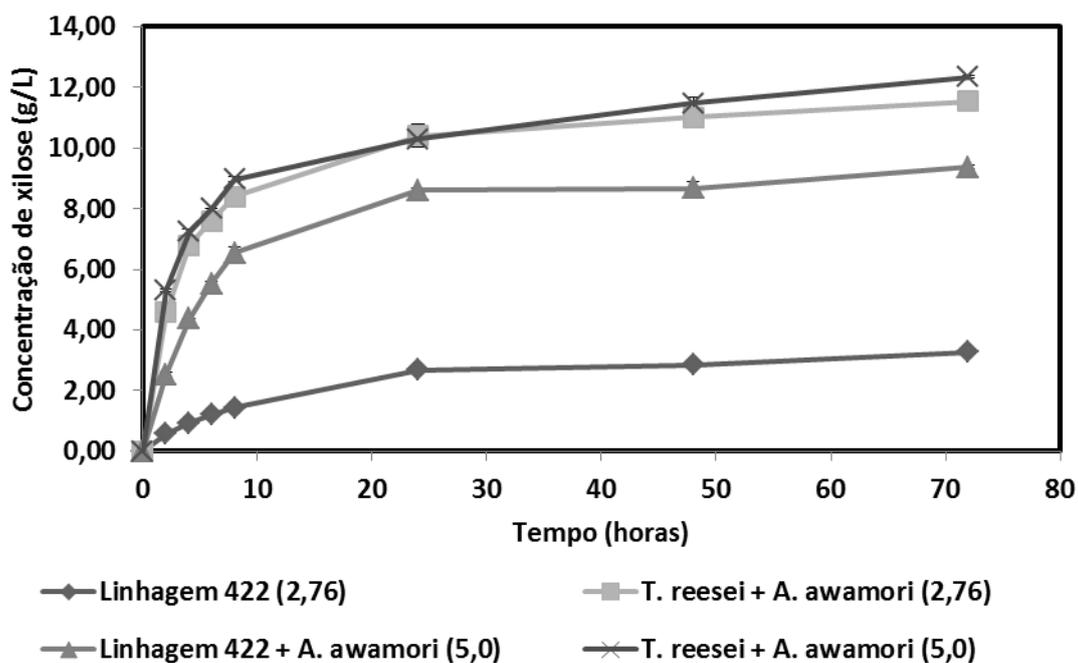


Figura 17. Concentração de xilose obtida ao longo do tempo de hidrólise de bagaço pré-tratado por moinho de bolas com enzimas produzidas pela linhagem 422 e pela linhagem referência *T. reesei* RUT C-30. Os números em parênteses correspondem à proporção BGU/FPU utilizada, alcançada pela adição de enzimas produzidas por *Aspergillus awamori*

As concentrações finais de xilose para os três ensaios contendo enzimas de *A. awamori* foram muito superiores à concentração obtida com a mistura enzimática da linhagem 422 (12,35, 11,53, 9,37 e 3,24 g/L, respectivamente). Os resultados indicam uma deficiência de enzimas necessárias para a degradação da hemicelulose (xilanase e outras enzimas acessórias) no *pool* enzimático da linhagem 422. Essa deficiência foi minimizada pela adição da mistura enzimática de *Aspergillus awamori*, rica em hemicelulases.

A ausência ou menor dosagem dessas enzimas acarreta em uma hidrólise incompleta da hemicelulose, o que dificulta o acesso das celulasas à celulose e resulta em um menor rendimento final em glicose. Alvira e colaboradores (2011) obtiveram um aumento no rendimento em glicose de 9,9% na hidrólise de palha de trigo tratada por explosão a vapor ao aumentar 10 vezes a carga enzimática de xilanase e adicionar 15 UI.g<sup>-1</sup> celulose de  $\alpha$ -arabinofuranosidase à mistura enzimática. Portanto, não foi a maior proporção BGU/FPU responsável pelo aumento dos rendimentos de hidrólise no presente estudo e sim a presença dessas enzimas acessórias.

A concentração final de xilose foi maior de acordo com o maior volume de enzimas de *A. awamori* utilizado – para o ensaio com enzimas de *T. reesei* com proporção BGU/FPU de 5,0 foram utilizados 0,88 mL da mistura enzimática de *A. awamori*; para o ensaio com BGU/FPU de 2,76 com as mesmas enzimas foram utilizados 0,48 mL; para o ensaio com enzimas da linhagem 422 e BGU/FPU de 5,0 foram utilizados 0,4 mL. Essa evidência sugere que o *pool* enzimático da linhagem 422 é tão eficiente na hidrólise da biomassa utilizada quanto as enzimas produzidas pela linhagem referência *T. reesei* RUT C-30, sendo as enzimas de *A. awamori* responsáveis pela diferença nos rendimentos de hidrólise.

Apesar de ter alcançado rendimento ligeiramente inferior ao das enzimas da linhagem de referência *T. reesei* RUT C-30 suplementadas com o sobrenadante do fungo *A. awamori*, de acordo com teste de Fisher-LSD ( $p < 0,05$ ), as enzimas secretadas pela linhagem 422 resultaram em um rendimento de quase 80% de conversão. Considerando que a linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 foi submetida ao longo de duas décadas a diversos processos que visaram o aumento da excreção de enzimas por esse microrganismo e que a linhagem 422 é um fungo selvagem, que não sofreu nenhuma manipulação genética ou foi submetida à mutação randômica, os resultados comparativos podem ser considerados muito promissores.

Adicionalmente, o rendimento em glicose obtido com a linhagem 422 foi similar ao reportado por Silva e colaboradores (2010) de 78,7%, após hidrólise com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por moinho de bolas utilizando uma dosagem de 15 FPU.g<sup>-1</sup> da enzima comercial *Acremonium cellulase* (Meiji Co. Japão) complementada com Optimash BG (Genencor International, EUA).

### 3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO PRÉ-TRATADO POR TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

A eficiência de degradação da biomassa das enzimas secretadas pela linhagem 422 também foi avaliada na sacarificação do bagaço pré-tratado por tratamento hidrotérmico. O tratamento hidrotérmico tem como característica principal a remoção de grande parte da hemicelulose e de uma parte de lignina da biomassa original, resultando em um material que apresenta a sua fração celulósica mais exposta às

enzimas do complexo celulolítico. Já o pré-tratamento por moinho de bolas tem como característica a manutenção da composição original da biomassa, resultando principalmente na redução do índice de cristalinidade da celulose. A diferença do efeito dos pré-tratamentos é uma interessante ferramenta de estudo, permitindo comparar a eficiência hidrolítica das enzimas frente a uma mesma biomassa, porém modificada em condições diferentes.

Ensaio comparativos de hidrólise do bagaço pré-tratado por tratamento hidrotérmico foram realizados com as enzimas produzidas pelas linhagens 422 e pela linhagem referência *T. reesei* RUT C-30. Para anular a interferência da diferença de razão das atividades de FPase e  $\beta$ -glicosidase, os extratos brutos de ambas as linhagem foram suplementados com enzimas produzidas por *A. awamori* de forma a alcançarem uma carga enzimática de  $\beta$ -glicosidase equivalente a 120 BGU.(g de glucana)<sup>-1</sup> (Figura 18).

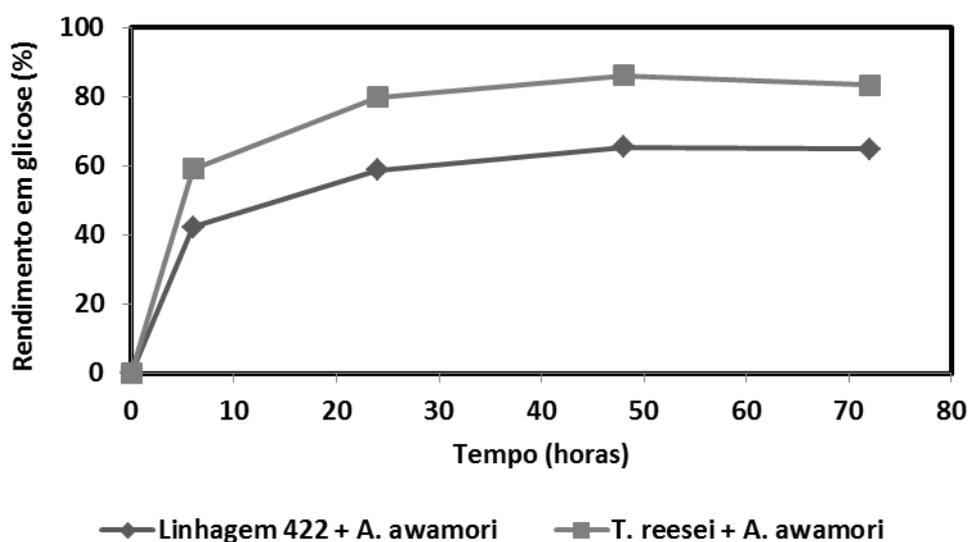


Figura 18. Rendimento em glicose obtido ao longo do tempo de hidrólise de bagaço pré-tratado por tratamento hidrotérmico com enzimas produzidas pela linhagem 422 e pela linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 suplementadas enzimas produzidas por *Aspergillus awamori*.

A linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 alcançou rendimento em glicose superior ao da linhagem 422 (83% e 65%, respectivamente), de acordo com teste de Fisher-LSD ( $p < 0,05$ ), que pode ser discutido a partir da análise comparativa dos perfis de concentração de xilose medidos ao longo do tempo de hidrólise apresentados na Figura 19.

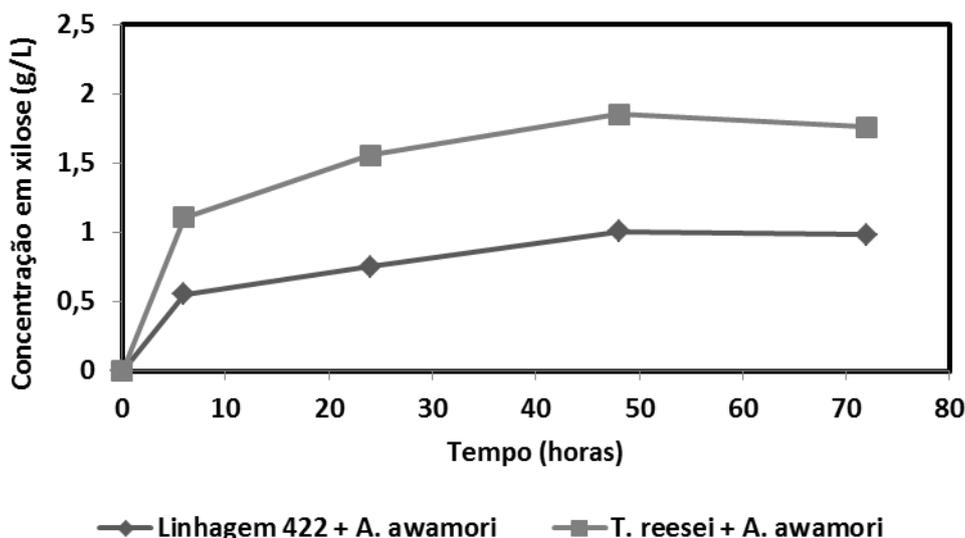


Figura 19. Concentração de xilose obtida ao longo do tempo de hidrólise de bagaço pré-tratado por tratamento hidrotérmico com enzimas produzidas pela linhagem 422 e pela linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 suplementadas com enzimas de *A. awamori*

A concentração de xilose alcançada pela linhagem referência *T. reesei* RUT C-30 foi superior à alcançada pela linhagem 422 (1,76 e 0,99 g/L, respectivamente), de acordo com teste de Fisher-LSD ( $p < 0,05$ ), o que indica novamente uma deficiência de enzimas acessórias necessárias para a degradação completa da biomassa no *pool* enzimático da linhagem 422.

No entanto, apenas uma pequena fração de hemicelulose (3,7%) está presente no bagaço pré-tratado utilizado na hidrólise, levantando questionamentos quanto à influência da falta de hemicelulases no aumento do rendimento em glicose.

Não existe ligação covalente entre a celulose e a lignina, enquanto a hemicelulose está diretamente ligada à lignina via ligações do tipo éster e éter. A quantidade de lignina residual na etapa de hidrólise é significativa (31,4%) e cria uma barreira através de ligações com a fração hemicelulósica restante, protegendo a celulose da ação enzimática. Para romper esse tipo de ligação entre a lignina e a hemicelulose, o *pool* enzimático precisa conter atividades de enzimas acessórias que não atuam diretamente na hidrólise dos polissacarídeos, porém contribuem para o processo global. Um exemplo de atividade enzimática acessória é a feruloil esterase, que promove a quebra das ligações lignina-xilana (WONG, 2005).

Apesar dessa atividade enzimática não ter sido medida neste estudo, uma das hipóteses para a menor eficiência de hidrólise das enzimas secretadas pela linhagem 422

poderia estar relacionada à deficiência de secreção de tais enzimas. Em estudos futuros, a atividade de feruloil esterase será dosada e, caso seja confirmada a baixa produção de tal enzima, esse será um importante ponto a ser visado em um programa de melhoramento genético futuro da linhagem.

Novamente foi observado que a concentração final de xilose foi maior de acordo com o maior volume de enzimas de *A. awamori* utilizado – para o ensaio com enzimas de *T. reesei* foram utilizados 1,7 mL da mistura enzimática de *A. awamori*; para o ensaio com enzimas da linhagem 422 foram utilizados 0,4 mL. Essa evidência reforça que o *pool* enzimático da linhagem 422 é tão eficiente na hidrólise da biomassa utilizada quanto as enzimas produzidas pela linhagem referência *T. reesei* RUT C-30, sendo as enzimas de *A. awamori* responsáveis pela diferença nos rendimentos de hidrólise.

O rendimento alcançado pelas enzimas produzidas pela linhagem 422 suplementada com enzimas de *A. awamori*, apesar de inferior ao obtido pela mistura enzimática da linhagem *T. reesei* RUT C-30 com sobrenadante do fungo *A. awamori*, foi similar a valores reportados na literatura para outros materiais lignocelulósicos. Díaz e colaboradores (2011) obtiveram 66,98% de conversão de celulose em glicose ao hidrolisarem talo de girassol tratado hidrotêrmicamente com uma mistura enzimática de Celluclast 1.5L e Novozymes 188. Hu e colaboradores (2010) hidrolisaram switchgrass (gramínea nativa da América do Norte) tratada hidrotêrmicamente com essa mesma mistura enzimática, alcançando 60,5% de rendimento em glicose.

No entanto, enquanto para o bagaço pré-tratado por moinho de bolas a diferença de rendimento entre a linhagem 422 e a mistura referência foi de cerca de 7% (de 79% para 85%), para o bagaço pré-tratado por tratamento hidrotérmico essa diferença foi mais relevante, de cerca de 28%. Como o pré-tratamento por moinho de bolas reduz drasticamente a cristalinidade da celulose, fator determinante na recalcitrância do material, existe menor exigência de presença/atuação de exoglucanases, responsáveis pela hidrólise da fração cristalina da celulose. Já o pré-tratamento hidrotérmico tem apenas um efeito pequeno de redução da cristalinidade, o que torna essencial a atuação efetiva de exoglucanases. Logo, a diferença de eficiência das enzimas produzidas pela linhagem 422, quando comparada à mistura de referência nos dois casos, pode estar relacionada à atuação e/ou presença de diferentes tipos de exoglucanases no *pool* enzimático. Para a linhagem *T. reesei* RUT C-30, sabe-se que duas exoglucanases são secretadas, a CBH1 e CBH2 (FOREMAN et al., 2003). A investigação detalhada do

*pool* enzimático secretado pela linhagem 422 poderá ser realizado futuramente, através de estudos de proteômica.

## CONCLUSÃO

---

O objetivo do presente trabalho foi alcançado com a identificação de uma linhagem selvagem superprodutora de enzimas celulolíticas capazes de hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. A linhagem 422 destacou-se como boa produtora das três enzimas estudadas, alcançando valores significativamente superiores aos das outras linhagens avaliadas no presente trabalho. Adicionalmente, os níveis de enzimas produzidos por esta linhagem foram superiores àqueles medidos para o fungo *T. reesei* RUT C-30 – com destaque para a alta atividade de  $\beta$ -glicosidase - o que a coloca como extremamente promissora para a produção de enzimas celulolíticas com fins industriais.

A linhagem 422 mostrou-se capaz de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por moinho de bolas com rendimentos próximos de 80%, em 72 horas, e comparáveis a valores obtidos por enzimas comerciais reportados na literatura. Os resultados alcançados são muito expressivos, sendo os rendimentos de hidrólise obtidos com as enzimas da linhagem 422, uma linhagem selvagem, comparáveis aos da linhagem referência *T. reesei* RUT C-30, que resultou de um trabalho de mutação sequencial.

As enzimas acessórias mostraram-se importantes para a hidrólise eficiente da biomassa lignocelulósica. Assim, a sua “carga de atividade” deveria ser adequadamente avaliada em ensaios de hidrólise. Para a linhagem 422, que já produz níveis satisfatórios de  $\beta$ -glicosidase, seria interessante formular misturas enzimáticas baseadas na proporção de atividades de enzimas acessórias, em especial a xilanase, e FPU ao invés de BGU/FPU.

A linhagem 422 foi capaz de:

- i) produzir níveis de FPase superiores ao *T. reesei* RUT C-30, de 1,70 e 1,18 FPU/mL, respectivamente, e de  $\beta$ -glicosidase, de 3,68 e 0,81 UI/mL, respectivamente, além de alcançar valores similares de atividade de xilanase, de 24,99 e 25,50 UI/mL, respectivamente;
- ii) hidrolisar o bagaço de cana pré-tratado em moinho de bolas, alcançando rendimento em glicose de 71,18% em 24 horas e 78,99% em 72 horas, valor comparável a dados da literatura.

- iii) hidrolisar o bagaço de cana pré-tratado por tratamento hidrotérmico, complementada com enzimas de *A. awamori*, alcançando rendimento em glicose de 64,96% em 72 horas.

A otimização do processo de produção de enzimas pela linhagem 422 será relevante na busca por coquetéis enzimáticos de valor comercial acessível a fim de tornar a produção de etanol de segunda geração um processo industrial economicamente viável. Devido a sua elevada capacidade de produção das atividades de FPase e  $\beta$ -glicosidase em níveis superiores ao do *T. reesei* RUT C-30, a linhagem 422 é uma forte candidata a programas de melhoramento genético.

# PROJETOS ATUAIS E FUTUROS

---

O trabalho de pesquisa envolvendo a linhagem 422 resultou em uma parceria com a EMBRAPA e com diversas outras instituições dentro do projeto de melhoramento genético “Linhagens microbianas superiores para a produção de bioetanol: *Trichoderma* sp. e *Aspergillus* sp. produtores de enzimas hidrolíticas e leveduras C5/C6.”, que entrou em vigência em agosto de 2011 com duração de 4 anos.

Visando o melhor entendimento da atuação das enzimas secretadas pela linhagem 422 na hidrólise da biomassa estudos subsequentes serão realizados, a saber:

- Ensaio comparativos de hidrólise com enzimas da linhagem 422 e da *T. reesei* RUT C-30 frente a bagaço de cana pré-tratado variando-se a carga do *pool* enzimático produzido por *A. awamori*. Visa-se colocar a razão BGU/FPU em segundo plano e a avaliar o papel das enzimas acessórias.
- Caracterização do secretoma da linhagem 422 por estudos de proteômica, comparando-o com o da linhagem referência *T. reesei* RUT C-30;
- Sequenciamento do genoma da linhagem 422 como etapa inicial para um programa de melhoramento genético;
- Estudo e otimização do meio e das condições de cultivo para a linhagem de *Trichoderma* 422, após melhoramento genético, visando aumentar sua capacidade de produção de enzimas celulolíticas.

# REFERÊNCIAS

---

- ADNEY, B, BAKER, J. 1996. Measurement of cellulase activities. National Renewable Energy Laboratory.
- AHAMED, A., VERMETTE, P. 2008. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT C-30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 40 (3), 399-407.
- ALVIRA, P., NEGRO, M.J., BALLESTEROS, M. 2011. Effect of endoxylanase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. *Bioresour. Technol.* 102, 4552-4558.
- ANDREAUS, J., CAMPOS, R., GÜBITZ, G., CAVACO-PAULO, A. 2000. Influence of cellulases on Indigo Backstaining. *Textile Research Journal*, 70, 628-632.
- BAYER, E.A., LAMED, R. 1992. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Biodegradation* 3, 171-188.
- BÉGUIN, P., AUBERT, J.P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 25-58.
- BOUDET, A.M., LAPIERRE, C., GRIMA-PETTENATI, J. 1995. Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytologist* 129, 203-236.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BROWN Jr., R. M. 2003. Cellulose Structure and Biosynthesis: What is in Store for the 21 st Century? *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*42, 487-495.
- BUSTO, M.D., ORGEGA, N., PEREA-MATEOS, M. 1996. Location, kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma reesei* cultures. *Bioresource Technology* 57, 187-192.

- CAO, Y., TAN, H. 2002. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydrate Res.* 337, 1291-1296.
- CHAUDHURI, B.K., SAHAI, V. 1993. Production of cellulase enzyme from lactose in batch and continuous cultures by a partially constitutive strain of *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology* 15, 513–518.
- COELHO, S.T., GOLDEMBERG, J., LUCON, O., GUARDABASSI, P. 2006. Brazilian sugarcane ethanol: lessons learned. *Ener.Sustainable Dev.* 10, 26–39.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, safra 2011/2012, terceiro levantamento, dezembro/2011.
- DELABONA, P.S., FARINAS, C.S., SILVA, M.R., AZZONI, S.F., PRADELLA, J.G.C. 2012. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bio. Tech.* 107, 517-521.
- DELABONA, P.D.S., COTA, J., HOFFMAN, Z.B., PAIXÃO, D.A.A., FARINAS, C.S., CAIRO, O.P.L, LIMA, D.J., SQUINA, F.M., RULLER, R., PRADELLA, G.D.C. 2012. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, *Bioresource Technology*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.105>
- DÍAZ, M.J., CARA, C., RUIZ, E., PÉREZ-BONILLA, M., CASTRO,E. 2011. Hydrothermal pre-treatment and enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Fuel* 90, 3225-3229.
- FENGEL, D., WEGENER, G. 1989. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter.
- FOREMAN, P.K., BROWN, D., DANKMEYER, L., DEAN, R., DIENER, S., DUNN-COLEMAN, N.S., et al. 2003. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol. Chem.* 278, 31988-31997.

- GALANTE, Y.M., DE CONTI, A., MONTEVERDI, R. 1998. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: G.F. Harman, C.P. Kubicek (Eds.), *Trichoderma & Gliocladium - Enzymes, biological control and commercial applications*. Vol. 2, Taylor & Francis, London, 327 – 342.
- GHOSE, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.* 59(2), 257-268.
- GOSH, B.K., GOSH A. 1993. Degradation of cellulose by fungal cellulase. *Microbial Degradation of Natural Products*. 84-121.
- HOSHINO, E., SUSUMO, I. 1997. Enzymes in detergency. In: Van Ee. JH, Misset O, Baas, EJ Eds., *Marcel Dekker, NewYork*, 149-174
- HU, Z., FOSTON, M., RAGAUSKAS, A.J. 2011. Comparative studies on hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of leaves and internodes of alamo switchgrass. *Bio. Tech.* 102, 7224-7228.
- KIRK, T.K., FARRELL, R.L. 1987. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 465-505.
- KOVÁCS, K., MEGYERI, L., SZAKACS, G., KUBICEK, C.P., GALBE, M., ZACCHI, G. 2008. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and  $\beta$ -glucosidase on pretreated willow. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 48-55.
- LARSSON, S., PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B., TENGBORG, C. STENBERG, K. ZACCHI, G., NILVEBRANT, N-O. 1998. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 531-536.
- MACEDO, I. 2005. *A energia da cana-de-açúcar (Sugarcane’s energy: twelve studies on Brazilian sugar cane agrobusiness and its sustentability)*. UNICA , São Paulo, Brasil.
- MANDELS, M., WEBER, J. 1969. Production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.* 95, 391–414.

- MARTINS, L.F., KOLLING, D., CAMASSOLA, M., DILLON, A.J., RAMOS, L.P. 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresour. Technol.* 99, 1417-1424.
- MATSUO, M., ENDOU, A., OKADA, T., YAMAOKA, Y. 1998. Purification and Characterization of  $\beta$ -Xylosidase from *Thermoascus* sp. *Journal of fermentation and bioengineering* 86(4), 403-405.
- NORKRANS, B. 1967. Cellulose and cellulolysis. *Appl. Microbio.* 9, 91-130.
- PERE, J., PUOLAKKA, A., NOUSIAINEN, P. BUCHERT, J. 2001. Action of purified *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fibers and yarn. *Journal of Biotechnology.* 89(2-3), 247-255.
- RAMOS, L. P., BREUIL, C., SADDLER, J. N. 1993. The use of enzyme recycle and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 15, 19-25.
- Renewable Energy Policy Network for the 21st Century - Renewables 2011 Global Status Report (disponível em [http://www.ren21.net/Portals/97/documents/GSR/REN21\\_GSR2011.pdf](http://www.ren21.net/Portals/97/documents/GSR/REN21_GSR2011.pdf); acessado em 04 de agosto de 2011)
- RYU, D.Y., ANDREOTTI, R., MANDELS, M., GALLO, B., REESE, E.T. 1979. Studies on quantitative physiology of *Trichoderma reesei* with two-stage continuous culture for cellulase production. *Biotechnology and Bioengineering* 21, 1887–1903.
- SAMUELS, G.J., LIECKFELDT, E., NIRENBERG, H.I. 1996. Description of *T. asperellum* sp. nov. and comparison to *T. viride*. *Sydowia.* 51, 71–88.
- SEIBOTH, B., LUKAS, H., SALOVUORI, N., KARIN, L., ROBSON, D.G., VEHEMAANPERAE, J., et al. 2005. Role of the bga1-encoded extracellular - galactosidase of *Hypocrea jecorina* in cellulase induction by lactose. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 851–857.

- SILVA, A.S., INOUE, H., ENDO, T., YANO, S., BON, E.P.S. 2010. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 7402-7409.
- SJÖSTRÖM, E. 1992. *Wood Chemistry Fundamentals and Applications*. 2 Ed. California, USA: Academic Press.
- SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., CROCKER, D. 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure, NREL/TP-510-42628.
- SUMNER, J.B. 1925. A more specific reagent for the determination of sugar in urine. *J Biol Chem* 65, 51–54.
- SUMNER, J.B., SISLER, E.B. 1944. A simple method for blood sugar. *Archives of Biochemistry* 4, 333-336.
- SUN, Y., CHENG, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1-11.
- TERAMOTO, Y., TANAKA, N., LEE, S., ENDO, T. 2008. Pretreatment of eucalyptus woodchips for enzymatic hydrolysis saccharification using combined sulfuric acidfree ethanol cooking and ball milling. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 75–85.
- VON SIVERS, M., ZACCHI, G. 1996. Ethanol from lignocellulosics: A review of the economy. *Biores. Technol.* 56, 131-140.
- VYAS, S., LACHKE, A. 2003. Biodeinking of mixed office waste paper by alkaline active cellulases from alkalotolerant *Fusarium* sp. *Enz. Microb. Technol.* 32, 236-245.
- WAKIYAMA, M., YOSHIHARA, K., HAYASHI, S., OHTA, K. 2008. Purification and Properties of an Extracellular  $\beta$ -Xylosidase from *Aspergillus japonicus* and Sequence Analysis of the Encoding Gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106(4), 398-404.

- WANG, Z., ONG, H.X., GENG, A. 2012. Cellulase production and oil palm empty fruit bunch saccharification by a new isolate of *Trichoderma koningii* D-64. *Process Biochem*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.001>
- WEN, Z., LIAO, W., CHEN, S. 2005. Production of cellulase/ $\beta$ -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* e *Aspergillus phoenicis* on dairy manure, *Process Biochem*. 40, 3087-3094.
- WONG, D.W.S. 2006. Feruloyl Esterase: A Key Enzyme in Biomass Degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 133, 87-112.
- WYMAN, C. 1999. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Ann Rev Energy Environ*. 24, 189–226.