



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA**



**PRODUÇÃO DE CELULASE POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA EMPREGANDO RESÍDUOS
AGROINDUSTRIALIS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

MARIA APARECIDA BARROS

**Orientadores: Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro**

**UBERLÂNDIA - MG
2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA**



**PRODUÇÃO DE CELULASE POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA EMPREGANDO RESÍDUOS
AGROINDUSTRIALIS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Maria Aparecida Barros

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

**UBERLÂNDIA- MG
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG - Brasil

B277p Barros, Maria Aparecida, 1985-

Produção de celulase por fermentação submersa empregando resíduos agroindustriais para produção de etanol / Maria Aparecida Barros. - 2011.

77 f. : il.

Orientador: Ubirajara Coutinho Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Hidrólise - Teses. 3. Biomassa - Teses. 5. Álcool - Teses. I. Coutinho Filho, Ubirajara. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM
20/07/2011.

BANCA EXAMINADORA:

Ubirajara Coutinho Filho

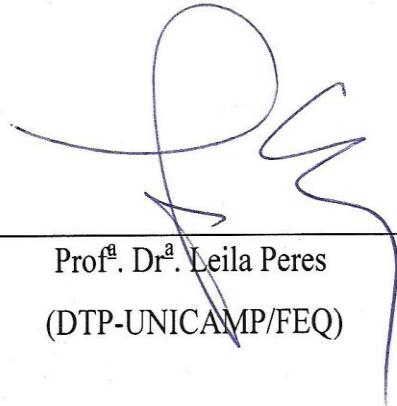
Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho

(Orientador - PPG-EQ/UFU)



Profª. Drª. Vicelma Luiz Cardoso

(PPG-EQ/UFU)



Profª. Drª. Leila Peres

(DTP-UNICAMP/FEQ)



Profª. Drª. Patrícia Angélica Vieira

(PPG-EQ/UFU)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho, primeiramente, a Deus que me proporcionou forças necessárias para que eu pudesse conseguir superar os obstáculos de minha vida, não me deixando desanimar e iluminando meu caminho. Dedico também a minha mãe Maria do Rosário e meu irmão Júnior que sempre estiveram ao meu lado, ajudando-me e por muitas vezes abrindo mão dos seus sonhos para realização do meu. Ao meu pai José Eurípedes por sempre me incentivar. Ao professor Ubirajara Coutinho Filho por me direcionar e orientar com paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas alegrias proporcionadas, por iluminar o meu caminho e estender a mão nas horas de dificuldades. É muito bom dizer obrigada a tantas pessoas que, neste período de mestrado, se mantiveram simplesmente presentes, do nosso lado. Por isso meus sinceros agradecimentos...

...aos meus pais, Maria Rosário e José Eurípedes, que sempre me deram amor, segurança e apoio para minha formação pessoal e acadêmica.

...ao meu irmão Júnior, por estar ao meu lado toda a vida, não tenho palavras para expressar tamanho do amor e gratidão que sinto por você. Obrigada por fazer parte da minha vida.

...ao meu orientador Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho, pelos ensinamentos durante o mestrado. Agradeço também pela paciência na elaboração desse trabalho e dedicação.

...ao co-orientador Prof. Eloízio Júlio Ribeiro pelas palavras amigas, pelo sorriso e pelo carinho.

...a Profa. Vicelma Luiz Cardoso, um agradecimento especial, pelos valiosos ensinamentos e ajuda no fechamento deste trabalho.

...a todos os professores da FEQUI que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação, contribuindo com informações valiosas para a realização deste estudo.

...as alunas da graduação que me auxiliaram, Flávia Pavani Piovani e Priscila Bernardes Silva, pela ajuda, apoio e convivência durante todo o período experimental.

...aos amigos e colegas da pós-graduação e do laboratório de bioquímica: Nattácia, Francielle, Betânia, Thiago, Gustavo, Curt, Líbia, David, Soraya, Wesley, Carla, Janaina, Mauriele, Rui, Rafael, Christiane, Diego, Jeferson, Alex, Wilson Jr., Herinque, Nádia, Romina e Magno pela amizade, carinho, companheirismo, pelas horas de estudo, enfim apoio incondicional durante esse dois anos de mestrado, pois juntos trilhamos uma etapa importante em nossas vidas.

...aos meus amigos pelo apoio e amizade nos momentos compartilhados!

...aos funcionários da FEQUI: Silvino, Cléo, Ione, Roberta, Lúcia e José Henrique pela colaboração.

...ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

...a FAPEMIG pela concessão da bolsa.

Enfim, a todos, que com boa intenção, colaboraram pela realização e finalização deste trabalho. Muito obrigada!

“Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.”

João Guimarães Rosa

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	i
Lista de tabelas.....	iv
Resumo.....	v
“Abstract”.....	vi
CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 A questão energética mundial.....	4
2.2 Biomassa.....	11
2.2.1 Soro de queijo e lactose.....	11
2.2.2 Resíduos lignocelulósicos.....	17
2.2.3 Tratamentos de resíduos lignocelulósico.....	22
2.3 Hidrólise e degradação da biomassa.....	23
2.4 Enzimas.....	24
2.4.1 Hidrólise enzimática da lactose.....	27
2.4.2 Hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos.....	27
2.4.3 Enzima β - Galactosidase.....	28
2.4.4 Enzima Celulase.....	29
2.5 Micro - organismos.....	31
2.5.1 <i>Aspergillus niger</i>	31
2.5.2 <i>Trichoderma reesei</i>	33
CAPITULO 3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Micro-organismos.....	36
3.2 Meio de cultura e manutenção do fungo.....	36
3.3 Substratos.....	37
3.3.1 Tratamento do material lignocelulósico.....	37
3.4 Rotina de ensaios.....	39

3.5	Fermentações em estado líquido para produção de enzimas.....	40
3.6	Preparo do inóculo	42
3.7	Concentração de Enzimas.....	42
3.8	Atividade enzimática.....	42
3.9	Estudo da hidrólise enzimática.....	44
3.10	Determinação de açúcares redutores.....	44
3.11	Fermentação para produção do etanol e quantificação do etanol..	45
CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....		48
4.1	Fermentações em estado líquido para produção de enzimas.....	48
4.1.1	Seleção de meio de cultura.....	48
4.2	Avaliação preliminar do complexo enzimático.....	52
4.3	Complexos enzimáticos dos fungos <i>Aspergillus niger</i> e <i>Trichoderma reesei</i>	54
4.4	Avaliação da hidrólise da celulose.....	57
4.5	Produção de etanol.....	61
CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....		66
5.1	Conclusões.....	66
5.2	Sugestões.....	67
CAPÍTULO 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		68
APÊNDICES		

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Matriz energética do mundo e do Brasil.....	4
Figura 2.2	Produção de etanol no decorrer dos anos no Brasil.....	7
Figura 2.3	Consumo mensal de etanol e gasolina.....	8
Figura 2.4	Fluxograma com as principais matérias-primas e processos utilizados para a produção de etanol.....	10
Figura 2.5	Produção de leite ao longo dos anos no Brasil.....	12
Figura 2.6	Representação dos processos de fabricação de alguns queijos.....	13
Figura 2.7	Estrutura molecular básica de uma molécula de α -lactose e β -lactose.....	16
Figura 2.8	Complexo lignocelulósico: cadeias de celulose envolvidas por hemicelulose e lignina.....	18
Figura 2.9	Estrutura da celulose.....	19
Figura 2.10	Representação do complexo lignocelulósico antes e depois de um pré – tratamento.....	22
Figura 2.11	Hidrólise enzimática de lactose catalisada por β -galactosidase.....	27
Figura 2.12	Esquema da hidrólise enzimática da celulose para produção de etanol.....	30
Figura 2.13	Micrografia eletrônica de varredura do fungo <i>Aspergillus niger</i>	32
Figura 2.14	<i>Trichoderma reesei</i>	34
Figura 3.1	Cepas de <i>Aspergillus niger</i> e <i>Trichoderma reesei</i>	36
Figura 3.2	Substratos: celulose, lactose, casca de arroz e soro.....	37
Figura 3.3	Método AFEX de tratamento de material lignocelulósico.....	38
Figura 3.4	Tratamento de material lignocelulósico.....	38
Figura 3.5	Rotina para produção de complexos enzimáticos.....	39
Figura 3.6	Rotina ensaios com complexos enzimáticos.....	40
Figura 3.7	Meio fermentado para produção de enzimas.....	41

Figura 3.8	Microrreator de mistura com camisa acoplado a agitador magnético.....	43
Figura 3.9	Banho termostatizado empregado.....	43
Figura 3.10	Espectrofotômetro utilizado para leitura das análises de etanol e açúcares.....	45
Figura 3.11	HPLC Shimadzu modelo LC-20A Prominence utilizado nas análises de açúcar.....	47
Figura 4.1	Crescimento celular do fundo <i>Aspergillus niger</i>	48
Figura 4.2	Atividades para β -galactosidase obtida para diferentes tempos.....	49
Figura 4.3	Atividades para celulase obtida para diferentes tempos.....	49
Figura 4.4	Produtividade para celulase obtida para diferentes tempos.....	50
Figura 4.5	Atividades para β -galactosidase obtida para diferentes tempos.....	51
Figura 4.6	Atividades para celulase obtida para diferentes tempos.....	51
Figura 4.7	Hidrólise de soro 40g/L e celulose 20g/L.....	52
Figura 4.8	Determinação da ação hidrolítica do extrato enzimático.....	53
Figura 4.9	Determinação da concentração total de açúcar redutor.....	53
Figura 4.10	Atividades de celulase por volume de meio e massa de proteína complexo enzimático produzido por <i>Aspergillus</i> (a) e <i>Trichoderma</i> (b).....	54
Figura 4.11	Atividades de β -galactosidase por volume de meio e massa de proteína complexo enzimático produzido por <i>Aspergillus</i> (a) e <i>Trichoderma</i> (b).....	54
Figura 4.12	Recuperação enzimática.....	55
Figura 4.13	Atividade em β -galactosidase dos complexos enzimáticos produzidos por <i>Aspergillus</i> e <i>Trichoderma</i> na forma bruta e concentrada.....	56
Figura 4.14	Atividade em celulase dos complexos enzimáticos produzidos por <i>Aspergillus</i> e <i>Trichoderma</i> na forma bruta e concentrada.....	56
Figura 4.15	Hidrólise da celulose 20g/L com o complexo produzido por <i>Aspergillus niger</i> na forma bruta e concentrada.....	57

Figura 4.16	Comparação dos complexos produzidos pelo <i>Aspergillus niger</i> e <i>Trichoderma reesei</i> na forma concentrada.....	58
Figura 4.17	Hidrólise da celulose 20 g/L pelo complexo enzimático de <i>Trichoderma reesei</i> na forma bruta.....	59
Figura 4.18	Hidrólise da celulose 20 g/L pelo complexo enzimático de <i>Trichoderma reesei</i> na forma concentrada.....	59
Figura 4.19	Hidrólise da celulose 20 g/L gerado mistura de complexo enzimático de <i>Trichoderma reesei</i> misturado a complexo enzimático de <i>Aspergillus niger</i>	60
Figura 4.20	Representação da hidrólise na forma individual do complexo bruto de <i>Trichoderma reesei</i> e da mistura dos complexos do <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Aspergillus niger</i>	60
Figura 4.21	Etanol.....	61
Figura 4.22	ART inicial (a) e final (b).....	61
Figura 4.23	Consumo ART.....	62
Figura 4.24	Comparação ART inicial e produção de etanol.....	62
Figura 4.25	Formação de possíveis inibidores da fermentação etílica.....	63
Figura 4.26	Produção de gás carbônico.....	64
Figura 4.27	Concentração de células.....	64

LISTA DE TABELA

Tabela 2.1	Análise das principais fontes da matriz energética.....	5
Tabela 2.2	Matérias-primas processamento e custos de produção de etanol em diferentes países produtores.....	9
Tabela 2.3	Composição do leite integral, leite desnatado e do soro do queijo doce e ácido.....	14
Tabela 2.4	Possibilidades de aproveitamento do soro lácteo na indústria.....	15
Tabela 2.5	Poder adoçante de alguns açucares.....	17
Tabela 2.6	Composição química parcial dos principais resíduos lignocelulósicos.....	21
Tabela 2.7	Métodos de pré-tratamentos em materiais lignocelulósicos.....	23
Tabela 2.8	Comparação entre hidrólise enzimática e hidrólise ácida.....	24
Tabela 2.9	Classificação das enzimas segundo a IUB.....	25
Tabela 2.10	Produção de enzimas de enzimas utilizando tipos diferentes de substratos e micro-organismos.....	26
Tabela 2.11	Possíveis fontes de obtenção de β -galactosidase.....	28
Tabela 2.12	Produção de enzimas celulase, utilizando tipos diferentes substratos e micro-organismos.....	30
Tabela 2.13	Produção de diversas enzimas por <i>Aspergillus niger</i> com aplicação comercial, demonstrando a alta eficiência da espécie.....	33
Tabela 3.1	Composição dos meios usados para produção dos complexos enzimáticos....	41
Tabela 3.2	Descrição dos meios de fermentação para produção de etanol.....	46
Tabela 3.3	Dados do cromatógrafo.....	47

RESUMO

A preocupação com o consumo crescente de combustíveis, aliada a escassez de matérias-primas e a poluição ambiental estimulam o uso da biotecnologia na produção de biocombustíveis. Neste aspecto um dos interesses da biotecnologia moderna é a utilização de resíduos urbanos, industriais e agrícolas para despoluir o ambiente e criar produtos e tecnologias alternativos associadas à produção de etanol. Este trabalho tem como objetivo avaliar a produção e utilização do complexo enzimático hidrolítico de biomassa mista de soro de queijo e celulose na produção de etanol. Neste trabalho são apresentados os resultados do estudo da produção conjunta das enzimas β -galactosidase e celulase em meios contendo lactose e celulose em diferentes tempos de fermentação para meios de cultura submersa de composição soro 60g/L, extrato de levedura 3g/L com sais (meio 1), soro 60g/L, celulose 20g/L, extrato de levedura 3g/L com sais (meio 2), lactose 40g/L, extrato de levedura 3g/L com sais (meio 3), lactose 40g/L, celulose 20g/L, extrato de levedura 3g/L com sais (meio 4). Observou - se maior produção de enzimas nos meios 3 e 4 sendo escolhido o meio 4 como melhor meio de fermentação para produção de enzimas devido a maior produção de celulase em relação ao meio 3. Após a escolha do meio foi avaliada a produção conjunta das enzimas e estudada a hidrólise da celulose e soro de queijo produzidas pelo extrato enzimático gerado por *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*. O melhor tempo de produção de enzimas encontrado foi de 12h, a hidrólise estabilizou com aproximadamente 8h, sendo a temperatura para hidrólise do soro fixada em 37°C e a hidrólise da biomassa celulósica a 45°C. Pode- ser observado que as enzimas produzidas pelo *Aspergillus niger* apresentaram maior capacidade hidrolítica quando comparado com o complexo enzimático do *Trichoderma reesei*. A hidrólise realizada com os complexos enzimáticos foi comparado com a hidrólise ácida das biomassas de soro e celulose sendo o pH para a hidrólise ácida ajustado em 1. Após a hidrólise foi realizado uma fermentação alcoólica com os hidrolisados e observou - se uma maior produção de etanol nos hidrolisados com complexos enzimáticos com *Aspergillus niger*.

Palavras Chaves: biomassa, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, hidrólise, Celulase, β -galactosidase

ABSTRACT

The concern with the growing consumption of fuel, coupled with the scarcity of raw materials and environmental pollution encourage the use of biotechnology in the production of biofuels. In this respect the interests of a modern biotechnology is the use of municipal waste, industrial and agricultural to clean up the environment and creating alternative products and technologies associated with the production of ethanol. This study aims to evaluate the production and use of biomass hydrolytic enzyme complex mixed cheese whey and cellulose for ethanol production. This paper presents the results of the joint production of the enzymes β - galactosidase and cellulase in means containing lactose and cellulose fermentation submerged times in different culture composition whey 60g / L, yeast extract 3g / L with salts (mean 1), whey 60 g / L, cellulose 20 g / L, yeast extract 3g / L with salts (mean 2), lactose 40 g / L, yeast extract 3g / L with salts (mean 3), lactose 40 g / L, cellulose 20g / L, yeast extract 3g / L with salts (mean 4). Observed - a higher enzyme production in media 3means 4 being chosen as the best means of fermentation for enzyme production due to increased production of cellulase in relation to the mean 3. After the choice of means was assessed joint production of enzymes and studied the hydrolysis of cellulose and whey produced by the enzymatic extract produced by *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. The best time of enzyme production was found for 12h , hydrolysis stabilized at approximately 8 h, with the temperature for the hydrolysis of whey set a 37° C and hydrolysis of cellulose to 45°. It can be observed that the enzymes produced by *Aspergillus niger* showed higher capacity when compared with the hydrolytic enzyme complex from *Trichoderma reesei*. Hydrolysis carried out with the enzyme complexes was compared with acid hydrolysis of biomass from whey and cellulose and the pH adjusted to acid hydrolysis in 1. After the hydrolysis was performed with a fermentation hydrolysates and observed - a higher production of ethanol in complex enzyme hydrolysed with *Aspergillus niger*.

Keywords: biomass, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, enzyme, Cellulase, β -galactosidase

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

A preocupação com o consumo crescente de combustíveis, aliada à escassez de matérias-primas e à poluição ambiental estimulam o uso da biotecnologia na produção de biocombustíveis. Neste aspecto um dos interesses da biotecnologia moderna é a utilização de resíduos urbanos, industriais e agrícolas para despoluir o ambiente e criar produtos e tecnologias alternativas associadas à produção de etanol.

Qualquer produto que contenha açúcar ou outro carboidrato constitui-se em matéria prima para obtenção de etanol, desde que o mesmo possa em etapas simultâneas ou anteriores ao processo produtivo, ser hidrolisado para gerar carboidratos metabolizáveis ou, então, seja diretamente metabolizado pelos micro-organismos de interesse. Neste sentido a solução de carboidratos, dito mosto, tem que estar adequada para o desenvolvimento do micro-organismo, ou seja, além de uma composição capaz de suprir as exigências do micro-organismo deve estar devidamente condicionado em termos de pH, temperatura, assepsia ou esterilidade (LIMA et al., 2001).

Embora no Brasil praticamente toda produção do etanol utilize sacarose como substrato, há o interesse em várias outras fontes de carbono como o amido, principal fonte de carbono na produção de etanol nos EUA, lactose e celulose. As novas fontes de carboidrato são motivos de diferentes pesquisas e mesmo investimentos do setor agroindustrial produtor de etanol. Hoje, grande parte deste interesse está voltada para o chamado etanol de segunda geração, que é gerado a partir do uso de celulose (EMBRAPA, 2011).

A grande disponibilidade de materiais ricos em celulose faz com que a produção de etanol de celulose seja de grande interesse mundial, pois a celulose presente na madeira e outras fontes como resíduos agroindustriais é a matéria prima mais abundante do planeta. A produção de etanol de segunda geração difere do processo de produção com sacarose pelos tratamentos que antecedem a produção e pelo fato de ser comum na fermentação a presença de sólidos em suspensão. Entre os processos de tratamento da fonte celulósica que antecedem a fermentação estão o uso de vapor super aquecido, uso de soluções de íons metálicos e o tratamento com peróxido em meio alcalino. O processo hidrolítico pode ser realizado por rotas químicas e biológicas, sendo que nos dias atuais tem-se dado preferência para as rotas

enzimáticas, pois o custo de hidrólise e as restrições provenientes da formação de subprodutos capazes de inibir as etapas de fermentação que seguem a hidrólise reduzem o interesse na rota química (KANG *et al.*, 2004).

Embora se tenha maior interesse nas rotas biológicas, há a necessidade processos físicos e químicos destinados à preparação da matéria prima para hidrólise enzimática. A preparação da matéria prima antes da fermentação é feita de várias formas que envolvem etapas como: 1) prévio tratamento destinado a separar a celulose, hemicelulose e lignina ou hidrolisar parcialmente a mistura destes componentes; 2) uma possível separação da celulose insolúvel da mistura líquida lignina e hemicelulose; 3) uso de um conjunto de enzimas capazes de hidrolisar a celulose e hidrolisar os produtos da hidrólise da celulose (celulose solúvel, glicose, celobiose, polímeros de celobiose nas moléculas de trealose e gentiobiose; 4) fermentação da celulose tratada e hidrolisada (KAPDAN e KARGI 2006).

Outro resíduo de interesse crescente é o soro de queijo efluente, pois este sobra na produção do queijo em grandes quantidades se tornando uma potencial fonte de poluição ambiental. A capacidade de poluição do soro está principalmente associada à lactose, pois apesar das inúmeras utilidades do soro este é, ainda hoje, utilizado em quantidades inferiores à necessária para consumir o excedente de soro que é gerado na produção de queijo. Este fato pode ser explicado por vários fatores conjuntos: o custo de secagem do soro, o valor de mercado do soro e o fato da indústria de alimentos restringir o uso da lactose por conta de características como baixa solubilidade, baixo poder adoçante e a intolerância à mesma por parte da população mundial (SILVEIRA *et al.*, 2005).

Pelo conteúdo de lactose, o soro pode ser fermentado a etanol e este fato tem interesse prático, pois aí há a necessidade de ampliar esta produção para atender a todas demandas futuras e embora a produção de etanol brasileira seja grande, esta se dá com pouca participação do uso de fontes distintas da cana-de-açúcar. Assim trabalhos e pesquisas que descrevam a utilização integrada de matérias primas como soro de queijo e celulose é de grande interesse prático para matriz energética, pois a produção de combustível pode ser ampliada pelo uso de carboidratos hidrolisados provenientes de fontes variadas, como o soro e celulose (KARGI e OZMIHCI, 2006)

O interesse e relevância que o assunto desperta pelo fato da produção de energia proposta se fazer de forma simultânea à utilização subprodutos agrícolas, assim a mesma não compete com a cadeia produtiva de alimentos e, também, valoriza esta cadeia e amplia a competitividade da mesma.

Os objetivos destas dissertação visa atender parte do projeto “Produção de etanol pelo uso de complexo enzimático misto de *Aspergillus niger* e cepas selecionadas do ecossistema do cerrado” do Edital MCT/CNPq/FNDCT Nº 046/2009 - Formação de recursos humano em etanol e biodiesel. O objetivo principal do presente trabalho foi estudar a utilização de biomassa mista de soro de queijo e celulose na produção de complexo enzimático hidrolítico por fermentação submersa com *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* com objetivos específicos de:

- Avaliar a produção de β -galactosidase e complexo de celulase por fermentação submersa de meios contendo soro de queijo, lactose e celulose;
- Quantificar ação hidrolítica do extrato enzimático gerado ao fim da fermentação quando puro e quando submetido à concentração;
- Avaliar a utilização destes extratos enzimáticos em fermentação alcoólica;
- Comparar a ação dos complexos enzimáticos de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* gerados quando utilizados de forma isolada e combinados.

Estes objetivos atendem a etapa do projeto mencionado referente a avaliação de metodologias da fermentação para produção de complexo enzimático lignocelulósico , avaliação de metodologias de quantificação da etapa da digestão que será também usada nas cepas de cultura do cerrado e geração de informações comparativas da ação desse complexo em relação ao produzido por cepas coletas no cerrado. Vale a pena reassalta que a etapa do projeto que consiste na coleta dos fungos do cerrado, seleção das cepas e no estudo das mesmas, está sendo desenvolvido por uma aluna de doutorado e, portanto, não faz parte desta dissertação.

CAPITULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- A Questão energética mundial

A disponibilidade de energia para o consumo diário de qualquer sociedade humana, em qualquer parte do mundo, é um fator fundamental para a qualidade de vida de seus cidadãos. O petróleo tem tido uma importância ímpar, sendo responsável pelo fornecimento de um terço da energia primária consumida no planeta por décadas, o que pode ser confirmado pela comparação das matrizes energéticas do Brasil e do mundo apresentadas na Figura 2.1. O petróleo é um combustível fóssil considerado como uma fonte de energia não renovável. Sua utilização como combustível em todo mundo gera uma grande dependência, ocasionando elevados preços praticados nos últimos anos e desdobramentos econômicos, políticos e sociais importantes para a maior parte das nações do mundo (CONAB, 2008).

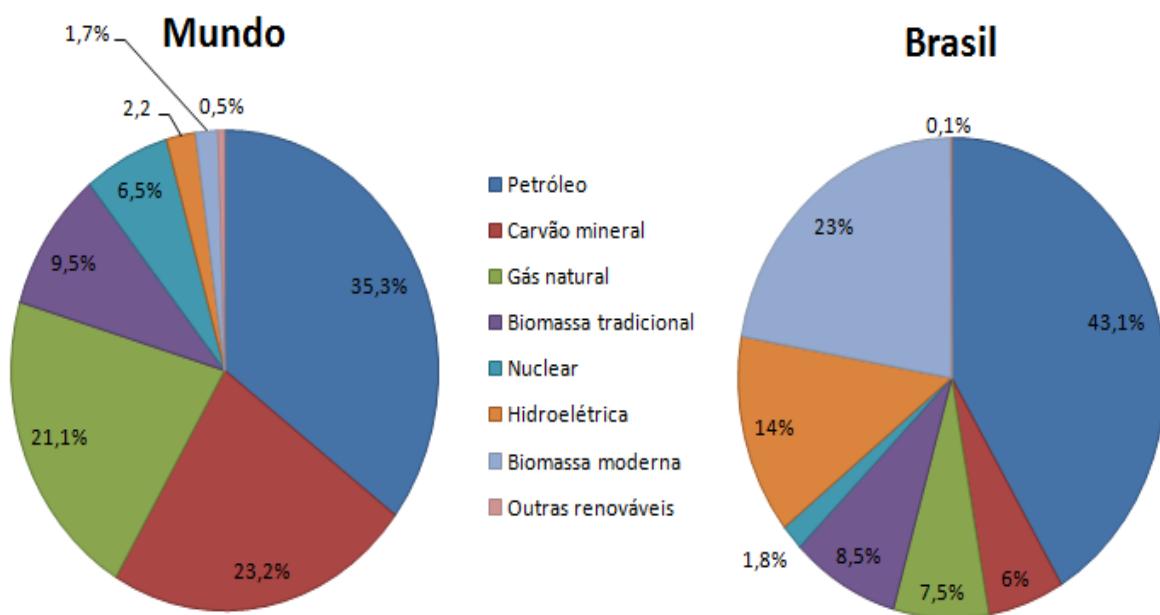


Figura 2.1- Matriz energética do mundo e do Brasil. (BRASIL, 2005).

Segundo Sun e Cheng (2002) o petróleo bruto tem sido o principal recurso para atender o aumento da demanda da energia no mundo, com isso as reservas de petróleo são cada vez mais exploradas o que pode trazer um declínio na produção mundial do petróleo bruto. Infelizmente, o aumento dos preços do petróleo e falhas no fornecimento de

petróleo implicado pelo monopólio exclusivo países politicamente voláteis, têm provocado o interesse em explorar fontes alternativas de energia para aumentar a segurança energética de um país. Por conta disso, o desenvolvimento de energias renováveis e sustentáveis vem sendo cada vez mais pesquisados e desenvolvidos devido aos principais aspectos positivos e negativos das principais fontes energéticas demonstrados na Tabela 2.1

Tabela 2.1-Análise das principais fontes da matriz energética. (BRASIL, 2005).

Combustível	Aspectos positivos	Aspectos negativos
Carvão	<ul style="list-style-type: none"> • Abundante; • Economicamente acessível; • Uso seguro; • Fácil de transportar e de armazenar; • Amplamente distribuído. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta emissão de gases de efeito estufa; • Necessita portentosos investimentos para desenvolvimento de tecnologias que reduzam as emissões de gases de efeito estufa (GEE) a níveis aceitáveis; • Extração perigosa.
Petróleo	<ul style="list-style-type: none"> • Alta densidade energética; • Fácil de transportar e de armazenar; • Co-evolução da fonte energética com os equipamentos para seu uso. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fortemente poluidor da atmosfera; • Preços voláteis; • Concentração geográfica das jazidas; • Produto cartelizado e mercado manipulável; • Vulnerabilidade de interrupção de oferta e instabilidade geopolítica; • Riscos de transporte e armazenamento; • Reservas em esgotamento.
Renováveis	<ul style="list-style-type: none"> • Baixas emissões de gases de efeito estufa; • Sustentabilidade. 	<ul style="list-style-type: none"> • Custos altos; • Fontes intermitentes; • Distribuição desigual; • Estágio tecnológico inferior às demais
Gás	<ul style="list-style-type: none"> • Eficiente e conveniente; • Combustível multiuso; • Alta densidade energética. 	<ul style="list-style-type: none"> • Produto emissor de gases de efeito estufa; • Transporte e armazenamento caro e arriscado;

	<ul style="list-style-type: none"> • Requer infra-estrutura cara, própria e inflexível; • Jazidas concentradas geograficamente; • Produto cartelizado e mercado manipulável, volatilidade de preços.
Nuclear	<ul style="list-style-type: none"> • Não há emissões de gases de efeito estufa; • Poucas limitações de Recursos. • Alta densidade energética • Baixa aceitação da sociedade; • Sem solução para eliminação dos resíduos; • Operação arriscada e perigosa; • Muito intensivo em capital.

Neste contexto os combustíveis derivados da biomassa têm despertado grande interesse por serem renováveis, e serem neutros ou superavitários na emissão de dióxido de carbono. A energia de biomassa é aquela fornecida por materiais de origem vegetal renovável ou obtida pela decomposição de dejetos. Há três aspectos importantes a salientar: a viabilidade econômica, a sustentabilidade de cada fonte e a disponibilidade de recursos renováveis para geração de energia, que variam entre as diferentes regiões do globo (SOUZA e MACEDO, 2010).

O interesse em explorar fontes alternativas de energia para aumentar a segurança energética de um país leva ao desenvolvimento de energias renováveis e sustentáveis de biocombustíveis líquidos de extrema importância, destacando – se nesse cenário o etanol como um novo combustível mundial. Embora a energia equivalente de etanol é 68% menor do que o combustível de petróleo, a combustão do etanol é mais limpa, a emissão de substâncias tóxicas é menor, reduzindo as emissões de carbono em 80% em relação a gasolina, eliminando completamente a liberação de ácidos (KRYLOVA *et al.*, 2008).

O etanol é uma fonte de energia produzido através de açucares, é considerado como uma boa alternativa para substituir o petróleo é um combustível limpo e renovável (BAI *et al.*, 2008; ALMEIDA e SILVA, 2006).

Na produção de etanol o Brasil é o país com maior vantagem competitiva neste produto. O etanol brasileiro é derivado da cana- de - açúcar e representa hoje a melhor e mais

avançada opção para a produção em larga escala do mundo. Ao longo dos anos o Brasil vem desenvolvendo tecnologias sustentáveis, a indústria de cana-de-açúcar é de longa data um dos esteios da economia brasileira. A partir da introdução das primeiras mudas no país, em 1532, por mais de dois séculos o açúcar foi o principal produto brasileiro. Há cerca de 40 anos, teve início a transformação do setor. Além do açúcar, as usinas passaram a ter foco na produção do etanol. A indústria sucroalcooleira vive um momento de otimismo, decorrente de uma conjunção de fatores favoráveis. Ao tempo em que a economia nacional inicia processo de crescimento, esse fato reflete no aumento na produção e consumo de etanol que podem ser observados respectivamente na Figura 2.2 e na Figura 2.3 (BRESSAN FILHO, 2008, SOUZA e MACEDO, 2010).

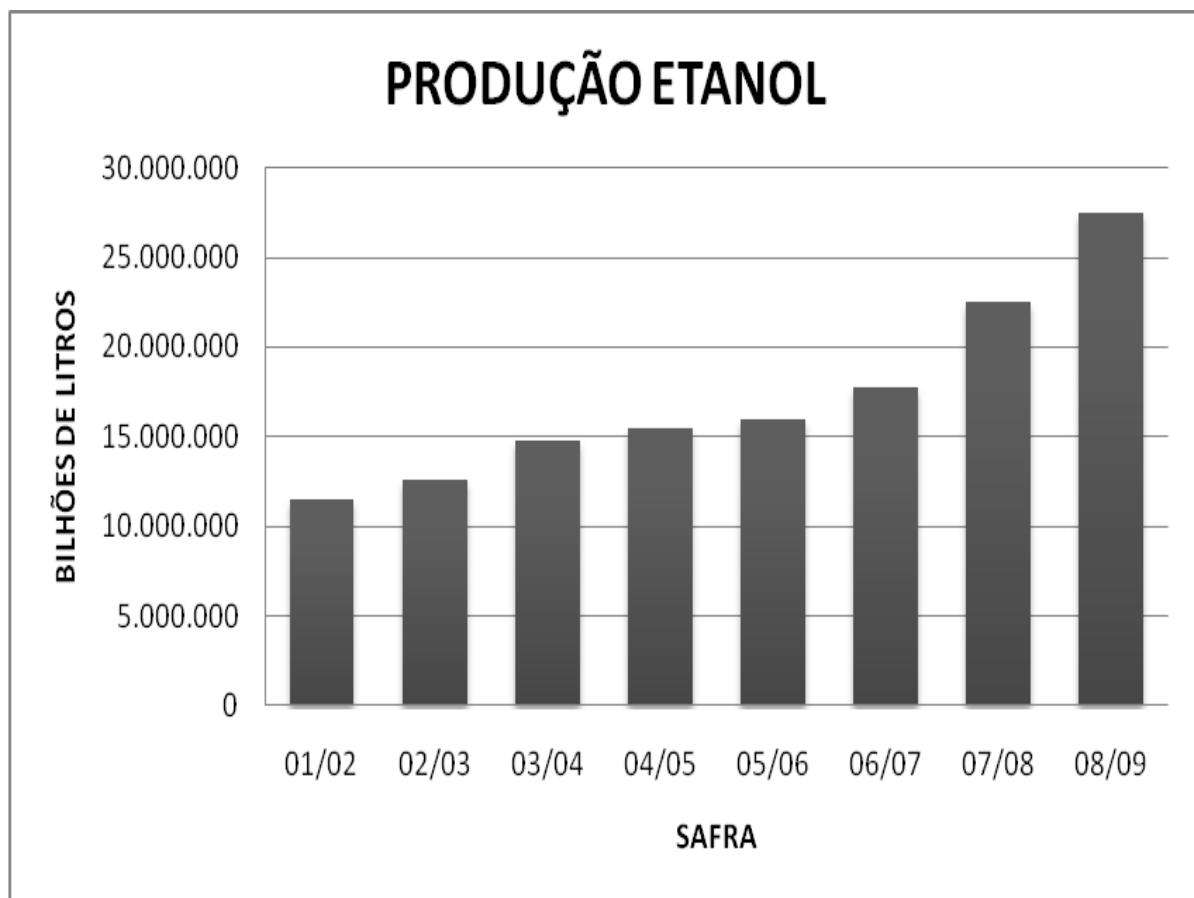


Figura 2.2- Produção de etanol no decorrer dos anos no Brasil (ÚNICA, 2011).

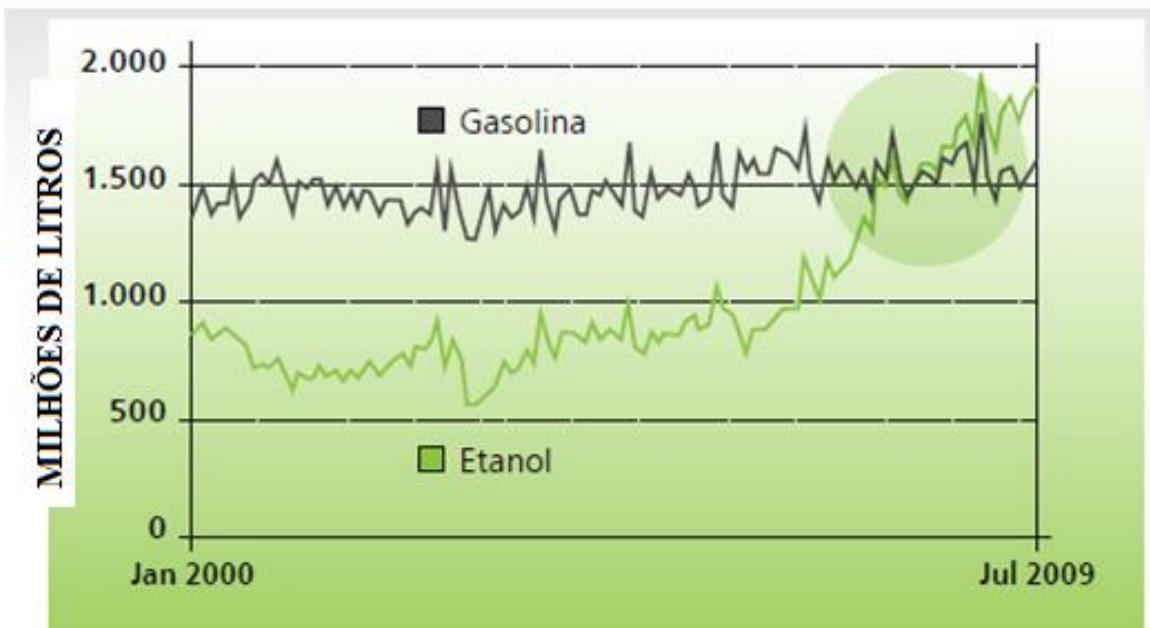


Figura 2.3- Consumo mensal de etanol e gasolina (SOUZA e MACEDO, 2010).

Segundo Sun e Cheng (2005) o etanol é amplamente utilizado como um substituto parcial da gasolina em vários países. O uso de etanol como aditivo e combustível tem popularidade crescente por várias razões:

- Regulamentações governamentais;
- Incentivos econômicos;
- Interesse em redução da dependência do petróleo.

O etanol é um dos principais temas de pesquisas decorrente da perspectiva de esgotamento das fontes de combustíveis fósseis, assim como preocupações de natureza ambiental relacionadas a emissões de componentes que são prejudiciais ao meio ambiente. Entretanto, para evitar a expansão desmedida das áreas de cultivo, têm-se desenvolvido processos biotecnológicos que permitem a utilização de grande número de matérias-primas naturais e residuais existentes em todo país, destacando-se as biomassas residuais de composição lignocelulósica, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais, para a produção de bioetanol de segunda geração.

As matérias primas para produção de etanol são geralmente substrato com alto teor de açúcares na sua composição, como é o caso da cana-de-açúcar e da beterraba; ou, em segundo plano, plantas que possuam substâncias que possam ser transformadas em açúcares fermentescíveis, após um tratamento adequado. A possibilidade de usos de biomassas para produção atual de etanol tem uma grande diversidade de matérias primas como mostra a

Tabela 2.2. Pela abundância e baixo custo a cana de açúcar, milho e material celulósico se destacam segundo Mussato *et al.*, (2009).

Tabela 2.2- Matérias-primas processamento e custos de produção de etanol em diferentes países produtores (MUSSATO *et al.*, 2009).

Grupos	Matéria-prima	Países	Custo(US\$/L)	Processo
Açúcar simples	Cana-de-açúcar	Brasil	0.16–0.22	
		Índia	-	
	Beterraba	França	0.60–0.68	Moagem para extração de açúcar
		Europa	0.45	
	Sorgo	Índia	-	
Amidos	Soro de leite	Nova Zelândia	0.42–0.49	
	Milho	Estados Unidos	0.25–0.40	
		China	-	
		Canadá	-	Moagem liquefação e sacarificação
	Trigo	China	-	
		Canadá	-	
		Europa	0.42	
Biomassa lignocelulósica	Mandioca	Tailândia	0.18	
	Mistura de materiais lignocelulósicos	Estados Unidos	0.43	Moagem e hidrólise de ligações

A escolha da matéria-prima para produção de bioetanol é fortemente relacionada com condições de cultivo de diferentes culturas, resultando no uso de uma variedade de processos, com os custos de produção diferentes como mostrado. Segundo Demirbas (2005) a produção de etanol normalmente é realizada em três etapas:

- Obtenção de uma solução de açúcares fermentáveis;
- Fermentação de açúcares;
- Separação e purificação de etanol.

As etapas antes da fermentação alcoólica, para obtenção de açúcares fermentescíveis, são as principais diferenças entre os processos de produção de etanol de cana – de – açúcar, milho e material lignocelulósico como mostra a Figura 2.4.

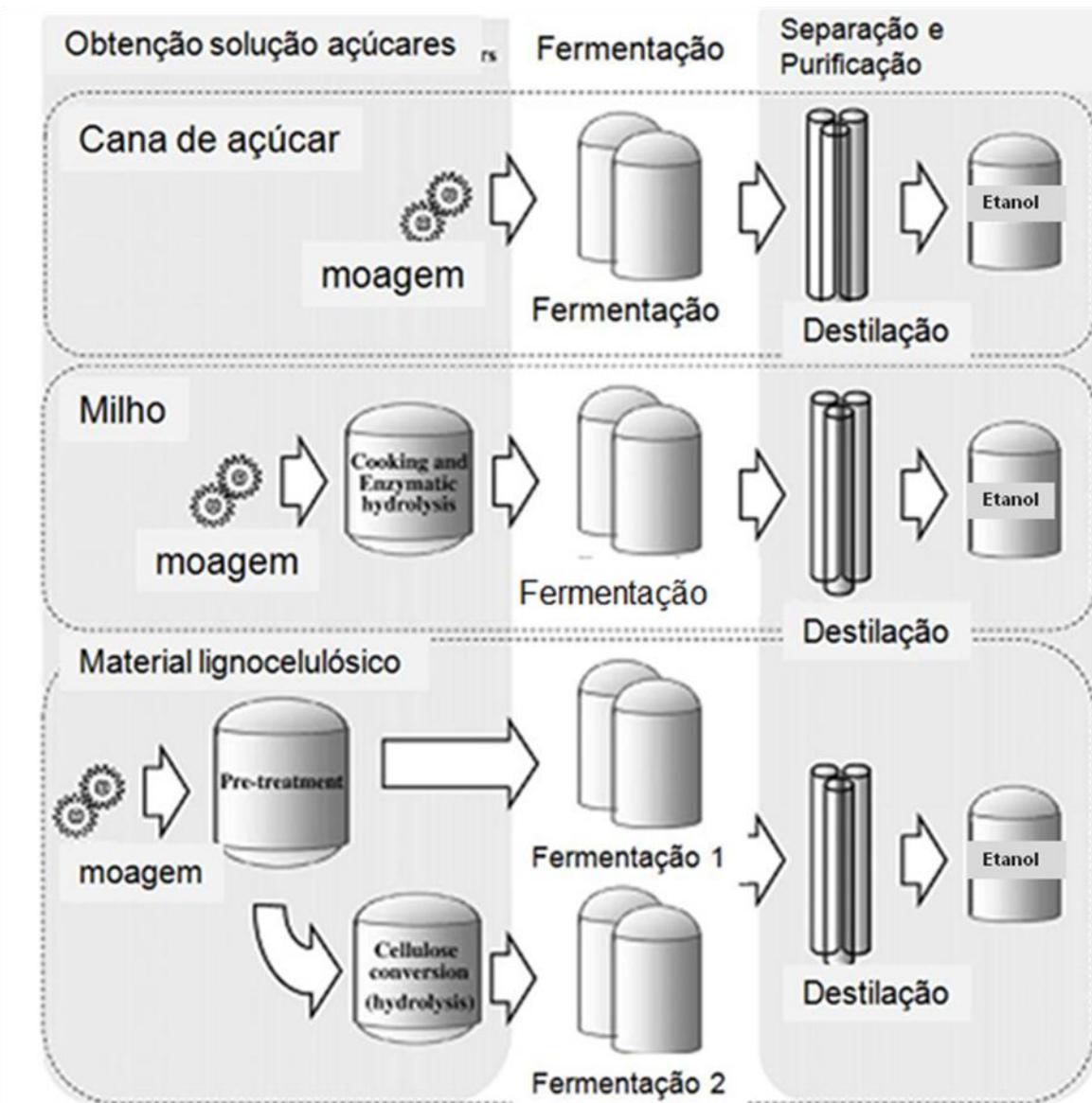


Figura 2.4- Fluxograma com as principais matérias-primas e processos utilizados para a produção de etanol (MUSSATO *et al.*, 2009).

Na produção de etanol com cana-de-açúcar a matéria-prima passa por um processo de moagem para obtenção dos açúcares e consecutivamente por processo de fermentação, destilação para purificar e separar o etanol. Para produção de etanol com grãos (milho, trigo) envolve moagem e hidrólise do amido que tem ser totalmente quebrado à glicose pela combinação de duas enzimas α -amilase e amiloglicosidase, antes de ser fermentado por

levedura para produzir etanol. A produção de etanol com base na biomassa lignocelulósica ou etanol de segunda geração é de interesse devido à sua grande disponibilidade, são subprodutos das atividades agrícolas e os resíduos industriais e apresentam um grande potencial para a produção de álcool combustível em larga escala. Na produção de etanol a partir de material lignocelulósico utilizam - se processos químicos (empregando ácidos) ou da biotecnologia moderna (empregando enzimas) para a quebra de moléculas de celulose para produção de açúcares fermentescíveis, para então produzir o etanol por meio de processos fermentativos alcoólicos da biotecnologia convencional. Para ser realizada a fermentação alcoólica, a biomassa celulósica precisa passar por algumas etapas (MUSSATO *et al.*, 2009; DAWSON e BOOPATHY, 2007).

- 1- Pré-tratamento para tornar a celulose e a hemicelulose mais acessível para as etapas subsequentes. Pré-tratamento geralmente envolve uma etapa mecânica para reduzir o tamanho das partículas, um pré-tratamento químico (ácido diluído, meio alcalino, extração por solvente, de explosão a vapor, entre outros) para retirar a lignina e a hemicelulose, aumentando a superfície de contato para hidrólise ácida ou enzimática.
- 2- Hidrólise ácida ou enzimática para quebrar polissacarídeos até açúcares simples;
- 3- Fermentação dos açúcares (hexoses e pentoses) para produção de etanol utilizando micro-organismos.

2.2 – Biomassa

2.2.1 – Soro de queijo e lactose

O leite é considerado um dos alimentos mais ricos em nutrientes, pois sua composição é rica em proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas, garantindo proteção imunológica e maior fonte de cálcio absorvível ao homem (MÜLLER, 2002 apud TREVISAN, 2008). O Brasil desponta hoje como um dos maiores produtores de leite do mundo, apresentando um crescimento anual significativo desde o início dos anos 90, como pode ser observado na Figura 2.5 que mostra o crescimento da produção de leite ao longo dos anos no país.

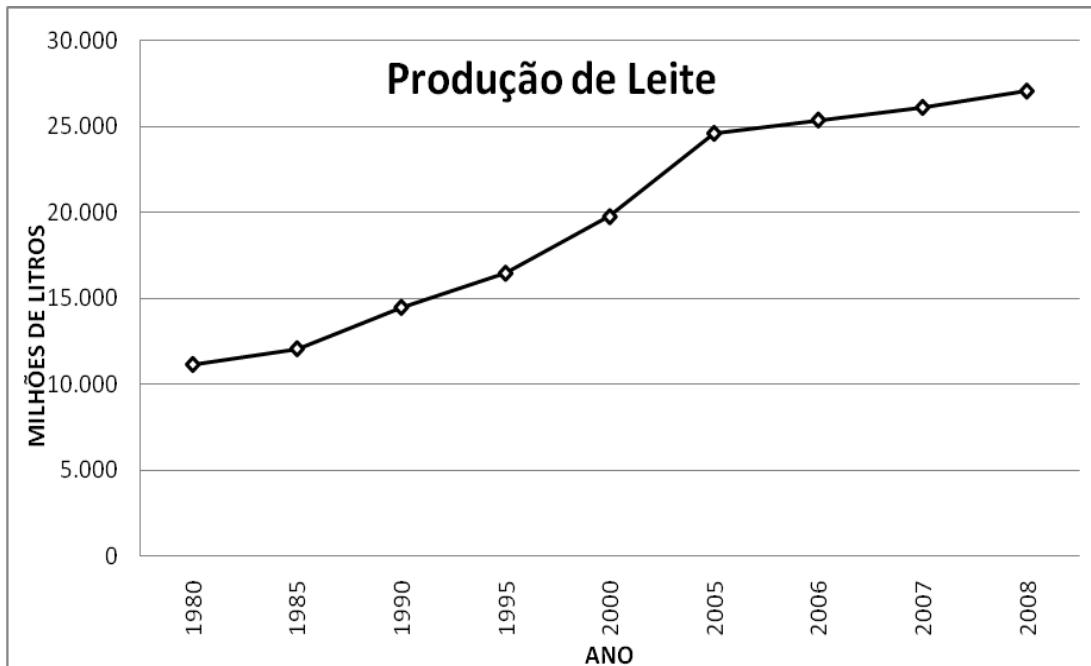


Figura 2.5- Produção de leite ao longo dos anos no Brasil (EMBRAPA 2008)

A perspectiva de manter o índice de crescimento na produção de leite nos próximos anos cria condições para o país mudar o perfil de importador para exportador de produtos lácteos, já que são diversos os produtos derivados do leite, dentre os quais o queijo se destaca (PONCHIO, 2005). Em 2005 o Brasil produziu 480.000 toneladas de queijo, sendo considerado o sétimo produtor mundial do produto e por consequência desta produção aproximadamente gerou 4,3 milhões de toneladas de soro de queijo, das 145 milhões de toneladas produzidas mundialmente (DUMAIS *et al.*, 1991; RICHARDS *et al.*, 2002; GUVEN *et al.*, 2008). O soro do queijo pode ser definido como a porção aquosa que se separa do coágulo durante a fabricação convencional do mesmo ou manufatura da caseína. A Figura 2.6 representa a forma como o soro é gerado como um subproduto do queijo. O soro é reconhecido como um produto nobre, pois contém cerca de 50% dos nutrientes do leite que o originou: proteínas solúveis, lactose, vitaminas e minerais e consiste em 85 a 90 % do volume do leite utilizado para produção do queijo (MIZUBUTI, 1994).

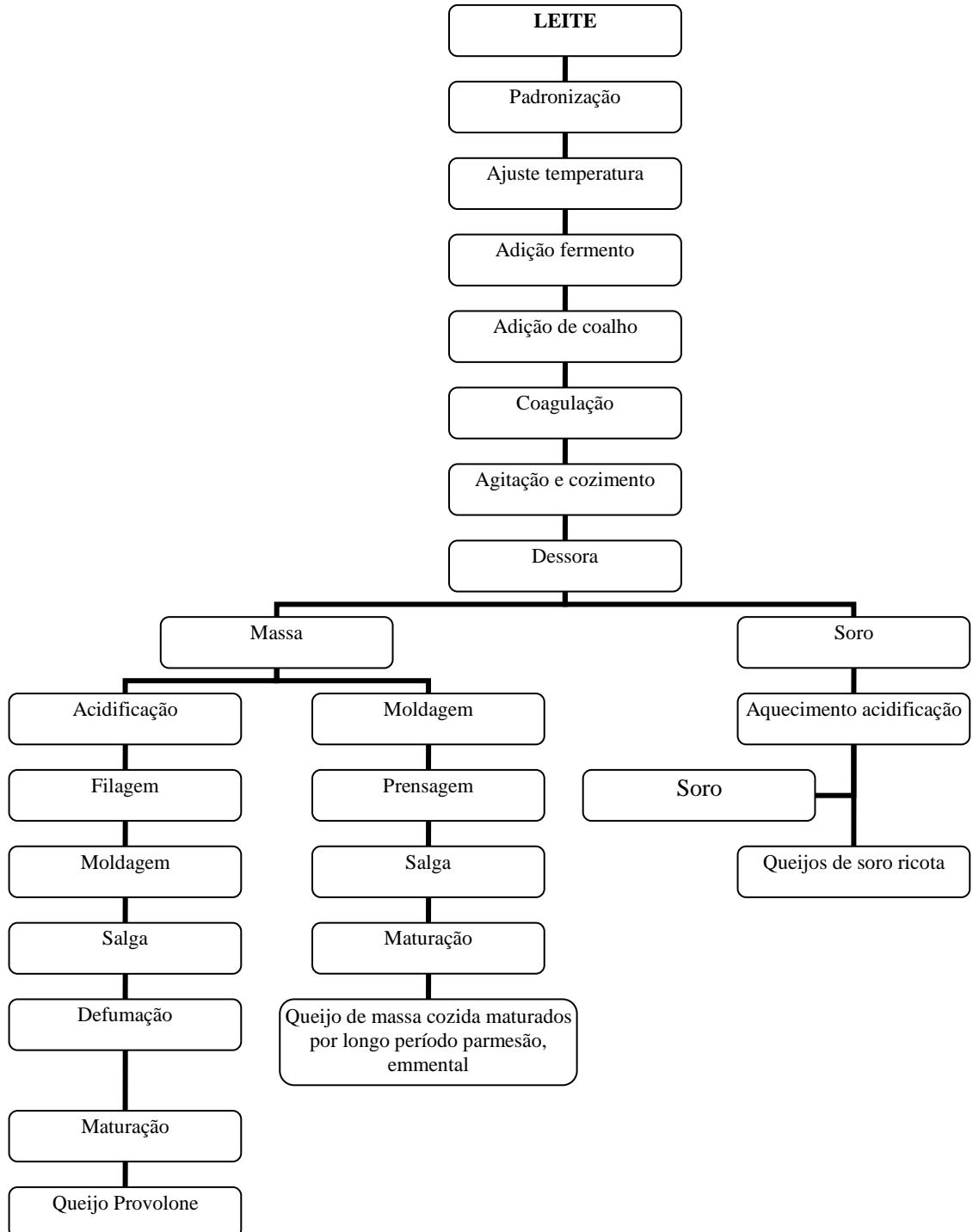


Figura 2.6 – Representação dos processos de fabricação de alguns queijos (AQUARONE, 2001 – adaptado).

O termo soro de leite designa produtos com características variáveis de acordo com a forma que o mesmo foi originado. Existem dois tipos de soro de queijo, o soro doce e o soro ácido. O soro doce é proveniente da coagulação enzimática do leite (pH 6,3 a 6,7) para produção queijos tipo cheddar, minas frescal entre outros . O soro ácido (pH 4,6 a 4,7) é

resultante de manufatura de caseína ou de queijos feitos com leite coagulados inicialmente por ácido, tal como o queijo cottage, ricotta entre outros. O soro ácido é mais rico em cálcio e fosfato do que o soro doce, devido à ação dissolvente dos íons de hidrogênio sobre o fosfato de cálcio da caseína. A partir dessa classificação podem surgir outras variantes de acordo com o processo em que o mesmo é submetido (MORR e HÁ, 1993 apud VEREDAS, 2000).

Segundo Vilani (2001) os constituintes do soro são basicamente os mesmos do leite que o originou, sendo que a gordura e a caseína foram retiradas na produção do queijo, permanecendo na sua composição metade dos sólidos totais presentes no leite onde a lactose se encontra em maior quantidade. A Tabela 2.3 mostra uma comparação entre a composição de leite integral, leite desnatado, soro doce e soro ácido.

Tabela 2.3- Composição do leite integral, leite desnatado e do soro do queijo doce e ácido (USDEC, 2009).

Componente (%)	Leite Integral	Leite Desnatado	Soro Doce (pH 6,7)	Soro Ácido (pH 4,6)
Umidade	84,7	90,4	93,7	93,5
Lactose	4,8	5,1	4,9	4,9
Gordura	3,5	0,1	0,5	0,04
Proteína	3,5	3,6	0,8	0,7
Cinzas	0,7	0,7	0,5	0,8

Através de vários processos, o soro pode ser seco e utilizado como alimento animal, aditivo alimentar, convertido em produtos químicos, combustíveis e outros produtos através da fermentação. Porém estima-se que apenas 50 % do soro produzido mundialmente seja utilizado para tais fins, devido a grande quantidade de lactose presente em sua composição o que consequentemente contribui para sua baixa solubilidade e baixo poder adoçante (YANG e OKOS, 1989 , MIZUBUTI, 1994). Atualmente o soro é aproveitado em vários processos na indústria o que pode ser observado na Tabela 2.4 onde são apresentadas as possibilidades de aplicação do soro.

Tabela 2.4-Possibilidades de aproveitamento do soro lácteo na indústria (CARMINATTI, 2001 & OLIVEIRA, 2000 – adaptado).

Bebidas carbonatadas e fermentadas
Bebidas energéticas
Produção de biscoitos, e alimentos lácteos em pó
Precipitados de albuminas e globulinas como aditivos alimentares
Preparados de albuminas utilizados como suplementos de valor nutritivo de alguns elementos
Fabricação etanol
Preparados cosméticos e farmacêuticos
Produção de lactose fabricação de ácido láctico para a indústria farmacêutica ou alimentícia
Meio de fermentação para a fabricação de antibióticos, combustíveis (metano) e produção de enzimas
Biomassa para a produção de alimentos

Em face de sua rica composição nutricional, com frações consideráveis de lactose, proteínas, minerais e quantidades apreciáveis de vitaminas do grupo B, o soro permite, por um lado, uma série de aplicações na indústria alimentícia. Por outro lado, pode atuar como agente de poluição em cursos d’água devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), capaz de comprometer a vida de seres bióticos neles presentes (GÜVEN *et al.*, 2008; BONNET *et al.*, 1999).

Segundo Rosa (2010) com a crescente preocupação em melhor aproveitar os recursos naturais evitando prejuízos ao meio ambiente, torna-se importante a busca de novas alternativas para reduzir o potencial de poluição do soro e os custos associados ao tratamento do mesmo como efluente e para sua maior utilização em novos produtos na indústria, visando à melhoria de processos, diminuindo os custos de produção e agregando valores aos resíduos de potencial comercial.

A lactose é o principal carboidrato do leite e outros produtos lácteos, sendo o componente majoritário do extrato seco do leite de vaca, aproximadamente 40 a 50%, e no soro de leite em torno de 70 a 80%. São produzidas mundialmente $6 \cdot 10^6$ toneladas de lactose por ano (GÄNZLE *et al.*, 2008).

A lactose é um dissacarídeo redutor, constituído por um radical β -D-galactose e um radical α -D-glicose unidos por ligação glicídica β -1,4. Por apresentar ambas as moléculas em forma de anel piranosílico, a lactose deve ser denominada apropriadamente de 4-O- β -D-

galactopiranosil-D-glucopiranose. A lactose apresenta-se em duas formas anoméricas, α – lactose e β – lactose. A lactose quando em solução está sujeita ao fenômeno de mutarrotação, ou seja, pode ocorrer uma mudança fazendo com que a forma α se transforme em β e vice-versa, o que pode influir na sua solubilidade (NICKERSON, 1974).

A estrutura da α -lactose e da β -lactose são apresentadas respectivamente na Figura 2.7.

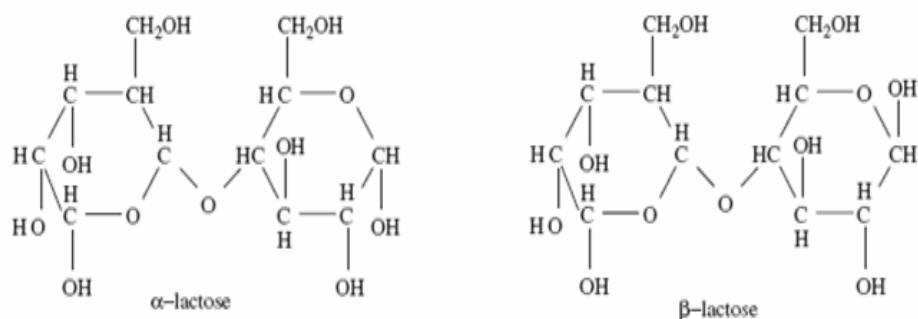


Figura 2.7 - Estrutura molecular básica de uma molécula de α -lactose e β -lactose (GÄNZLE, *et al.*, 2008)

A lactose é uma substância energética e seus monossacarídeos entram na constituição de cerebrosídios abundantes na massa cerebral e mielina nervosa, no organismo humano age como uma promotora na absorção e retenção de cálcio no intestino e absorção de magnésio e manganês (MANAN *et al.*, 1999; BEHMER, 1991).

Como características principais a lactose apresenta baixa solubilidade em água e baixo poder adoçante em relação a outros açúcares (Tabela 2.5), e incapacidade de ser fermentada por micro-organismos o que limita sua capacidade de utilização.

Para utilização da lactose, uma das alternativas e principais tecnologias utilizadas é a hidrólise enzimática da lactose, que consiste em hidrolisar a lactose em seus monossacarídeos (glicose e galactose) podendo assim ser utilizados em diversos setores da indústria (MAHONEY, 1997)

Tabela 2.5- Poder adoçante de alguns açucares (ZADOW, 1984).

Açúcares	Poder adoçante relativo
Sacarose	100
Lactose	16
D-galactose	32
D-glicose	74
D-frutose	173

Além do uso alimentar, vários autores propõem o uso da mesma na produção de etanol. A abundância da mesma como subproduto faz com que todas as aplicações alimentares citadas não representem o uso de todo soro e lactose gerado pela indústria de queijos. Assim a produção de etanol de soro de leite é assunto de interesse e a literatura cita que na fermentação de soro de leite obtém-se concentrações de etanol entre 13 a 23 g/L para tempos de fermentação entre 5 e 14 h, em temperaturas de 25 a 30°C (ZAJSEK e GORSEK, 2010; SANSONETTI *et al.*, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

2.2.2 – Resíduos lignocelulósicos

O termo biomassa refere – se a qualquer tipo de matéria orgânica oriunda de fontes vegetais ou animais que são abundantemente geradas nos setores agroindustriais e florestais (ZENI e PENDRAK, 2006).

Segundo Pereira (2007) a matéria orgânica de origem vegetal, ou seja, a biomassa vegetal pode ser classificada em:

- Biomassa Natural;
- Biomassa Alimentícia;
- Biomassa de Cultivos Energéticos;
- Biomassa Residual onde pode-se destacar as de composição lignocelulósica (resíduos lignocelulósicos).

O aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos ou biomassa lignocelulósica é uma pesquisa de interesse prático e relevante no cenário nacional devido à grande variedade de subprodutos e resíduos decorrente da produção industrial e agrícola. Graças à vasta biodiversidade encontrada em seu território, o Brasil dispõe de uma grande variedade de

resíduos agrícolas e agroindustriais. São geradas anualmente aproximadamente 350 milhões de toneladas de resíduos derivados das atividades industriais (papel e celulose, serrarias, usinas de açúcar e álcool etc.) e unidades de produção agrícola geradoras de resíduos de culturas (palha de trigo, casca de arroz, palha de milho etc.) (RAMOS, 2000).

Esses resíduos podem conter muitas substâncias de alto valor, se for empregada uma tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. Existe uma vasta possibilidade de usos importantes para esses resíduos como solução para o problema da fome pela produção de alimentos e rações destinadas à alimentação de animais, produção de biofertilizantes e geração de uma grande variedade de enzimas (xilanases, amilases, proteases e enzimas associadas à degradação da celulose), moléculas de uso terapêutico e industrial e a geração de energia (LEARY *et al.*, 2009, TAMANINI e HAULY, 2004).

Os resíduos lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose, entremeados por outra macromolécula formada por fenóis e alcoóis, a lignina, aos quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio (LEE, 1997).

A Figura 2.8 apresenta o complexo lignocelulósico no qual são representadas as estruturas químicas dos compostos constituintes da celulose. Pode-se observar, pela figura, que a lignina é um composto fenólico, a celulose é constituída por unidades de glicose e a estrutura da xilose nas moléculas de hemicelulose. A Figura 2.9 mostra a mesma estrutura celulose representada de forma diferente. Nesta outra representação é possível observar o arranjo estrutural do conjunto assim como a parede celular na qual se aloja a celulose.

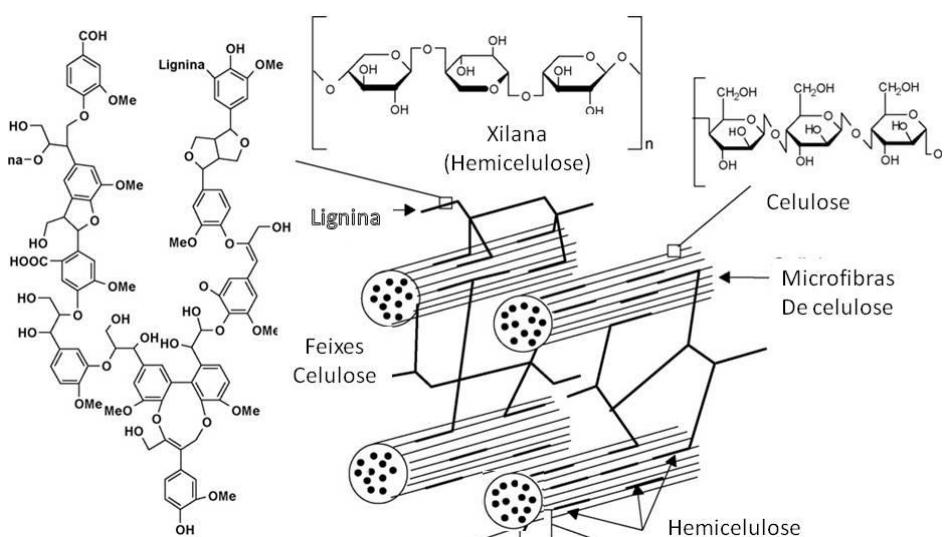


Figura 2.8- Complexo lignocelulósico: cadeias de celulose envolvidas por hemicelulose e lignina (GRAMINHA *et al* , 2007 – Adaptado).

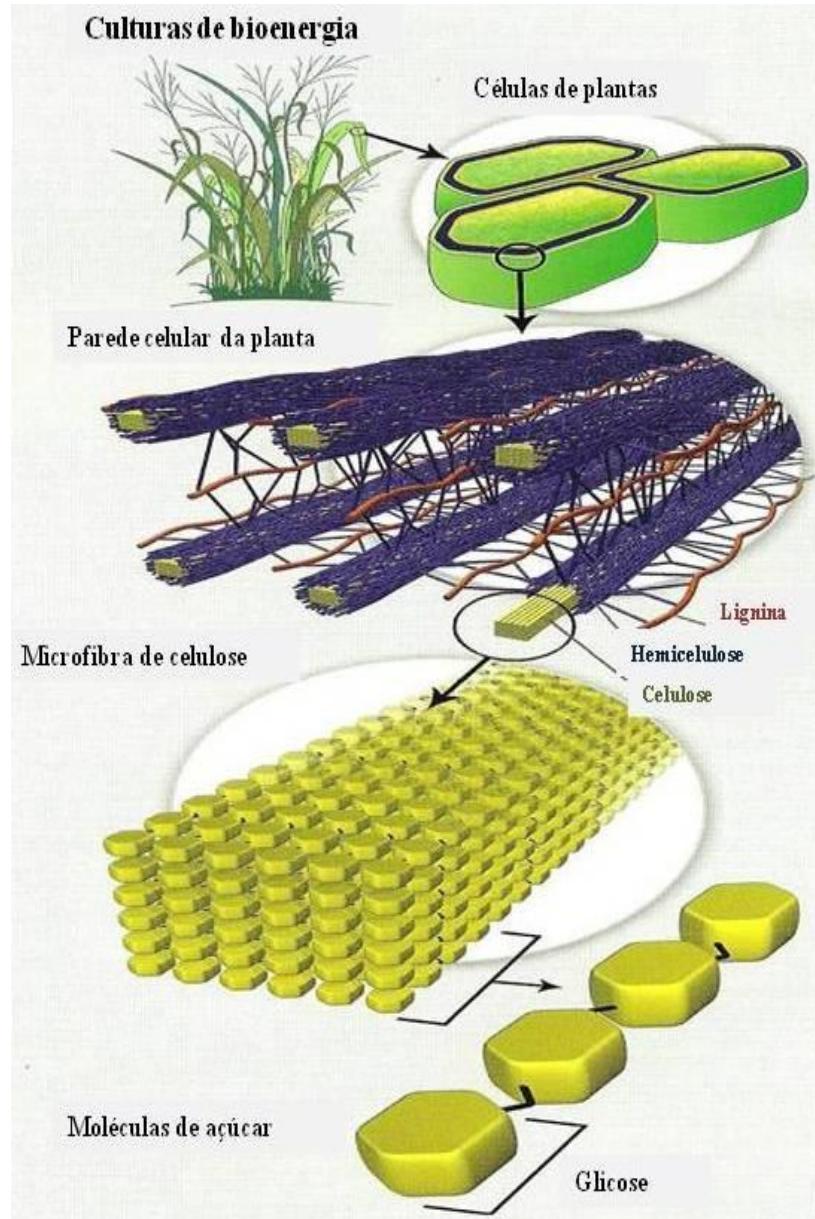


Figura 2.9- Estrutura da celulose (WYMAN e YANG, 2009).

A celulose constitui a mais abundante molécula orgânica existente na natureza, pois a madeira e os resíduos da agroindústria constituem reservas naturais renováveis disponíveis em grandes quantidades, representa importante fração dos subprodutos agroindustriais sendo uma alternativa para a produção de energia e de alimentos, bem como fonte de poluição urbana e industrial (TAMANINI e HAULY, 2004).

A celulose é constituída por cadeias lineares de glicose. Essas moléculas estão ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4) formando uma cadeia linear e por ligações de hidrogênio intramoleculares (ligações entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes) (ARANTES e

SADDLER, 2010). A celobiose, um dímero de glicose, é a unidade repetitiva do polímero (ARISTIDOU e PENTILLÄ, 2000).

Segundo Pereira Jr. *et al.*, (2008) a celulose apresenta, como principais características:

- Unidades de glicose unidas entre si;
- Alto grau de polimerização (1000 a 15000 unidades de glicose);
- Forma arranjo fibroso;
- Apresenta regiões amorfas e cristalinas;
- É atacada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente;
- É insolúvel em álcalis.

A hemicelulose é constituída por uma mistura de polímeros de hexoses, pentoses e ácidos urônicos que podem ser ramificados ou lineares o que contribui para a complexidade da molécula. São encontradas nas paredes das células vegetais associadas à celulose e lignina (KOOTSTRA *et al.*, 2009).

Como características a hemicelulose apresenta segundo Pereira Jr.(2008):

- Unidades de diferentes pentoses e hexoses ligadas entre si;
- Baixo grau de polimerização (60 a 300 unidades de açúcares);
- Não forma arranjo fibroso;
- Apresenta somente regiões amorfas;
- É atacada rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente;
- É solúvel em álcalis.

A lignina é formada por unidades de *p*-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. Depois da celulose é a segunda molécula mais abundante na natureza (LEMOS 2001).

Segundo Fasanella (2008) a lignina apresenta como características:

- Ser um composto heterogêneo;
- Alto peso molecular;
- Estrutura irregular;
- Altamente insolúvel e recalcitrante;
- Fornecer suporte estrutural à parede secundária de plantas vasculares;
- Tornar a parede celular vegetal hidrofóbica;
- Conferir resistência contra ataques microbianos.

A composição dos resíduos lignocelulósicos possui características químicas semelhantes às da madeira e são identificados em diferentes quantidades percentuais, de celulose, hemicelulose e lignina, dependendo da espécie e condições de crescimento (TAMANINI e HAULY, 2004; RABELO, 2007).

A Tabela 2.6 mostra a composição química parcial dos principais produtos lignocelulósicos.

Tabela 2.6-Composição química parcial dos principais resíduos lignocelulósicos (CANETHERI *et al.*, 2001; MUSSATO e ROBERTO, 2002; TAMANINI e HAULY, 2004).

Resíduos Lignocelulósicos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Bagaço de cana	40,2	26,4	25,2
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2
Palha de trigo	42,25	32,16	23,0
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1
Palha de sorgo	34,0	44,0	20,0
Palha de milho	25-41,2	34,5	14,1
Semente de algodão	20,0	13,1	17,6
Jornal	64,4	21,7	21,0
Resíduos Urbanos	40,0	26,0	20
Casca de soja	40 - 53	14 - 33	1 - 3
<i>Eucalyptus globulus</i>	46,3	17,1	22,9
<i>Eucalyptus grandis</i>	40,2	15,7	26,9

Os resíduos lignocelulósicos ou biomassa lignocelulósica são matérias-primas de grande interesse industrial uma vez que podem ser utilizadas para a produção de uma grande variedade de produtos, sendo crescente o número de pesquisas para sua utilização. Segundo Vásquez *et al.*, (2007) a tendência das pesquisas para o reaproveitamento dos resíduos lignocelulósicos é desenvolver processos biotecnológicos que torne possível a produção de bioetanol. Para a produção de bioetanol os resíduos lignocelulósicos devem passar por um

processo de hidrólise para transformar os polissacarídeos presentes na biomassa em açúcares fermentáveis e permitir uma posterior fermentação.

2.2.3- Tratamentos de resíduos lignocelulósicos

Para produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos é preciso submeter o resíduo a um pré – tratamento com o objetivo de remover a hemicelulose e a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais, aumentando a acessibilidade às moléculas de celulose para que as enzimas celulases possam agir sobre a sua estrutura convertendo-a em açucares fermentáveis (DAWSON e BOOPOTHY 2007). A Figura 2.10 representa um complexo lignocelulósico antes e após o pré-tratamento que torna a celulose acessível para ação enzimática.

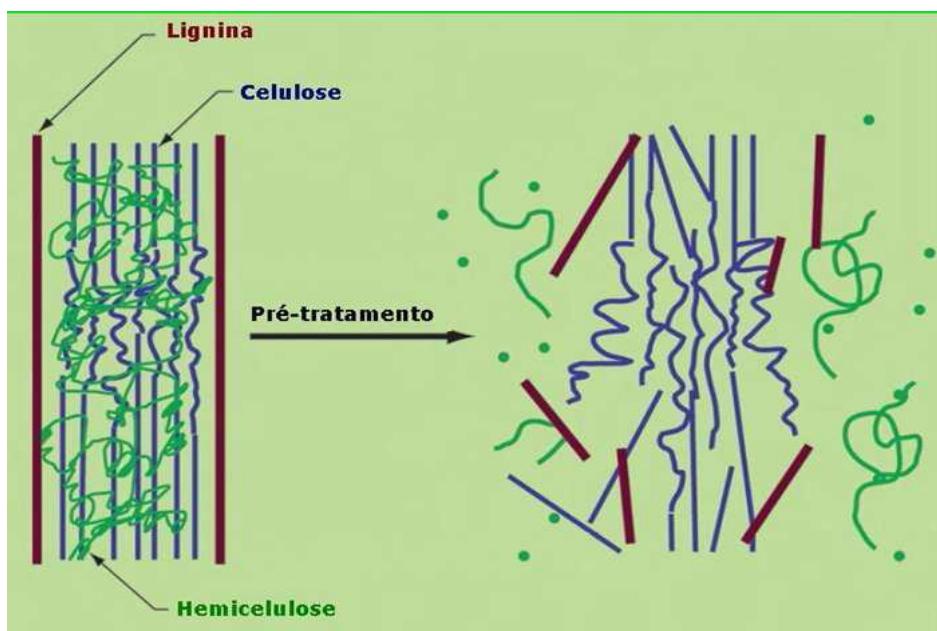


Figura 2.10 - Representação do complexo lignocelulósico antes e depois de um pré – tratamento (MOSIER *et al.*, 2005 - Adaptado).

Existem diversos tipos de pré-tratamentos que podem ser utilizados para abrir a estrutura do complexo lignocelulósico conforme a Tabela 2.7.

Tabela 2.7-. Métodos de pré-tratamentos em materiais lignocelulósicos (WYMAN 1994, DAWSON e BOOPOTHY, 2007).

Pré - tratamento
Explosão de vapor ácido-catalisada
Explosão a vapor
Explosão de fibra usando amônia
Organosolv
Extração supercrítica
Diluir o pré-tratamento ácido
Hidrólise ácida
Hidrólise alcalina
Deslignificação oxidativa

O objetivo do pré-tratamento é remover a hemicelulose e a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais; além disso, deve evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de bioproductos que possam inibir os micro-organismos fermentadores (SUN & CHENG, 2005).

2.3 – Hidrólise e degradação da biomassa

A hidrólise de biomassa para produção de etanol é utilizada para converter os açúcares não fermentescíveis em açúcares fermentescíveis. São utilizados basicamente dois tipos de hidrólise, o método ácido e o método enzimático.

- Método ácido: a reação é muito rápida, mas envolve soluções de ácidos fortes, como o sulfúrico e o clorídrico, e condições operacionais severas de pH e temperatura.
- Método enzimático: permite condições mais moderadas de temperatura e pH, a reação é lenta e não causa problema nos produtos obtidos (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; BAILEY e OLLIS, 1986).

A Tabela 2.8 mostra uma comparação de vários aspectos da hidrólise enzimática revelando que esta é superior à hidrólise ácida.

Tabela 2.8- Comparaçao entre hidrólise enzimática e hidrólise ácida (KRISHNA *et al* , 2000).

Parâmetro	Hidrólise ácida	Hidrólise enzimática
Pré-tratamento	Pode ser necessário	Necessário
Taxa de hidrólise	Rápida (min.)	Lenta (h)
Temperatura	Alta (200°C)	Baixa (45°C)
Pressão	Alta	Atmosférica
Rendimento	Depende do material e dos detalhes do processo	Depende do material e dos detalhes do processo
Formação de subprodutos	Provável formação	Não há formação

Rabelo (2007) afirma que os processos de hidrólise ácida estão mais desenvolvidos, porém exigem condições severas de operações, possuem baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista, ou produtos contaminados, que requerem uma etapa posterior de purificação (KRAJEWSKA, 2004). Já a hidrólise enzimática é conduzida em condições amenas de temperatura e pressão, as enzimas são mais específicas, resultando em um produto mais limpo e um maior rendimento. O processo hidrolítico pode ser realizado por rotas químicas e biológicas, sendo que nos dias atuais tem-se dado preferência pelas rotas enzimáticas, pois o custo de hidrólise e as restrições provenientes da formação de subprodutos capazes de inibir as etapas de fermentação que seguem a hidrólise reduzem o interesse na rota química (MOFFAT *et al.*, 1994 apud VIEIRA 2009).

2.4 – Enzimas

Enzimas são definidas como proteínas, polímeros de cadeia longa com aminoácidos sucessivamente ligados uns aos outros através de ligações peptídicas em uma seqüência determinada geneticamente, que apresentam atividade catalítica. São um grupo de substâncias orgânicas de natureza geralmente protéica, com atividade intra ou extracelular, que têm funções catalisadoras, ou seja, catalisam reações químicas (CHIBATA, 1978; FABER, 2004).

A eficiência das enzimas como catalisadores é medida pelo número de transformações moleculares, que é explicada pelo número de moléculas de substrato que uma enzima converte por unidade de tempo (SANTOS, 2007). As enzimas apresentam três principais

propriedades estabilidade, especificidade e atividade (DIXON e WEBB, 1979; BOBBIO E BOBBIO, 1992; GALVÃO, 2004).

- Estabilidade: a capacidade catalítica de uma enzima depende de que sua estrutura nativa seja por forças de interação.
- Especificidade: é devido ao sítio ativo, parte da enzima que a difere da proteína, que é capaz de se ligar a moléculas denominadas substrato.
- Atividade: é a medição da velocidade inicial da reação sob uma faixa de condições determinadas.

Uma enzima catalisa só um tipo de reação química, o que possibilita definir quando se encontra um tipo de enzima o metabolismo que a célula efetua. As enzimas são encontradas em todos os tipos de células, animais, vegetais e microbianas. Elas são divididas em seis grandes classes na indústria são oxireduases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (COURI, 1993; SANTOS, 2007). Conforme a Tabela 2.9, a União Internacional de Bioquímica (IUB) classifica as enzimas da seguinte forma:

Tabela 2.9- Classificação das enzimas segundo a IUB.

CLASSES DE ENZIMAS	
Oxirreduases	Catalisam reações de oxiredução, transferindo elétrons, hidretos (H-) ou prótons (H+). Exemplo: oxidases.
Transferases.	Transferem grupos químicos entre moléculas. Exemplo: transaminases.
Hidrolases	Utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas. Exemplo: peptidases.
Liases	Formam ou destroem ligações duplas, respectivamente, retirando ou adicionando grupos funcionais. Exemplo: descarboxilases.
Isomerases	Transformam uma molécula em seu isômero. Exemplo: epimerases.
Ligases	Formam ligações químicas por reações de condensação, consumindo energia sob a forma de ATP. Exemplo: sintetasas.

As enzimas são altamente específicas quando comparadas aos catalisadores químicos, promovem somente uma reação bioquímica com seu substrato, em condições brandas de reação e reduzindo os problemas ambientais e toxicológicos. O seu uso como catalisadores em escala de processo industrial tem seu uso limitado devido seu alto custo de estabilização (SANTOS, 2007).

O mercado mundial de enzimas é grande, anualmente o gasto mundial com enzimas é superior a US\$ 2,5 bilhões de dólares e acredita-se que o mercado mundial de produção de enzimas terá um crescimento anual superior a 7,6%, sendo que em 2011 poderá atingir o valor correspondente a US\$ 6 bilhões (DJICK *et al.*, 2003; LEARY *et al.*, 2009). Algumas estratégias estão sendo estudadas para diminuir este custo, já que a maioria das enzimas provém de micro-organismos que foram selecionados pela natureza e modificados para produção industrial das mesmas (ZHANG *et al*, 2006).

1. Produção de enzimas utilizando substratos/biomassa de baixo custo;
2. Produção de enzimas com melhor estabilidade para processos específicos;
3. Produção de enzimas eficientes e no local do uso;

A Tabela 2.10- Apresenta a produção de enzimas, utilizando tipos diferentes substratos e micro-organismos.

Tabela 2.10 – Produção de enzimas de enzimas utilizando tipos diferentes de substratos e micro-organismos (SOUZA, 2008 – Adaptado).

Enzima	Substrato	Micro-organismo
α -amilase	Amido	Leveduras
Amilase	Bagaço de laranja e farelo de arroz	<i>Aspergillus awamori</i>
Proteases	Resíduos industriais de couro	<i>Bacillus sp</i>
Proteases	Amido solúvel e gelatina	<i>Lentinus citrinus</i> DPUA 1535
Invertases	Farelo de trigo	<i>Alternaria sp.</i>
Celulases	Soro de leite	<i>Aspergillus niger</i>
Celulases	Bagaço de cana	<i>Aspergillus niger</i>

2.4.1 – Hidrólise enzimática da lactose

A hidrólise da lactose é um método conhecido e utilizado industrialmente por ser realizado em condições mais amenas de temperatura e pressão. A reação de hidrólise da lactose forma dois monossacarídeos glicose e galactose como pode ser observado na Figura 2.11 (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985).

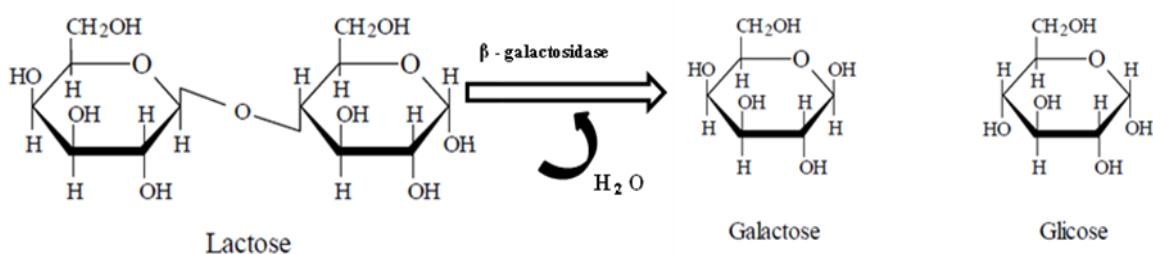


Figura 2.11-Hidrólise enzimática de lactose catalisada por β -galactosidase (ZADOW, 1984 - Adaptado).

Segundo López – Leiva e Guzman (1995) a hidrólise enzimática da lactose é realizada por enzimas lactases. A lactose hidrolisada pode ser aplicada em diversos setores da indústria. Na indústria alimentícia para produzir produtos com baixo teor de lactose, na indústria farmacêutica e para produção de etanol.

2.4.2 – Hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos

A hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos é antecedida pelo pré – tratamento da biomassa lignocelulósica para possibilitar o acesso das enzimas celulases à celulose. Na hidrólise ocorre a quebra da celulose em açúcares por enzimas celulases que são altamente específicas, resultando em uma menor formação de subprodutos e um maior rendimento de açúcares fermentescíveis (RABELO, 2007).

Alguns fatores devem ser observados para não alterar a hidrólise enzimática da celulose como a temperatura e pH que geralmente atuam em condições de pH 4,8 e temperatura entre 45° e 50°C, atividade enzimática, concentração de substrato entre outras condições de reações. As celulases são usualmente uma mistura de diversas enzimas. Os três maiores grupos de celulases que estão envolvidas no processo de hidrólise são: endoglucanases; exoglucanases e β - glucosidase (SUN e CHENG, 2002).

2.4.3 – Enzima β - Galactosidase

Entre as enzimas de interesse crescente, consta a β -galactosidase utilizada para hidrolisar a lactose formando glicose e galactose e sua importância industrial deve-se aos problemas tecnológicos, ambientais e de saúde relacionados com as propriedades da lactose. A enzima β – galactosidase ou lactase é classificada como hidrolase (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985; HOLSINGER, 1997; BLANCH e CLARK, 1997).

As propriedades da enzima β -galactosidase dependem consideravelmente da sua origem. As β -galactosidases podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais, em órgãos de animais e também por grande quantidade de micro-organismos conforme mostra Tabela 2.11 (GEKAS e LOPEZ-LEIVA, 1985).

Tabela 2.11 – Possíveis fontes de obtenção de β -galactosidase (SHUKLA, 1975).

POSSÍVEIS FONTES DE OBTENÇÃO DE β - GALACTOSIDASE	
PLANTAS	Pêssego Algumas espécies de rosas selvagens Amêndoas
BACTÉRIAS	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Bacillus sp</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Escherichia coli</i>
LEVEDURA	<i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis</i> <i>Kluyveromyces (Saccharomyces) lactis</i>
ORGANISMOS DE ANIMAIS	Intestino Cérebro Tecidos da pele de mamíferos
FUNGOS	<i>Aspergillus phoenecis</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus foetidus</i>

Segundo Oliveira (2005) a grande vantagem dos micro-organismos relativamente às plantas é o fato de atingirem maiores produtividades, sendo a β -galactosidase de origem

fúngica a mais utilizada em aplicações tecnológicas. Nem todas as β -galactosidase são consideradas seguras para utilização na indústria, as mais utilizadas em processos industriais são as produzidas por *A. niger*, *A. oryzae* e *Saccharomyces sp* (*lactis* ou *fragilis*).

A enzima β -galactosidase apresenta diversas potencialidades de utilização, trata-se de uma importante enzima de uso já consolidado em pelo menos dois dos mercados citados: produção de alimentos e produção de energia. Na produção de alimentos a beta-galactosidase reduz o teor de lactose no leite, produzindo, assim, leites especiais para aqueles que têm intolerância à lactose, e importante na produção de produtos com baixo teor de lactose. Na produção de energia, a enzima é importante para que certos micro-organismos como o *Saccharomyces cerevisiae* possam fermentar a lactose (NAGODAWITHANA e REED, 1990; SHANKAR e MULIMANIA, 2007).

2.4.4 – Enzima celulase

As celulases são responsáveis pela degradação microbiana da celulose, fazem parte da família das glicosil-hidrolases, que hidrolisam oligossacarídeos e polissacarídeos e reconhecem as ligações $\beta - 1,4$ entre as moléculas de glicose. Trata-se de um complexo enzimático com pelo menos três enzimas que atuam na hidrólise da celulose: endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases (JUHÁSZ *et al.*, 2005). Endoglucanases que são responsáveis por iniciar a hidrólise, atuam nas regiões amorfas clivando ligações beta, dentro da molécula da celulose (DIENES *et al.*, 2004). Exoglucanases que atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, removendo as unidades de celobiose (CAO e TAN, 2002). E a $\beta -$ glucosidase que catalisa a hidrólise da celobiose em duas unidades de glicose (PETROVA *et al.*, 2002).

As celulases possuem ainda grande importância econômica, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais. As principais aplicações são nas indústrias alimentícias, ração animal, têxtil, detergente, cervejarias, indústria de polpa e papel, gestão de resíduos, indústria médico-farmacêutica e para produção de etanol celulósico (BHAT e BHAT, 1997).

A Figura 2.12 representa a ação das três enzimas na hidrólise da celulose. Nesta figura é possível observar a ação sequencial das enzimas na quebra da celulose em fragmentos maiores e a quebra destes em glicose.

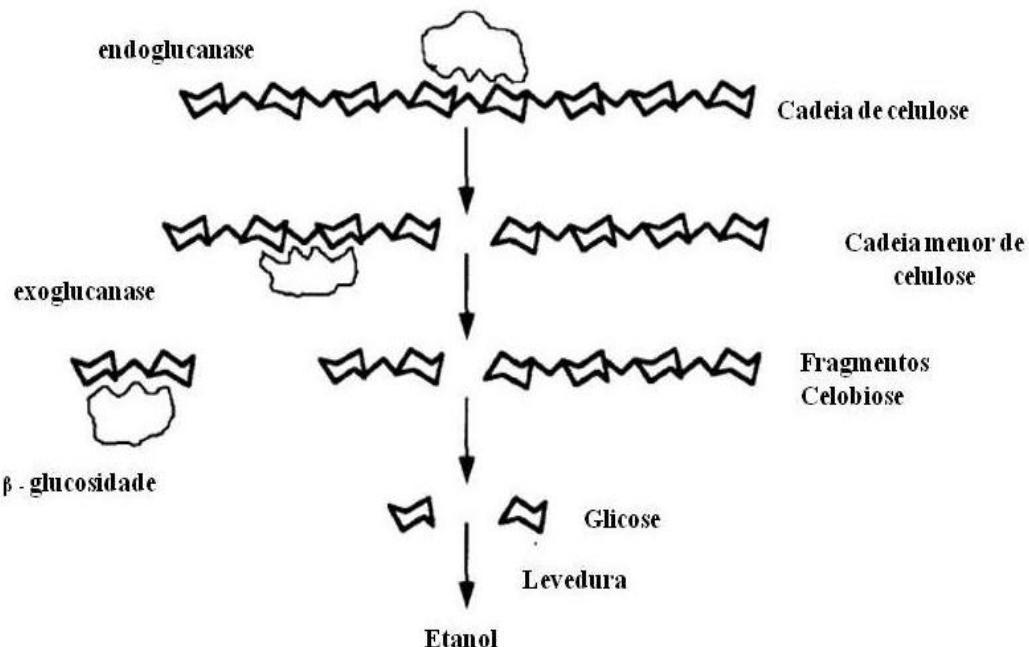


Figura 2.12-. Esquema da hidrólise enzimática da celulose para produção de etanol (WYMAN, 1994).

Existe na natureza uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulase esses micro-organismos degradam a especificamente a cadeia polimérica, originando polímeros com cadeias mais curtas (RABELO, 2007). Alguns estudos vêm sendo desenvolvidos para verificar a produção de celulases por micro-organismos e a eficiência de alguns micro-organismos e substratos na produção de celulase. A Tabela 2.12 - apresenta a produção de enzimas celulase, utilizando tipos diferentes substratos e micro-organismos.

Tabela 2.12 - Produção de enzimas celulase, utilizando tipos diferentes substratos e micro-organismos (AGUIAR, 2010).

Micro-organismo	Substrato
<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de cana - de - açúcar
<i>Aspergillus ellipticus</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	Bagaço de cana - de - açúcar
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Resíduos de grama

<i>Cellulomonas biazotea</i>	Fibras de grama
<i>Trichoderma reesei</i>	Bagaço de cana- de –açúcar e palha de arroz
<i>Aspergillus flavus</i>	Bagaço de cana - de -açúcar, serragem e sabugo de milho
<i>Trichoderma reesei</i> e <i>Aspergillus niger</i>	Sabugo de milho
<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de cana – de - açúcar
<i>Aspergillus niger</i>	Espiga de milho e serragem
<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo
<i>Trichoderma reesei</i> <i>Antigonus leptopus,</i>	Folhas de bananeira e palha de cana-de-açúcar
<i>Trichoderma lignorum</i>	Resíduos de banana
<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo
<i>Bacillus subtilis</i>	Palha de arroz, palha de trigo e Bagaço de cana – de - açúcar

2.5 - Micro – organismos

2.5.1 – *Aspergillus niger*

O gênero *Aspergillus* foi catalogado pela primeira vez em 1729 pelo biólogo e padre italiano Pietro Antonio Micheli. Trata-se do gênero mais comum dos fungos filamentosos, além de ser um dos mais bem estudados, com cerca de 274 diferentes espécies descritas (KAAIJ, 2007).

O gênero *Aspergillus* caracteriza-se pela produção de esporos assexuais que se dá em uma estrutura chamada aspergillum ou “cabeça aspergillar” que é especializada e característica do gênero, consiste de uma haste (estipede) asseptado que termina em uma

vesícula. Eles possuem uma estrutura denominada conidióforo que é constituído pelo aspergillum e pelo estipe e a célula pé (SANTOS, 2007; FASANELLA, 2008).

A espécie *Aspergillus niger* representa um fungo filamentoso que é encontrado com facilidade no solo, plantas em decomposição e em diversos ambientes que os seus esporos são levados pelo ar solo. É observado como um bolor negro em frutas e outros alimentos, sendo uma das poucas espécies desse reino classificadas como GRAS (Geralmente Reconhecido Como Seguro), pela Food and Drug Administration (FDA).

Uma imagem do fungo *Aspergillus niger* é apresentada na Figura 2.13.



Figura 2.13- Micrografia eletrônica de varredura do fungo *Aspergillus niger* (GENOME JGI, 2011).

Uma das razões para o notável interesse por *Aspergillus niger* pode ser explicada pela diversidade de reações por ele sintetizadas. O gênero *Aspergillus niger* cresce com facilidade na presença de polissacarídeos, monossacarídeos e outros carboidratos, bem como, em ambientes que apresentem composição inadequada para o crescimento de outros fungos. A espécie *Aspergillus niger* destaca-se por ser utilizada numa grande variedade de processos industriais, com destaque a produção de ácido cítrico, ácido glucônico e produção de enzimas, conforme apresentado na Tabela 2.13 (ANDERSEN *et al.*, 2008; SOCCOL e PANDEY 2009).

A Tabela 2.13 -Produção de diversas enzimas por *Aspergillus niger* com aplicação comercial, demonstrando a alta eficiência da espécie (COURI, 1993).

Classe da Enzima	Setor da indústria	Aplicação
Poligalacturo-ase	Alimentação	Clarificação de sucos de fruta
	Alimentação	Extração de óleo de azeitona
Celulase	Detergentes	Limpeza, clarificação
	Têxtil	Amaciamento de tecidos de algodão
Lactase	Farmacêutica	Fabricação de capsulas de lactase
	Bebidas	Deslactosação do leite
Invertase	Panificação	Produção de açúcar invertido
	Saúde	Higiene bucal
Pectinases	Papel	Degomagem de fibras
	Alimentação	Clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas.
Naringinase	Bebidas	Remoção do amargor do suco cítrico
Protease	Detergentes	Remoção de manchas de proteínas
	Papel e celulose	Remoção de biofilmes
	Couro	Purga do couro
Amilase	Detergentes	Remoção de manchas de amido
	Panificação	Aumenta maciez e volume do pão
	Bebidas	Tratamento de uvas, cerveja light
Celulase	Detergentes	Limpeza, descoloração
	Têxtil	Amaciamento de tecidos de algodão
	Papel e celulose	Remoção de tintas, modificação das fibras

2.5.2 - *Trichoderma reesei*

O *Trichoderma reesei*, Figura 2.14 é um fungo filamentoso, pertencente ao grupo Deuteromycota. Ele alterna morfologicamente entre hifas septadas na sua fase somática e assexuada e os esporos haplóides denominados conídios durante sua fase de reprodução (THRONDSET *et al.*, 2010). A espécie *Trichoderma* desempenha um papel

importante na indústria de biotecnologia, onde sua capacidade de síntese proteíca e secreção são amplamente explorados para produção de proteína, sendo que algumas cepas geram mais de 40 g/L de proteínas (GÓRKA – NIEC, 2011).

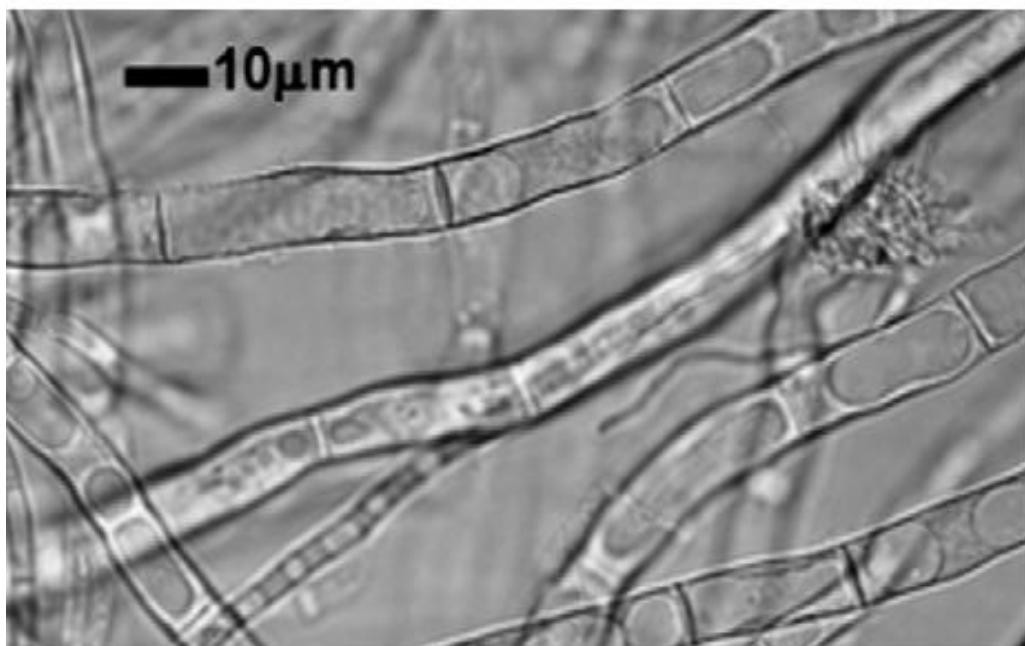


Figura 2.14: *Trichoderma reesei* (GÓRKA – NIEC, 2011).

Entre as proproteínas produzidas pelo *Trichoderma reesei* há um especial interesse na produção de celulase. O *Trichoderma reesei* produz pelo menos seis diferentes celulases: duas celobiohidrolases (CBH I e CBH II, E.C. 3.2.1.91) que atuam na hidrólise da celulose a partir da extremidade redutora (CBH I) e não redutora (CBH II) e quatro endoglucanases (EG I, EG II, EG III e EG V, E.C. 3.2.1.4) que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso na fibra de celulose. Além destas principais o mesmo produz duas β- glucosidases (BG I e BG II, EC 3.2.1.21) que atuam na hidrólise de celobiose (SEIBOTH *et al.*, 1997, QIN *et al.*, 2008 ; NIEVES *et al.*, 1990).

Segundo Kovács *et al.* (2009) a limitação das celulases produzidas pelo *Trichoderma reesei* é o baixo nível de atividade de β – glucosidase, o que leva ao acúmulo de celobiose. Muitas pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de bioprocessos economicamente viáveis na produção de celulase aumentando assim o potencial hidrolítico das enzimas produzidas pelo *Trichoderma reesei*, como a modificação genética da espécie ou a co – cultura de *Trichoderma reesei* com um fungo que apresenta uma boa produção de β – glucosidase, pois assim aproveita-se a grande capacidade de produção de complexo lignocelulósico do *Trichoderma*, que corresponde a um valor que pode ser superior a 60% de

sua produção enzimática com especial destaque para CBH I, que sozinha corresponde a 40 a 60% da produção enzimática (WANG e XIA, 2011). Outra dificuldade associada ao complexo de celulase de *Trichoderma reesei*, também presente na maioria dos complexos celulósicos de outros fungos, é a baixa estabilidade das enzimas em pH e temperaturas elevadas (QIN, 2008).

CAPITULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Micro-organismos

Para as fermentações foram utilizadas, a cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16404 e a cepa CCT 2768 de *Trichoderma reesei* adquiridas da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello – Brasil.

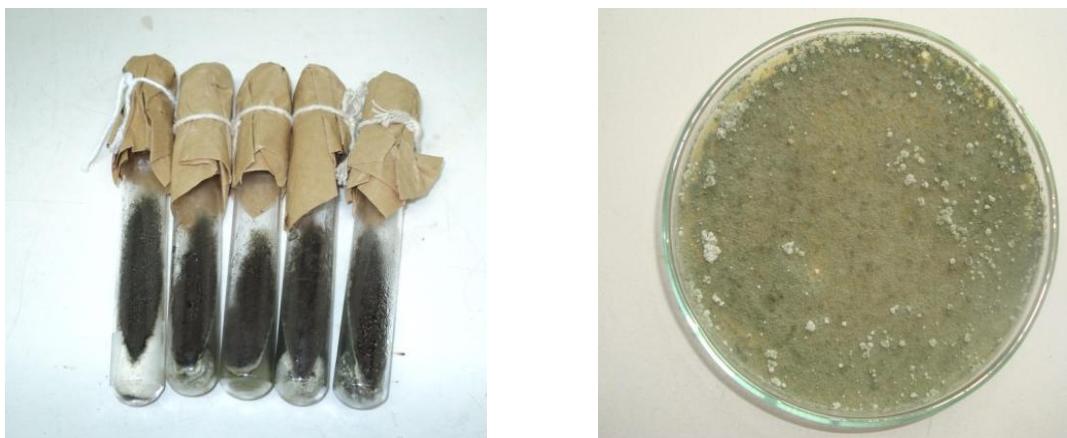


Figura 3.1- Cepas *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*

3.2 - Meio de cultura e manutenção do fungo

Os esporos das linhagens foram preservados em tubos de ensaio com tampas de algodão, envolto em gaze, tampados com papel grosso e renovadas por cultivo a cada 15 dias em ágar batata glicose (PDA), formado por ágar 15 g/L, glicose 20 g/L e batata 200 g/L. No preparo deste meio a infusão de batata destinada ao meio foi gerada pela fervura de 200 g batata fatiada em 1L água destilada por uma hora, após uma hora a batata foi descartada, à água do cozimento foram adicionados glicose e ágar o meio foi homogeneizado. Este meio foi conservado sob refrigeração a $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$

3. 3 – Substratos

Como meio de cultivo no processo de fermentação submersa para obtenção das enzimas β - galactosidase e celulase, foram utilizadas celulose – Sigma e lactose – Vetec e soro de queijo - cedido pela Cargil. Para fermentação alcoólica casca de arroz tratada e soro de queijo em pó.

A casca de arroz foram trituradas em processador em seguida submetido a tratamento com amônia para liberar as fibras de celulose. O resíduo seco foi armazenado em sacos plásticos fechados.

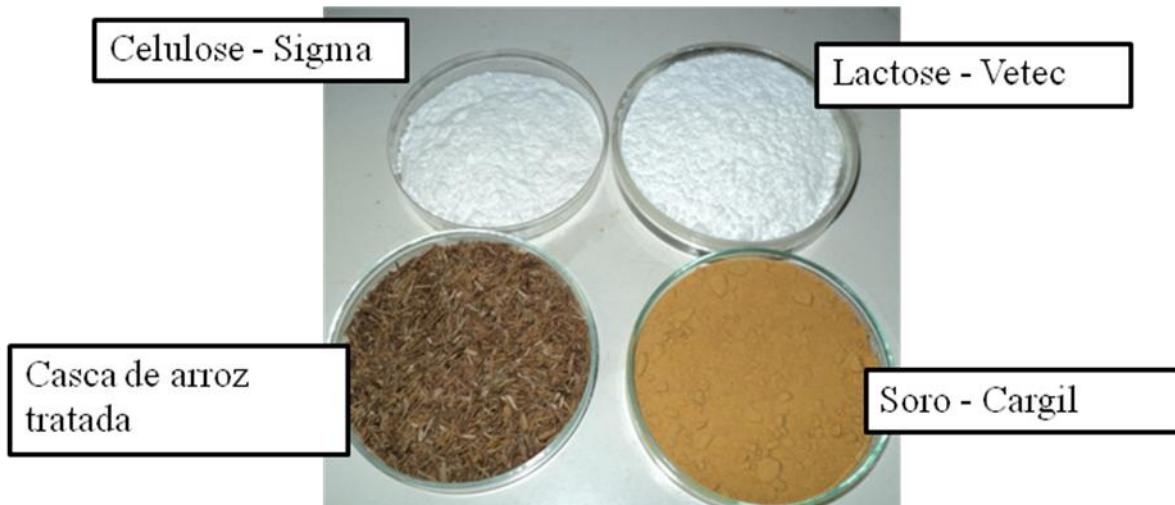


Figura 3.2 – Substratos: celulose, lactose, casca de arroz e soro em pó.

3.3.1- Tratamento do material lignocelulósico

Foi utilizado nos experimentos de fermentação alcoólica casca de arroz tratada. A casca de arroz foi trituradas em processador e em seguida, submetida a tratamento com amônia em proporção 1:1 à temperatura 121 °C em autoclave por 1 h , para liberar as fibras de celulose (Figura 3.10 e Figura 3.11). O resíduo foi lavado e seco e armazenado em sacos plásticos fechados.

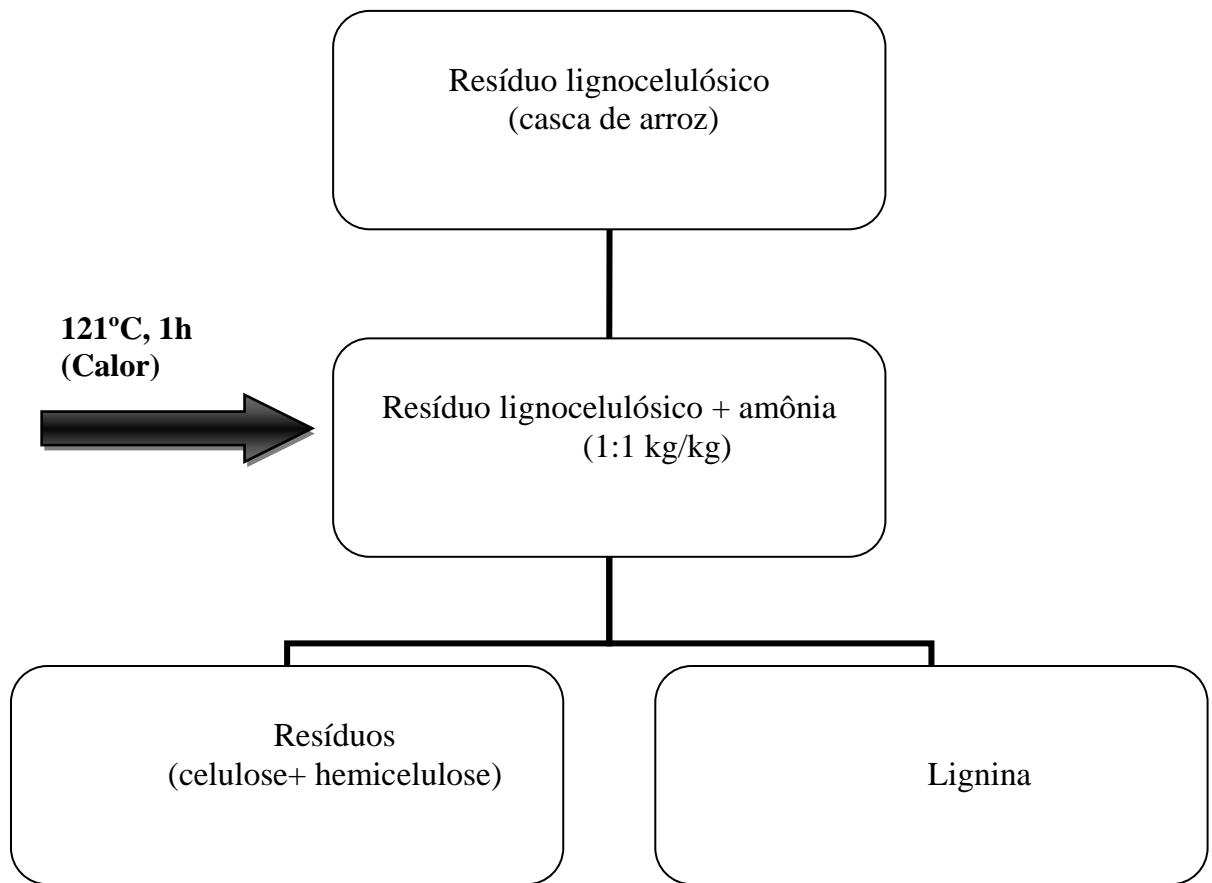


Figura 3.3 Método AFEX de tratamento de material lignocelulósico (Fonte: autor)



Figura 3.4- Tratamento de material lignocelulósico.

3.4-Rotina de ensaios

Ao longo do trabalho foram utilizadas rotinas de produção do complexo enzimático e rotinas de ensaios com o complexo enzimático gerado. A Figura 3.1 mostra a rotina associada à conservação do fungo e produção do extrato enzimático e a Figura 3.2 mostra a seqüências de ensaios que utilizaram a enzima. Sendo que, a descrição dos métodos e equipamentos utilizados nestas rotinas são apresentados na seqüência.

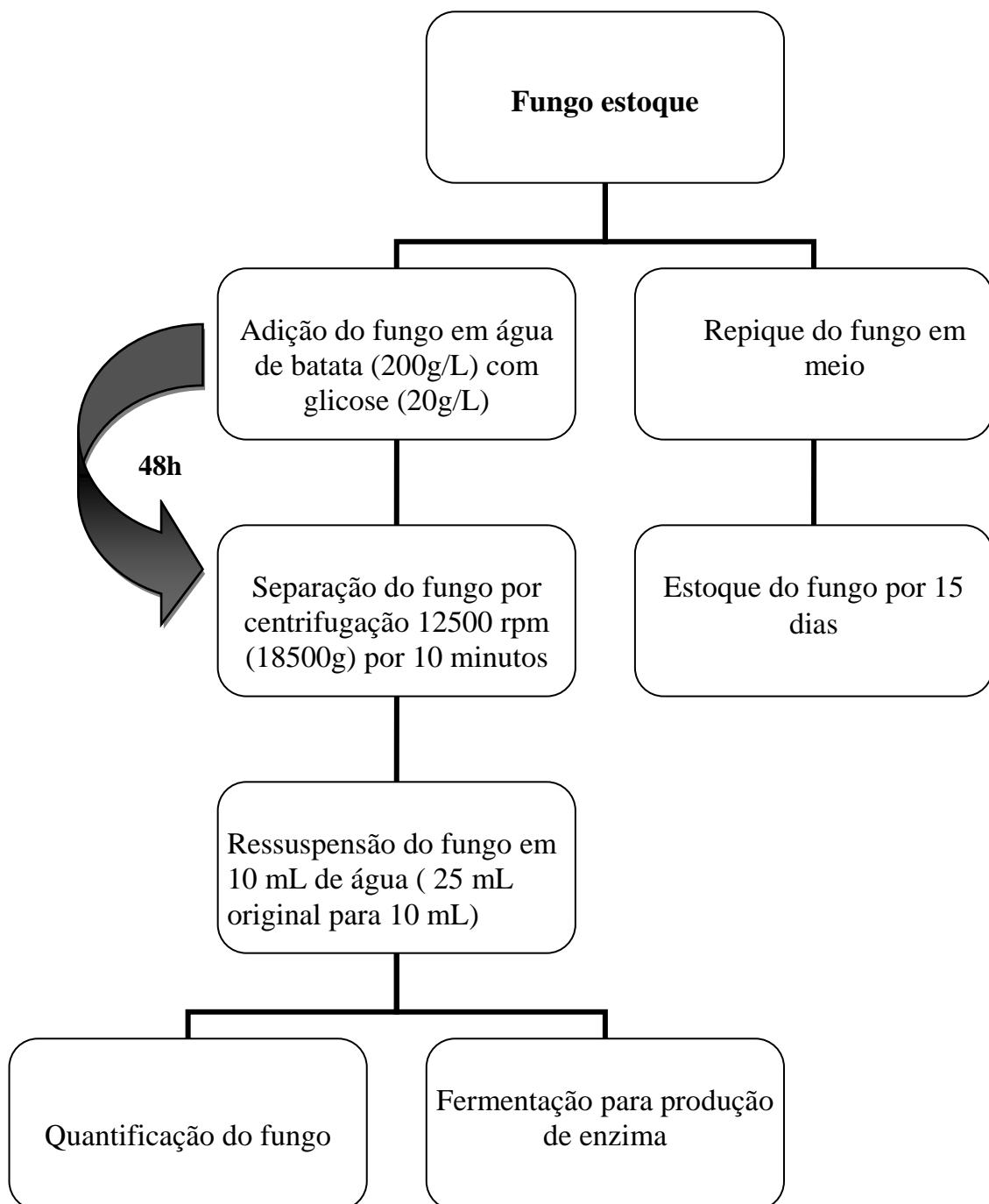


Figura 3.5- Rotina para produção de complexos enzimáticos (Fonte: autor).

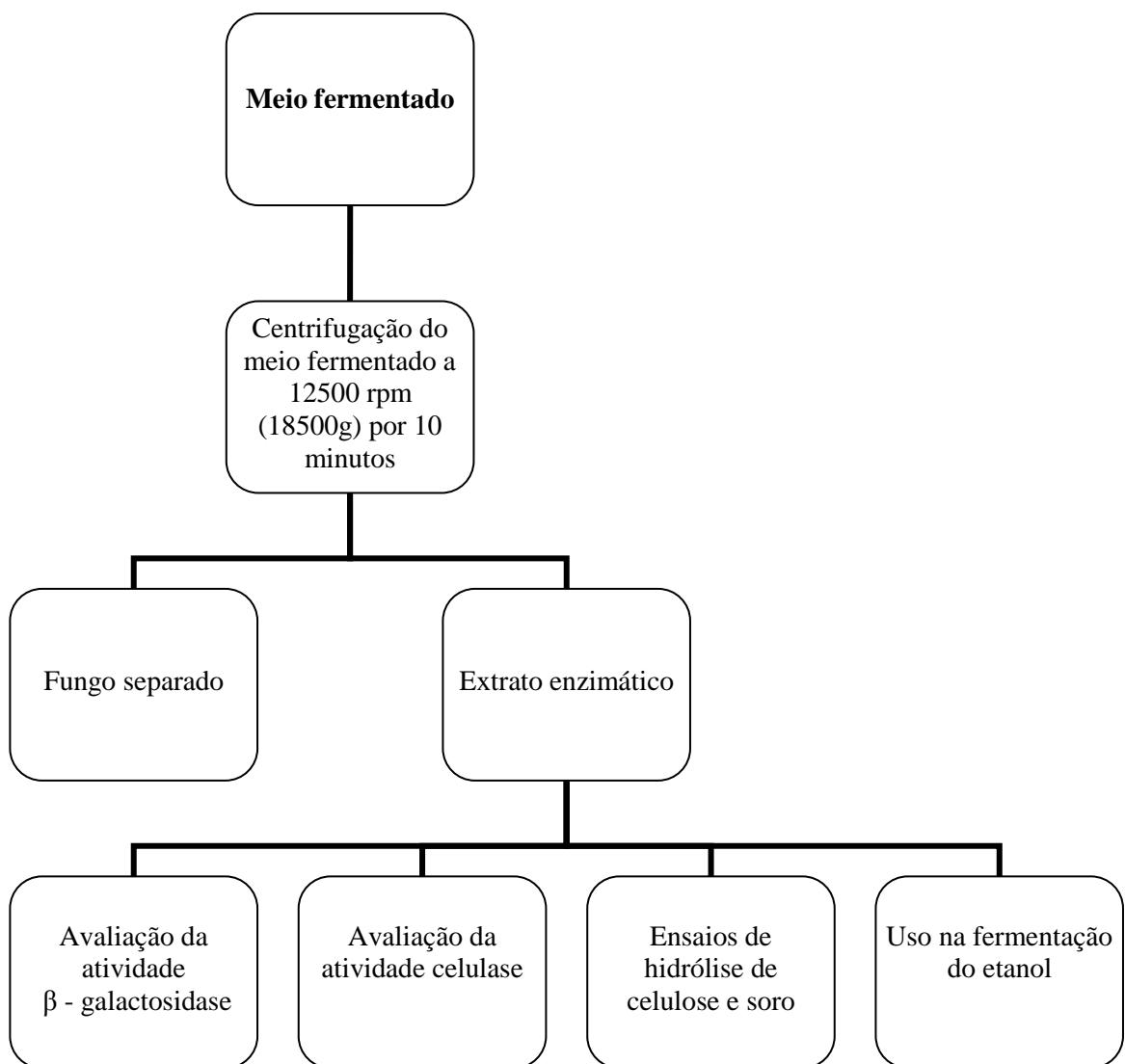


Figura 3.6- Rotina ensaios com complexos enzimáticos (Fonte: autor).

3.5 - Fermentações em estado líquido para produção de enzimas

Foram realizadas fermentações submersas para produção de enzimas em duas etapas: uma etapa preliminar composta de fermentação em quatro meios de composições apresentadas na Tabela 3.1 durante 6, 18, 24, 30 e 48 h em erlenmeyer contendo 100 mL à temperatura ambiente de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com agitação 130 rpm em shaker. Em uma etapa seguinte as fermentações (Figura 3.5) foram conduzidas em erlenmeyer contendo soro com 40 g/L de lactose, 20 g/L de celulose, 3 g/L de extrato de levedura e mistura de sais cloreto de zinco (ZnCl_2), cloreto de magnésio (MgCl_2) e cloreto de manganês (MnCl_2) na concentração de 0,05 g/L durante 12 horas na qual foi avaliada a produção de celulase e β -galactosidase. Em

ambas as etapas foram avaliadas a atividade enzimática em β -galactosidase e celulase do extrato enzimático gerado. Em todas as fermentações o inóculo foi preparado com meio de cultura formado de uma solução de água de batata (200g/L) com glicose fermentada por 48h seguido de centrifugação e resuspensão dos esporos na concentração na ordem de grandeza de 10^6 células/mL.

Tabela 3.1- Composição dos meios usados para produção dos complexos enzimáticos.

	Soro	de levedura	Extracto	Lactose	Celulose
Meio 1*	60g/L		3g/L	-	-
Meio 2*	60g/L		3g/L	-	20g/L
Meio 3*		-	3g/L	40g/L	-
Meio 4*		-	3g/L	40g/L	20g/L

*Sais contidos em todos os meios: MgCl₂ (0,05g/L); MnCl₂ (0,05 g/L); ZnCl₂ (0,05g/L)



Figura 3.7- Meio fermentado para produção de enzimas.

3.6 - Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo foram utilizados como meio de cultura uma solução de água de batata (200 g/L) e glicose 20 g/L. A batata foi cozida por uma hora e descartada, à água do cozimento foi adicionado glicose e homogeneizado. O meio foi colocado em erlenmeyers de 250 mL de volume. Este foi tampado com tampão de algodão envolto em gaze e autoclavados a 1,0 atm durante 20 min. Esporos de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, obtidos por raspagem do meio de manutenção, foram adicionados a água de batata com glicose sendo cada fungo em um erlenmeyer contendo 250 mL de água de batata com glicose. O meio inoculado foi deixado em agitação de 130 rpm em shaker por 48h em temperatura ambiente de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.7 – Concentração de enzimas

A concentração enzimática foi realizada pelo método “salting-out” (precipitação salina) utilizando sulfato de amônio na concentração de 400 g/L, da mistura sal e extrato enzimático bruto. Com ajuste de pH para 6,5 e manutenção da mistura salina a 4°C por um período de 12h (overnight) seguido de centrifugação a 12500 rpm e solubilização do precipitado em água em um volume correspondente a 1/3 do volume inicial.

3.8 - Atividade enzimática

As atividades de β -galactosidase e celulase presentes no meio fermentativo foram determinadas pelo método das taxas iniciais de reação usando método espectrofotométrico do ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959) para quantificação do açúcar redutor. Para beta-galactosidase a atividade foi definida pela velocidade de formação de açúcar redutor total (ART) gerada pela hidrólise de uma solução de lactose na concentração de 10 g/L a temperatura de 37°C a pH 6,5 e expressa em unidades/mL sendo uma unidade (U) corresponde a geração de um micromol de glicose por minuto. A atividade de celulase foi quantificada pela hidrólise de solução de carbox metilcelulose na concentração de 5 g/L em pH 4,5 e temperatura e 45°C e expressa da mesma forma descrita para beta-galactosidase.

Nas determinações foi utilizado um microrreator de mistura, com volume total de 200 mL, com camisa externa para circulação de água (Figura 3.6) proveniente de um banho termostatizado (Figura 3.7) para controle de temperatura e acoplado a agitador magnético Ika labortechnik RCT basic utilizado nos experimentos. A mistura reacional era constituída de 20 mL de solução do substrato de lactose ou celulose e 5 mL de complexo enzimático e agitada por 20 min, durante esta determinação alíquotas de 1 mL foram tiradas nos tempos 0, 5, 10, 15 e 20 min. A produção de proteína foi determinada pelo método espectrofotométrico com leitura UV dos complexos enzimáticos produzidos a 280 nm e as absorbâncias foram comparadas a curva de calibração construída com albumina (Apêndice 1).

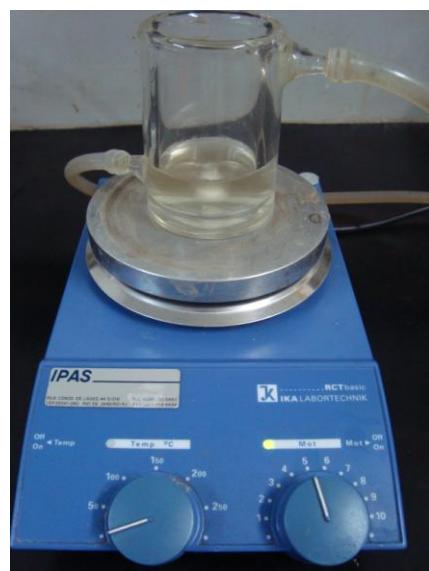


Figura 3.8 - Microrreator de mistura com camisa acoplado a agitador magnético.



Figura 3.9- Banho termostatizado empregado.

3.9 - Estudo da hidrólise enzimática

Para avaliação da capacidade hidrolítica das enzimas geradas foi realizado o estudo da hidrólise da celulose na concentração de 20 g/L em pH 4,5 e temperatura de 45°C e da lactose na concentração de 40 g/L em pH 6,5 a 37°C em reator batelada com agitação magnética com controle de temperatura. Nestes estudos o meio fermentado foi separado das células por centrifugação a 12500 rpm por 10 minutos e utilizado como extrato enzimático bruto adicionado as soluções de lactose e celulose na proporção de um volume de meio para um volume das soluções (misturas, dos meios) sendo retiradas alíquotas em determinados tempos. Nos experimentos foi utilizado um microrreator de mistura, com volume total de 200 mL, com camisa externa para circulação de água proveniente de um banho termostatizado para controle de temperatura e acoplado a agitador magnético Ika Labortechnik RCT basic utilizado nos experimentos. O volume reacional foi de 25 mL. A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5 – dinitrosalicílico (MILLER, 1959). As absorbâncias obtidas das leituras foram comparadas com a curva de calibração construída com padrão de glicose (Apêndice1).

3.10 – Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido 3,5 – dinitrosalicílico (MILLER, 1959). O método de DNS baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico e, ao mesmo tempo, na oxidação do grupo aldeído ou cetônico a grupos carboxílicos, com o desenvolvimento da cor laranja-marrom intenso.

O método de DNS utiliza os reagentes ácido dinitrosalicílico, sal de Rochelle e hidróxido de sódio, cada uma com uma função específica.

A determinação da concentração de açúcares redutores foi feita adicionando 1 mL da amostra diluída a 2 mL do reagente DNS em Tubos de Folin-Wu e levada para um banho em água fervente por 5 minutos. Após este tempo, resfriavam-se os tubos em banho com água em temperatura ambiente e completava o volume a 25 mL com água destilada, os quais eram homogeneizados e a seguir realizada a leitura da absorbância.

A calibração do zero no aparelho foi feita utilizando um teste em branco, onde 1 mL de água destilada substituía a amostra, seguindo o mesmo procedimento. O método foi

previamente padronizado por uma curva de calibração de glicose (0,1 a 1,0 mg/mL com intervalos de 0,1 g/L). As leituras foram realizadas a 540 nm. .



Figura 3.10- Espectrofotômetro utilizado para leitura das análises de etanol e açúcares.

3.11 - Fermentação para produção do etanol e quantificação do etanol

As fermentações alcoólicas foram realizadas com seis meios de composição variadas apresentadas na Tabela 3.2. Em um primeiro momento os meios foram hidrolisados com complexos enzimáticos produzidos com *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* por 72 h conforme descrito na Tabela 3.2, em alguns meios foi adicionado ácido clorídrico por 1 dia ajustando o pH em 1. As fermentações alcoólicas foram realizadas em erlenmeyer com volume final de 100 mL à temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com agitação 130 rpm em shaker por 48 h a pH 4,5.

A levedura utilizada para a fermentação alcoólica foi a cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 produzida pela Mauri do Brasil na forma seca com uma concentração na ordem de grandeza de 10^6 células/mL. Os elenmeyers foram pesados para observar a concentração de gás carbônico. As amostras foram submetidas à centrifugação em uma centrífuga Beckman Couter modelo J-25 a 12500 rpm por 15 minutos.

Tabela 3.2- Descrição dos meios de fermentação para produção de etanol.

Ensaio	Descrição
A+C	Soro 60g/l, celulose 20g/L, 20mL complexo enzimático produzido com <i>Aspergillus</i> .
[A+C]	Soro 60g/l, celulose 20g/L, 20mL complexo enzimático produzido com <i>Aspergillus</i> com adição de ácido clorídrico por 1 dia.
A+T+C	Soro 60g/l, celulose 20g/L, 10mL complexo enzimático produzido com <i>Aspergillus</i> e 10mL do complexo enzimático produzido por <i>Trichoderma reesei</i> .
[A+T+C]	Soro 60g/l, celulose 20g/L, 10mL complexo enzimático produzido com <i>Aspergillus</i> e 10mL do complexo enzimático produzido por <i>Trichoderma reesei</i> . com adição de ácido clorídrico por 1 dia.
A+T+R	Soro 60g/l, casca de arroz tratada 20g/L, 10mL complexo enzimático produzido com <i>Aspergillus</i> e 10mL do complexo enzimático produzido por <i>Trichoderma reesei</i> .
[A+T+R]	Soro 60g/l, casca de arroz tratada 20g/L, 10mL complexo enzimático produzido com <i>Aspergillus</i> e 10mL do complexo enzimático produzido por <i>Trichoderma reesei</i> . com adição de ácido clorídrico por 1 dia.

A - Enz. *Aspergillus*; T - Enz. *Trichoderma*; C – Celulose; R - Resíduo casca; [] – hidrólise ácida

O etanol foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A Tabela 3.3 apresenta os dados do cromatógrafo. A cromatografia líquida é uma técnica de separação física conduzida por uma fase líquida. A amostra é separada em seus componentes constituintes (ou analitos), distribuindo-se entre a fase móvel (líquido que flui) e uma fase estacionária (absorventes embalados dentro de uma coluna). Este método é rápido e preciso, tem operação automática, alta sensibilidade de detecção e pode ser aplicado para quantificação de diversas amostras (DONG, 2006). As áreas obtidas das leituras foram comparadas com a curva de calibração construída com padrão de etanol (Apêndice 3).

Tabela 3.3- Dados do cromatógrafo.

Dados Cromatógrafo	
Marca	HPLC Shimadzu modelo LC-20A Proninence
Fase móvel	Água deionizada (filtrada em membrana de acetato de celulose 0,20 microlitros, desgaseificada com sonicador)
Detector	Índice de refração
Coluna	SUPELCOGOGEL Ca (HPLC 30cmX7,8mm)
Fluxo de bomba	0,5 ml/min
Temperatura	80 graus Celsius
Volume de injeção	20 microlitros (as amostras foram filtradas em Millipore 0,22 micrometros)



Figura 3.11- HPLC Shimadzu modelo LC-20A Prominence utilizado nas análises de açúcar

CAPITULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Fermentações em estado líquido para produção de enzimas

4.1.1– Seleção de meio de cultura

A Figura 4.1 mostra o crescimento celular do fungo *Aspergillus niger* obtido nas fermentações dos meios testados (Tabela 3.1). É possível observar que todos meios foram satisfatórios no que se refere ao crescimento sendo que no meio 2 foi constatado maior crescimento.

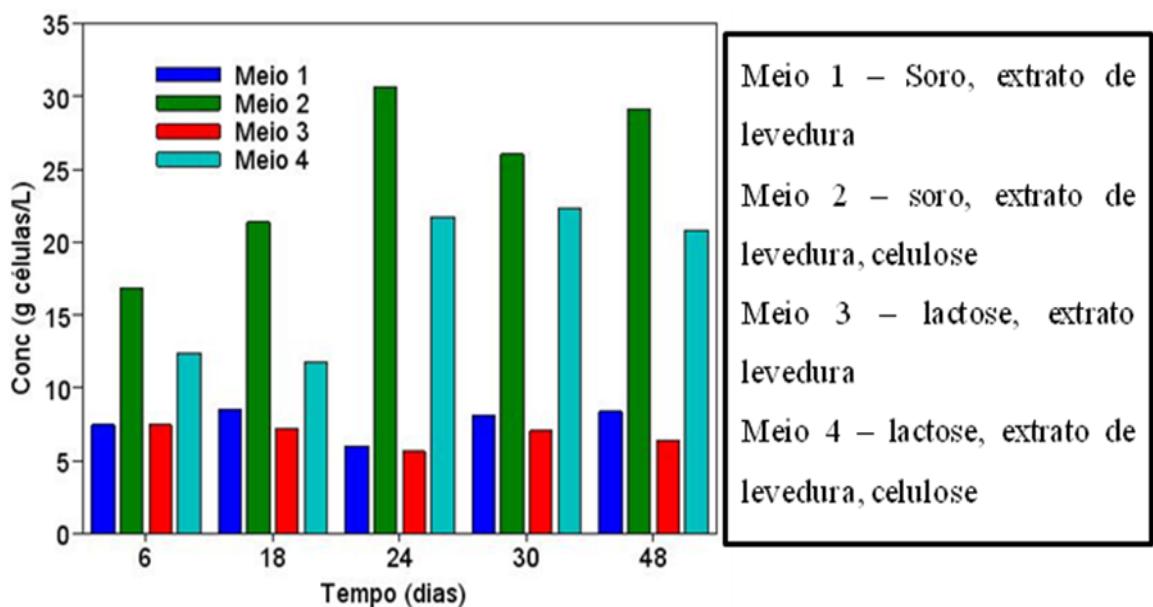


Figura 4.1 - Crescimento celular do fundo *Aspergillus niger*

A Figura 4.2 representa as atividades obtidas para β -galactosidase em diferentes tempos de fermentação para os quatro meios distintos. Pode-se observar, que a cepa escolhida (*Aspergillus Níger*) fermentou melhor em meio contendo lactose do que em meio com soro e que o menor tempo de fermentação 6h utilizado foi o que favoreceu a maior atividade enzimática.

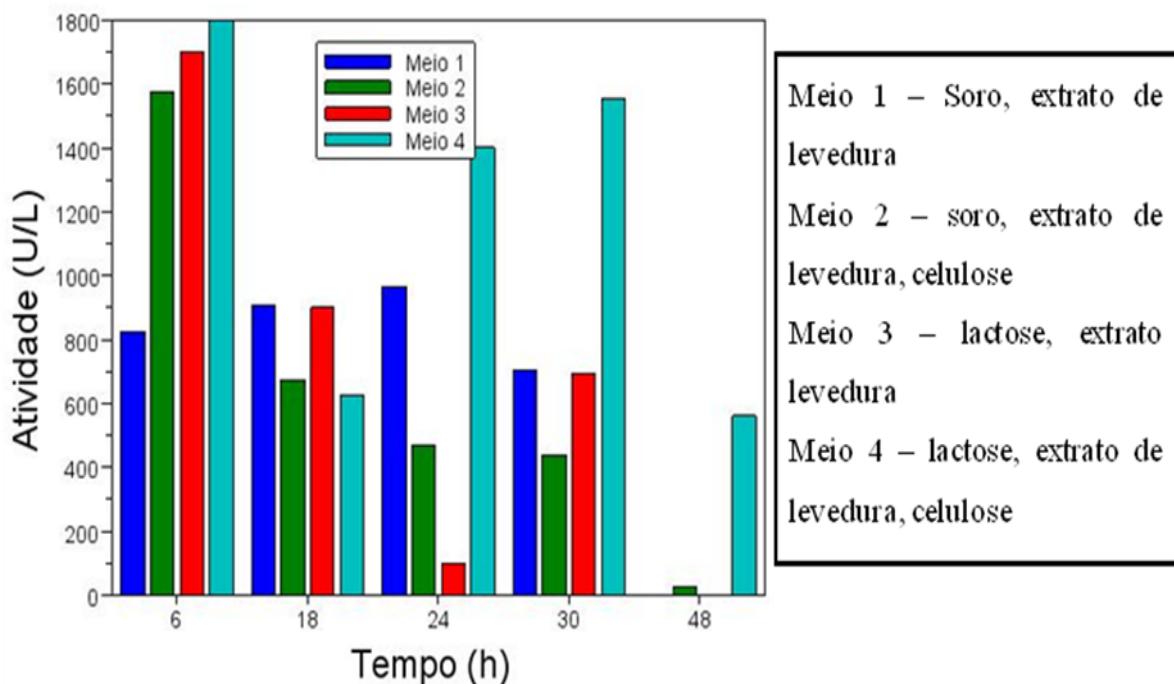


Figura 4.2 – Atividades para β -galactosidase obtida para diferentes tempos.

A Figura 4.3 representa as atividades em celulase e a Figura 4.4 a produtividade desta enzima, pode-se observar que embora o maior tempo 48h utilizado foi o que mais favoreceu a atividade, verificou - se maior produtividade da enzima para o menor tempo.

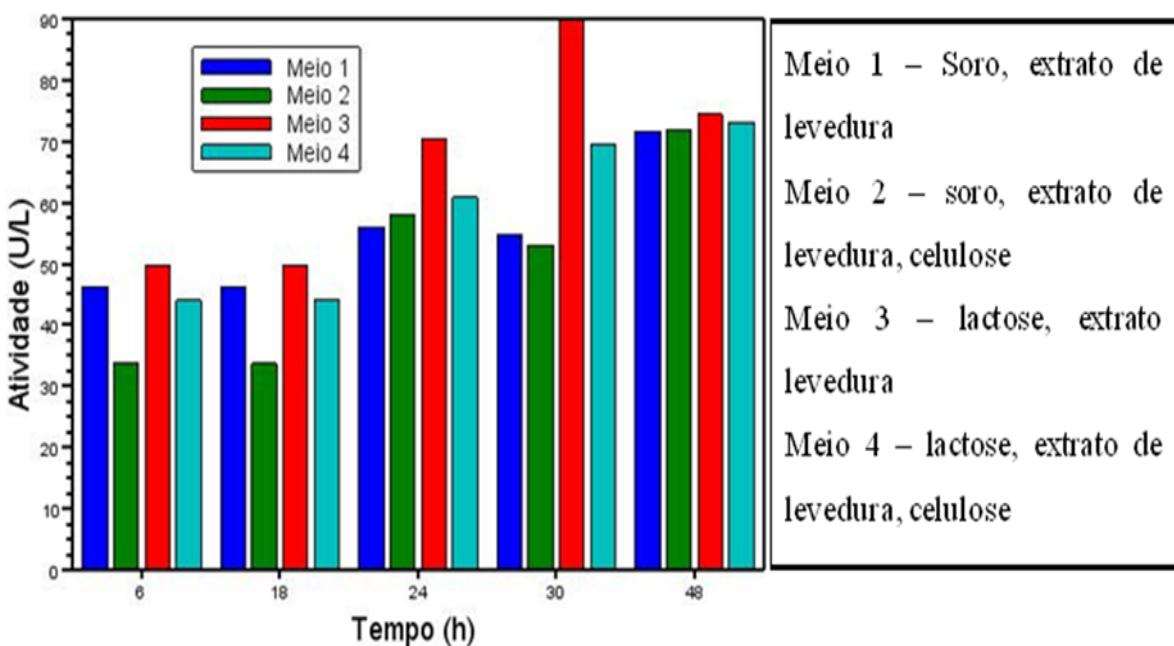


Figura 4.3 – Atividades para celulase obtida para diferentes tempos.

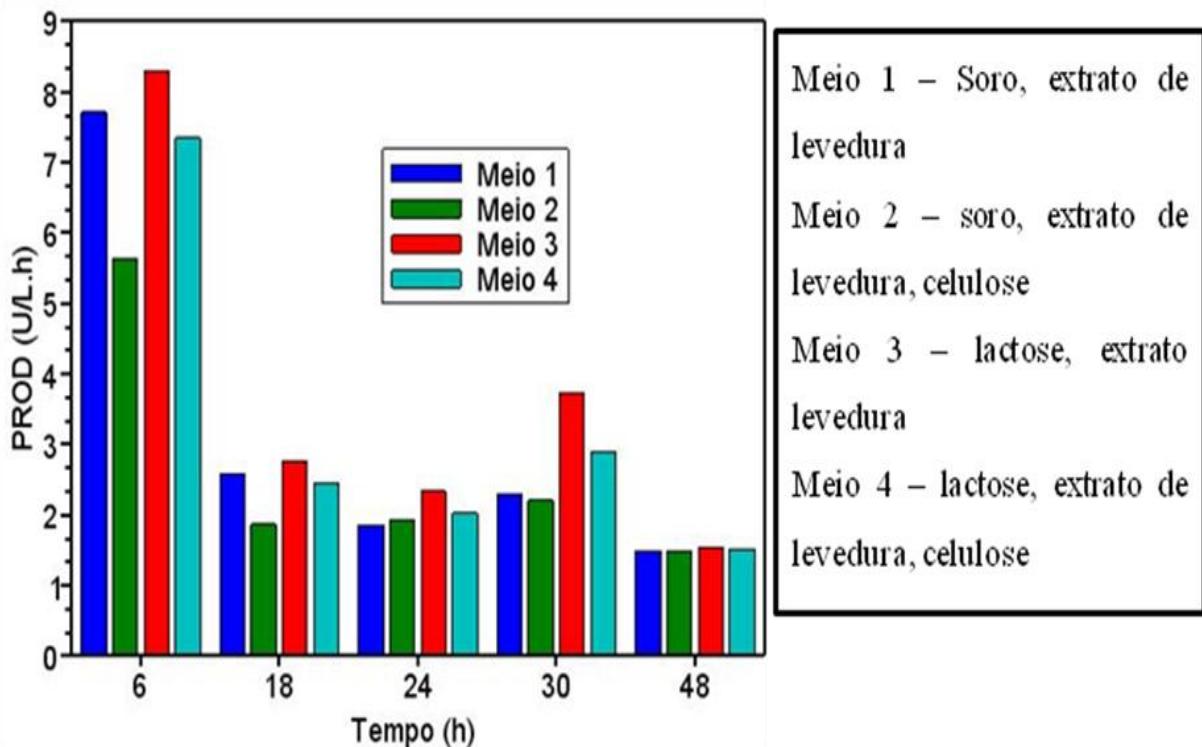


Figura 4.4 - Produtividade para celulase obtida para diferentes tempos.

Diante das atividades para duas enzimas e produtividade para os quatro meios tem-se que os meios 3 e 4 foram as condições mais favoráveis para produção enzimática e que o tempo de fermentação de 6h é o que favoreceu uma maior produção de enzimas, assim optou-se pelo uso do meio 4 e tempo de fermentação de 6h como condições de estudo destinado a investigar o uso das enzimas de interesse.

A Figura 4.5 e 4.6 mostram avaliação do meio escolhido, meio 4, para 1,3, 5, 6, 8 e 12 h de fermentação. Pelos resultados tem-se que para 10 e 12 h de fermentação tem-se, respectivamente, as melhores atividades em β -galactosidase. Para enzima celulase tem-se que 12 h apresentou a melhor atividade. Caso o tempo escolhido seja 10h tem-se a redução da atividade da celulase comparada a 12h é de 26,6%, já a escolha de 12h gera uma redução na atividade de β -galactosidase de 3% assim 12 h foi o tempo de fermentação adotado.

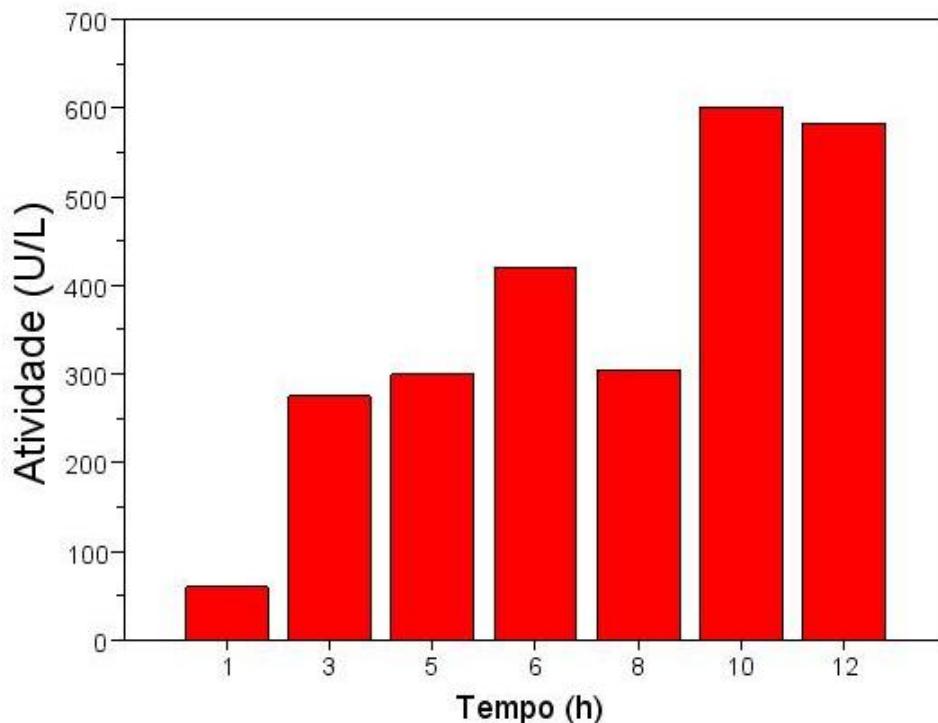


Figura 4.5 – Atividades para β -galactosidase obtida para diferentes tempos.

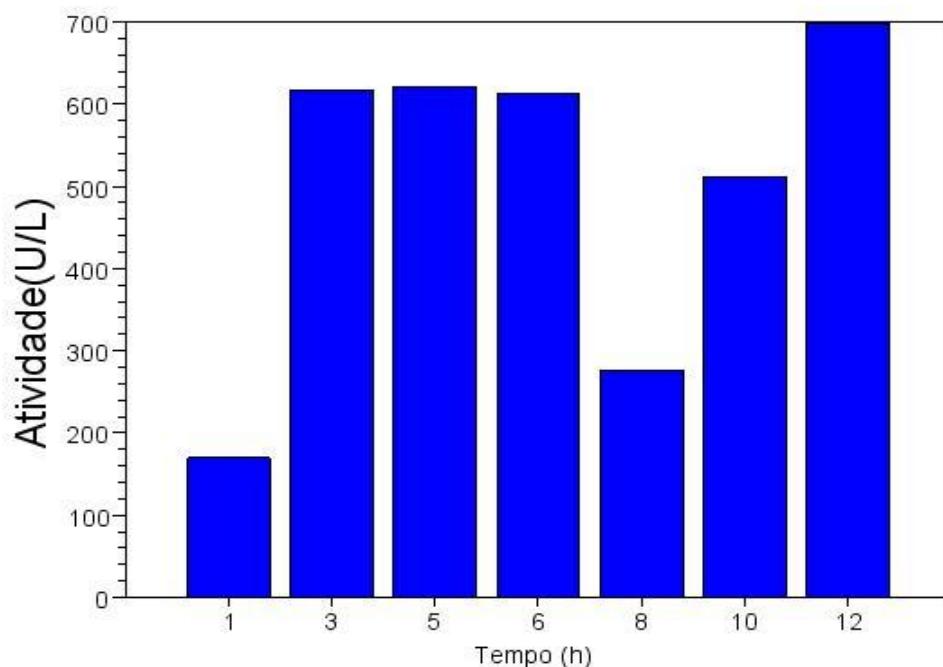


Figura 4.6 – Atividades para celulase obtida para diferentes tempos.

4. 2-Avaliação preliminar do complexo enzimático

As Figuras 4.7, a 4.9 mostram o teste do complexo enzimático em biomassa de soro e celulose, para 24h de reação. Pode-se observar, que a enzima consegue hidrolisar estas biomassas de forma satisfatória para tempos superiores à 6h de hidrólise. O que significa, que a enzima em questão tem potencial para ser utilizada na hidrólise de biomassa mista de soro e celulose.

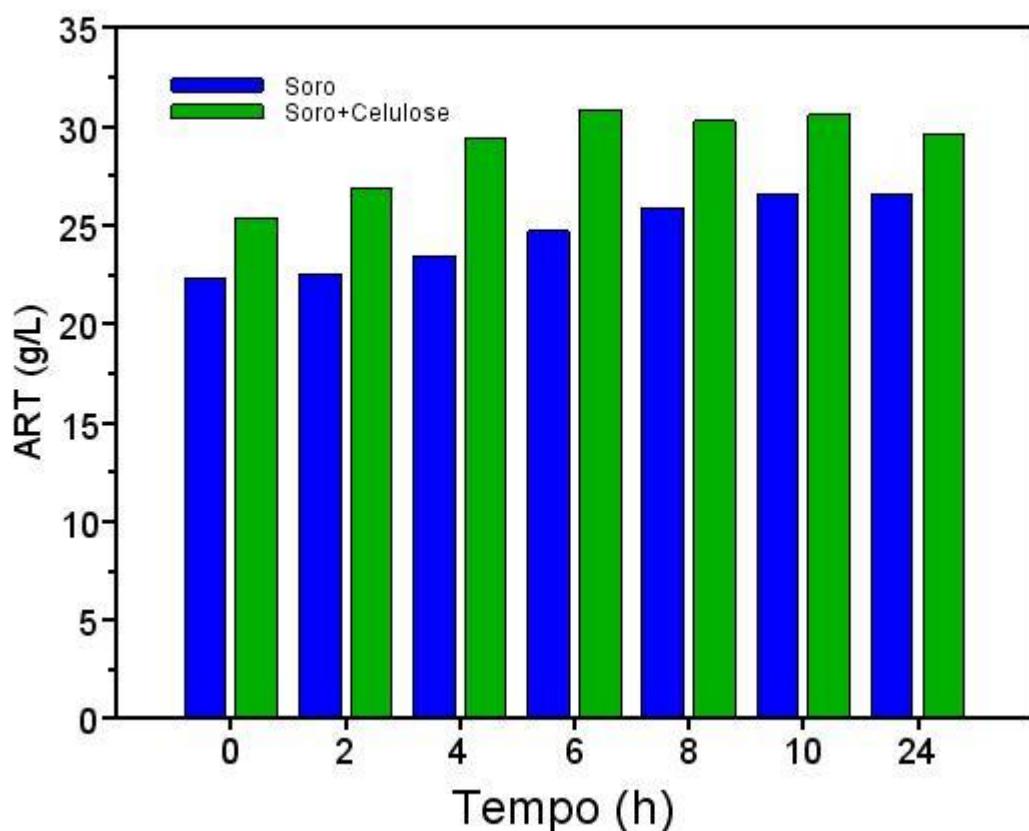


Figura 4.7- Hidrólise de soro 40g/L e celulose 20g/L.

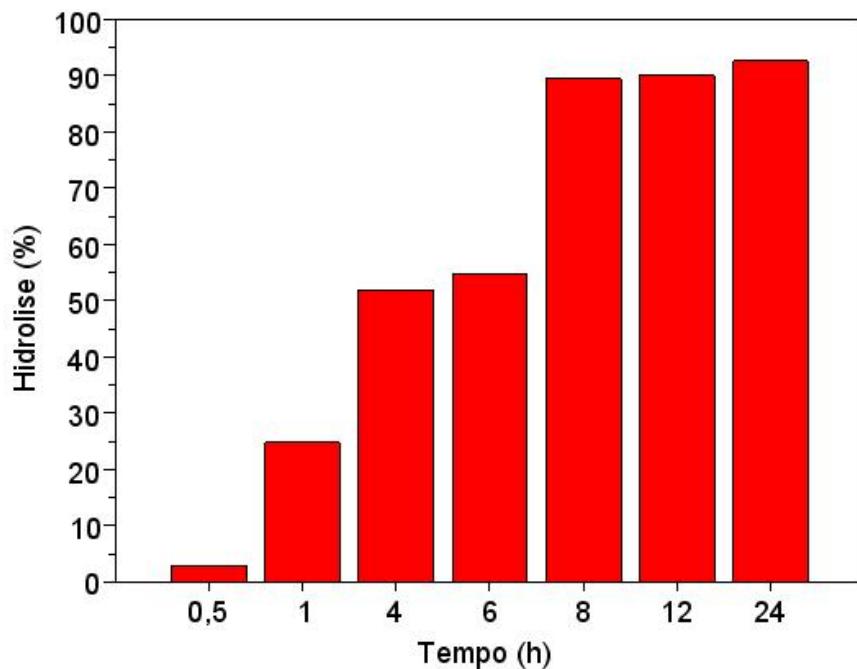


Figura 4.8 – Determinação da ação hidrolítica do extrato enzimático.

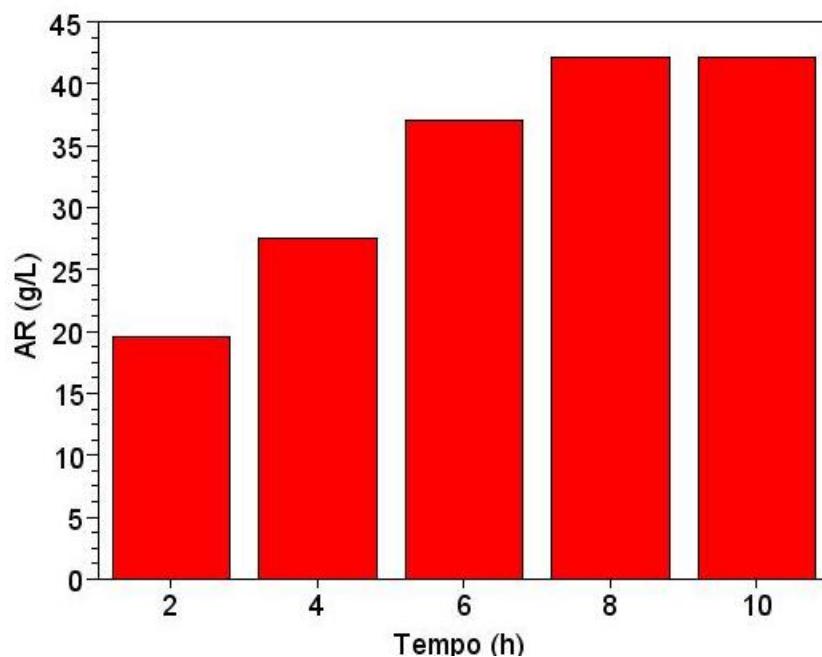


Figura 4.9 – Determinação da concentração total de açúcar redutor.

4.3 – Complexos enzimáticos dos fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*

As Figuras 4.10 (a e b) e 4.11 (a e b) mostram as atividades em celulase e β -galactosidase por volume de meio e massa de proteína obtida pelos complexos enzimáticos produzidos por *Aspergillus* e *Trichoderma* na forma bruta e concentrada com sulfato de amônio. As Figuras mostram que as condições de concentração não foram capazes de aumentar a atividade de celulase e β -galactosidase produzidos pelo *Trichoderma*, porém no complexo enzimático produzido pelo *Aspergillus*ouve uma melhora na atividade de celulase e β -galactosidase. Também é possível observar, que houve com a concentração dos complexos enzimáticos uma redução na atividade de celulase.

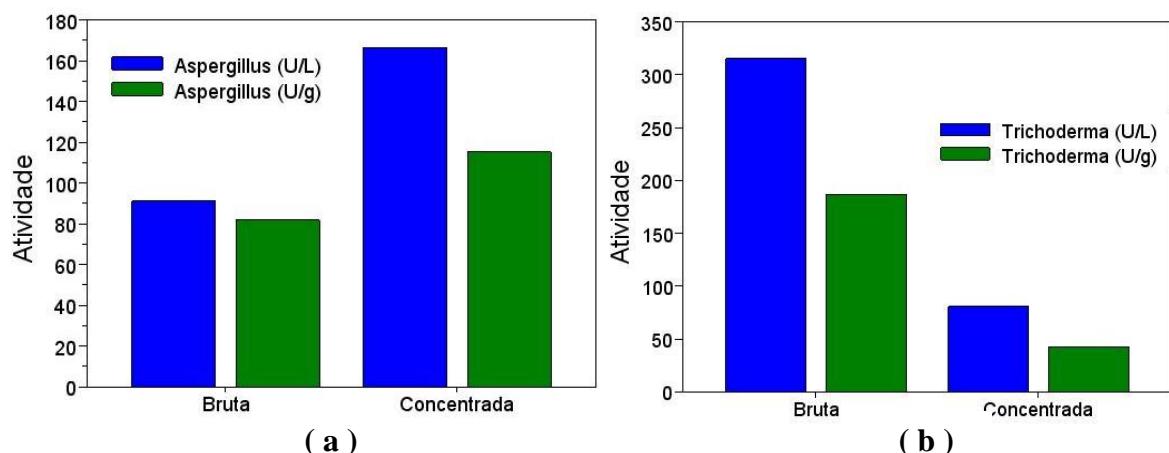


Figura 4.10- Atividades de celulase por volume de meio e massa de proteína obtida pelo complexo enzimático produzido por *Aspergillus* (a) e *Trichoderma* (b).

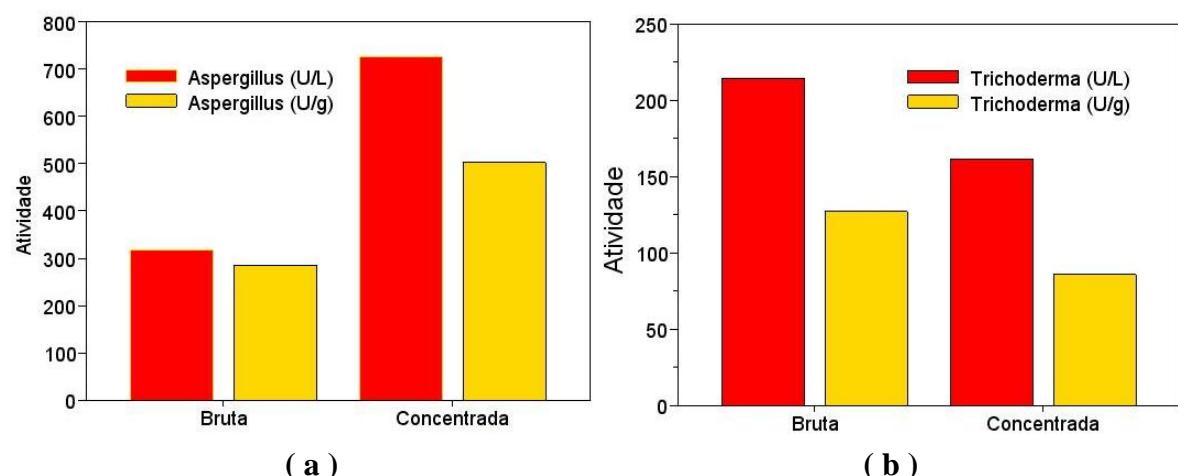


Figura 4.11-Atividades de β -galactosidase por volume de meio e massa de proteína obtida pelo complexo enzimático produzido por *Aspergillus* (a) e *Trichoderma* (b).

A Figura 4.12 mostra a recuperação enzimática em porcentagem. O complexo enzimático produzido pelo *Trichoderma* apresentou uma menor recuperação enzimática, para celulase e β -galactosidase quando comparado com o complexo enzimático produzido pelo *Aspergillus*. O complexo produzido pelo *Trichoderma* conseguiu em celulase aproximadamente 8% em recuperação enzimática enquanto o complexo produzido pelo *Aspergillus* recuperou aproximadamente 60%. Em β -galactosidase o complexo enzimático do *Trichoderma* recuperou aproximadamente 25% e o complexo do *Aspergillus* recuperou aproximadamente 86%. Também é possível observar que a recuperação enzimática é maior em β -galactosidase nos complexos enzimáticos produzidos.

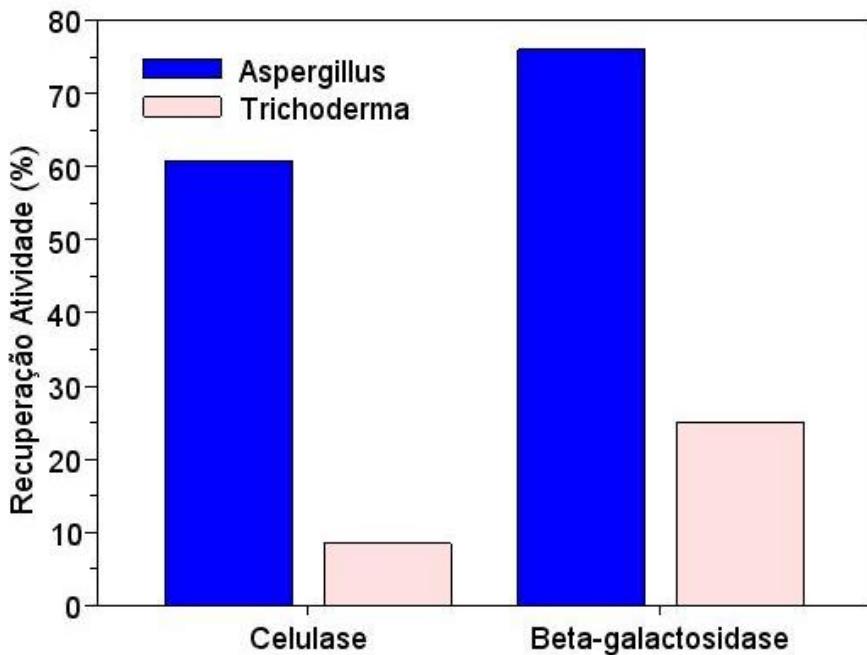


Figura 4.12 - Recuperação enzimática

As Figuras 4.13 e 4.14 mostram as atividades enzimáticas dos complexos enzimáticos produzidos com *Aspergillus* e *Trichoderma* em termos de β -galactosidase e celulase na forma bruta e concentrada. Pode-se observar, que tanto o *Aspergillus niger* quanto o *Trichoderma reesei* são capazes de produzir β -galactosidase e celulase. Embora a atividade enzimática não seja capaz de descrever características destas enzimas como estabilidade enzimática pode - se observar que o *Aspergillus niger* apresenta maior produção de β -galactosidase e o *Trichoderma reesei* maior produção de celulase. Pode – se observar, que a concentração com sulfato de amônio reduziu a atividade dos complexos enzimáticos de *Trichoderma reesei* e aumentou as atividades dos complexos enzimáticos do *Aspergillus niger*. Este fato pode ser

causado por baixa estabilidade das enzimas do *Trichoderma reesei* ou perda do conteúdo enzimático ou mesmo a retirada de cofatores no processo de precipitação

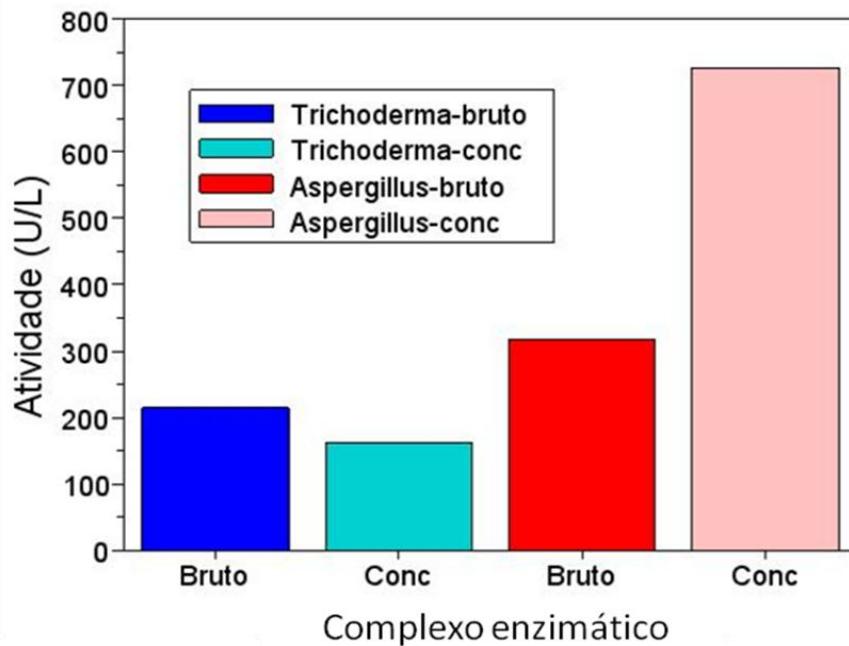


Figura 4. 13- Atividade em β -galactosidase dos complexos enzimáticos produzidos por *Aspergillus* e *Trichoderma* na forma bruta e concentrada.

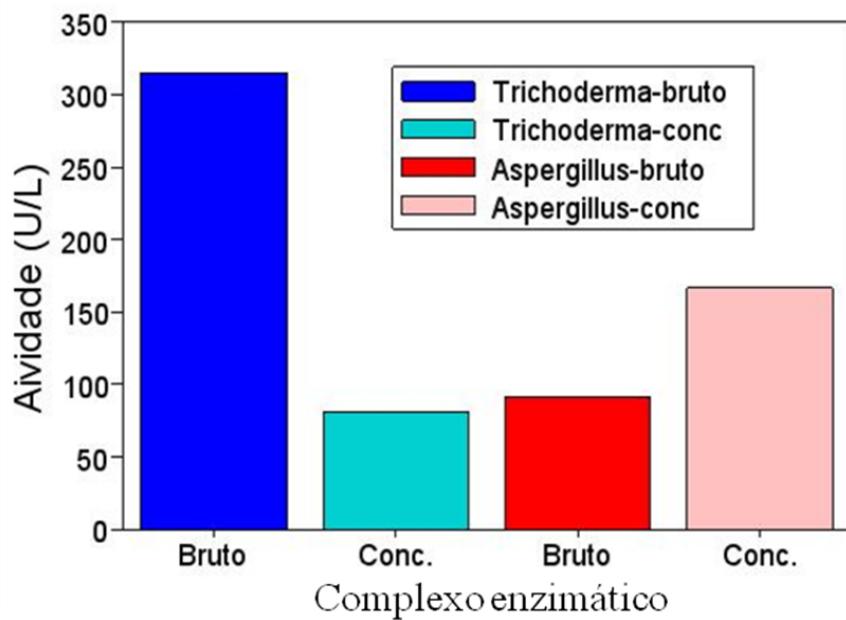


Figura 4.14-Atividade em celulase dos complexos enzimáticos produzidos por *Aspergillus* e *Trichoderma* na forma bruta e concentrada.

4.4 –Avaliação da hidrólise de celulose

A Figura 4.15 mostra o comportamento de hidrólise da celulose gerada pela ação do complexo enzimático de *Aspergillus niger* na forma bruta e concentrada com sulfato de amônio. Pode-se observar, que o teste de hidrólise comprova as informações obtidas pela atividade inicial: a menor atividade corresponde a uma menor hidrólise ao longo do tempo e que a enzima concentrada é menos estável que a enzima bruta, pois para tempos superiores a 4h de hidrólise há redução da atividade do complexo enzimático concentrado. Assim, para aplicações práticas, o uso do complexo concentrado requer que o mesmo tenha sua estabilidade melhorada pelo uso de aditivos.

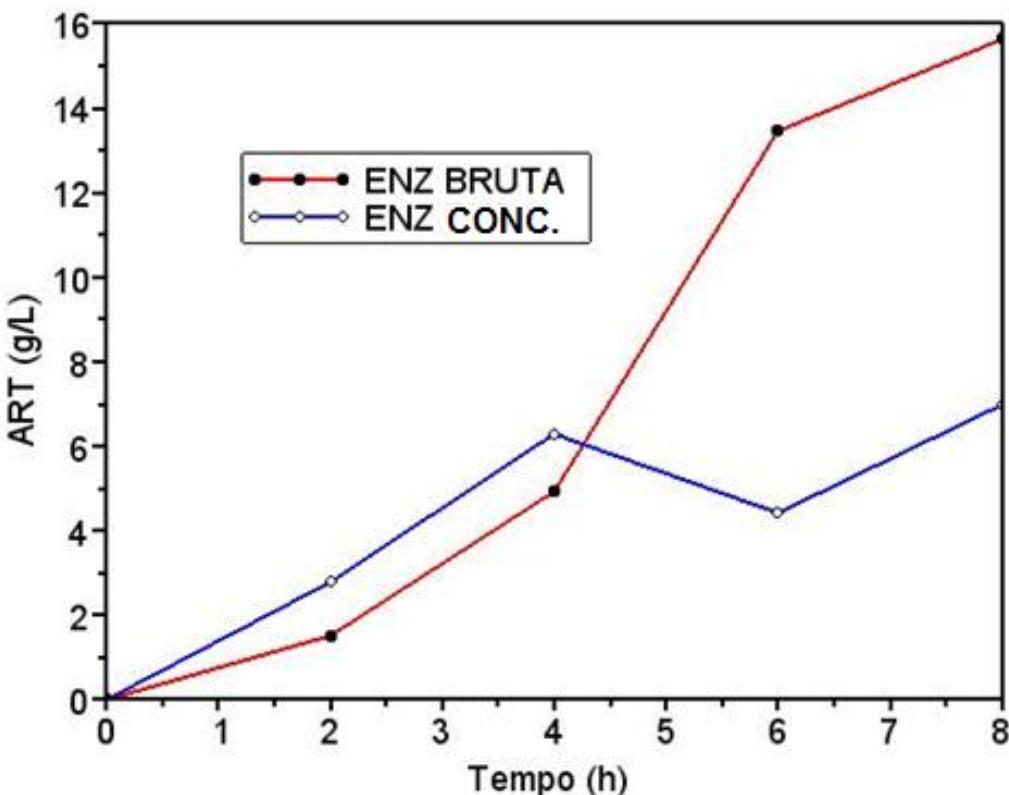


Figura 4.15 - Hidrólise da celulose 20g/L com o complexo produzido por *Aspergillus niger* na forma bruta e concentrada.

A Figura 4.16 mostra a comparação da hidrólise com os complexos produzidos pelo *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* concentrados. Na comparação o complexo produzido pelo *Aspergillus niger* mostrou – se superior ao complexo produzido com o *Trichoderma reesei* o que pode ser consequência de perda de estabilidade ou baixa produção da enzima

β -glucosidase sendo que esta segunda explicação é a mais provável, pois segundo Kovács *et al.*, (2009) o complexo enzimático produzido pelo *Trichoderma reesei* apresenta baixa produção das enzimas do tipo β -glucosidase que é a responsável pela quebra da celobiose em glicose.

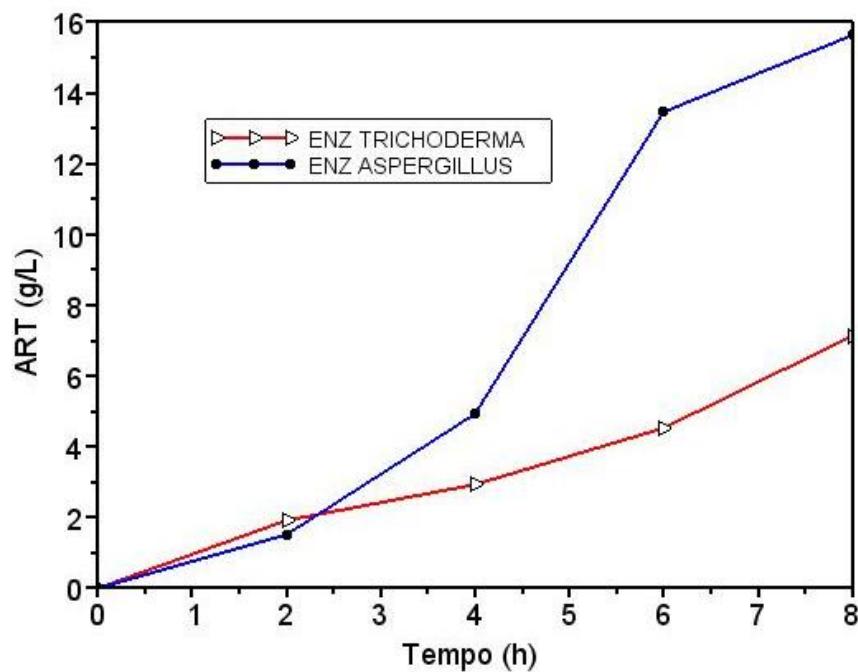


Figura 4.16- Comparaçao dos complexos produzidos pelo *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* na forma concentrada.

As Figuras 4.17 e 4.18 mostram a hidrólise da celulose 20g/L com temperatura 45°C e pH 4,5 na proporção 1:1 de extrato enzimático e solução de celulose com complexos enzimáticos gerado pela ação do complexo enzimático de *Trichoderma reesei* na forma bruta e concentrada (com sulfato de amônio). Pode-se observar, nas Figuras 4.17 e 4.18 que o teste de hidrólise comprova as informações obtidas pela atividade inicial: a menor atividade corresponde a uma menor hidrólise ao longo do tempo. A Figura 4.19 mostra a hidrólise da mistura não concentrada de enzimas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*. A Figura 4.20 mostra a hidrólise da celulose 20g/L com complexo enzimático bruto do *Trichoderma reesei* e da mistura de enzimas concentradas no mesmo eixo. É possível constatar por essa Figura que até 12h o comportamento da hidrólise é semelhante, mas a mistura dos complexos tem uma maior conversão de celulose em ART que o complexo enzimático bruto do *Trichoderma reesei* em tempos superiores a 12h, o que pode ser explicado pela maior estabilidade ou pela

ação diferenciada de hidrólise como, por exemplo, uma combinação entre a hidrólise final de cellobiose e a hidrólise da celulose a outros oligossacarídeos.

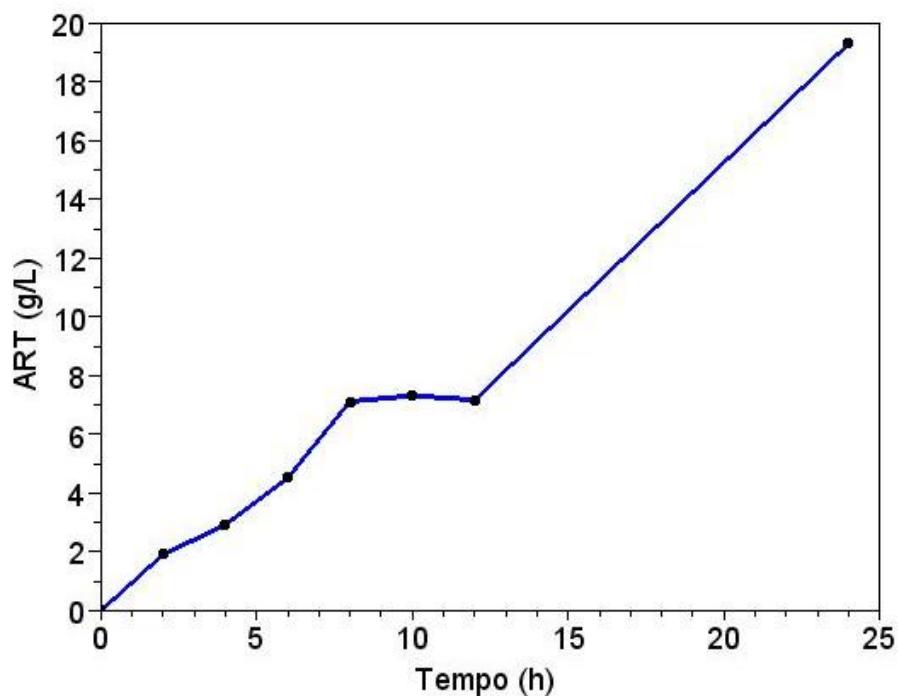


Figura 4.17-Hidrólise da celulose 20 g/L pelo complexo enzimático de *Trichoderma reesei* na forma bruta .

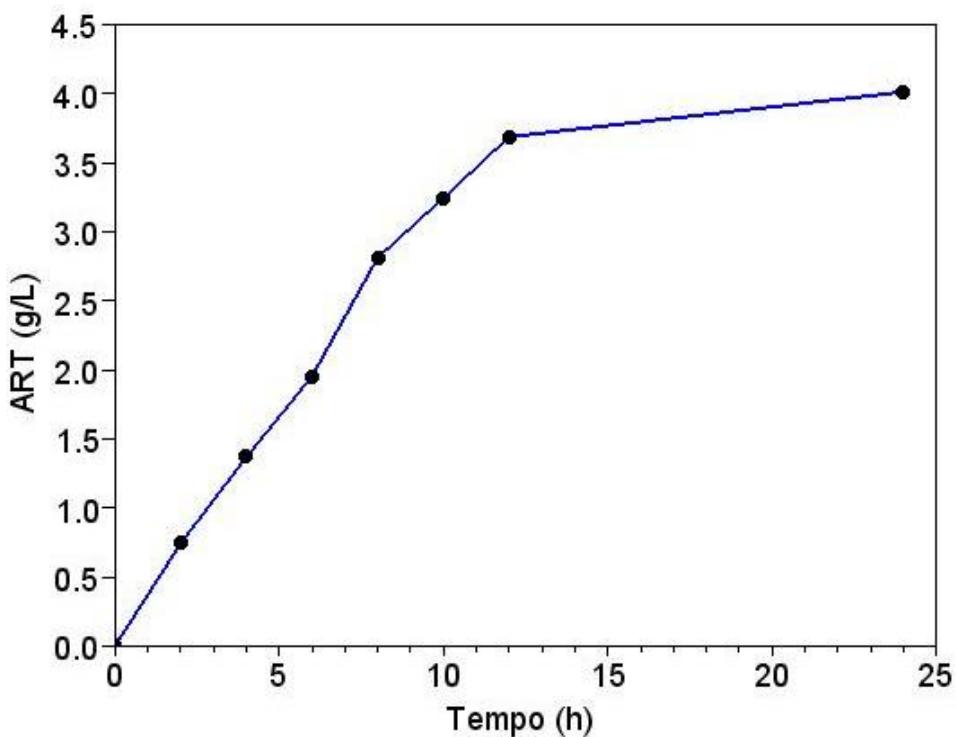
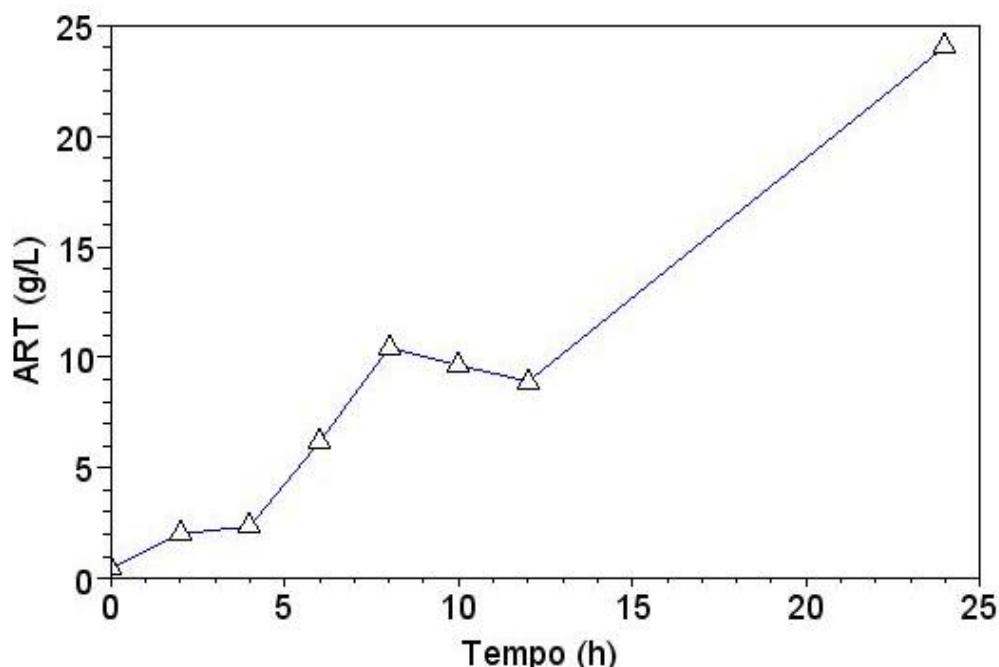


Figura 4.18-Hidrólise da celulose 20 g/L pelo complexo enzimático de *Trichoderma reesei* na forma concentrada.



Figuras 4.19 - Hidrólise da celulose 20 g/L gerada pela mistura de complexo enzimático de *Trichoderma reesei* misturado a complexo enzimático de *Aspergillus niger*.

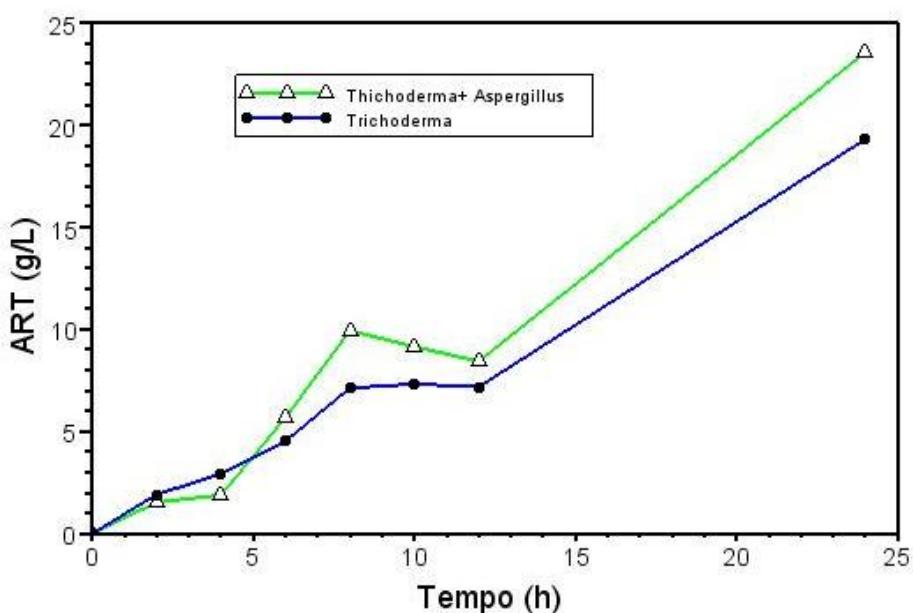


Figura 4.20 - Representação da hidrólise da celulose na forma individual do complexo bruto de *Trichoderma reesei* e da mistura dos complexos do *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*.

4.5 – Produção de etanol

A Figura 4.21 mostra a produção de etanol obtida nos diferentes sistemas estudados apresentados na Tabela 3.2 e Figura 4.22 (a e b) mostra de ART inicial e final nestas fermentações. A Figura 4.21 mostra que a situação de maior atividade obtida corresponde uma maior produção de etanol, mostra que o tratamento ácido reduziu a produção de etanol e que o uso da casca tratada tem uma disponibilidade menor de açúcar capaz de ser convertida em etanol o que pode ser observado na Figura 4.22.

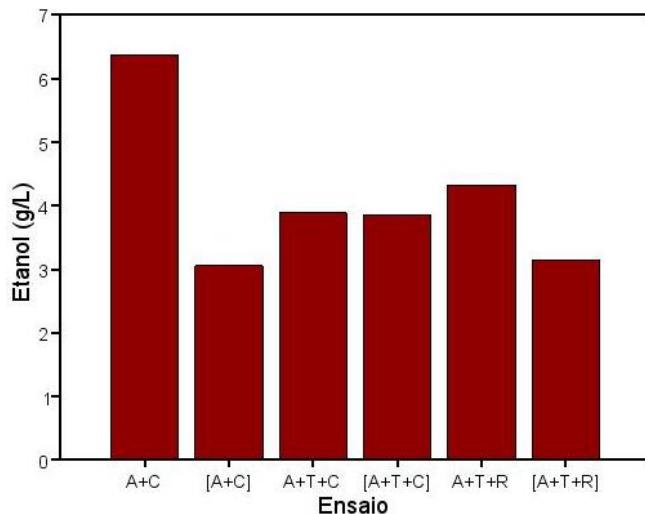


Figura 4.21-Etanol

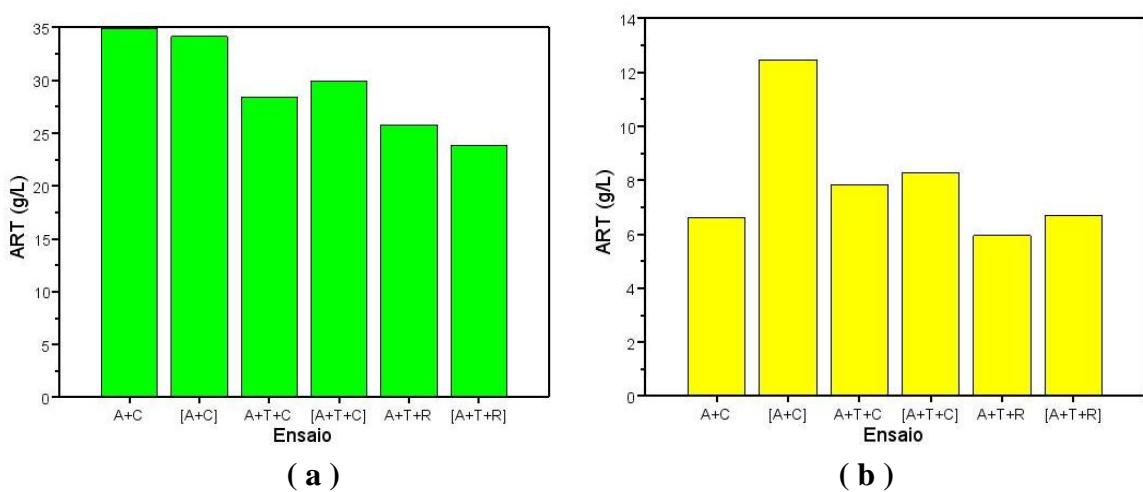


Figura 4.22-ART inicial (a) e final (b).

A – Enz. *Aspegillus*; T – Enz. *Trichoderma*; C – Celulose; R – Resíduo casca de arroz; [] - hidrólise ácida

A Figura 4.23 mostra o consumo de ART nas fermentações estudadas e Figura 4.24 apresenta uma comparação do ART inicial com a produção de etanol. A comparação entre os resultados da redução de concentração de ART e produção de etanol são coerentes, pois mostram que o maior consumo de ART está associado a uma maior produção de etanol.

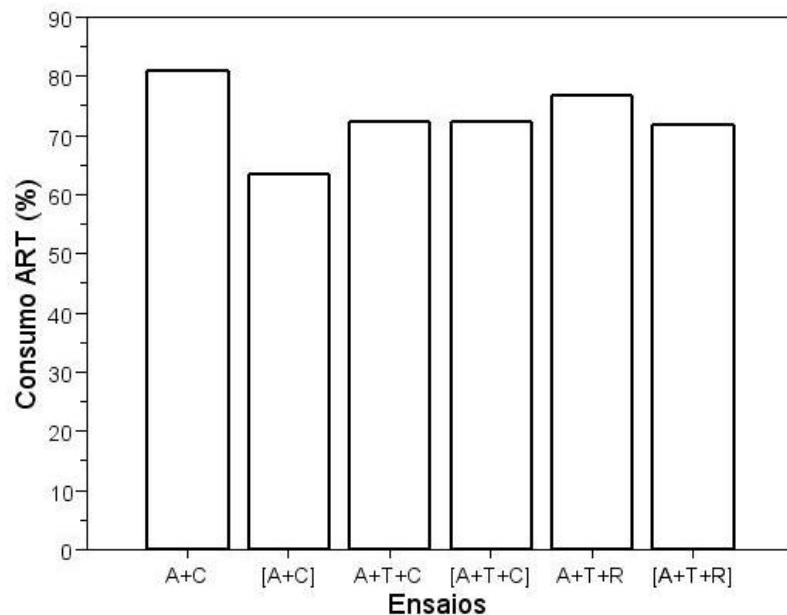


Figura 4.23-Consumo ART.

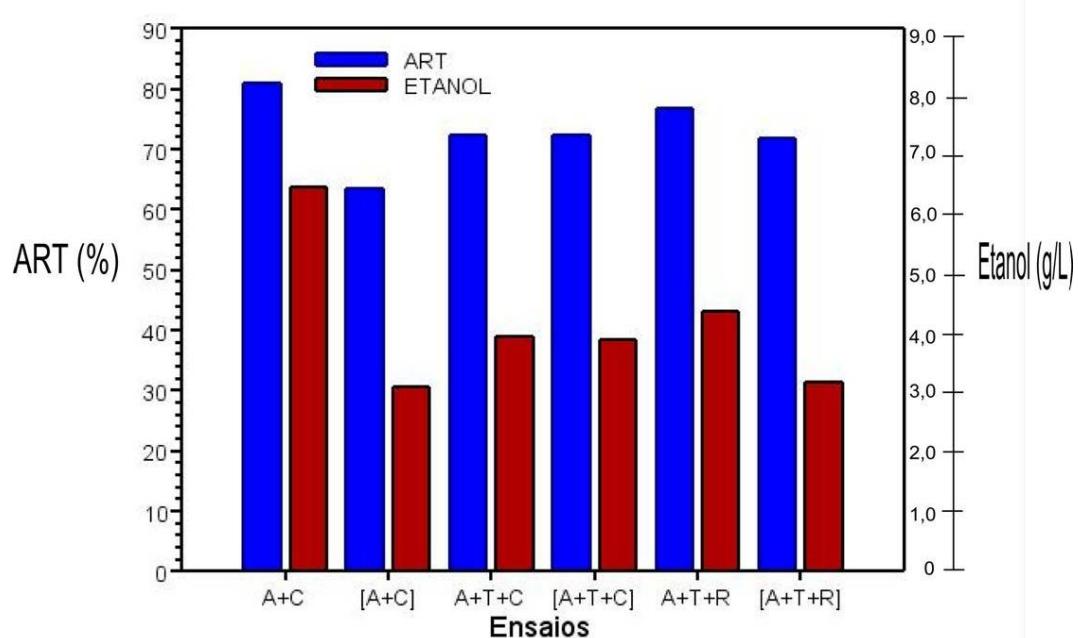


Figura 4.24 – Comparaçao ART inicial e produção de etanol

A – Enz. *Aspegillus*; T – Enz. *Trichoderma*; C – Celulose; R – Resíduo casca de arroz;
[] - hidrólise ácida

A redução na produção de etanol com o tratamento ácido pode ser explicado pela possível formação de inibidores e a redução comparativa da casca com a celulose é explicada pela maior complexidade da casca. Segundo Krishna (2000) a hidrólise ácida pode causar problemas com o produto final devido a formação de subprodutos que podem atrapalhar a formação do produto final. Ainda referente a redução da produção de etanol com o tratamento ácido cabe ressaltar, que uma possível explicação é a inibição ocorrida como mostrado na Figura 4.25.

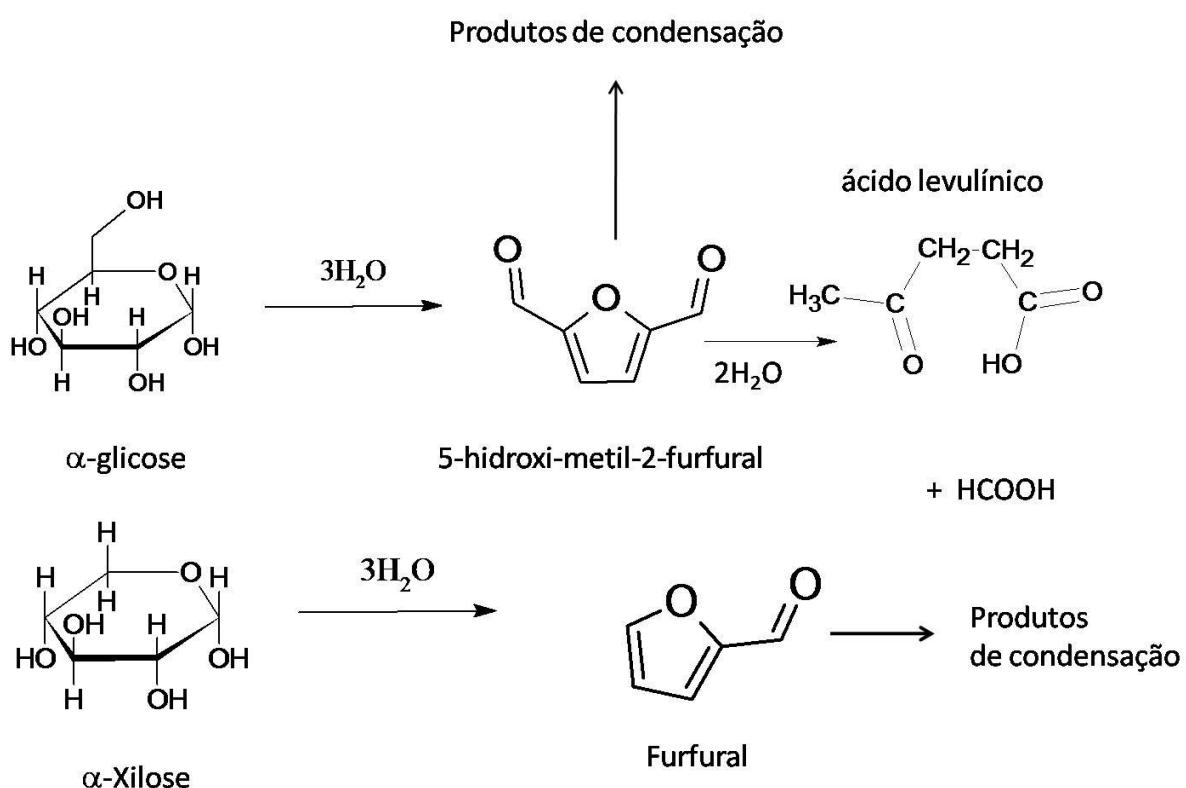


Figura 4.25- Formação de possíveis inibidores da fermentação etílica (Fonte: autor).

A Figura 4.26 mostra a evolução de gás carbônico observado durante a fermentação expressa em termos de produção acumulada. Esta Figura mostra, que ocorre consumo de substrato até o fim da fermentação, pois não foi observado estabilização no total de gás carbônico apresentado e mostra, também, que não foi possível associar o metabolismo a produção de etanol, ou seja, estes resultados sugerem que além do etanol há outros metabólicos.

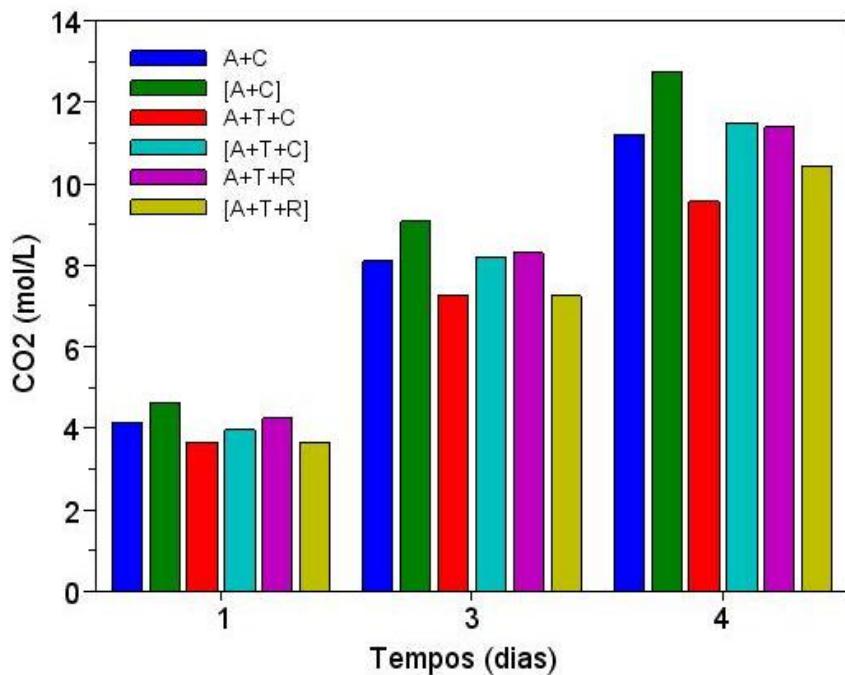


Figura 4.26 - Produção de gás carbônico

Figura 4.27 mostra as concentrações celulares no início e fim de cada fermentação. É possível observar que as diferentes condições testadas apresentaram um crescimento celular semelhante. Esta Figura, 4.26 e Figura 4.27, mostram que a menor produção de etanol não reflete um menor crescimento celular.

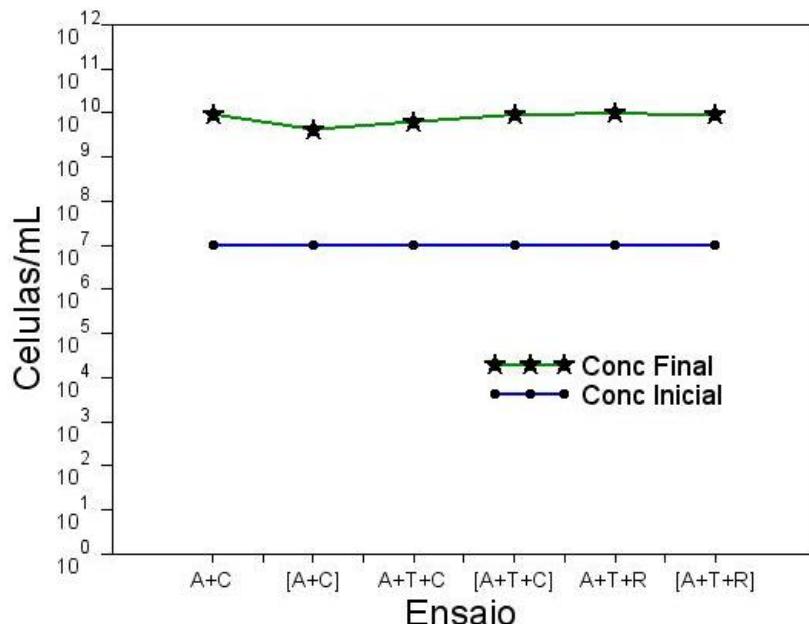


Figura 4.27- Concentração de células.

A – Enz. *Aspegillus*; T – Enz. *Trichoderma*; C – Celulose; R – Resíduo casca de arroz; [] - hidrólise ácida

Os baixos teores de etanol obtidos em todos ensaios (inferior a 10 g/L) pode ser parcialmente explicados pela baixa concentração de açúcar redutor total inicial (Figura 4.22) do sistema e pela complexidade do substrato que gera uma baixa conversão do açúcar redutor total final (Figura 4.22). Estes resultados mostram que as condições utilizadas neste trabalho precisam ser otimizadas para que o mesmo seja viável em relação à produção de etanol e também mostra que embora não seja viável o mesmo possibilita avaliar diferentes efeitos na fermentação alcoólica.

CAPITULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5- CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1- Conclusões

- ✓ A produção de complexo enzimático de *Aspergillus niger* ATCC 16404 por fermentação de lactose e celulose tem o melhor tempo de fermentação de 12h;
- ✓ Os complexos enzimáticos produzidos mostra capacidade de hidrolisar biomassa mista de soro e celulose;
- ✓ O complexo enzimático de *Trichoderma reesei* CCT 2768 tem maior atividade e capacidade hidrolítica da celulose quando em conjunto com o complexo enzimático de *Aspergillus niger*;
- ✓ Foi observado que a concentração do complexo enzimático de *Trichoderma reesei* com sulfato de amônio gerou perda de atividade;
- ✓ Nas condições testadas o *Aspergillus niger* mostrou se superior ao *Trichoderma reesei* no que se refere a atividade e estabilidade do complexo enzimático estudado;
- ✓ Os baixos teores de etanol obtidos em todos os ensaios (inferior a 10 g/L) pode ser parcialmente explicado pela baixa concentração de açúcar redutor total inicial.

5.2- Sugestões

- ✓ Avaliar a estabilidade da enzima;
- ✓ Comparar o complexo enzimático gerado com enzimas comerciais nas mesmas condições;
- ✓ Otimizar as condições de produção enzimática e fermentação alcoólica.;
- ✓ Avaliar processos de separação para as enzimas produzidas;

CAPITULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. L. F., SILVA C. M. S.. **Formação de um mercado internacional de etanol e suas inter-relações com os mercados de petróleo e açúcar.** XI Congresso Brasileiro de Energia, Rio de Janeiro, 2006.

ANDERSEN, M R; NIELSEN, M L; NIELSEN, J.. Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*, **Molecular Systems Biology**, v.4, 178, 1-13,2008

AQUARONE, E; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.. **Biotecnologia Industrial.** v.4. 1.ed. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2001

AQUIAR, C. M.. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*. (MESTRADO). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Paraná, 2010

ARANTES, V. & SADDLER, J.N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4. Disponível em www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4. Acesso em fevereiro de 2011.

ARISTIDOU, A. & PENTILLÄ, M. **Metabolic engineering applications to renewable resource utilization.** Curr. Opin. Biotechnol., 11, 2000, p. 187-198,

BAI FW, ANDERSON WA, MOO-YOUNG M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnol Adv**; 26: 2008, p. 89-105

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals.** New York: McGraw-Hill, 1986, 2^a Ed

BHAT, M. K. & BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnol. Adv.**, 15 (3/4), 1997, p. 583-620

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite: Leite, Queijo, Manteiga, Caseína, Iogurte, Sorvetes e Instalações.** 15 ed. São Paulo: Nobel, 1991

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. Principles of Catalysis. In: **Biochemical Engineering.** New York: Editora Marcel Dekker, 1997

BOBBIO, F.O., BOBBIO, P.A.. **Introdução à Química de Alimentos.** 2^a Ed, São Paulo. 1992

BONNET, J. L. ;BOGAERTS, P. ; BOHATIER J. **Biological treatment of whey by Tetrahymena pyriformis and impact study on laboratory - scale wastewater lagoon process, Chemosphere**, Volume 38, Issue 13, 2979-2993, 1999

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Plano nacional de agroenergia.** , Brasília-DF, 2005

BRESSAN FILHO, A.. **O etanol como um novo combustível universal:** Análise estatística e projeção dp consumo doméstico e exportação de etanol brasileiro no período de 2006 a 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

CANETTIERI, E.V.; SILVA, J.B.A.E.; FELIPE, M.G.A. Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.90, 2001, p.159-168

CAO, Y. & TAN, H. **Effects of cellulase on the modification of cellulose.** Carbohydr. Res., 337, 2002, p. 1291-1296

CARMINATTI, C. A. **Ensaios de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta – Galactosidase *kluyveromyces lactis*.** (MESTRADO). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CHIBATA, I. **Immobilized Enzymes – Research and Development.** New York: John Wiley & Sons, p. 71, 1978.

COURI, S. **Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonase por Aspergillus niger mutante 3T5B8. 198f.** Tese (Doutorado em Ciências). Pósgraduação em Tecnologia de Processos Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ, 1993.

DAWSON, L., BOOPATHY, R. Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production. **Bioresource Technology** 98, 2007, p. 1695-1699,

DEMIRBS, A. Bio-ethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. **Energy Source**;27, 2005, p. 327–37

DIENES, D.; EGYHÁZI, A. & RÉCZEY, K. **Treatment of recycled fiber with Trichoderma cellulases.** Ind. Crop. Prod., 20, 2004, p. 11-21

DIJCK, P. W. M.; SELTEN, G. C. M.; HEMPENIUS, R. A. **On the safety of a new generation of DSM Aspergillus niger enzyme production strains** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 38, 2003, Issue 1, 27-35

.DIXON M.; WEBB E. C. **Enzymes.** London: Longman Group Limited, 1979. 3^a ed.

DONG, M. W. Introduction. In: DONG, M. W. **Modern HPLC for practicing scientists.** Estados Unidos: Wiley-interscience, 2006, p. 1-12

DUMAIS, R.; BLAIS, J.; CONRAD, F. Queso. In: AMIOT, J. **Ciencia y Tecnología de la Leche.**Zaragoza- Espana: Ed. Acribia S.A., 1991, p. 248-296

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlim: Springer, 2004. 5^a ed., 454p.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, 2008. Dissertação (MESTRADO). Disponível em:<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-10022009-082433/>>. Acessado em 20 mai. 2011

GALVÃO, C. M. A.. **Hidrólise controlada do soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos. 2004

GÄNZLE, G. M.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, Hydrolysis and Valueadded Derivatives. **International Dairy Journal Elsevier**. Canadá, 2008, p. 685-694

GÉKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of Lactose: A Literature Review. **Process Biochemistry**. v. 20, 1985, p. 2-12

GRAMINHA, E. B. N., GONÇALVES, A. Z. L., PIROTA, R. D. P. B., BALSALOBRE, M. A. A., DA SILVA, R., GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal feed science and technology**. Review, 2007

GÓRKA-NIEC, W., KANIA, A., PERLINSKA-LENART, U., SMOLENSKA-SYM, G., PALAMARCZYK, G., KRUSZEWSKA, J.. Integration of additional copies of *Trichoderma reesei* encoding protein O-mannosyltransferase I results in a decrease of the enzyme activity and alteration of cell wall composition. **Fungal Biology** 115, 2011, p. 124-132

GUIMARÃES, P. M. R., TEIXEIRA, J. A., DOMINGUES, L.. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. **Biotechnology Advances** 28, 2010, p. 375-384

GÜVEN, G; PERENDECI, A; TANYOLAC, A.. Electrochemical treatment of deproteinated whey wastewater and optimization of treatment conditions with response surface methodology **Journal of Hazardous Materials**, Volume 157, 2008, Issue 1, 69-78

HOLSINGER, V. H. Physical and Chemical Properties of Lactose. In: Lactose, water, Salts and Vitamins. **Advanced Dairy Chemistry**. London, v.3, 1997, p.1-38

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M. & VIIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochem**, 40, 2005, p. 3519-3525

KAAIJ, R. M. V. D. **Alpha-glucan acting enzymes in *Aspergillus niger*: Diversity in enzymatic activities end functions**. University of Groningen, 2007. (MESTRADO). Disponível em:

<<http://dissertations.ub.rug.nl/faculties/science/2007/r.v.d.kaaij/>>. Acessado em abr. 2011.

KANG, S.W., PARK, Y.S., LEE, J.S., HONG, S.I., KIM, S.W. Production of cellulases and

hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.91, 2004, p. 153–156

KAPDAN, I K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 38, N. 5, 2006, p.569-582

KARGI, F.; OZMIHCI S. Utilization of cheese whey powder (CWP) for ethanol fermentations: Effects of operating parameters **Enzyme and Microbial Technology**, vol.38, 2006, p.711–718

KOOTSTRA, A.M.J.; BEEFTINK, H.H.; SCOTT. E.L.; SANDERS, J.P.M. (2009). **Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw.** **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 31. Disponível em www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1. Acesso em janeiro de 2011

KOVÁCS, K., SZAKÁCS, G., ZACCHI, G.. Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce using crude *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride* enzymes. **Process Biochemistry** **44**, 2009, p. 1323-1329,

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 35, 2004, p. 126-139

KRISHNA S. H.; RAO, K. C. S.; BABU, J. S.; REDDY, D. S. Studies on the production and application of cellulose from *Trichoderma reesei* QM-9414. **Bioprocess Engineering**, 22, 2000, p. 467-470

KRYLOVA AY, KOZYUKOY EA, LAPIDUS AL. Ethanol and diesel fuel from plant raw materials:a review. **Solid Fuel Chem**;42, 2008, p. 358–64.

LEARY, D.; VIERROS, M.;HAMON,G.;ARICO, S. MONAGLE, C. **Marine genetic resources:Areview of scientific and commercial interest**, *Marine Policy*, Volume 33, Issue 2, 2009, p 183-194,

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, 1997, p. 1-24

LEMOS, J.L.S. **Estudo da produção de xilanases por Aspergillus awamori em bagaço de cana.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.2001.

LIMA, U.A. BASSO, L.C. AMORIM, H.V. Produção de Etanol. In: LIMA, U.A. et al.Biotecnologia Industrial: **Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, Edgard Blücher, v.3, 2001. p.1 – 43

LOPEZ-LEIVA, M. H., GUZMAN, M.. formation of oligosaccharides during Enzymatic Hydrolysis of Milk Whey Permeates. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 8, 1995, p. 757-762

MAHONEY, R. R. Lactose: Enzymatic Modification. In: Lactose, Water, Salts and Vitamins. **Advanced Dairy Chemistry**. London, v.3, 1997, p.77-125,

MANAN, D.M.A.; ADB KARIM, A.; KIT, W.K. Lactose Content of Modified Enzyme-treated “Dadiah”. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p.439-443.199

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

MIZUBUTI, I. Y. **Soro de Leite: Composição, Processamento e Utilização na Alimentação.** In: Semana Ciências Agrárias, 1994. v. 15, n. 1

MOFFAT, G.; WILLIAMS, R. A.; WEBB, C.; STIRLING, R. Selective Separations in Environmental and Industrial Processes Using Magnetic Carrier Technology. **Minerals Engineering**. 1994, p. 1039–1056.,

MORR, C. V.; HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993

MOSIER *et al.* Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technology** **96**, 2005, p. 673-686

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. **Anais do II Sul- Leite**. Maringá: UEM, 2002, p. 206 – 217

MUSSATTO, S. I., DRAGONE, G., GUIMARÃES, P. M. R., SILVA, J. P. A., CARNEIRO, L. M., ROBERTO, I. C., VICENTE, A., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J. A.. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances** **28**, 2010, p.817-830,

MUSSATO, I.S.; ROBERTO, I.C. (2002). **Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz.** *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, n.28, 2002, p.34-39,

NAGODAWITHANA, T., REED, G. **Enzymes and biotechnology**, 2nd Ed., New York, *Applied Science Publishers*, 1990.

NICKERSON, T. A. Lactose. In: WEBB, B.H., JOHNSON, A.H. and ALFORD, J.A. **Fundamentals of Dairy Chemistry**. Connecticut: The AVI Publishing Co., 1974. 2nd ed., p. 224-260,

, NIEVES, R. A., HIMMEL, M. E., TODD, R. J., ELLIS, R. P.. Cross- Reactive and Specific Monoclonal Antibodies against Cellobiohydrolases I and II Endoglucanases I and II of *Trichoderma reesei*.**Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, 1990, p. 1103-1108,

OLIVEIRA, C. C. M.. **Produção de β-galactosidase por Levedura Recombinante – Desenvolvimento de um Sistema de Produção Estável.** (MESTRADO). Universidade do Minho Escola de Engenharia. 2005,

OLIVEIRA, E. H. P. **Preparação de membranas microporosas para tratamento de efluente da industrias de alimentos.** (MESTRADO). Departamento de Engenharia Química

e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G; SANTA ANNA, L.M.M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. In Series on Biotechnology, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 2008

PEREIRA Jr., N. **Biomassas residuais de composição lignocelulósica para a produção de etanol e o contexto de refinaria**. 2007.

PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G. KOLEV, D. N. Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnol. Lett.**, 24, 2002, p. 2107- 2111

PONCHIO, L. A.; GOMES, A. L; PAZ, E. **Perspectivas de consumo de leite no Brasil**. 2005. CEPEA.

PINTO, S.A.G.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R; FRAGA, S. L. P; TEIXEIRA, R.B. **Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**, disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br?home/down/index.php?pub/cot_102.pdf>, acesso em 16/05/2011

QIN, Y., WEI, X., LIU, X., WANG, T., QU, Y.. Purification and characterization of recombinant endoglucanases of *Trichoderma reesei* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* with highwhe glycosylation and stability. **Protein Expression and Purification** 58, 2008, p. 162-167

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (MESTRADO). Disponível em:<<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000418358>>. Acessado em fev. 2011.

RAMOS, L. P. **Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais**. In: Seminário Nacional sobre Reuso/Reciclagem de Resíduos Sólidos Industriais. São Paulo, 2000. Disponível em: <http://www.cca.ufscar.br/lamam/disciplinas_arquivos/res/artigo_pretratamento.pdf>. Acessado em 18 mar. 2011

RICHARDS, N.S.P.S. **Soro lácteo: Perspectivas Industriais e Proteção ao meio ambiente**. 2002

ROSA, P. R. F.. **Produção de probióticos de *Lactobacillus* imobilizados em alginato de cálcio empregando soro de queijo**. (MESTRADO). Universidade Federal de Uberlândia .2010

SANSONETTI, S., CURCIO, S., CALABRÒ, V., IORIO, G.. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as na effective alternative non-vegetable source. **Biomass e bionergy** 33, 2009, p. 1687 – 1692,

SANTOS, S.F.M. Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju como Substrato. 130f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2007.

SEIBOTH, B., HAKOLA, S., MACH, R., SUOMINEN, P. L., KUBICEK, C. P.. Role of Four Major Cellulases in Triggering of Cellulase Gene Expression by Cellulose in *Trichoderma reesei*. **Journal of Bacteriology**. v. 179, n. 17, 1997, p. 5318-5320,

SHANKAR, S.K.; MULIMANIA, V.H. β -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* **Bioresource Technology**, v. 98, n.4, 2007, p. 958-961

SILVEIRA, W.B. PASSOS, F.J. MANTOVANI, V.H.C. PASSOS, F.M.L. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 36, 2005, p. 930–936,

SOCCOL, C. R; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n.1, 2009, p.13-18

SOUZA, J. Estudo da durabilidade de argamassas utilizando cinzas e casca de arroz. 2008. Tese – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande-UFCG, Campina Grande-PB, 2008

SOUSA, E. L. L., MACEDO, I. C.. Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética. Luc projetos de Comunicação, São Paulo, 2010

SUN, Y. & CHENG, J.J.. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, 2005,. p. 1599-1606

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

TAMANINI, C. & HAULY, M.C.O.. **Resíduos agroindustriais para a produção biotecnológica de xilitol.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 25, n. 4, 2004, p. 315-330.

THRONDSET, W., KIM, S., BOWER, B., LANTZ, S., KELEMEN, B., PEPSIN, M., CHOW, N., MITCHINSON, C., WARD, W.. Flow cytometric sorting of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* for improved strains. **Enzyme and Microbial Technology** 47, 2010, p. 335-341

TREVISAN, A. P. **Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado..** Dissertação (MESTRADO) - Universidade Federal de Santa Maria,Santa Maria, 2008

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. (2011). **Produção de etanol, açúcar e cana-de-açúcar no Brasil.** Disponível em www.unica.com.br. Acesso em maio de 2011.

USDEC,2009. U. S. Dairy Export Council. Reference Manual for U. S. **Whey and Lactose products. Whey and Lactose: natural milk products.** Disponível em <www.fas.usda.gov>. Acesso em junho/2011.

VÁSQUEZ, M.P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M.B.; PEREIRA Jr., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2007, p. 137-140, issues 12.

VEREDAS, V. **Purificação da β-Lactalbumina a partir do Soro de Leite em Leito Fixo e Expandido de Resinas..** (MESTRADO), Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas. 2000

VIEIRA, C. D. **Imobilização da enzima β-galactosidase de Kluyveromyces fragilis em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação..** Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2009

VILANI, C.. **Tratamento do soro de Queijo desnatado empregando a Ultrafiltração e Estudo da biodegradabilidade da fração permeada utilizando o processo anaeróbio.** (MESTRADO). Universidade Federal de Uberlândia. 2001

YANG, S.; OKOS, M. R. Effects of Temperature on Lactose Hydrolysis by Immobilized β-galactosidase in Plug-Flow Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 33, n. 7, 1989, p. 873-885,

WANG, B., XIA, L.. high efficient expression of cellobiase gene from *Aspergillus niger* in the cells of *Trichoderma reesei*. **Bioresource Technology** **102**, 2011, p. 4568-4572

WYMAN, C. E, YANG, B.. Cellulosic biomass could help* meet California's transportation fuel needs. **California Agriculture**. v. 63, n 4, 2009, p. 185- 190

WYMAN, C. E.. Ethanol from lignocellulosic Biomass: Technology, Economics, and Opportunities. **Bioresource Technology** **50**, 1994, p. 3-16,

ZADOW, J.G. Lactose: Proprieties and Uses. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 67, 1984, p. 2654-2679,.

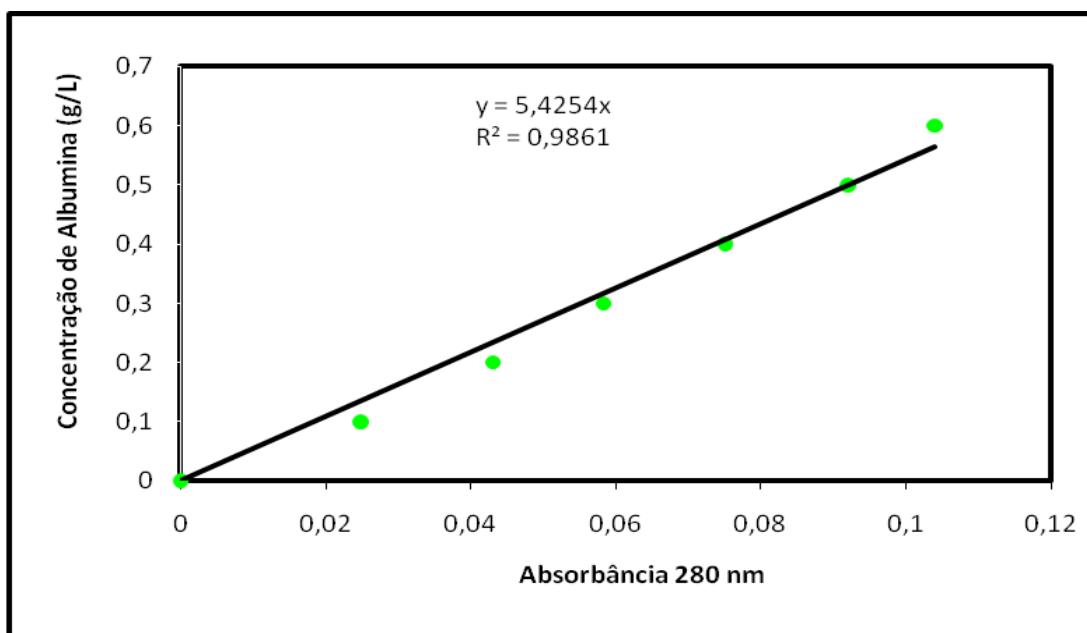
ZAJSEK, K., GORSEK, A.. Mathematical modelling of ethanol production by mixed kefir grains yeast population as a function of temperature variations. **Biochemical Engineering journal** **49**. 2010, p. 7-12

ZENI, G.; PENDRAK, I.P. **Bionconversão de celulose em proteína utilizando a levedura Cândida utilis e o fungo Pleurotus ostreatus.** Ponta Grossa: Trabalho de conclusão de curso apresentado á Universidade Federal Tecnológica do Paraná, 2006.

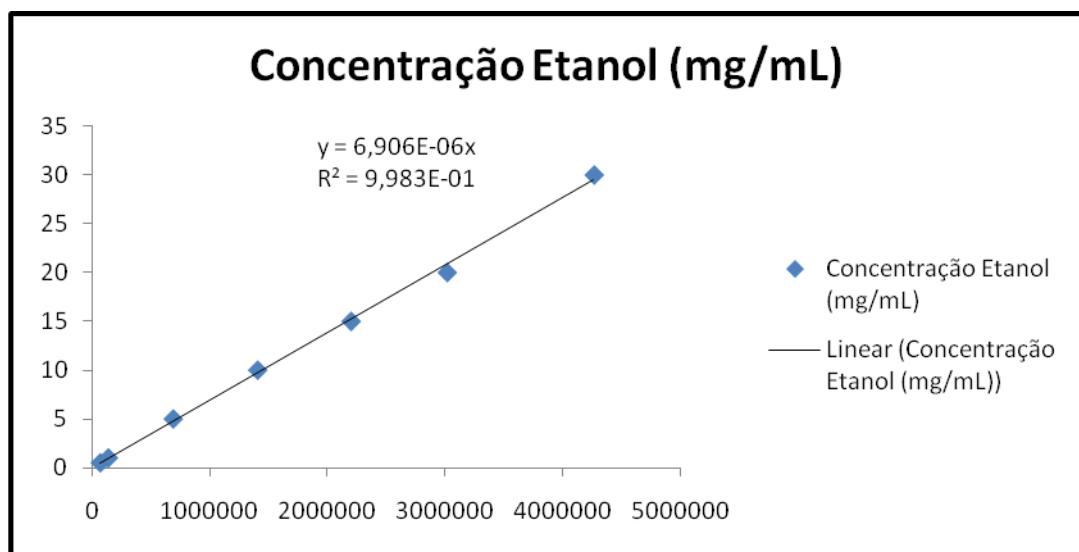
ZHANG, P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**. v. 24, 2006, p. 452- 481

Apêndice

Apêndice 1- Curva de calibração albumina



Apêndice 2 - Curva de calibração para concentração de etanol HPLC



Apêndice 3 - Curva de calibração glicose - DNS