



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



**Avaliação de complexos enzimáticos obtidos a partir de
fungos do Cerrado para produção de etanol de
segunda geração**

VERÔNICA DOS SANTOS LOPES

Uberlândia – MG

2013



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



**Avaliação de complexos enzimáticos obtidos a partir de
fungos do Cerrado para produção de etanol de
segunda geração**

VERÔNICA DOS SANTOS LOPES

Orientadores: Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
Prof^a. Dra. Vicelma Luiz Cardoso

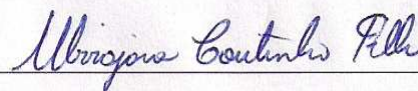
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Uberlândia – MG

2013

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 25/02/2013

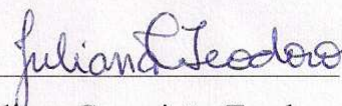
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
(Orientador – PPG-EQ/FEQ/UFU)



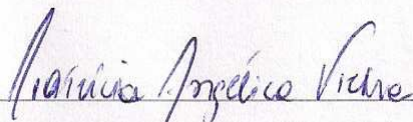
Prof^a. Dra. Vicelma Luiz Cardoso
(Orientadora – PPG-EQ/FEQ/UFU)



Dra. Juliana Conceição Teodoro
(Centro de Tecnologia Canavieira/CTC)



Prof^a. Dra. Miriam Maria de Resende
(PPG-EQ/FEQ/UFU)



Prof^a. Dra. Patrícia Angélica Vieira
(FEQ/UFU)

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

- L864a Lopes, Verônica dos Santos, 1988-
2013 Avaliação de complexos enzimáticos obtidos a partir de fungos do
 cerrado para produção de etanol de segunda geração / Verônica dos
 Santos Lopes. - 2013.
 73 f. : il.
- Orientadores: Ubirajara Coutinho Filho e Vicelma Luiz Cardoso.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
 grama de Pós-Graduação em Engenharia Química.
 Inclui bibliografia.
1. Engenharia química - Teses. 2. Alcool - Teses. 3. Enzimas de fun-
 go - Teses. 4. Bagaço de cana - Teses. I. Coutinho Filho, Ubirajara . II.
 Cardoso, Vicelma Luiz. III. Universidade Federal de Uberlândia. Pro-
 grama de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

Aos meus pais
e à minha irmã Viviane,
com amor e carinho,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bênçãos concedidas;

Aos meus pais, pelo exemplo de amor e de luta, pelos conselhos, pelo contínuo estímulo à superação, por sempre me apoiarem e por serem tão especiais em minha vida. Amo vocês!

À minha irmã, pelo carinho e pela torcida constante;

À minha madrinha Eunice Malaquias, pelo incentivo ao estudo e por estar sempre presente;

À minha querida avó Maria Malaquias, por todas as suas orações;

Aos meus amigos, pelas conversas e momentos especiais;

Ao meu orientador, Ubirajara, pela paciência, confiança, cordialidade com que sempre me recebeu, por todo apoio e pelos preciosos ensinamentos transmitidos;

À minha co-orientadora, Vicelma, pela dedicação e orientação, pelo conhecimento compartilhado, pelas sugestões, críticas e incentivo ao trabalho;

À Janaína Fischer, pelo auxílio e apoio durante a pesquisa;

Aos colegas de laboratório, pela amizade e troca de experiência;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao CTC, pelo fornecimento de bagaço de cana-de-açúcar tratado;

À todos os professores e funcionários da FEQUI, por terem participado de mais uma etapa importante da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Resíduos lignocelulósicos	3
2.1.1. Bagaço de cana-de-açúcar.....	3
2.1.2. Farelo e palha de arroz.....	6
2.1.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos	7
2.2. Fermentação em estado sólido.....	9
2.3. Micro-organismos produtores de celulasas	10
2.3.1. Cerrado: biodiversidade e fungos	11
2.4. Complexo enzimático de celulase	13
2.5. Etanol de primeira e segunda geração	14
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Micro-organismos.....	20
3.2. Biomassas	21
3.3. Produção dos complexos enzimáticos de fungos	23
3.3.1. Inóculo	24
3.3.2. Fermentação em estado sólido (FES)	25
3.3.2.1. Seleção do micro-organismo e seleção do meio fermentativo.....	26
3.3.2.2. Determinação do tempo de fermentação em estado sólido para produção de extrato enzimático	28
3.3.2.3. Determinação da biomassa da fermentação em estado sólido para produção de extrato enzimático	28
3.3.2.4. Seleção da quantidade de biomassa na fermentação em estado sólido para enchimento de um reator	29
3.4. Produção de etanol.....	30
3.4.1. Fermentações alcoólicas em diferentes tempos	31

3.4.2. Efeito do teor de bagaço de cana utilizado na fermentação submersa na produção de etanol.....	31
3.5. Fermentações alcoólicas sucessivas	32
3.6. Atividade enzimática	33
3.7. Determinação de proteínas	34
3.8. Quantidade de células.....	34
3.9. Determinação da concentração dos açúcares redutores totais (ART)	34
3.10. Determinação de etanol	35
3.11. Tratamento estatístico e síntese dos resultados	35
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1. Seleção e identificação do micro-organismo e seleção do meio fermentativo para fermentação em estado sólido	37
4.2. Influência do tempo de fermentação em estado sólido na produção de complexo enzimático.....	39
4.3. Avaliação da biomassa da fermentação em estado sólido na produção de complexo enzimático.....	42
4.4. Seleção da quantidade de sólido na fermentação em estado sólido para enchimento de um reator.....	45
4.5. Fermentações alcoólicas em diferentes tempos.....	50
4.6. Efeito do teor de bagaço de cana utilizado na fermentação submersa na produção de etanol	51
4.7. Fermentações alcoólicas sucessivas	53
4.8. Síntese da discussão das diferentes fermentações alcoólicas	53
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	55
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICE 1	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Foto ilustrativa do bagaço de cana-de-açúcar.	4
Figura 2.2 – Estrutura da celulose.	4
Figura 2.3 – Estrutura da hemicelulose.	5
Figura 2.4 – Estrutura da lignina.	6
Figura 2.5 – Esquema dos efeitos do pré-tratamento sobre a estrutura lignocelulósica.....	8
Figura 2.6 – Distribuição da vegetação do cerrado brasileiro	11
Figura 2.7 – Foto ilustrativa do fungo <i>Monilia sitophila</i>	12
Figura 2.8 – Evolução da produção de etanol de primeira geração no Brasil	15
Figura 2.9 – Fluxograma com as matérias-primas principais e os processos utilizados para a produção de etanol	17
Figura 2.10 – Principais processos utilizados para a produção de etanol celulósico com destaque para a hidrólise enzimática.	18
Figura 3.1 – Fotos ilustrativas do farelo de arroz (a) e da palha de arroz (b).....	22
Figura 3.2 – Fotos ilustrativas do bagaço de cana tratado com alta severidade (a) e do bagaço de cana tratado com baixa severidade (b).....	23
Figura 3.3 – Esquema ilustrativo da sequência de etapas para produção de complexo enzimático.....	24
Figura 3.4 – Foto ilustrativa das fermentações em estado sólido em diferentes ensaios.	25
Figura 3.5 – Fungos utilizados na pesquisa.....	27
Figura 3.6 – Foto ilustrativa dos erlenmeyers sobre mesa agita para a fermentação alcoólica.	31
Figura 3.7 – Esquema ilustrativo das fermentações sucessivas, no qual FES representa a fermentação em estado sólido e FS representa a fermentação submersa.	33
Figura 4.1 – Atividade enzimática para as doze formulações em diferentes tempos.....	38
Figura 4.2 – Determinação de proteínas para diferentes tempos de fermentação em estado sólido.	39
Figura 4.3 – Determinação de ART para diferentes tempos de fermentação em estado sólido.	40
Figura 4.4 – Quantidade de células obtida para os complexos enzimáticos produzidos em diferentes tempos.	40

Figura 4.5 – Concentração de etanol para diferentes tempos de fermentação em estado sólido.	41
Figura 4.6 – Determinação de proteínas para os diferentes substratos da FES.....	43
Figura 4.7 – Determinação de ART para os diferentes substratos da FES.....	43
Figura 4.8 – Quantidade de células obtida para os diferentes substratos da FES.....	44
Figura 4.9 – Concentração de etanol para os diferentes substratos da FES.	45
Figura 4.10 – Determinação de proteínas para quantidades variáveis de sólido na FES.	46
Figura 4.11 – Determinação de ART para quantidades variáveis de sólido na FES.....	47
Figura 4.12 – Quantidade de células obtida para quantidades variáveis de sólido na FES.....	48
Figura 4.13 – Concentração de etanol para quantidades variáveis de sólido na FES.....	49
Figura 4.14 – Descrição das melhores condições encontradas para a FES.	49
Figura 4.15 – Concentração de etanol para diferentes tempos de fermentação alcoólica.	50
Figura 4.16 – Concentração de etanol para teores de bagaço variáveis na fermentação submersa.	52
Figura 4.17 – Descrição das melhores condições encontradas para a fermentação alcoólica..	52
Figura 4.18 – Evolução da concentração de etanol em quatro fermentações alcoólicas sucessivas.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Composição do meio Czapek.	20
Tabela 3.2 - Composição do meio PDA.	21
Tabela 3.3 – Composição da solução de sais, acrescida de extrato de levedura para extração dos complexos enzimáticos.	26
Tabela 3.4 – Composição do meio líquido adicionado nas fermentações sólidas para escolha do melhor substrato.	28
Tabela 3.5 – Composição da biomassa da fermentação em estado sólido.	29
Tabela 3.6 – Diferentes quantidades de biomassa para a FES.	30
Tabela 3.7 – Composição de cada substrato da fermentação alcoólica.	32
Tabela 4.1 – Composição do meio líquido adicionado nas fermentações sólidas para escolha do melhor substrato.	37
Tabela 4.2 – Composição da biomassa para fermentação em estado sólido.	42
Tabela 4.3 – Quantidades de sólido estudadas.	46
Tabela 4.4 – Composição de cada substrato utilizado na fermentação alcoólica.	51

RESUMO

O esgotamento de petróleo, carvão e gás natural, combinado com o aumento da demanda energética mundial, levou a pesquisas de novas formas de produção de combustíveis alternativos, como o etanol de segunda geração. Este vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas apenas nos últimos 20 anos essa técnica tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis. Com isso, o estudo da produção de etanol de segunda geração se mostra interessante pela possibilidade de se aproveitar resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana-de-açúcar que é um resíduo lignocelulósico abundante no Brasil, e pelo uso de micro-organismos destinados a produção de enzimas para a hidrólise da biomassa lignocelulósica. Os micro-organismos que produzem o complexo de celulase podem ser encontrados no Cerrado brasileiro, visto que este detém cerca de 5% da biodiversidade do planeta, sendo considerado a savana mais rica do mundo. A fermentação em estado sólido representa uma etapa importante da cadeia produtiva para produção de complexo enzimático, possuindo vantagens, como menor geração de efluentes, baixo risco de contaminação, baixo custo operacional, além da possibilidade de reaproveitamento de diversos tipos de resíduos agroindustriais. Neste trabalho foi feita a avaliação comparativa da produção de complexo enzimático de fungos do Cerrado e *Aspergillus niger*. Três fungos do ecossistema do Cerrado foram avaliados e comparados com *Aspergillus niger* na capacidade de produzir etanol pelo uso do complexo enzimático e *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes condições de fermentação sólida (FES) e fermentação submersa (FS) de bagaço de cana-de-açúcar submetido à explosão de vapor. Entre os fungos testados foi constatado que o *Chrysonilia sitophila* se destacou como promissor, sendo que as melhores condições associadas a produção de etanol foram: a) 72 horas de FES com uso de bagaço de cana tratado e farelo de arroz na proporção de 1/3 e 2/3; b) 48 horas de fermentação alcoólica com uso de 80% de bagaço de cana tratado e 20% de bagaço *in natura*. Nas melhores condições foi observado a produção de 6,5 g/L de etanol ao fim de uma única fermentação e 16,7 g/L ao fim de quatro fermentações sucessivas com extrações sucessivas de complexo enzimático.

Palavras-chave: etanol de segunda geração, fermentação em estado sólido, bagaço de cana-de-açúcar, *Chrysonilia sitophila*.

ABSTRACT

The exhaustion of oil, coal and natural gas, combined with the increase in global energy demand, has led to research new ways of producing alternative fuels such as ethanol from second generation. This is being produced by the hydrolysis and fermentation of lignocellulosic materials since the late nineteenth century, but only in the last 20 years, this technique has been proposed to meet the fuel market. Thus, the study of the production of second generation ethanol proves interesting by the possibility of taking advantage of agro-industrial residues such as bagasse from sugarcane which is an abundant lignocellulosic residue in Brazil, and the use of micro-organisms intended for production of enzymes for hydrolysis of lignocellulosic biomass. The micro-organisms that produce cellulose complex can be found in the Brazilian Cerrado, since it holds about 5% of the planet's biodiversity, considered the richest savanna in the world. The solid state fermentation represents an important step for the production of the enzyme complex, possessing advantages, such as less effluent generation, low contamination risk, low operating cost, and the possibility of reuse of various types of agro-industrial residues. In this work was done a benchmarking the production of the enzyme complex by Cerrado fungi and *Aspergillus niger*. Three Cerrado fungi were evaluated and compared with *Aspergillus niger* in the ability to produce ethanol by use of the enzyme complex and *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SF) of exploded sugarcane bagasse. Among the fungi tested was found that the *Chrysonilia sitophila* stood out as promising, and the best conditions associated with ethanol production were: a) 72 hours of SSF using sugarcane bagasse and rice bran at a ratio of 1/3 and 2/3; b) 48 hours of SF using 80% of exploded sugarcane bagasse and 20% of raw bagasse. In the best conditions were observed 6,5 g/L of ethanol production after one alcoholic fermentation and 16,7 g/L of ethanol after four successive fermentations with successive enzyme complex production.

Key-words: ethanol from second generation, solid state fermentation, sugarcane bagasse, *Chrysonilia sitophila*.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O sistema energético mundial é, atualmente, dependente de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás). Esta situação necessita de mudanças não só pela exaustão gradativa das reservas de combustíveis fósseis como também pelos efeitos negativos ao meio ambiente que resultam do seu uso, como o aquecimento global. O controle da emissão desses gases e a garantia de uma demanda de energia, utilizando outras fontes, é um problema comum e urgente a toda humanidade.

A busca por combustíveis alternativos fez com que alguns países optassem por biocombustíveis, como o etanol de primeira geração, produzido pela fermentação de açúcares da cana, do milho, da beterraba e de outras fontes. Outra via para obtenção de etanol é pela hidrólise da biomassa celulósica, com geração de glicose que pode ser fermentada produzindo etanol, processo que produz etanol de segunda geração (OGEDA; PETRI, 2010).

A conversão da biomassa celulósica em açúcares fermentáveis para a produção de etanol de segunda geração vem sendo considerada uma alternativa promissora para aumentar a produção necessária para atender a demanda mundial. Neste processo há várias alternativas tecnológicas devido a complexidade e variedade de matérias-primas disponíveis. Entre as várias rotas, a de maior potencial de integração nas usinas comerciais consiste em uma etapa de pré-tratamento da biomassa para disponibilizar os polissacarídeos, seguida de hidrólise ácida ou enzimática para obtenção de açúcares fermentescíveis e fermentação microbiana destes açúcares a etanol (ZÚÑIGA, 2010).

Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos para modificar a estrutura rígida que caracteriza a lignocelulose. Para o bagaço de cana-de-açúcar, o pré-tratamento por explosão a vapor foi proposto como um dos mais promissores devido a sua compatibilidade em sistemas de biorrefinaria. Neste método, o material lignocelulósico é exposto a condições de elevada pressão seguidas de elevadas temperaturas e descompressão repentina, que causa a quebra da estrutura lignocelulósica associada a hidrólise da hemicelulose e despolimerização da celulose e lignina (ZÚÑIGA, 2010; BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, 2008).

A produção de complexo enzimático com potencial aplicação na produção de etanol de segunda geração representa uma etapa importante da cadeia produtiva. Com isso, há um crescente interesse na busca de novos micro-organismos, que produzem enzimas, nos mais variados ambientes. O Cerrado brasileiro merece atenção, pois é reconhecido como a savana

mais rica do mundo em biodiversidade, com a presença de ecossistemas capazes de abrigar fungos produtores de complexos enzimáticos que degradam a celulose.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral a produção de etanol de segunda geração a partir de complexo enzimático de fungo do Cerrado, obtido da fermentação em estado sólido. Os objetivos específicos foram:

- selecionar fungo do ecossistema do Cerrado para produção de complexo enzimático, que seja capaz de degradar a celulose de bagaço de cana-de-açúcar;
- avaliar a produção do complexo enzimático por fermentação em estado sólido em diferentes condições;
- avaliar a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando o complexo enzimático gerado e diferentes condições de fermentação submersa.
- estudar fermentações alcoólicas sucessivas para aumentar a produção de etanol.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Resíduos lignocelulósicos

Os resíduos lignocelulósicos são abundantes fontes de carboidratos e sua bioconversão tem recebido grande atenção nos últimos anos. Processos utilizando esse tipo de resíduo como matéria-prima podem diminuir a dependência do homem por combustíveis fósseis por meio do fornecimento de uma conveniente e renovável fonte de energia na forma de glicose (OJUMU et al., 2003).

O Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais cujo bioprocessamento representa um processo de interesse econômico e social. Neste contexto, os resíduos de usinas de açúcar e álcool e unidades de produção agrícola geradoras de resíduos de culturas de cereais, de milho, de trigo, cascas de arroz e de aveia, dentre outros são potenciais fontes de matéria-prima para fermentação e diversos processos são desenvolvidos para o aproveitamento desses materiais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como as enzimas, os ácidos orgânicos, os aminoácidos, entre outros (MENEZES; SILVA; DURRANT, 2009).

2.1.1. Bagaço de cana-de-açúcar

Estima-se, no Brasil, que a cada tonelada de cana-de-açúcar processada, obtém-se cerca de 280 kg de bagaço, sendo que a cada ano é produzido aproximadamente de 5 a 12 milhões de toneladas desse material, correspondendo a cerca de 30% do total da cana moída (PANDEY et al., 2000).

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo fibroso (Figura 2.1) obtido pela moagem da cana. Este resíduo contém de 48 a 52% de umidade, 2 a 3% de sólidos solúveis (brix), 46 a 48% de sólidos insolúveis (fibra) e características físico-químicas que dependem do sistema de colheita da cana (cana queimada ou sem queimar), do corte e da forma de carregamento. Condições climáticas anteriores e posteriores à colheita e diferentes estágios de desenvolvimento vegetativo podem interferir, também, na composição do bagaço de cana para fins energéticos (CTC, 2012).



Figura 2.1 – Foto ilustrativa do bagaço de cana-de-açúcar.

A composição química do bagaço de cana é baseada em três polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, sendo que a celulose é o principal componente químico da biomassa. A celulose fornece força à parede celular das plantas e é composta de cadeias lineares de D-glicose, unidas por ligações β -1,4-glicosídicas (Figura 2.2) com alto grau de polimerização e elevado peso molecular, principalmente em sua forma cristalina que confere alta resistência ao rompimento de suas ligações por substâncias químicas (BORTOLAZZO, 2011).

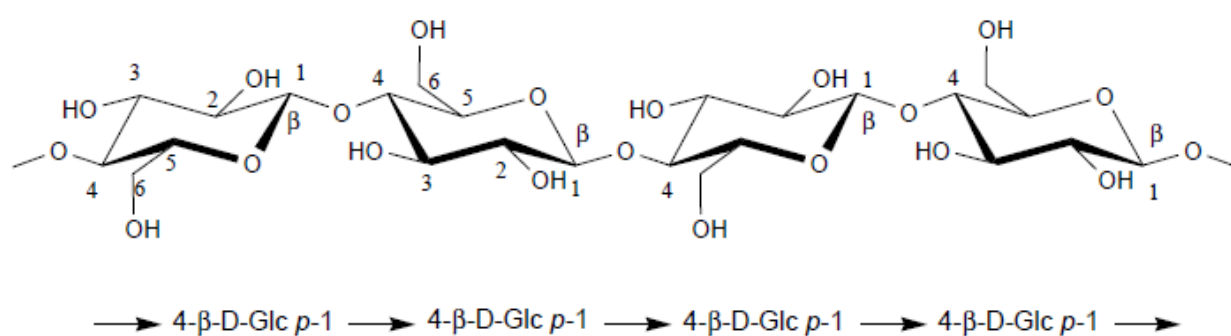


Figura 2.2 – Estrutura da celulose.

As hemiceluloses são compostas por uma coleção heterogênea de polissacarídeos amorfos com grau de polimerização muito inferior ao da celulose. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, proporcionando flexibilidade e estabilidade ao agregado (Figura 2.3). São mais suscetíveis à hidrólise ácida quando comparadas com as celulosas, pois oferecem maior acessibilidade aos ácidos (BORTOLAZZO, 2011).

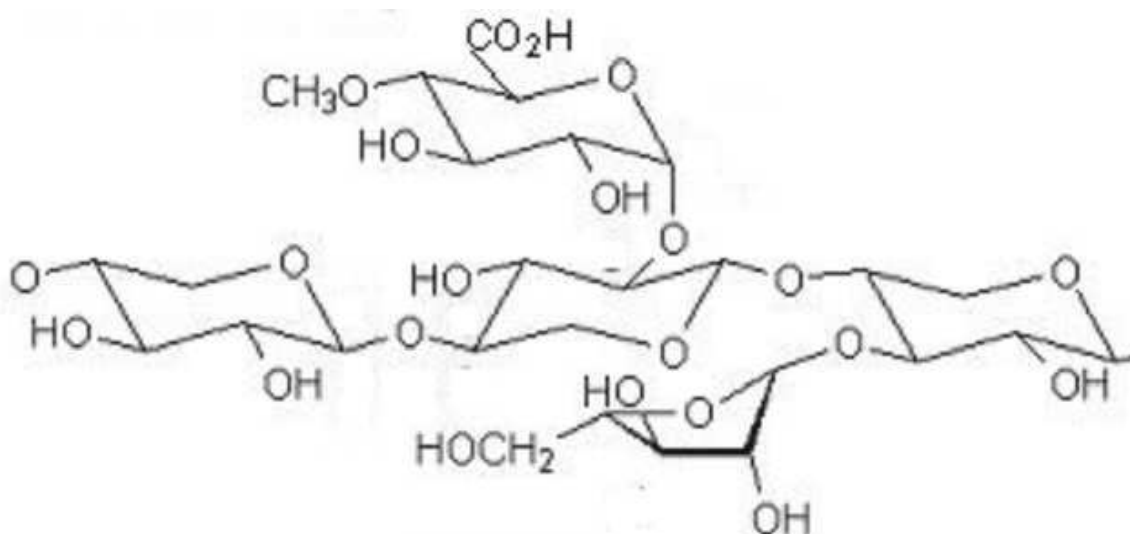


Figura 2.3 – Estrutura da hemicelulose.

Já a lignina é um polímero fenólico, uma macromolécula ramificada e amorfa, formando uma rede de anéis aromáticos unidos principalmente por ligações alquil-aril-éter, como mostra a Figura 2.4 (ZÚÑIGA, 2010).

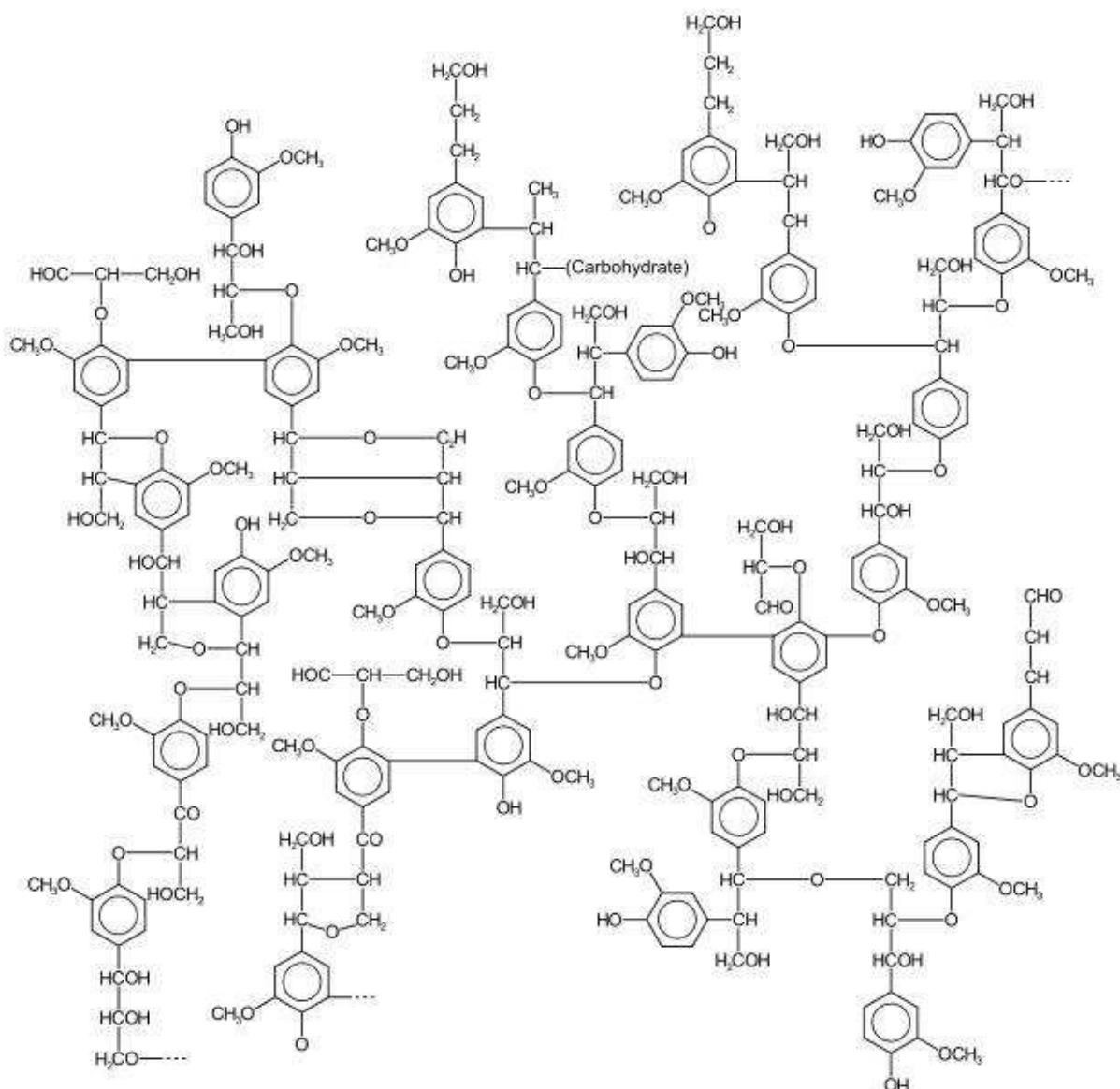


Figura 2.4 – Estrutura da lignina.

O bagaço de cana-de-açúcar, portanto, é um material de alto teor lignocelulósico e, para que sua utilização se torne viável para produção de etanol de segunda geração, é necessário o desenvolvimento de métodos de tratamento que promovam o rompimento da estrutura fibrosa, tornando-a mais digestível.

2.1.2. Farelo e palha de arroz

O arroz está entre os cereais mais consumidos do mundo. O Brasil é o nono maior produtor mundial e colheu cerca de 11,6 milhões de toneladas na safra 2011/2012 (CONAB,

2013). Para que esse alimento possa ser consumido, é preciso que seja produzido em grande escala e posteriormente seja beneficiado, para que ele possa ser encaminhado ao comércio para venda ao consumidor final.

A fase de beneficiamento do arroz gera resíduos ou subprodutos como a casca do arroz, o farelo e os grãos quebrados (quirera). O farelo pode ser transformado em óleo ou ração, os grãos quebrados podem servir como matéria-prima para produção de farinhas e de amido pré-cozido, já a casca de arroz pode ser usada na produção de papel ou como fonte energética (LORENZETT; NEUHAUS; SCHWAB, 2012).

A casca de arroz tem baixa densidade e peso específico, além de lenta biodegradação, permanecendo em sua forma original por longos períodos de tempo. Como a casca corresponde a cerca de 20% do total da produção de arroz, tem-se que a produção mundial da mesma é cerca de 80 milhões de toneladas por ano (LORENZETT; NEUHAUS; SCHWAB, 2012).

O farelo de arroz corresponde a 5-8% do total do grão de arroz. É fonte de proteínas, fibras dietéticas e de compostos funcionais como tocotrienóis, além de ser uma fonte de lipídios. No Brasil, o farelo de arroz possui baixo valor comercial, sendo utilizado para extração de óleo, como ingrediente da ração animal e como fertilizante orgânico. É também utilizado em multimisturas, tostado de forma caseira, sendo distribuído a famílias de baixa renda (SILVA; SANCHES; AMANTE, 2006).

2.1.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

A hidrólise da celulose à glicose em meio aquoso, catalisada por complexo enzimático de celulase, possui um rendimento muito baixo devido à estrutura altamente cristalina da celulose, dificultando o acesso aos sítios ativos do substrato. Além disso, a lignina restringe a hidrólise, visto que esconde a superfície celulósica impedimento o intumescimento das fibras do substrato. Torna-se necessária, então, uma etapa de pré-tratamento para se quebrar a estrutura cristalina da lignocelulose e remover a lignina, expondo as moléculas de celulose e hemicelulose à ação enzimática (Figura 2.5) (OGEDA; PETRI, 2010).

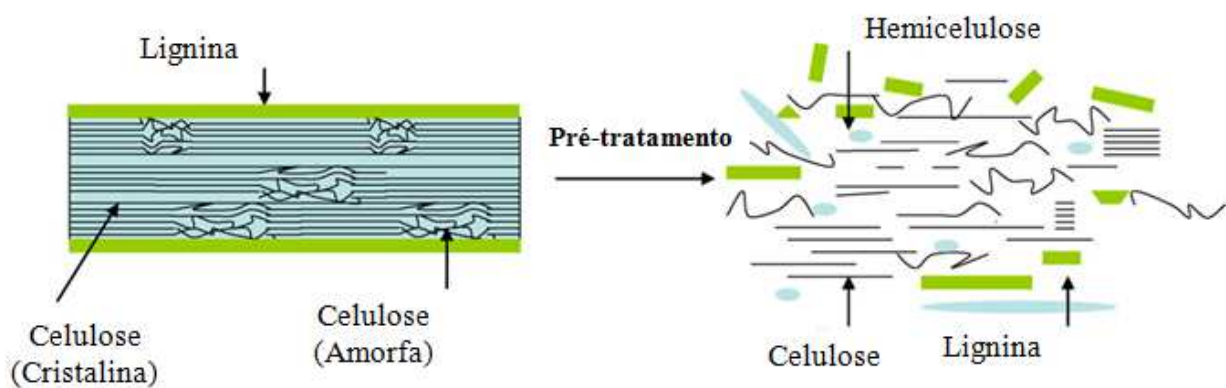


Figura 2.5 – Esquema dos efeitos do pré-tratamento sobre a estrutura lignocelulósica (CABIAC et al., 2011 – adaptado).

Os pré-tratamentos disponíveis, atualmente, podem ser físicos, químicos, biológicos ou de fracionamento por solvente. O pré-tratamento físico quebra o tamanho das fibras pela moagem, processamento aquoso ou exposição ao vapor. Os processos químicos de pré-tratamento mais utilizados são com ácido diluído, álcali, solvente orgânico, amônia, dióxido de enxofre, dióxido de carbono, entre outros produtos que geram uma biomassa mais digerível pelas enzimas. Os métodos biológicos são usados, algumas vezes, combinando-se com tratamentos químicos que visam solubilizar a lignina, deixando a celulose mais acessível à hidrólise e à fermentação (MACHADO, 2009).

Entre as formas mais difundidas de pré-tratamento pode ser citada a explosão a vapor, que modifica física e quimicamente os materiais lignocelulósicos, fracionando os três principais polímeros que constituem esses materiais: celulose, encontrada na porção insolúvel, hemicelulose, que permanece no hidrolisado e lignina, que pode ser separada com metanol, etanol ou hidróxido de sódio. Este método pode ser realizado em diferentes condições de pressão, temperatura e tempo (MACHADO, 2009).

Explosão a vapor é um método promissor para tornar a biomassa mais acessível à ação da enzima celulase. O material é aquecido usando vapor de alta pressão (20-50 bar, 210-290°C) em poucos minutos. Esta reação é, em seguida, parada pela descompressão súbita à pressão atmosférica. Este método usa o processo de compressão, água quente, e nenhum catalisador ácido ou químico é necessário, fazendo com que a explosão a vapor seja um método economicamente interessante e ambientalmente atrativo (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAALJ, 2005).

2.2. Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) se apresenta como uma técnica capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos e subprodutos gerados, minimizando possíveis problemas ambientais e agregando valor a esses materiais, por meio da produção de substâncias de interesse econômico. Portanto, pelo uso de resíduos agroindustriais como substrato microbiano para síntese de celulases, a fermentação em estado sólido representa um importante decréscimo nos custos de produção, além de vantagens com relação à elevada especificidade do complexo enzimático final.

A mesma tem sido utilizada durante séculos em todo o mundo. Tradicionalmente, a FES foi utilizada principalmente para a produção de alimentos fermentados, como laticínios e molho de soja. Na FES, o micro-organismo pode crescer entre os fragmentos de substrato, isto é, no interior da matriz do substrato, ou sobre a superfície do substrato.

A FES, também chamada por alguns autores de fermentação semi-sólida (FSS), aplica-se ao processo de crescimento de micro-organismos sobre substratos sólidos sem a presença livre de água para a produção de complexos enzimáticos. Possui algumas vantagens, como menor geração de efluentes, baixo risco de contaminação devido a baixa umidade do meio, menor exigências de água quando comparada à fermentação submersa, além do fácil manuseio, baixo custo operacional e possibilidade de reaproveitamento de diversos tipos de resíduos agroindustriais (PONTES, 2009).

Na FES, a água é um dos parâmetros que mais influenciam no processo fermentativo, pois possui elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida. Os substratos para a FES são, em geral, resíduos ou subprodutos da agroindústria como farelos, cascas, bagaços, entre outros (PINTO et al., 2005).

A fermentação em estado sólido está adquirindo uma relevância especial em processos biotecnológicos como uma alternativa a tradicional fermentação submersa. A FES exige menos energia, produz menos águas residuais, pode minimizar o problema de eliminação de resíduos sólidos, além de ter menores riscos de contaminação e baixos custos operacionais (DÍAZ et al., 2007).

Os materiais sólidos usados na FES podem ser classificados em duas categorias: materiais inertes, que só agem como um local de fixação para o micro-organismo e não inerte, que fornecerá alguns nutrientes para o micro-organismo. Esses materiais são tipicamente lignocelulósicos à base de produtos agrícolas ou agroindustriais, tais como subprodutos de grãos e cereais. Certo número de tais substratos foi empregado: bagaço de cana, trigo, farelos

de arroz e milho, palha de trigo, palha de arroz, casca de arroz, resíduos de banana, polpa de beterraba, etc (DÍAZ et al., 2007).

A escolha do substrato da FES é tão essencial para a produção do complexo enzimático quanto a escolha do micro-organismo. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do micro-organismo favorece a formação dessas enzimas.

2.3. Micro-organismos produtores de celulasas

Os micro-organismos celulolíticos são aqueles que produzem enzimas capazes de degradar a celulose natural. Na natureza, existe uma variedade de micro-organismos que produzem celulasas, e a hidrólise da celulose por estas resulta na produção final de glicose que é utilizada como fonte de carbono pela levedura para produção de etanol (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Quando se trata de um processo fermentativo, a seleção do micro-organismo se torna relevante devido à necessidade deste apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto e possibilitar sua rápida liberação para o meio. Além disso, não devem apresentar inconstância quanto ao comportamento fisiológico e tampouco exigirem condições de processo muito complexas (PONTES, 2009).

A maioria dos micro-organismos celulolíticos pertence ao grupo das bactérias e dos fungos, podendo ocorrer em todas as biotas que há acúmulo de resíduos de celulose. Os fungos filamentosos, contudo, são os mais adaptáveis aos processos fermentativos como a fermentação em estado sólido, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecer a colonização do meio (PONTES, 2009).

Os fungos são considerados os mais importantes micro-organismos utilizados pela indústria na produção de enzimas, e os principais micro-organismos produtores de celulasas são: *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*, *Aspergillus sp*, *Schizophyllum sp*, *Chaetomium sp* e *Humicola sp* (BORTOLAZZO, 2011).

Portanto, vários micro-organismos, especialmente os fungos filamentosos, podem produzir celulasas para a hidrólise de materiais lignocelulósicos, sendo que a hidrólise enzimática da celulose envolve a ação sinérgica de um complexo celulolítico, geralmente de

fungos, formado por endoglucanases, exoglucanases e β -D-glicosidades (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

2.3.1. Cerrado: biodiversidade e fungos

O cerrado brasileiro é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de aproximadamente 2 milhões de km², que é cerca de 22% do território nacional (Figura 2.6). Neste espaço territorial encontram-se as nascentes das três maiores bacias hidrográficas da América do Sul: Amazônica/Tocantins, São Francisco e Prata, resultando em um elevado potencial aquífero e favorecendo a sua biodiversidade (MMA, 2013).

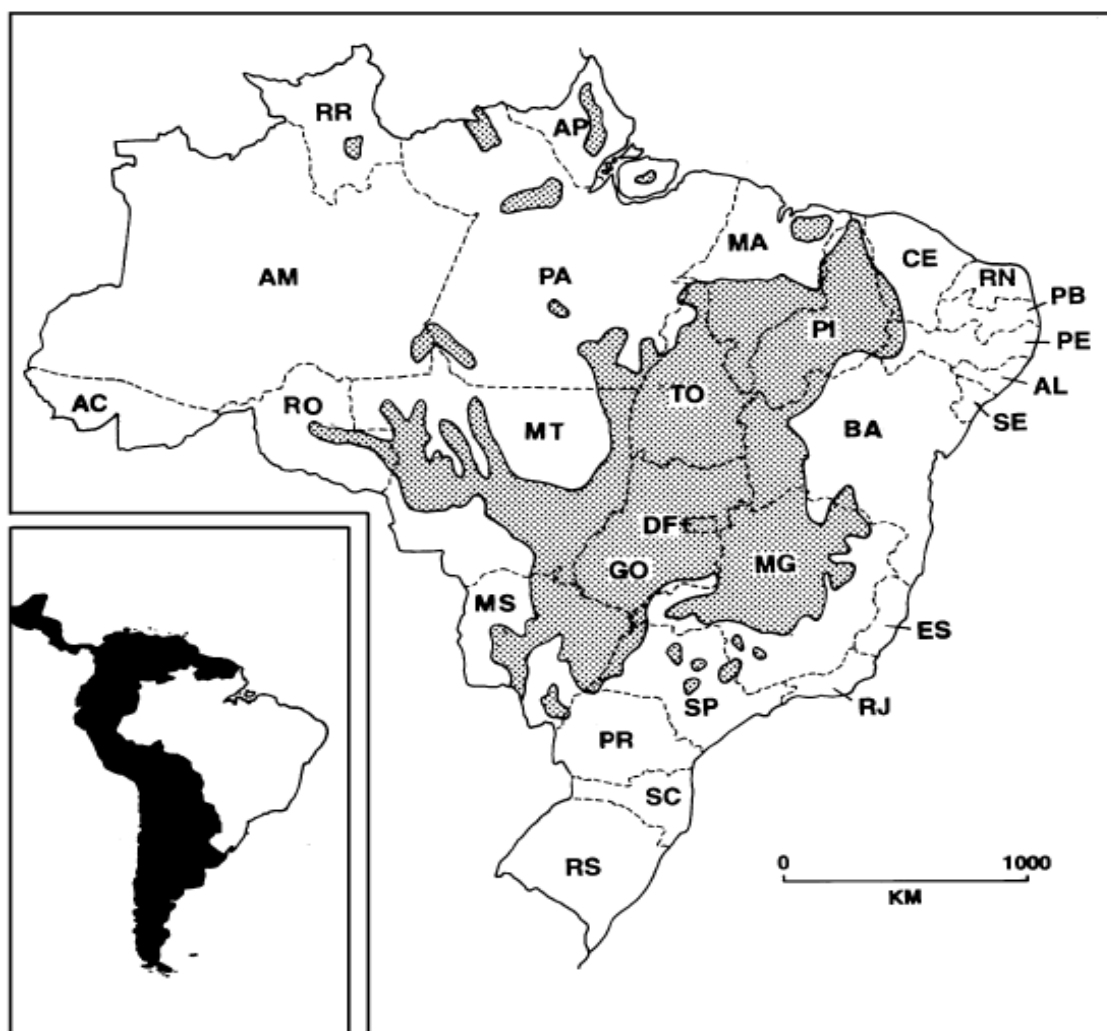


Figura 2.6 – Distribuição da vegetação do cerrado brasileiro (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997).

O cerrado detém cerca de 5% da biodiversidade do planeta, sendo considerado a savana mais rica do mundo. A heterogeneidade espacial é um fator determinante para a ocorrência de uma diversidade de espécies: o bioma abriga mais de 11000 espécies vegetais, além de uma grande variedade de vertebrados, terrestres e aquáticos, de invertebrados e de micro-organismos, tais como fungos associados às plantas da região (MMA, 2013).

O fungo *Chrysonilia sitophila*, que pode ser encontrado no ecossistema do cerrado, é um anemófilo, isto é, fungo dispersado pelo ar atmosférico e que pode ser encontrado como componente da flora microbiana do homem e de animais domésticos, como contaminante de alimentos, como deteriorantes de acervos e madeiras, em água doce e salgada, ou ser responsável pelo emboloramento. Sua dispersão na natureza é ampla; os propágulos fúngicos podem ser encontrados em altas concentrações nos mais variados locais, especialmente em ambientes úmidos (MEZZARI, 2002).

As colônias de *Chrysonilia sitophila* se expandem rapidamente, com taxa de crescimento diário, a 25 °C, de cerca de 25 mm. Este fungo é praticamente incolor, mas logo desenvolve uma coloração laranja, como mostra a Figura 2.7 (VON ARX, 1981).



Figura 2.7 – Foto ilustrativa do fungo *Chrysonilia sitophila*.

2.4. Complexo enzimático de celulase

Celulase é uma enzima constituída por um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. É um biocatalisador altamente específico que atua em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose desperta maior interesse industrial devido a possibilidade de sua conversão em etanol. A sinergia acontece quando a atividade exibida por misturas de componentes é maior que a soma das atividades desses componentes avaliadas separadamente (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; OGEDA, 2011).

A bioconversão de resíduos que contêm celulose até glicose é catalisada por um grupo de enzimas denominadas celulasas. Para que ocorra a hidrólise enzimática da celulose é necessário que ocorra a adsorção da enzima à superfície do substrato, com a formação de um complexo enzima celulose. A adsorção das celulasas sobre o substrato promove, além de um contato físico entre estes componentes, um importante papel na eficiência da hidrólise de celulose (SALAMONI, 2005).

A classificação das celulasas, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, é dividida em três grupos: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

As endoglucanases são enzimas que catalisam a hidrólise interna de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose, atuando aleatoriamente sobre regiões amorfas e sobre substratos solúveis de celulose, liberando celoligossacarídeos. Elas podem hidrolisar também ligações β -1,4 em D-glicanas que contenham ligações β -1,3. As endoglucanases são também conhecidas como celulasas, endo β -1,4-glicanases, glicanases ou carboximetil celulasas. Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável sobre carboximetilcelulose, Avicel, β -glicana e xilana (SALAMONI, 2005).

As exoglucanases conhecidas também como celobiohidrolases, β -1,4-celobiohidrolases ou avicelases, catalisam a hidrólise de ligações β -1,4-glicosídicas na celulose e celotetraose, das extremidades com resíduos redutores e não redutores e unidades de glicose de terminais não redutores da cadeia (SALAMONI, 2005).

A completa hidrólise é realizada pela ação das β -glicosidases, conhecidas também como celobiasas, que convertem celobiose em glicose e catalisam a hidrólise de resíduos de β -D-glicose terminais não redutores liberando β -D-glicose (SALAMONI, 2005).

A hidrólise enzimática de celulose pela celulase envolve, portanto, três etapas: adsorção das celulasas na superfície de celulose, subsequente quebra da celulose através da ação sinérgica das celulasas e dessorção da celulase do resíduo de celulose no sobrenadante. Acredita-se que a acessibilidade da celulase nos sítios de adsorção sobre a estrutura cristalina da celulose é um fator importante na determinação da taxa de hidrólise. Com o intuito de se aumentar a área superficial acessível à adsorção de celulasas, o substrato é sujeito frequentemente a pré-tratamentos que destroem o arranjo de microfibrilas de celulose nos domínios cristalinos (OGEDA, 2011).

Contato físico direto entre as enzimas e as moléculas do substrato é um pré-requisito para a hidrólise. Qualquer característica estrutural que limite a acessibilidade das enzimas diminui o rendimento hidrolítico (OGEDA, 2011).

Portanto, contribuições científicas vêm sendo geradas continuamente, no que tange ao isolamento de micro-organismos produtores de celulasas, ao aumento da expressão de celulasas por mutações gênicas, à purificação e caracterização de componentes destes complexos enzimáticos, ao entendimento sobre os mecanismos de ataque à celulose, à determinação de estruturas tridimensionais das celulasas e à demonstração do potencial industrial dessas enzimas (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

2.5. Etanol de primeira e segunda geração

O Brasil se destaca como produtor de etanol de primeira geração em larga escala depois de 1970, quando houve o primeiro choque na produção petrolífera, como pode ser visto na Figura 2.8. Até o fim da década de 1970, o etanol era usado como insumo para as indústrias de bebidas e para algumas indústrias químicas, ressaltando-se que grande parte do etanol era proveniente do gás natural. Já em 1975, foi implantado o Programa Nacional do Alcool – Proálcool, com o objetivo de estimular a produção de álcool para atender às necessidades do mercado interno e externo e da política de combustíveis automotivos (ROSA; GARCIA, 2009; MONTEIRO; ALTMAN; LAHIRI, 2012).

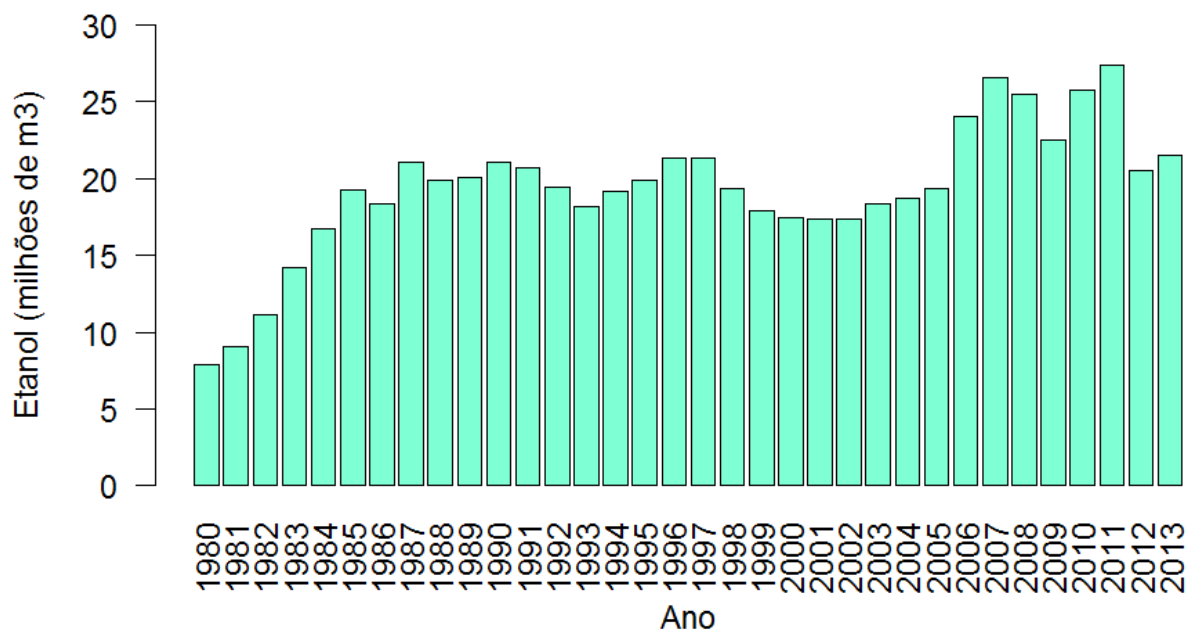


Figura 2.8 – Evolução da produção de etanol de primeira geração no Brasil (MONTEIRO; ALTMAN; LAHIRI, 2012 – adaptado).

Na produção de etanol, o estado de São Paulo se destaca por ser produtor de 60% de todo etanol brasileiro, mas a atual produção vem se diversificando com o aumento da mesma em diversos estados, com destaque para Minas Gerais e Goiás, pois a atual capacidade de expansão da produção em São Paulo é limitada (EGESKOG et al., 2011).

Ainda hoje a via fermentativa é a mais importante para a obtenção de álcool no Brasil, tanto para a produção de etanol de primeira geração, pela cana-de-açúcar, quanto de segunda geração, a partir de biomassas lignocelulósicas. O que torna a produção de etanol por fermentação a forma mais econômica de sua obtenção é a diversidade de matérias-primas naturais e residuais existentes no país (PEREIRA JR; COUTO; SANTA ANNA, 2008)

O etanol de segunda geração vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos desde o fim do século XIX, mas apenas nos últimos 20 anos essa técnica tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis. Os Estados Unidos e a Europa conduzem os principais programas de pesquisa e desenvolvimento sobre esse tema em escalas experimentais de produção. Contudo, o sucesso da pesquisa poderia transformar o etanol de segunda geração em um biocombustível passível de ser produzido em várias regiões do mundo, aproveitando, assim, a alta disponibilidade de resíduos de biomassa produzidos em

diversas atividades, tais como as agrícolas e industriais (MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008).

O etanol pode ser produzido a partir da fermentação direta de açúcares simples ou a partir de polissacarídeos tais como amido ou celulose, que podem ser convertidos em açúcares. Assim, as fontes de carboidratos podem ser classificadas em três grupos principais: (1) açúcares simples: cana-de-açúcar, beterraba, sorgo, soro de leite e melaço; (2) amidos: grãos como o milho e trigo, tubérculos tais como mandioca, batata, etc; (3) biomassa lignocelulósica: material lenhoso, palhas, resíduos agrícolas e resíduos de culturas (MUSSATTO et. al, 2010).

A produção de etanol é, geralmente, realizada em três etapas: obtenção de uma solução de açúcares fermentescíveis, fermentação destes açúcares em etanol, e separação e purificação de etanol. A forma de execução destas etapas depende da biomassa utilizada, como mostra a Figura 2.9 (MUSSATO et. al, 2010), na qual pode-se observar que a etapa anterior à fermentação para se obter açúcares fermentescíveis é o que diferencia os processos de produção de etanol a partir do açúcar simples, a partir do amido e a partir do material lignocelulósico. Na produção de etanol que utiliza sacarose, a etapa de hidrólise é desnecessária, pois a sacarose é um açúcar fermentescível. Já, na produção de etanol de amido de milho, torna-se necessária a sacarificação (Reator M): o amido é gelatinizado por cozimento e submetido a hidrólise enzimática para formação de monômeros de glicose, os quais podem ser fermentados pelos micro-organismos. Nos processos que utilizam biomassa lignocelulósica, é necessária a abertura das fibras e tratamento para conversão da hemicelulose e da celulose em açúcares fermentescíveis: a) abertura das fibras de celulose; b) separação da celulose da hemicelulose com hidrólise desta a pentoses e hexoses (Reator 1); c) hidrólise da celulose a glicose (Reator 2).

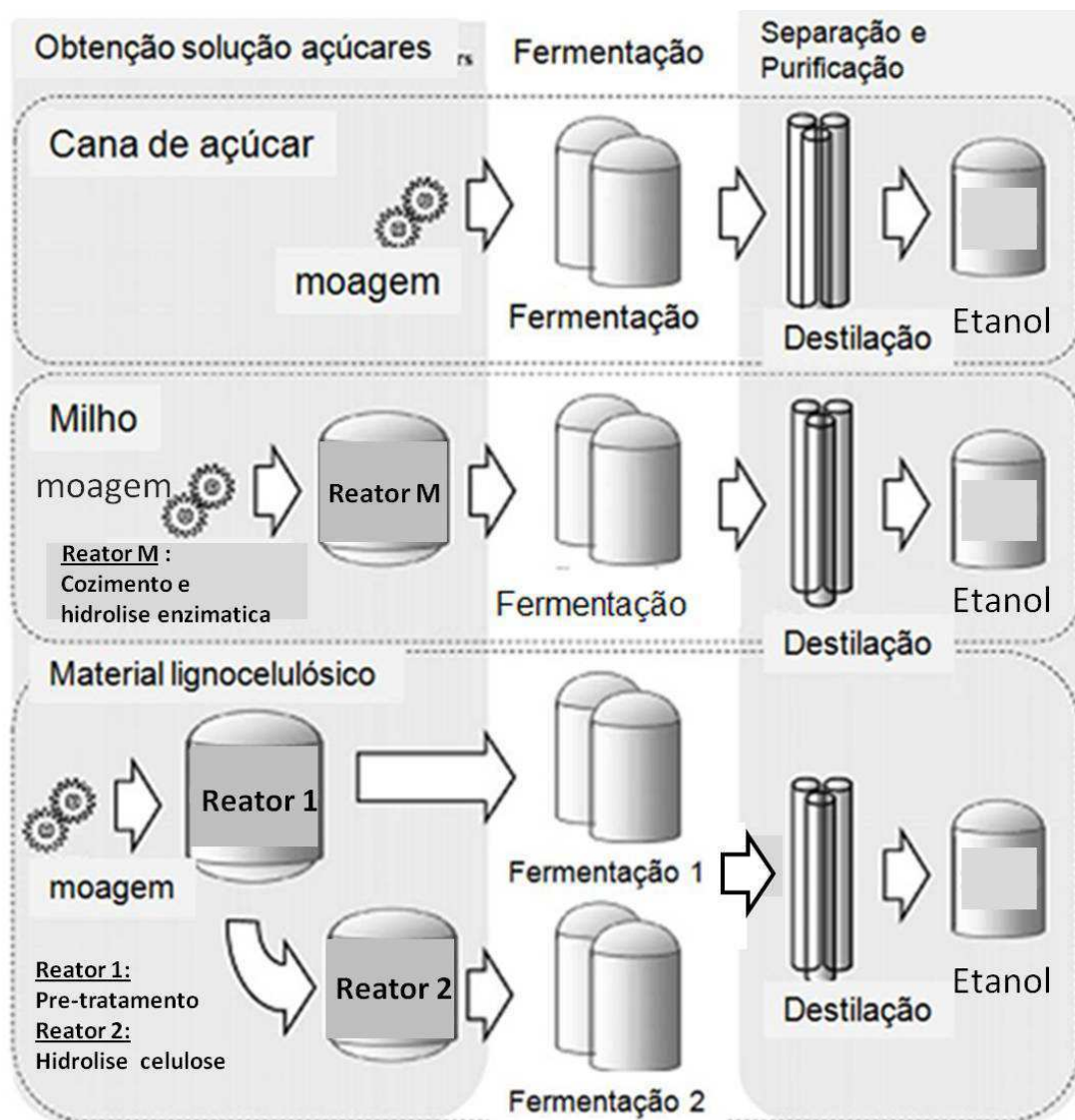


Figura 2.9 – Fluxograma com as matérias-primas principais e os processos utilizados para a produção de etanol (MUSSATTO et al., 2010 – adaptado).

As etapas básicas da produção de etanol de segunda geração, de acordo com a Figura 2.10, são: (1) pré-tratamento da biomassa, como o bagaço de cana, para tornar a celulose mais acessível para as etapas subsequentes, (2) hidrólise enzimática para quebrar os polissacarídeos em açúcares simples, (3) fermentação destes açúcares em etanol e (4) destilação. Na hidrólise enzimática, a técnica de fermentação em estado sólido (FES) pode ser utilizada para a produção de complexos enzimáticos que serão extraídos e utilizados na hidrólise da celulose.



Figura 2.10 – Principais processos utilizados para a produção de etanol celulósico com destaque para a hidrólise enzimática.

As tecnologias envolvidas para a produção de etanol de segunda geração são mais complexas e o custo da produção é mais elevado quando comparado com a produção de etanol a partir de cana, beterraba ou milho. No entanto, a maioria dos materiais lignocelulósicos apresenta um grande potencial para a produção de etanol em grande escala para o consumo mundial como um combustível renovável. A biomassa lignocelulósica se tornará, portanto, a matéria-prima principal para a produção de etanol no futuro próximo (MUSSATTO et al., 2010).

Na produção de etanol de segunda geração, tanto a hidrólise da celulose como a presença de outros compostos distintos da celulose na biomassa dificultam a produção de etanol. Esta dificuldade pode ser constatada pela comparação da concentração de etanol obtida na produção de álcool de cana com as concentrações que a literatura cita para etanol de segunda geração. Neste sentido, são valores típicos da literatura para processos batelada com meio sólido as concentrações de etanol variáveis entre 3,5 e 13,6 g/L, como mostra a Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Etanol de segunda geração gerado com diferentes condições de fermentação batelada.

Descrição	Explicação	Etanol (g/L)	Referência
Fermentação de papel nas concentrações de 10 g/L e 45 g/L para 5 dias de fermentação	Otimização do meio de cultura com o uso de nutrientes e vitaminas, e <i>Clostridium thermocellum</i>	3,5 e 13,6	ISLAM et al., 2013
Fermentação de palha de trigo com 200 g/L de sólido	Otimização da produção de etanol pelo uso de agentes esterilizantes na fermentação etílica de palha de trigo hidrolisada por enzima comercial	5,6	LEVER; HO, 2012
Fermentação de palha de trigo com 200 g/L de sólido	Otimização da produção de etanol pelo uso de agentes esterilizantes na fermentação etílica de palha de trigo hidrolisada por complexo enzimático bruto	8,7	LEVER; HO, 2012
Fermentação de sorgo com enzima comercial, com 40 g/L de sólido (72 h)	Otimização das condições de pré-tratamento e fermentação com o uso de hidrólise ácida	8,4	XU et al., 2011
Fermentação de palha de trigo sem pré-tratamento na concentração de 47 g/L	Produção de complexo enzimático bruto por FES de <i>Trichoderma reesei</i> utilizado na fermentação etílica de palha de trigo, com tempos variáveis entre 1 e 7 dias	5,5	LEVER; HO; CORD-RUWISCH, 2010

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Micro-organismos

Neste trabalho foram utilizados três fungos de uma coleção de 105 fungos do Cerrado provenientes da região do Triângulo Mineiro, armazenados no laboratório de Engenharia Bioquímica (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química/UFU. Detalhes sobre esta coleção são apresentados no Apêndice 1.

Os fungos utilizados foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio Czapek (Tabela 3.1), previamente esterilizado em autoclave a 1,0 atm por 20 min, incubadas em estufa (25 ± 1 °C) por 5 dias para o crescimento, e posteriormente mantidos sob refrigeração com renovação de cultivo a cada 20 dias.

Tabela 3.1 – Composição do meio Czapek.

Czapek (g/L)	
Glicose	20,00
Nitrato de sódio (NaNO_3)	2,00
Fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4)	1,00
Sulfato de magnésio (MgSO_4)	0,50
Cloreto de potássio (KCl)	0,50
Sulfato ferroso (FeSO_4)	0,01
Ágar	20,00

Fonte: DSMZ, 2009

Como referencial de comparação, utilizou-se, também, a cepa notadamente produtora de celulase *Aspergillus niger* ATCC 16404, adquirida da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello – Brasil. Esta cepa foi preservada por repique contínuo em tubos de ensaio contendo meio de Batata Glicose Agar – PDA (Tabela 3.2) previamente esterilizado em autoclave a 1,0 atm por 20 min, incubada em estufa (25 ± 1 °C) por 5 dias para o crescimento, e posteriormente conservada sob refrigeração com renovação de cultivo a cada 20 dias.

Tabela 3.2 - Composição do meio PDA.

PDA (g/L)	
Infusão de batatas	200,0
Glicose	20,0
Agar	15,0

Fonte: DSMZ, 2009

O Quadro 3.1 descreve os micro-organismos utilizados neste trabalho, o local de origem e as características físicas dos fungos no momento da coleta.

Quadro 3.1 – Fungos, local de origem e descrição.

Fungo	Local de origem	Descrição no momento da coleta
23	Município de Estrela do Sul/MG	Verde água, não filamentoso
38	Coletado ramo podre de pequizeiro. Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Amarelo, não filamentoso
42	Coletado no caule de eucalipto, Fazenda Experimental do Glória-Uberlândia/MG	Verde água, não filamentoso, tipo pó esbranquiçado
Fungo Coleção de Cultura (referencial de comparação)		
65	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello – Brasil

Para as fermentações alcoólicas, utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 (Sc) produzida pela Mauri Brasil Ind. Com. Ltda na forma seca, sendo estocada sob refrigeração (5 ± 1 °C) em embalagem fechada. Esta levedura é comercializada e utilizada no Brasil em plantas industriais de fermentação alcoólica.

3.2. Biomassas

As biomassas utilizadas foram:

- resíduo do beneficiamento de arroz (farelo e palha), adquirido da Cocal Alimentos do município de Uberlândia (Figura 3.1);



(a)



(b)

Figura 3.1 – Fotos ilustrativas do farelo de arroz (a) e da palha de arroz (b).

- soro de leite em pó, cedido pela empresa Cargill de Uberlândia;
- bagaço de cana-de-açúcar *in natura*;
- mistura em iguais proporções de bagaço de cana-de-açúcar, proveniente do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) do município de Piracicaba/SP, na forma já tratada com explosão a vapor nas seguintes condições:
 - 1) Alta severidade: pressão – 19 kgf/cm^2 ; tempo - 4 min (Figura 3.2 - a)
 - 2) Baixa severidade: pressão - 12 kgf/cm^2 ; tempo - 8 min (Figura 3.2 - b)



(a)

(b)

Figura 3.2 – Fotos ilustrativas do bagaço de cana tratado com alta severidade (a) e do bagaço de cana tratado com baixa severidade (b).

3.3. Produção dos complexos enzimáticos de fungos

A Figura 3.3 apresenta as sequências de etapas empregadas para a produção dos complexos enzimáticos de fungos, sendo que cada uma delas é explicada nos itens 3.3.1 e 3.3.2. A primeira etapa consistiu da preparação do inóculo que foi utilizado na fermentação em estado sólido (FES). Após o tempo de fermentação necessário para a produção do complexo enzimático, uma solução de sais acrescida de extrato de levedura e Tween 80 (Tabela 3.3) foi adicionada ao meio sólido fermentado para a extração do complexo enzimático. Este meio fermentado, já com a solução de sais, era agitado com bastão de vidro por cinco minutos e filtrado. Na filtração, a massa sólida era prensada com um béquer com o intuito de se extrair a maior quantidade de líquido possível, obtendo-se o extrato enzimático que era utilizado na fermentação submersa (FS) para a produção de etanol.

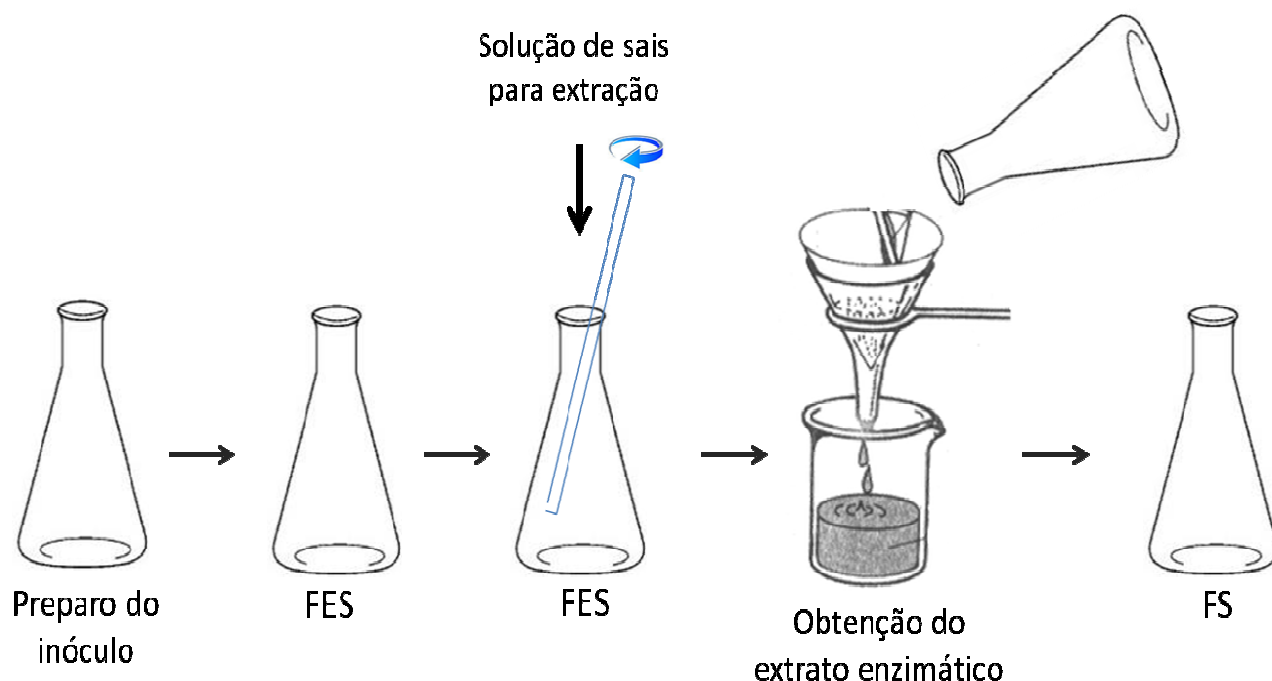


Figura 3.3 – Esquema ilustrativo da sequência de etapas para produção de complexo enzimático.

3.3.1. Inóculo

O inóculo para cada fermentação em estado sólido foi preparado com meio de cultura Czapek líquido, conforme composição: NaNO_3 (2,0 g/L); K_2HPO_4 (1,0 g/L); MgSO_4 (0,5 g/L); KCl (0,5 g/L); FeSO_4 (0,01 g/L); Glicose 20,0 (g/L), previamente esterilizado em autoclave a 1,0 atm por 20 min. Esporos da linhagem, obtidos da raspagem de dois tubos de ensaio contendo o fungo em estudo, foram inoculados em erlenmeyers de 250 mL de volume, com tampão de algodão envolto em gaze, contendo 100 mL de Czapek líquido. O meio inoculado foi mantido sob agitação a 120 rpm, por 48 h em temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). Após essa etapa, as células geradas foram centrifugadas e ressuspensas em água no mesmo volume (100 mL). Estas células foram utilizadas, imediatamente, nas fermentações em estado sólido visando a produção do complexo enzimático.

3.3.2. Fermentação em estado sólido (FES)

As fermentações em estado sólido para produção dos complexos enzimáticos de fungos foram conduzidas com meios sólidos de biomassa de arroz (farelo e palha), bagaço de cana-de-açúcar tratado e solução de soro de leite na concentração de 60 g/L, em erlenmeyers de 500 mL de volume (Figura 3.4) com tempos e composições dos meios variáveis. Foram realizados quatro conjuntos distintos de ensaios: 1) seleção do micro-organismo e do meio fermentativo; 2) determinação do tempo de fermentação; 3) determinação da biomassa da fermentação e 4) determinação da quantidade de biomassa para enchimento de um reator de 500 mL de volume.



Figura 3.4 – Foto ilustrativa das fermentações em estado sólido em diferentes ensaios.

A extração do complexo enzimático foi feita utilizando uma solução de sais acrescida de extrato de levedura e Tween 80 (Tabela 3.3). Para cada 50 g de substrato em base úmida utilizado na fermentação em estado sólido, foram necessários 125 mL da solução de sais para a extração dos complexos enzimáticos (FISCHER et al., 2012a). O meio fermentado da FES, juntamente com a solução de extração, era filtrado obtendo-se, assim, o extrato enzimático que era utilizado em seguida na fermentação submersa (fermentação alcoólica) para a produção de etanol.

Tabela 3.3 – Composição da solução de sais, acrescida de extrato de levedura para extração dos complexos enzimáticos.

Solução de sais acrescida de extrato de levedura (g/L)	
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	5,0
Sulfato de magnésio (MgSO_4)	1,0
Cloreto de amônio (NH_4Cl)	1,0
Cloreto de potássio (KCl)	5,0
Extrato de levedura	6,0
Tween 80	10,0 mL

Fonte: FISCHER et al., 2012b.

3.3.2.1. Seleção do micro-organismo e seleção do meio fermentativo

Para a seleção do melhor micro-organismo capaz de degradar a celulose, fermentações em estado sólido foram realizadas com os quatro fungos (Figura 3.5) que apresentaram maior índice enzimático em testes preliminares (não são apresentados neste trabalho). Também foi avaliado o uso de solução de soro de leite (60 g/L) e de solução de minerais acrescida de extrato de levedura, de composição: KH_2PO_4 (5,0 g/L); MgSO_4 (1,0 g/L); NH_4Cl (1,0 g/L); KCl (5,0 g/L); extrato de levedura (6,0 g/L), na produção de complexo enzimático. Estas soluções foram adicionadas ao substrato em uma determinada quantidade, de modo a garantir que a fermentação ocorresse em estado sólido.



Figura 3.5 – Fungos utilizados na pesquisa.

Foram testadas composições de meio líquido adicionado nas fermentações em estado sólido, conforme mostra a Tabela 3.4. Cada composição foi avaliada em termos de atividade enzimática para tempos de fermentação de 24, 48, 72, 94 e 101 horas. Como substrato sólido foi utilizado 50 g das seguintes biomassas: 1/3 de bagaço de cana-de-açúcar tratado (mistura em igual proporção de bagaço de cana tratado com baixa severidade e com alta severidade), 1/3 de farelo de arroz e 1/3 de palha de arroz. As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers estáticos de 500 mL de volume.

Tabela 3.4 – Composição do meio líquido adicionado nas fermentações sólidas para escolha do melhor substrato.

<i>Formulação</i>	<i>Composição</i>
Formulação 1	soro 17mL + minerais 17mL + inóculo (<i>Aspergillus niger</i> Fa) 34mL
Formulação 2	soro 17mL + minerais 17mL + inóculo (Fungo do cerrado 23) 34mL
Formulação 3	soro 17mL + minerais 17mL + inóculo (Fungo do cerrado 38) 34mL
Formulação 4	soro 17mL + minerais 17mL + inóculo (Fungo do cerrado 42) 34mL
Formulação 5	minerais 34mL + inóculo (<i>Aspergillus niger</i> Fa) 34mL
Formulação 6	minerais 34mL + inóculo (Fungo do cerrado 23) 34mL
Formulação 7	minerais 34mL + inóculo (Fungo do cerrado 38) 34mL
Formulação 8	minerais 34mL + inóculo (Fungo do cerrado 42) 34mL
Formulação 9	soro 34mL + inóculo (<i>Aspergillus niger</i> Fa) 34mL
Formulação 10	soro 34mL + inóculo (Fungo do cerrado 23) 34mL
Formulação 11	soro 34mL + inóculo (Fungo do cerrado 38) 34mL
Formulação 12	soro 34mL + inóculo (Fungo do cerrado 42) 34mL

3.3.2.2. Determinação do tempo de fermentação em estado sólido para produção de extrato enzimático

O fungo e o meio escolhidos no ensaio anterior foram utilizados na avaliação da produção de etanol para diferentes tempos de fermentação em estado sólido. Para os tempos de 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas foram feitas análises de determinação de proteínas (método de Lowry); determinação de células (absorbância a 600nm em espectrofotômetro); determinação de açúcares redutores totais (ART) e determinação de etanol.

3.3.2.3. Determinação da biomassa da fermentação em estado sólido para produção de extrato enzimático

Para determinação da melhor biomassa da fermentação em estado sólido, foram conduzidas 12 fermentações (Tabela 3.5) em erlenmeyers estáticos de 500 mL, variando-se a proporção de bagaço de cana tratado, farelo de arroz e palha de arroz. Cada composição testada continha 50 gramas de biomassa e composição de meio líquido escolhida nos ensaios

anteriores. Nestas fermentações foram realizadas as mesmas análises do item 3.3.2.2 (determinações de proteínas, células, ART e etanol).

Tabela 3.5 – Composição da biomassa da fermentação em estado sólido.

<i>Meio</i>	<i>Bagaço de cana tratado</i>	<i>Farelo de arroz</i>	<i>Palha de arroz</i>
M1	-	½	½
M2	-	1/3	2/3
M3	-	2/3	1/3
M4	½	½	-
M5	2/3	1/3	-
M6	1/3	2/3	-
M7	½	-	½
M8	1/3	-	2/3
M9	2/3	-	1/3
M10	1/3	1/3	1/3
M11	1	-	-
M12	-	1	-

3.3.2.4. Seleção da quantidade de biomassa na fermentação em estado sólido para enchimento de um reator

A seleção da quantidade total de biomassa na fermentação em estado sólido para enchimento de um reator estático de 500 mL de volume foi avaliada para diferentes quantidades, conforme apresentado na Tabela 3.6. Para cada 50 g de biomassa utilizada na fermentação em estado sólido, foram utilizados 125 mL de solução de sais acrescida de extrato de levedura, de composição descrita anteriormente (Tabela 3.3), para extração do complexo enzimático. Na Tabela 3.6 também estão especificadas as quantidades necessárias da solução de sais para extração, de acordo com a relação citada (para cada 50 g de biomassa utilizou-se 125 mL de solução de sais), assim como as quantidades necessárias da solução de soro de leite (60 g/L) e inóculo. Nestes ensaios, também foram feitas análises de proteínas, de células, de açúcares redutores totais e de concentração de etanol.

Tabela 3.6 – Diferentes quantidades de biomassa para a FES.

Sólidos (biomassa)	Total de biomassa (g)	Solução de soro de leite (mL)	Inóculo (mL)	Solução de sais para extração (mL)
S1	25,0	17,0	17,0	62,5
S2	50,0	34,0	34,0	125,0
S3	75,0	51,0	51,0	187,5
S4	100,0	67,0	67,0	250,0
S5	120,0	80,4	80,4	300,0
S6	140,0	93,8	93,8	350,0
S7	160,0	107,2	107,2	400,0

3.4. Produção de etanol

O substrato utilizado para a produção de etanol foi composto de bagaço de cana *in natura* e bagaço de cana tratado pelo processo de explosão a vapor com alta e baixa severidade.

A fermentação alcoólica foi realizada com 100 mL de extrato enzimático obtido por FES, em erlenmeyers sobre mesa agitada com volume total de 250 mL (Figura 3.6). As condições adotadas para a fermentação alcoólica foram as mesmas da fermentação com caldo de cana-de-açúcar: temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, pH de 4,5, concentração de inóculo (levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904) de 30 g/L. Os testes iniciais foram realizados utilizando 16 gramas de bagaço tratado (mistura em iguais proporções dos dois tipos de bagaço tratado) e 4 gramas de bagaço *in natura*, por um tempo de 48 h de fermentação.



Figura 3.6 – Foto ilustrativa dos erlenmeyers sobre mesa agita para a fermentação alcoólica.

3.4.1. Fermentações alcoólicas em diferentes tempos

As fermentações alcoólicas iniciais foram conduzidas por 48 h. Novas fermentações alcoólicas foram feitas para testar diferentes tempos de fermentação, utilizando o substrato de 16 gramas de bagaço tratado e 4 gramas de bagaço *in natura*, composição que foi utilizada nos testes iniciais. Fermentações alcoólicas foram conduzidas com o extrato enzimático produzido nas condições ótimas da FES. Os tempos testados foram para 24 h, 48 h e 72 h.

3.4.2. Efeito do teor de bagaço de cana utilizado na fermentação submersa na produção de etanol

Testes foram realizados para determinação da melhor composição para a fermentação alcoólica, a partir da melhor condição de produção do complexo enzimático. Diferentes composições foram testadas, como mostra a Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Composição de cada substrato da fermentação alcoólica.

Substrato	Bagaço de cana tratado (g)	Bagaço de cana <i>in natura</i> (g)	% de bagaço tratado no total de sólido	Quantidade total de sólido (g de sólido)
A	12,0	8,0	60,0	20,0
B	16,0	4,0	80,0	20,0
C	20,0	-	100,0	20,0
D	14,4	9,6	60,0	24,0
E	19,2	4,8	80,0	24,0
F	21,0	4,0	84,0	25,0
G	16,8	11,2	60,0	28,0
H	22,4	5,6	80,0	28,0
I	28,0	-	100,0	28,0
J	26,0	4,0	86,7	30,0

As fermentações alcoólicas foram conduzidas em erlenmeyers sobre mesa agitada contendo 100 mL de extrato enzimático, levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904 (30 g/L), por um tempo determinado no teste anterior (item 3.4.1.).

3.5. Fermentações alcoólicas sucessivas

Foi avaliada a produção de etanol em fermentações sucessivas nas condições ótimas obtidas nos experimentos anteriores (tempo e composição do meio de FES, quantidade de sólido para enchimento do erlenmeyer para FES, tempo e composição do substrato da fermentação alcoólica). Este experimento foi realizado em sequência, na qual o meio fermentado de cada fermentação alcoólica era utilizado na extração do complexo enzimático da fermentação em estado sólido seguinte, e este complexo enzimático era utilizado na fermentação alcoólica seguinte, como mostra a Figura 3.7. A concentração de etanol era determinada ao final de cada fermentação alcoólica.

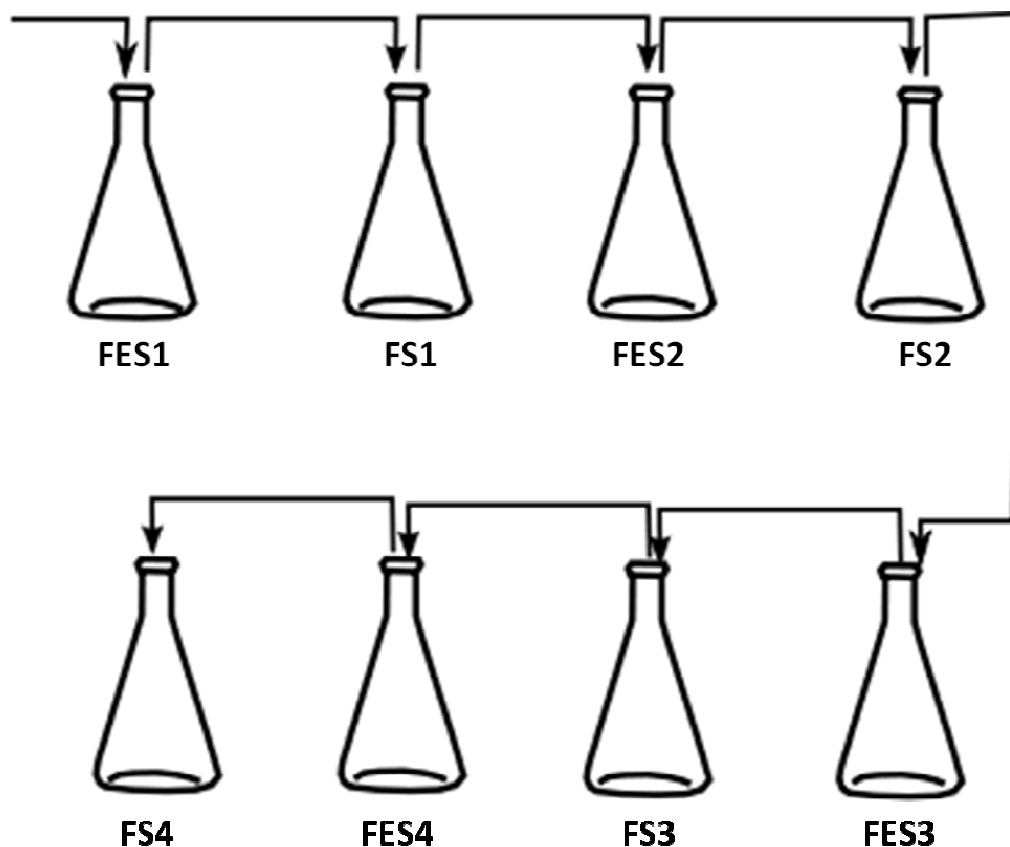


Figura 3.7 – Esquema ilustrativo das fermentações sucessivas, no qual FES representa a fermentação em estado sólido e FS representa a fermentação submersa.

3.6. Atividade enzimática

A atividade enzimática da celulase foi determinada utilizando-se papel de filtro (FPase), expressa em U/g. Com esse método, avaliou-se a velocidade de quebra da celulose proveniente de papel de filtro. Utilizou-se 50 mg de papel de filtro Whatman número 1 picotado como substrato e a concentração de celulase foi quantificada pela hidrólise do papel de filtro em solução tampão de acetato de sódio a 0,2 mol/L e pH 4,7, temperatura de 45 °C usando-se 1 mL de extrato enzimático, 2 mL de tampão durante uma hora. Posteriormente, a quantidade de glicose liberada foi dosada pela reação com ácido dinitrosalicílico – DNS – que foi preparado da seguinte forma: 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio ((CHOH)₂·COONa·COOK) com 16 g de hidróxido de sódio (NaOH) dissolvido em água destilada. Em seguida, foram adicionados 10 g de ácido 3-5 dinitrosalicílico (C₇H₄N₂O₇). Por fim, completou-se o volume para 1 L com água destilada.

3.7. Determinação de proteínas

Na determinação de proteínas do complexo enzimático, foi utilizado o método de Lowry. Neste método, foram utilizadas duas soluções (A e B); a solução A continha 2 g de carbonato de sódio anidro, 0,02 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 100 mL de hidróxido de sódio 0,1N; e a solução B continha 0,5 g de sulfato de cobre, 2 gotas de ácido sulfúrico em 100 mL de água destilada. No momento da análise, as soluções A e B eram misturadas na seguinte proporção: 50 mL da solução A e 1 mL da solução B, e 3 mL desta mistura era adicionada, em um tubo de ensaio, à 1 mL da amostra. Agitava-se o tubo e esperava-se por 10 min. Após essa etapa, adicionava-se 0,3 mL de Folin-Ciocalteau N/2 (normalidade do reagente diluída à metade) ao tubo de ensaio. Agitava-se e esperava-se por 30 min. Desse processo, surgiu uma coloração azul devido a reação da proteína com o íon cobre em solução alcalina. Para quantificação, utilizava-se um espectrofotômetro à 750 nm para determinação de proteínas. Para este método, foi necessária a construção prévia de uma curva-padrão de albumina.

3.8. Quantidade de células

A determinação da concentração celular resultante da fermentação em estado sólido foi realizada pelo método espectrofotométrico a 600 nm, pela determinação da absorbância das células ressuspensas obtidas no processo de extração das mesmas do meio sólido. Nesta metodologia a absorbância obtida em cada leitura foi convertida em massa celular por volume do meio, pelo uso de uma curva padrão que relaciona a concentração celular com a absorbância a 600 nm.

3.9. Determinação da concentração dos açúcares redutores totais (ART)

As concentrações de ART foram determinadas de acordo com o método do ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS) descrito por MILLER (1959). O método DNS baseia-se na redução do ácido dinitro-3,5-salicílico a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento da coloração avermelhada, sendo lida espectrofotometricamente (RABELO, 2007).

Na preparação da solução de DNS, dissolveu-se, à temperatura ambiente, 1 g de ácido dinitro-3,5-salicílico em 50 mL de água e acrescentou-se 20 mL de hidróxido de sódio na concentração 80 g/L (reagente A). Dissolveu-se, também, 30 g de tartarato duplo de sódio e potássio (Sal de Rochelle) em água até dissolução total (reagente B). Posteriormente, adicionou-se o reagente B sobre o A, misturando-os sob agitação constante. Por último, completou-se o volume para 100 mL.

Para a quantificação dos ART, adicionou-se 0,5 mL das amostras em cada tubo de Folin-Wu e 1 mL de DNS. Os tubos foram mantidos em banho-maria por 5 minutos para desenvolvimento da coloração avermelhada. Após este tempo reacional, as amostras foram resfriadas imediatamente pela imersão dos tubos em um banho com água fria. Completou-se o volume até 12,5 mL com água destilada, agitaram-se os tubos para homogeneização da solução e efetuaram-se as leituras da absorbância em espectrofotômetro à 540nm. Preparou-se um tubo onde o volume da amostra foi substituído por água destilada, sendo chamado de tubo branco da reação, para zerar o espectrofotômetro.

Para determinar a concentração dos ART em cada uma das amostras analisadas, foi necessária a construção de uma curva-padrão de glicose.

3.10. Determinação de etanol

As concentrações de etanol foram determinadas pelo método de Cromatografia de Alta Eficiência (HPLC), que consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. A amostra foi diluída em água deionizada, filtrada e injetada no sistema cromatográfico marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL Ca, na qual os componentes são separados e detectados por refração de luz. A solução de arraste utilizada foi água deionizada, fluxo de bomba de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 80 °C e volume de injeção de 20 µL. O etanol foi quantificado a partir de sua respectiva curva de calibração, previamente determinada.

3.11. Tratamento estatístico e síntese dos resultados

Os ensaios foram conduzidos em duplicata sendo que para cada amostra foi feito a determinação das medidas em duplicata, de forma que as barras de erro representam o erro médio associado a média de quatro valores (dois valores de cada uma das réplicas).

Ao final de todos os resultados é feita uma síntese na qual todos ensaios são apresentados de forma comparativa que possibilita avaliar se cada conjunto de variáveis testadas influi na produção de etanol. Esta síntese encontra-se na forma de uma figura que apresenta os resultados dos seis conjuntos de experimentos, que são: 1) seleção do tempo de FES; 2) determinação do substrato da FES; 3) determinação da quantidade de sólidos na FES para enchimento de um reator de 500 mL de volume; 4) seleção do tempo de FS; 5) determinação do substrato da FS e 6) fermentações alcoólicas sucessivas. A maior concentração de etanol em cada conjunto de experimentos é descrita como sendo um círculo de área máxima chamada de 100 e as demais concentrações com áreas proporcionais aos valores das concentrações de etanol observadas.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Seleção e identificação do micro-organismo e seleção do meio fermentativo para fermentação em estado sólido

Para a seleção do micro-organismo e do meio fermentativo para produção de complexo enzimático de celulase, foram testadas doze composições diferentes de meio líquido nas fermentações em estado sólido, conforme apresentado na Tabela 4.1, para tempos de fermentação de 24, 48, 72, 94 e 101 horas. As formulações foram utilizadas em 50 g de meio sólido, conforme descrito no item 3.3.2.1.

Tabela 4.1 – Composição do meio líquido adicionado nas fermentações sólidas para escolha do melhor substrato.

<i>Formulação</i>	<i>Composição</i>
Formulação 1	soro 17mL + mineral 17mL + inóculo (<i>Aspergillus niger</i> Fa) 34mL
Formulação 2	soro 17mL + mineral 17mL + inóculo (Fungo do cerrado 23) 34mL
Formulação 3	soro 17mL + mineral 17mL + inóculo (Fungo do cerrado 38) 34mL
Formulação 4	soro 17mL + mineral 17mL + inóculo (Fungo do cerrado 42) 34mL
Formulação 5	mineral 34mL + inóculo (<i>Aspergillus niger</i> Fa) 34mL
Formulação 6	mineral 34mL + inóculo (Fungo do cerrado 23) 34mL
Formulação 7	mineral 34mL + inóculo (Fungo do cerrado 38) 34mL
Formulação 8	mineral 34mL + inóculo (Fungo do cerrado 42) 34mL
Formulação 9	soro 34mL + inóculo (<i>Aspergillus niger</i> Fa) 34mL
Formulação 10	soro 34mL + inóculo (Fungo do cerrado 23) 34mL
Formulação 11	soro 34mL + inóculo (Fungo do cerrado 38) 34mL
Formulação 12	soro 34mL + inóculo (Fungo do cerrado 42) 34mL

A atividade enzimática para cada formulação e para os diferentes tempos de fermentação é apresentada na Figura 4.1, na qual para cada tempo as formulações de 1 a 12 seguem na mesma ordem descrita na Tabela 4.1. A formulação que gerou maior atividade

enzimática foi a de número 10 para um tempo 94 h de fermentação. Pode-se notar, então, que a solução de soro de leite favoreceu a produção do complexo enzimático para todos os fungos e o fungo do ecossistema do Cerrado de número 23 foi o que se sobressaiu em relação a atividade enzimática.

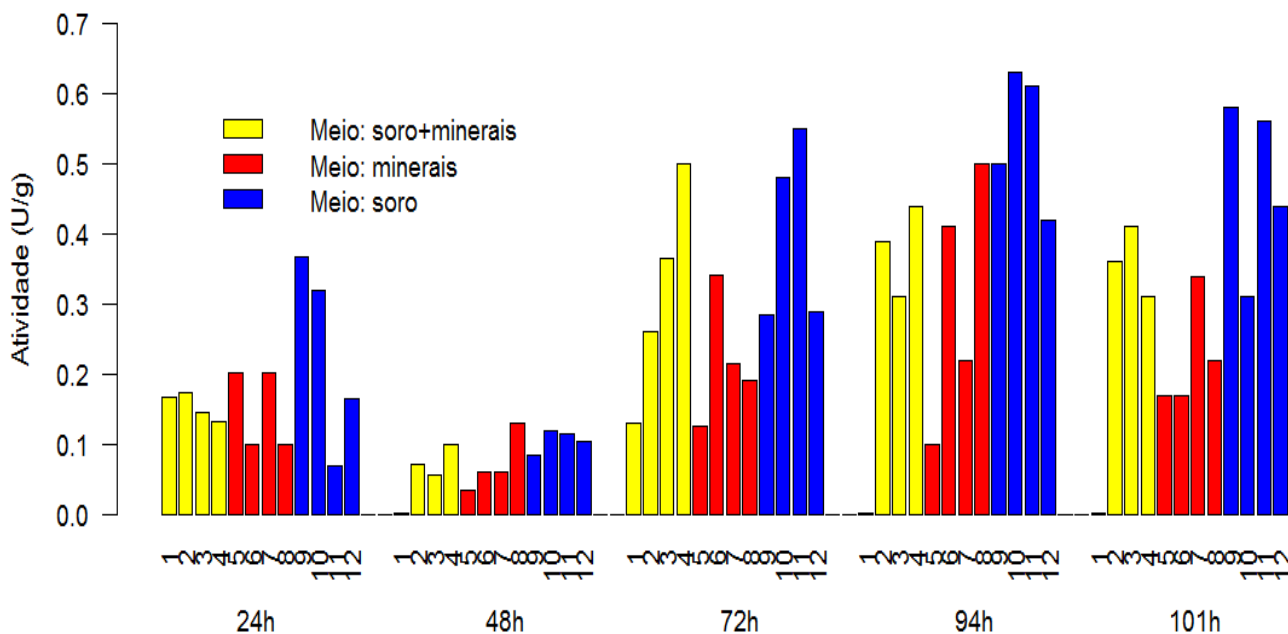


Figura 4.1 – Atividade enzimática para as doze formulações em diferentes tempos.

A identificação do micro-organismo selecionado (fungo do Cerrado de número 23) foi feita no laboratório Exame da cidade de Uberlândia pelo uso de características morfológicas como sendo o *Chrysonilia sitophila*. Este é classificado como um fungo decompositor que se nutre de matéria orgânica animal ou vegetal morta, como pele, folhas e frutas, provocando a sua decomposição. As colônias de *Chrysonilia sitophila* são brancas e macias, mas logo desenvolvem uma coloração laranja devido a produção de massas de conídios de cor, que podem se produzidos em grande profusão. Este fungo pode facilmente tornar-se um contaminante em laboratórios microbiológicos e viveiros pela sua capacidade de crescer bem em Agar nutriente e meios bacteriológicos semelhantes (HARRIGAN, 1998).

4.2. Influência do tempo de fermentação em estado sólido na produção de complexo enzimático

Na determinação do tempo de fermentação em estado sólido para a produção do complexo enzimático, a formulação 10 (34 mL de solução de soro de leite, 34 mL de inóculo de *Chrysonilia sitophila*) foi utilizada na fermentação em estado sólido, com 50 g de biomassa composta por: 1/3 de bagaço de cana-de-açúcar tratado, 1/3 de farelo e 1/3 de palha de arroz. Os tempos da fermentação em estado sólido estudados foram: 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 84 h e 96 h.

A Figura 4.2 apresenta a quantidade de proteínas no extrato enzimático, obtida na fermentação em estado sólido nos tempos estudados. Pode-se observar que a produção de proteínas, muitas das quais enzimas, foi maior para 72 h de fermentação em estado sólido.

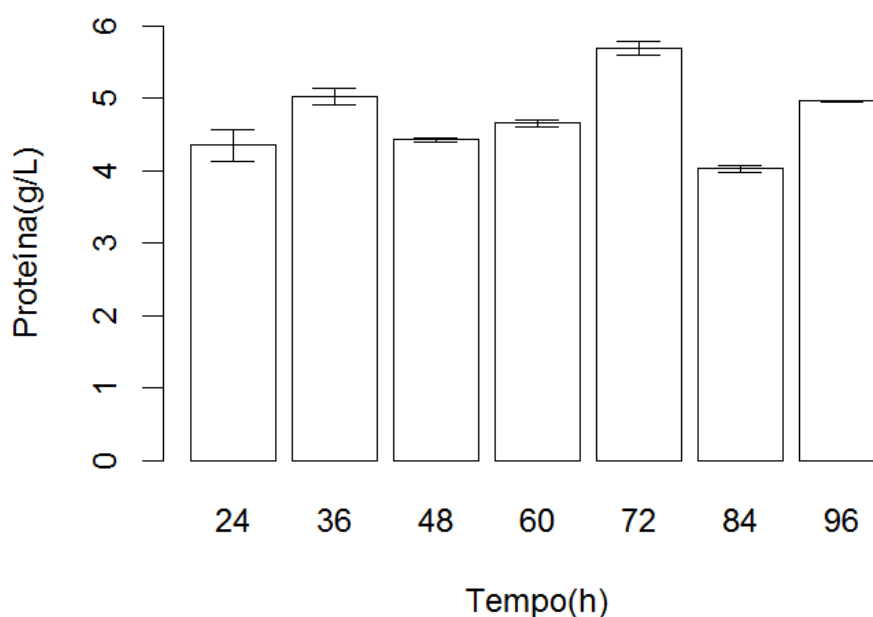


Figura 4.2 – Determinação de proteínas para diferentes tempos de fermentação em estado sólido.

Os açúcares redutores totais (ART) foram determinados para cada extrato enzimático. Os resultados mais satisfatórios foram para as amostras fermentadas em 24 h, 36 h e 72 h, conforme Figura 4.3.

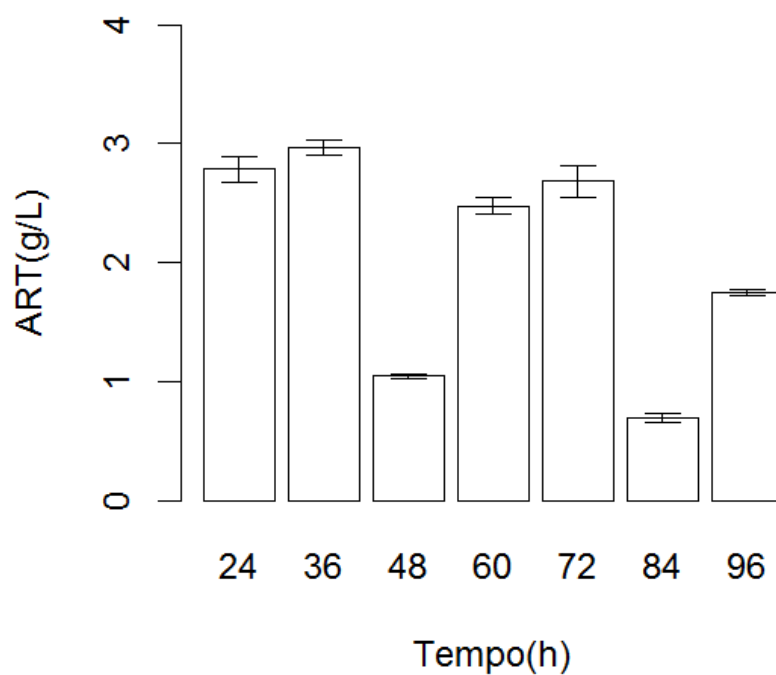


Figura 4.3 – Determinação de ART para diferentes tempos de fermentação em estado sólido.

A quantidade de células gerada nos diferentes tempos de fermentação em estado sólido pode ser visualizada na Figura 4.4. Pode-se notar que em 72 h de fermentação sólida o crescimento celular foi maior.

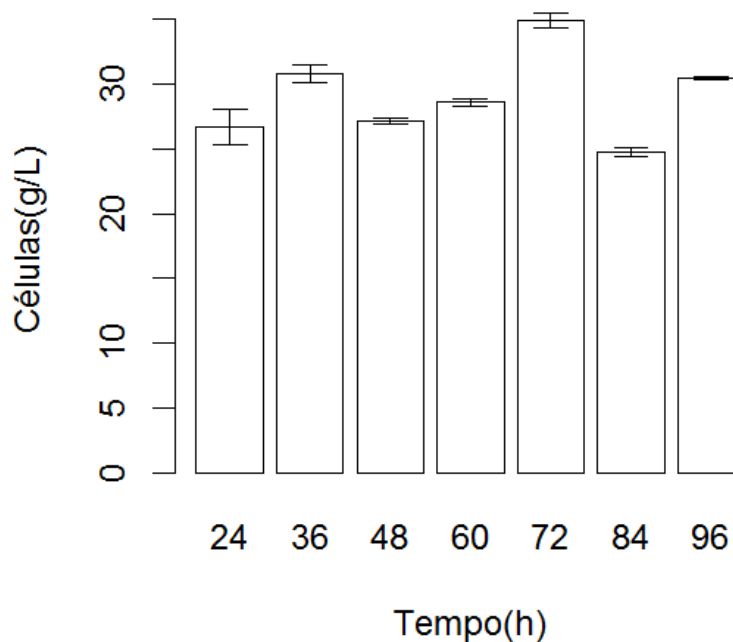


Figura 4.4 – Quantidade de células obtida para os complexos enzimáticos produzidos em diferentes tempos.

A produção de etanol para os diferentes tempos de fermentação em estado sólido estudados é apresentada na Figura 4.5. Pode-se observar que entre os tempos testados, o de maior concentração de etanol foi o de 72 h de fermentação em estado sólido. O fato do tempo observado neste ensaio ser menor que o tempo de 94 h, observado como o melhor tempo na produção de celulase no teste anterior, decorre do fato ser um fenômeno complexo, no qual diferentes enzimas, distintas da celulase, avaliadas no teste anterior atuarem na produção de etanol.

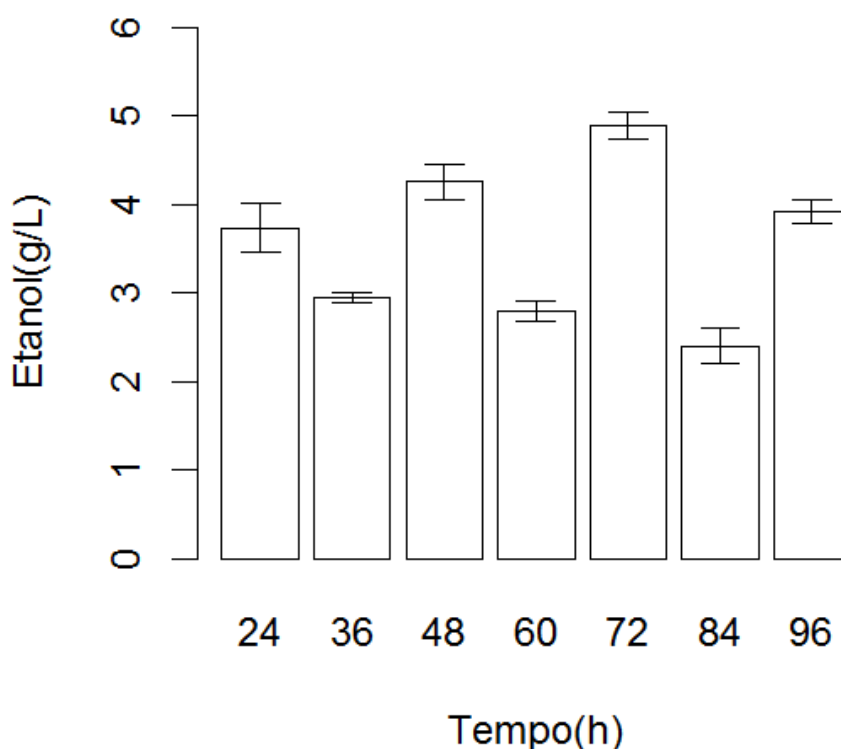


Figura 4.5 – Concentração de etanol para diferentes tempos de fermentação em estado sólido.

A comparação entre as Figuras 4.2, 4.4 e 4.5 mostra que as situações de maior geração de proteínas, crescimento celular e produção de etanol ocorreram para 72 h de fermentação sólida. Neste tempo, embora o ART observado no extrato enzimático não seja maior em 72 h, conforme mostra a Figura 4.3, tem-se que neste tempo o ART corresponde a um dos maiores observados.

Com os resultados descritos acima, conclui-se que o complexo enzimático produzido em 72 horas de fermentação em estado sólido foi o mais satisfatório, visto que nesse tempo a concentração de etanol foi maior. Este tempo é melhor que o encontrado nos trabalhos de Sukumaran e colaboradores (2009), que conduziram a fermentação em estado sólido por 96

horas na produção de celulase utilizando o fungo *Trichoderma reesei* e farelo de trigo como substrato.

4.3. Avaliação da biomassa da fermentação em estado sólido na produção de complexo enzimático

Para 72 h de fermentação em estado sólido, foram testadas doze composições diferentes de substrato para a fermentação. Foram testadas as biomassas de arroz e bagaço de cana-de-açúcar tratado, conforme Tabela 4.2. Todas as fermentações neste teste foram conduzidas em erlenmeyers estáticos de 500 mL de volume, com 50 g de substrato, 34 mL de solução de soro de leite em pó na concentração 60g/L e 34 mL de inóculo.

Tabela 4.2 – Composição da biomassa para fermentação em estado sólido.

<i>Meio</i>	<i>Bagaço de cana tratado</i>	<i>Farelo de arroz</i>	<i>Palha de arroz</i>
M1	-	½	½
M2	-	1/3	2/3
M3	-	2/3	1/3
M4	½	½	-
M5	2/3	1/3	-
M6	1/3	2/3	-
M7	½	-	½
M8	1/3	-	2/3
M9	2/3	-	1/3
M10	1/3	1/3	1/3
M11	1	-	-
M12	-	1	-

A quantidade de proteínas pode ser visualizada na Figura 4.6. Pode-se observar que os meios M6, M7 e M9 se destacam como os meios de maior concentração enzimática, sendo que o meio M6, composto de 1/3 de bagaço de cana tratado e 2/3 de farelo de arroz, foi o que apresentou o resultado mais satisfatório, ou seja, nesta composição houve uma maior

produção de proteínas, que são constituídas por produtos da ação do fungo no substrato e enzimas extracelulares produzidas pelo fungo.

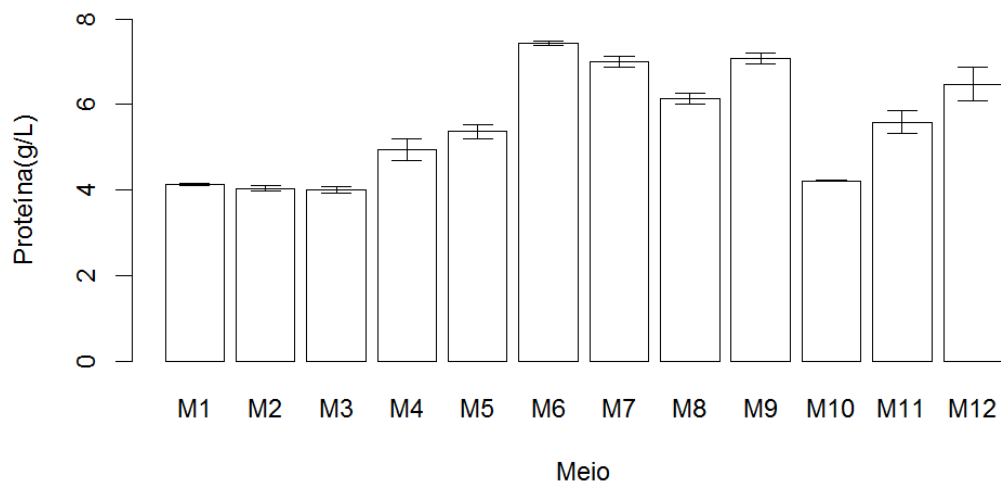


Figura 4.6 – Determinação de proteínas para os diferentes substratos da FES.

A Figura 4.7 mostra os açúcares redutores totais determinados nos diferentes complexos enzimáticos produzidos. Os meios M6, M7 e M9, que apresentaram maior produção enzimática, não foram os meios que apresentaram os maiores valores de ART. Os baixos valores de ART podem ser associados ao fato das células ativas serem capazes de produzir enzimas que hidrolisam o meio sólido e, ao mesmo tempo, consumir os açúcares redutores e outros produtos da hidrólise.

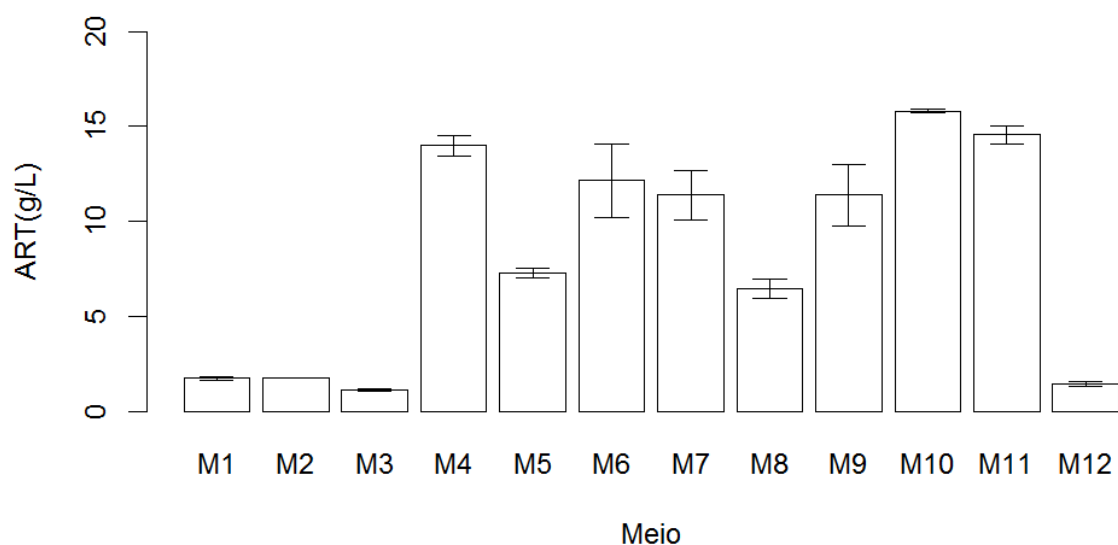


Figura 4.7 – Determinação de ART para os diferentes substratos da FES.

A quantidade de células obtida nos complexos enzimáticos produzidos é apresentada na Figura 4.8. Pode-se observar que os meios M1, composto de $\frac{1}{2}$ farelo de arroz e $\frac{1}{2}$ palha de arroz; e M2, composto de $\frac{1}{3}$ de farelo de arroz e $\frac{2}{3}$ de palha de arroz, foram os que tiveram maiores quantidades de células. Tais meios, M1 e M2, não apresentam bagaço de cana tratado em sua composição e se destacam no crescimento celular, sendo que uma possível explicação para este destaque refere-se ao uso do amido como fonte de carbono principal ou o fato do crescimento, associado a hidrólise de celulose (meios M6, M7 e M9 que possuem bagaço), ser mais lento pela maior dificuldade de degradação da celulose do que do amido.

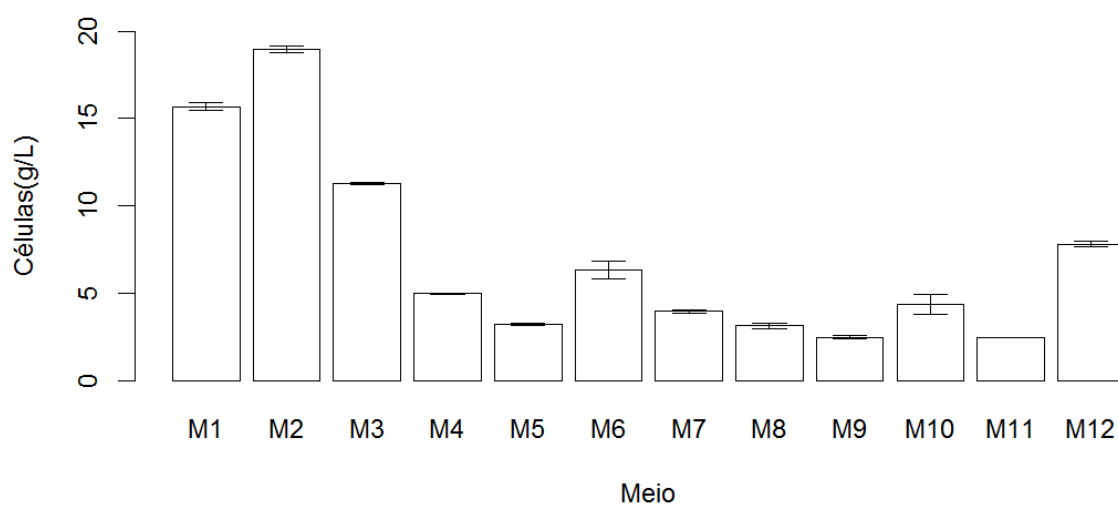


Figura 4.8 – Quantidade de células obtida para os diferentes substratos da FES.

A produção de etanol é apresentada na Figura 4.9 para os diferentes substratos estudados da fermentação em estado sólido, realizada em 72 h. Pode-se notar que o meio M6, composto de $\frac{1}{3}$ de bagaço de cana tratado e $\frac{2}{3}$ de farelo de arroz, foi o que apresentou a maior concentração de etanol, que foi de 5,3 g/L aproximadamente. Este resultado é coerente com a maior concentração de proteína observada, pois a degradação da celulose envolve enzimas que são proteínas.

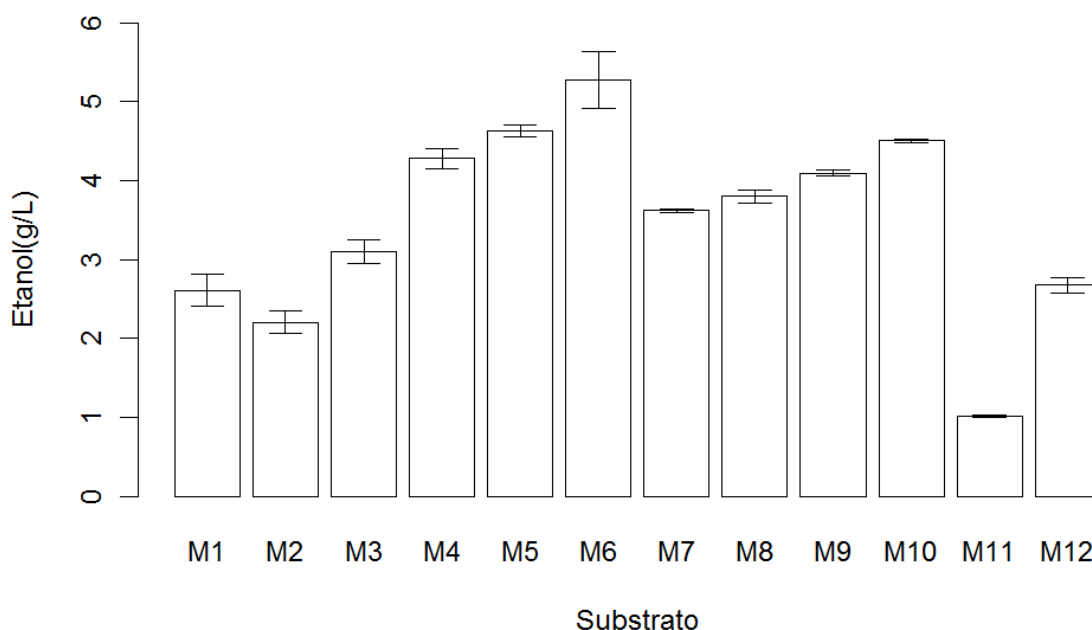


Figura 4.9 – Concentração de etanol para os diferentes substratos da FES.

A comparação da concentração de etanol obtida pelo extrato enzimático dos meios M6, M11 e M12 mostra que a combinação bagaço de cana tratado e farelo de arroz favorece a produção de etanol, pois o uso de bagaço na ausência de farelo, meio M11, gera 5,2 vezes menos etanol do que observado em M6 e o uso de farelo na ausência de bagaço, meio M12, gera 2,0 vezes menos etanol que o observado no meio já citado. Como o objetivo deste trabalho foi a produção de etanol, o substrato escolhido para as fermentações sólidas seguintes foi o M6, composto de 1/3 de bagaço de cana tratado e 2/3 de farelo de arroz, visto que apresentou maior produção de etanol.

4.4. Seleção da quantidade de sólido na fermentação em estado sólido para enchimento de um reator

Utilizando o substrato da fermentação em estado sólido selecionado na etapa anterior, meio M6 composto de 1/3 bagaço de cana tratado e 2/3 de farelo de arroz e 72 h de fermentação, foi analisada a quantidade de sólido ideal para um reator de 500 mL de volume capaz de gerar um complexo enzimático que favoreça o aumento da concentração de açúcares, possibilitando o aumento da produção de etanol.

A Tabela 4.3 mostra as quantidades de sólido estudadas, e as respectivas quantidades de solução de soro de leite (concentração 60 g/L) e inóculo que foram necessárias para garantir que a fermentação ocorresse em estado sólido.

Tabela 4.3 – Quantidades de sólido estudadas.

Sólidos	Total de sólido (g)	Solução de soro de leite (mL)	Inóculo (mL)	Solução de sais para extração (mL)
S1	25,0	17,0	17,0	62,5
S2	50,0	34,0	34,0	125,0
S3	75,0	51,0	51,0	187,5
S4	100,0	67,0	67,0	250,0
S5	120,0	80,4	80,4	300,0
S6	140,0	93,8	93,8	350,0
S7	160,0	107,2	107,2	400,0

A quantidade de proteínas é apresentada na Figura 4.10. A fermentação na condição de enchimento de sólido S7 foi a que apresentou maior quantidade de proteína presente no complexo enzimático, que pode ser considerada um fator importante na produção de etanol.

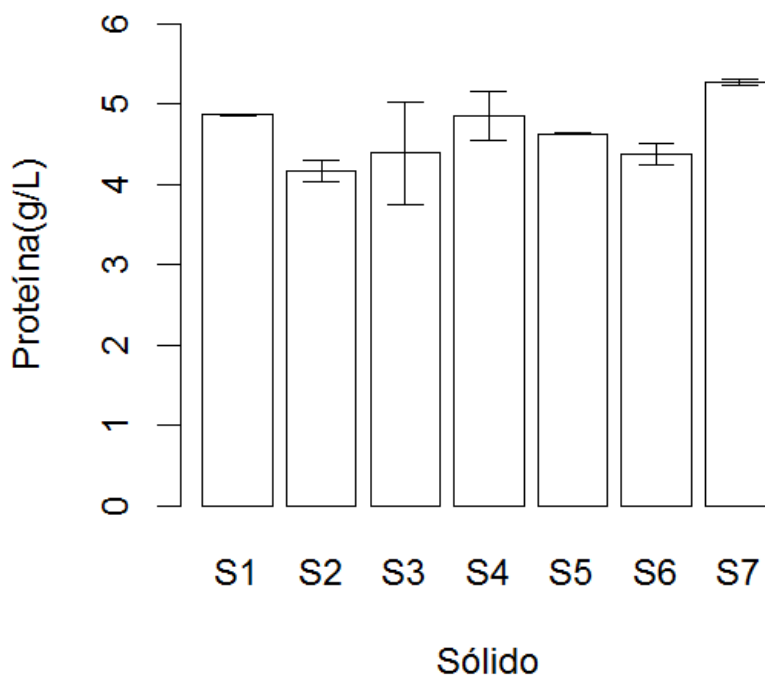


Figura 4.10 – Determinação de proteínas para quantidades variáveis de sólido na FES.

A Figura 4.11 mostra os açúcares redutores totais determinados em cada extrato enzimático. Pode-se notar que o aumento da quantidade de sólido na FES fez aumentar a quantidade de ART. A comparação entre os teores de ART observados neste experimento e os obtidos no estudo da seleção de diferentes substratos de FES mostra que os resultados são coerentes, no sentido de que os maiores valores de ART deste experimento são da ordem de grandeza de pelo menos 2,0 vezes menor do que o observado no ensaio de seleção de substrato.

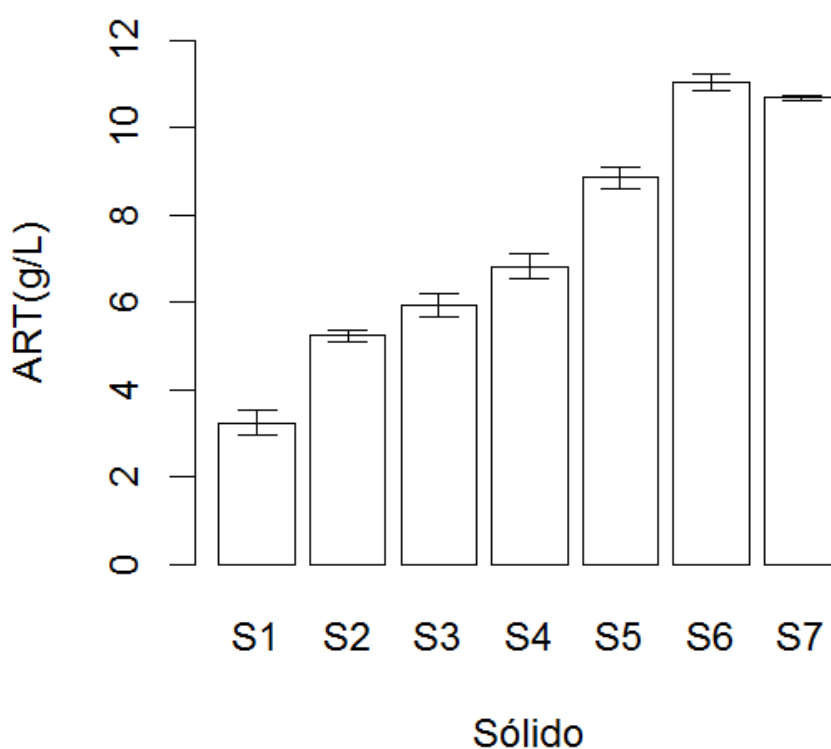


Figura 4.11 – Determinação de ART para quantidades variáveis de sólido na FES.

A Figura 4.12 mostra a quantidade de células determinada para cada extrato enzimático. O meio S7 foi o que se destacou no que se refere ao maior crescimento celular.

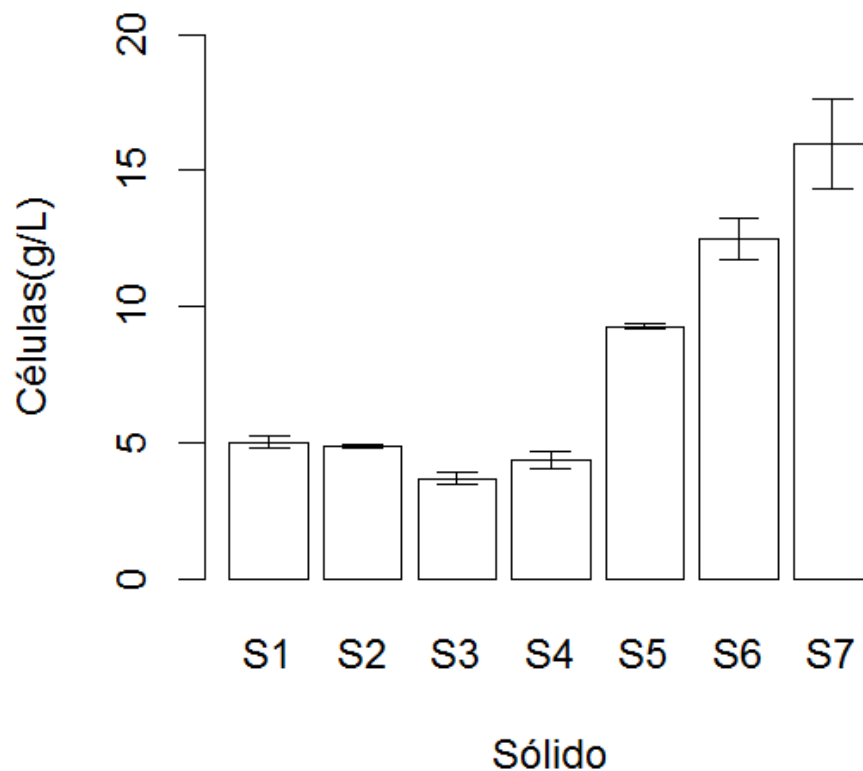


Figura 4.12 – Quantidade de células obtida para quantidades variáveis de sólido na FES.

A Figura 4.13 apresenta a concentração de etanol obtida nas fermentações alcoólicas, nas quais foram utilizados os complexos enzimáticos produzidos com quantidades variáveis de sólido na fermentação em estado sólido. A maior concentração de etanol observada em S7 é coerente com a maior concentração de proteína no extrato enzimático, e como a concentração de etanol é maior que a obtida na seleção do meio, tem-se que este experimento pode ser satisfatório no que se refere ao propósito de melhorar a produção de etanol.

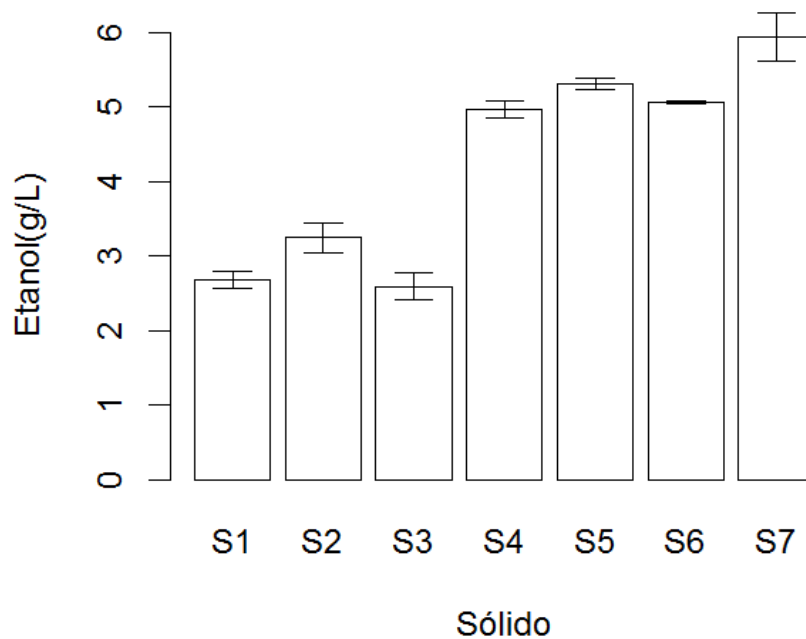


Figura 4.13 – Concentração de etanol para quantidades variáveis de sólido na FES.

De acordo com os resultados acima, a quantidade de 160 g de sólido na FES, caracterizada por S7, para produção de complexo enzimático foi a que apresentou os resultados mais satisfatórios, especialmente em termos de concentração de etanol, que é o foco deste trabalho.

As melhores condições encontradas para a fermentação em estado sólido foram, portanto, tempo de fermentação de 72 h, biomassa composta por 1/3 de bagaço de cana tratado (mistura em igual volume de bagaço de cana tratado com alta e baixa severidades) e 2/3 de farelo de arroz, 160 g de biomassa para enchimento de um reator de 500 mL de volume (Figura 4.14).

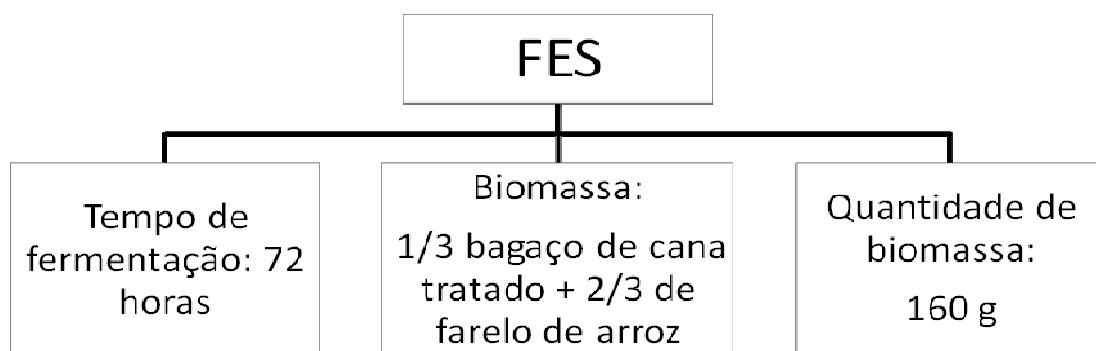


Figura 4.14 – Descrição das melhores condições encontradas para a FES.

4.5. Fermentações alcoólicas em diferentes tempos

As fermentações alcoólicas iniciais deste trabalho foram conduzidas por 48 h. Novos testes foram feitos para confirmar se o tempo de 48 h era o mais satisfatório para este trabalho.

A Figura 4.15 apresenta a produção de etanol em diferentes tempos de fermentação alcoólica na melhor condição da FES. Pode-se observar que o aumento do tempo da fermentação submersa de 48h para 72h não gerou melhora no processo. Os resultados desta figura também sugerem que *Chrysonilia sitophila* se destaca na hidrólise por gerar tempos de fermentações alcoólicas menores que os encontrados na literatura, como, por exemplo, o tempo de 72 h nos trabalhos de Xu e colaboradores (2011) no estudo de produção de etanol de sorgo, e o tempo de 192 h com o uso de enzima comercial e celulose de papel (ISLAM et al., 2013).

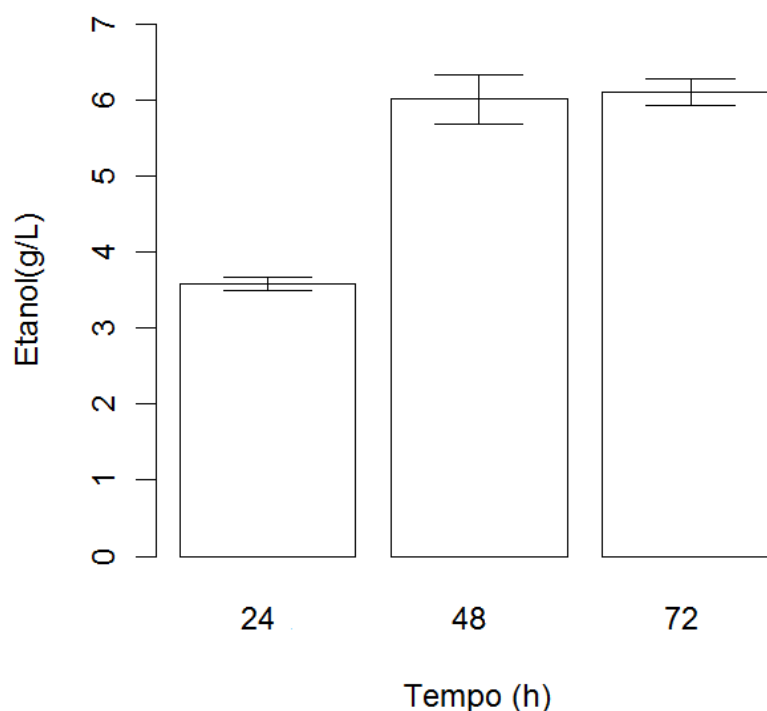


Figura 4.15 – Concentração de etanol para diferentes tempos de fermentação alcoólica.

4.6. Efeito do teor de bagaço de cana utilizado na fermentação submersa na produção de etanol

A Tabela 4.4 mostra a composição de cada substrato estudado na fermentação alcoólica. Os ensaios foram realizados por 48h de fermentação, utilizando o complexo enzimático produzido na FES nas condições ótimas, acima citadas.

Tabela 4.4 – Composição de cada substrato utilizado na fermentação alcoólica.

Substrato	Bagaço de cana tratado (g)	Bagaço de cana <i>in natura</i> (g)	% de bagaço tratado no total de sólido	Quantidade total de sólido (g de sólido)
A	12,0	8,0	60,0	20,0
B	16,0	4,0	80,0	20,0
C	20,0	-	100,0	20,0
D	14,4	9,6	60,0	24,0
E	19,2	4,8	80,0	24,0
F	21,0	4,0	84,0	25,0
G	16,8	11,2	60,0	28,0
H	22,4	5,6	80,0	28,0
I	28,0	-	100,0	28,0
J	26,0	4,0	86,7	30,0

A Figura 4.16 apresenta a produção de etanol para as diferentes proporções de bagaço utilizadas na fermentação alcoólica. O ensaio H, composto por 22,4 g de bagaço de cana tratado e 5,6 g de bagaço de cana *in natura*, totalizando 28 g de sólido, foi o que apresentou maior concentração de etanol, 6,5 g/L aproximadamente. A comparação entre os diferentes ensaios G, H e I mostra que a adição de bagaço de cana *in natura* favoreceu a produção de etanol, porém o excesso do mesmo reduz a produção. Para menores concentrações de sólido, meio mais diluído (meios A, B e C) não foi observado este efeito. Uma possível explicação seria a atuação do bagaço *in natura* que só favorece o processo quando há uma maior interação entre este e o bagaço tratado.

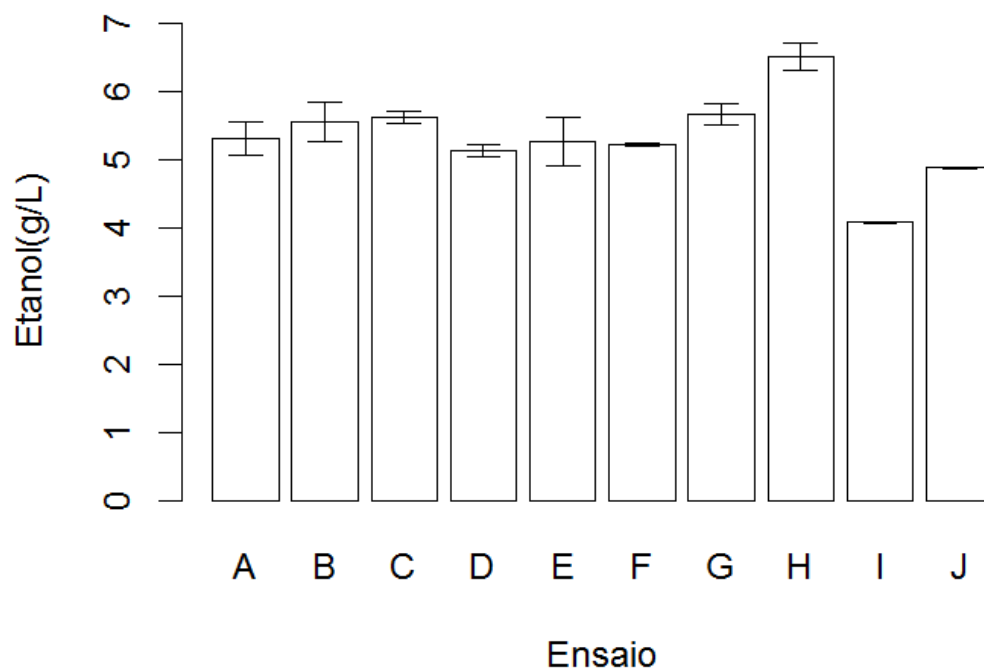


Figura 4.16 – Concentração de etanol para teores de bagaço variáveis na fermentação submersa.

As melhores condições encontradas para a fermentação alcoólica foram, portanto, tempo de fermentação de 48 h e substrato composto por 22,4 g de bagaço de cana tratado e 5,6 g de bagaço de cana *in natura* (Figura 4.17). A quantidade de substrato da melhor condição (280 g/L de sólido úmido ou 196 g/L de sólido seco) são semelhantes às condições otimizadas usadas nos trabalhos de Lever e colaboradores (2010, 2012), que trabalharam com palha de trigo e 200 g/L de material seco no erlenmeyer.

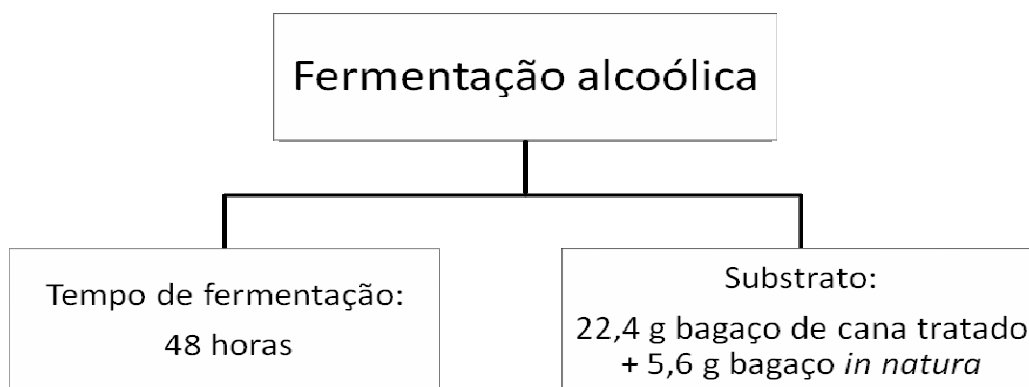


Figura 4.17 – Descrição das melhores condições encontradas para a fermentação alcoólica.

4.7. Fermentações alcoólicas sucessivas

Quatro fermentações alcoólicas sucessivas foram conduzidas nas melhores condições da FES (160 g de 1/3 de bagaço de cana tratado e 2/3 de farelo de arroz, por 72 h de fermentação) e nas melhores condições da fermentação alcoólica (22,4 g de bagaço de cana tratado, 5,6 g de bagaço de cana *in natura*, por 48 h de fermentação). A Figura 4.18 mostra os resultados obtidos em cada fermentação alcoólica. Os valores sugerem que as fermentações sucessivas melhoram a produção de etanol. A possibilidade da hidrólise enzimática gerar metabólitos, que se acumulam durante as fermentações consecutivas, com a capacidade de inibir a produção de etanol não foi observada para quatro fermentações sucessivas. A concentração final de 16,7 g/L encontrada mostra o potencial do fungo e da metodologia de sucessivas fermentações, que ainda pode ser otimizada.

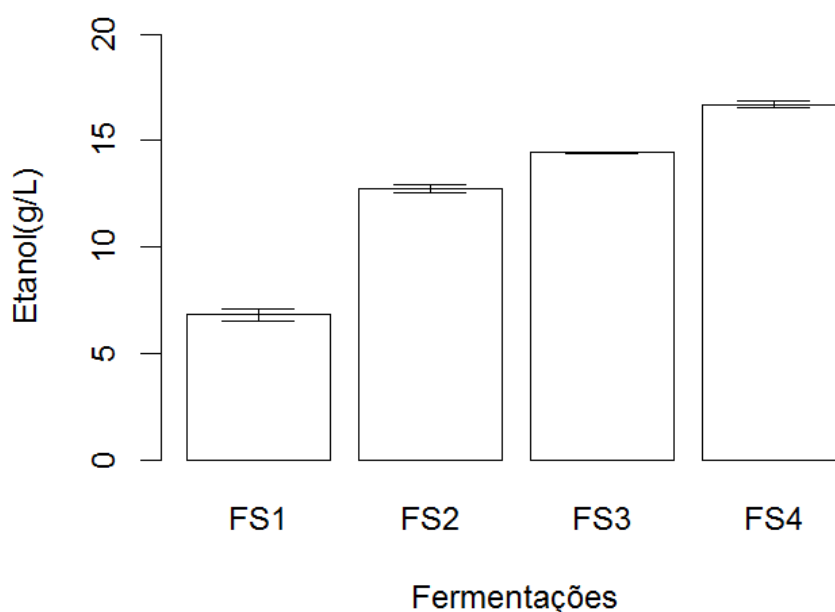


Figura 4.18 – Evolução da concentração de etanol em quatro fermentações alcoólicas sucessivas.

4.8. Síntese da discussão das diferentes fermentações alcoólicas

A Figura 4.19 apresenta valores relativos que comparam os melhores resultados de cada conjunto de ensaios com os resultados do mesmo experimento, na qual é atribuído o valor 100 ao maior valor de concentração de etanol em cada experimento. Pela figura pode-se

observar que houve um progressivo aumento na concentração de etanol associado a cada novo estudo, ou seja, todas variáveis testadas (tempo da FES, meios da FES, variação de sólidos no erlenmeyer da FES, tempo da FS, meios da FS e fermentações alcoólicas sucessivas) foram significativas na produção de etanol e compreensão do processo, conforme já descrito nas diferentes etapas.

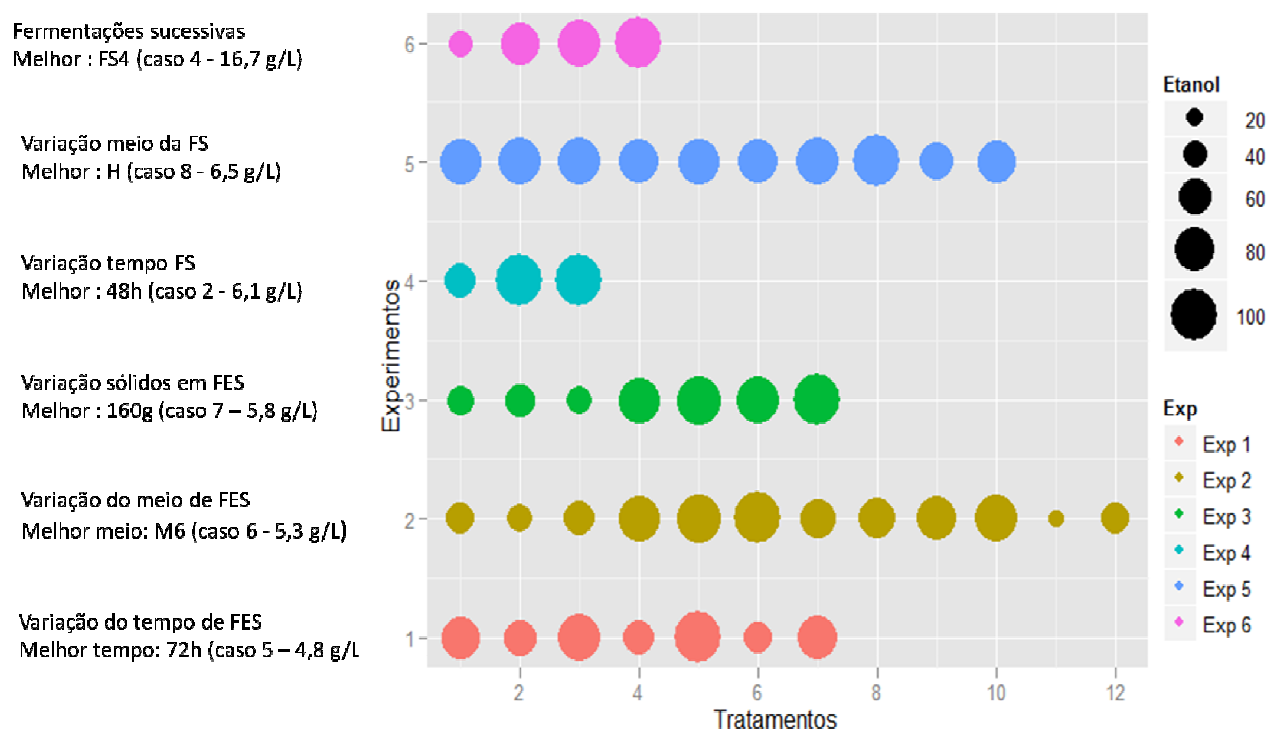


Figura 4.19 – Sequência dos diferentes ensaios de fermentação alcoólica.

As concentrações de etanol obtidas no último experimento desta dissertação são compatíveis com a literatura; a concentração de etanol máxima obtida neste trabalho (16,7 g/L) foi de 2,78 vezes maior do que a concentração de etanol encontrada por Lever e colaboradores (2010) na fermentação em batelada. Estes autores, porém, descobriram que a concentração de etanol aumentou de 6 g/L para 21 g/L quando alimentavam um erlenmeyer funcionando como um erlenmeyer batelada alimentado, o que sugere que os resultados ainda podem ser otimizados.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

Os resultados indicaram a potencialidade do emprego do fungo *Chrysonilia sitophila*, encontrado no ecossistema do cerrado, para degradação da celulose, por fermentação em estado sólido, dos resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana e o farelo de arroz, os quais têm baixo custo e são abundantes. Pôde-se concluir que:

- o fungo *Chrysonilia sitophila* é um micro-organismo promissor para a produção de complexo enzimático por ser capaz de degradar a celulose;
- a fermentação em estado sólido apresentou bons resultados quando esta era conduzida por 72h e tinha como substrato bagaço de cana tratado e farelo de arroz na proporção de 1/3 e 2/3 respectivamente;
- a quantidade de sólido que o reator continha influenciou nos resultados, de modo que 160 g de sólido foi a melhor quantidade para a produção de complexo enzimático capaz de degradar a celulose e aumentar a produção de etanol em um reator de 500 mL de volume na fermentação em estado sólido;
- a seleção do substrato da fermentação alcoólica foi importante para se aumentar a produção de etanol;
- o tempo de 48h de fermentação alcoólica foi o mais satisfatório;
- quatro fermentações sucessivas aumentaram a produção de etanol;
- a sequência de experimentos realizada foi bem sucedida, pois mostrou caminhos promissores para a produção de etanol de segunda geração.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Alguns aspectos deste trabalho merecem maior investigação:

- estudo mais detalhado sobre as fermentações alcoólicas sucessivas para aperfeiçoar o processo, como o uso de alimentação em processo batelada alimentada;
- estudo mais específico sobre o fungo *Chrysonilia sitophila*;
- estudo da combinação de processos químicos e enzimáticos na hidrólise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BORTOLAZZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

CABIAC, A.; GUILLON, E.; CHAMBON, F.; PINEL, C.; RATABOUL, F.; ESSAYEM, N. Cellulose reactivity and glycosidic bond cleavage in aqueous phase by catalytic and non catalytic transformations. **Applied Catalysis A: General**, v. 402, p. 1-10, 2011.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CTC - CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Bagaço e Palha de Cana Para Fins Energéticos – Caracterização, Manuseio e Armazenagem**. Disponível em: http://www.ctcanavieira.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=431&Itemid=1380. Acesso em: 30 mai. 2012.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 30 jan. 2013.

DÍAZ, A. B.; CARO, I.; ORY, I.; BLANDINO, A. Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 302-306, 2007.

DSMZ – Centro de Pesquisas de Material Biológico da Alemanha. Disponível em: <http://www.dsmz.de/microorganisms/medium>. Acesso em: 01 março de 2013

EGESKOG, A.; BERNDES, G.; FREITAS, F.; GUSTAFSSON, S.; SPAROVEK, G. Integrating bioenergy and food production – A case study of combined ethanol and dairy production in Pontal, Brazil. **Energy for Sustainable Development**, v. 15, p. 8-16, 2011.

FISCHER, J.; ANDRADE, L.; BERTACI, G. A.; FILHO, U. C.; CARDOSO, V. L. Produção de complexo enzimático gerado por fungo selecionado e fermentação em estado sólido. **XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Búzios – RJ, 2012a.

FISCHER, J.; LOPES, V. S.; RAMADAN, L.; FERREIRA, J. V. G.; GALVÃO, C. M. A.; TEODORO, J. C.; FILHO, U. C.; CARDOSO, V. L. Produção de extrato enzimático e etanol celulósico. **7º Congresso Internacional de Bioenergia**, São Paulo – SP, 2012b.

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

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3 ed., p. 367, 1998.

ISLAM, R.; ÖZMIHÇI, S.; CICEK, N.; SPARLING, R.; LEVIN, D. B. Enhanced cellulose fermentation and end-product synthesis by *Clostridium thermocellum* with varied nutrient compositions under carbon-excess conditions. **Biomass and Bioenergy**, v. 48, p. 213-223, 2013.

LEVER, M.; HO, G. Reducing energy for cellulose ethanol production by the use of sterilizing agents in lieu of steam. **Renewable Energy**, v. 43, p. 403-406, 2012.

LEVER, M., HO, G.; CORD-RUWISCH, R. Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulose from solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 18, p. 7083-7087, 2010.

LORENZETT, D. B.; NEUHAUS, M.; SCHWAB, N. T. Gestão de resíduos e a indústria de beneficiamento de arroz. **Revista Gestão Ambiental**, v. 08, n. 01, p. 219-232, 2012.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276.

MACEDO, I.C.; SEABRA, J.E.A.; SILVA, J.E.A.R, S. Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 582-595, 2008.

MACHADO, D. S. **Seleção de fungos capazes de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninolíticas. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, n. 1, p. 68-78, 2009.

MEZZARI, A. **Fungos anemófilos em Porto Alegre, RS**. 2002. 75 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias na área de Micologia) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **O bioma cerrado**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>. Acesso em: 02 jan. 2013.

MONTEIRO, N.; ALTMAN, I.; LAHIRI, S. The impact of ethanol production on food prices: The role of interplay between the U.S. and Brazil. **Energy Policy**, v. 41, p. 193-199, 2012.

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**, v. 28, p. 817-830, 2010.

OGEDA, T. L. **Hidrólise enzimática de celuloses pré-tratadas**. 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OJUMU, T. V.; SOLOMON, B. O.; BETIKU, E.; LAYOKUN, S. K.; AMIGUN, B. Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. *African Journal of Biotechnology*. v. 2, n. 6, p. 150–152, 2003. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/Pdf2003/JunePDFs2003/Ojumu%20et%20al.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2012.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 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, p. 45, 2008.

PINTO, G. A. S.; 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. **Comunicado Técnico**, n. 102, p. 1-5, ago. 2005.

PONTES, C. R. **Enriquecimento protéico do bagaço de caju através de fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger***. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 180 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Botanical Briefing**, n. 80, p. 223-230, 1997.

ROSA, S. E. S. da; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, n. 32, p. 117-155, dez. 2009.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v. 27, n. 2, p. 205-211, abr.-jun. 2004.

SALAMONI, S. P. **Produção e caracterização de celulases secretadas por *Streptomyces* sp. Isolado de processo de compostagem**. 2005. 96 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SILVA, M. A.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran. **Journal of Food Engineering**, v. 75, n. 4, p. 487 – 491, 2006.

SUKUMARAN, R., K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock an its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, n. 34, p. 421-424, 2009.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. **Applied and environmental microbiology**, v. 43, n.4, p. 777-780, 1982.

VON ARX, J. A. On *Chrysonilia sitophila* and some families of Ascomycetes. **Sydowia**, v. 34, p. 13-29, 1981.

XU, F.; THEERARATTANANOON, K.; WU, X.; PENA, L.; SHI, Y.; STAGGENBORG, S.; WANG, D. Process optimization for ethanol production from photoperiod-sensitive sorghum: Focus on cellulose conversion. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1212-1218, 2011.

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

ZÚÑIGA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. 2010. 228 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

APÊNDICE 1

A coleção de fungos do Cerrado do Núcleo de Engenharia Bioquímica (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química/UFU é composta por 105 fungos. A coleta destes micro-organismos foi feita em novembro de 2010 (período chuvoso), em alguns locais da região do Triângulo Mineiro. Amostras de frutos e fragmentos de cascas de material proveniente do ecossistema do Cerrado foram coletadas e colocadas em sacos plásticos esterilizados, os quais foram imediatamente transportados para o laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química/UFU.

As cepas foram inoculadas, transferindo-se fragmentos do micro-organismo presente no material coletado para placas de petri contendo meio Czapek previamente esterilizado, de composição de acordo com DSMZ (2009), e após inoculação foram incubadas em estufa ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 5 dias para o crescimento.