

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**

FABIANO AVELINO GONÇALVES

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS
PRODUTORES DE CELULASES E
HEMICELULASES E SUA AVALIAÇÃO SOBRE A
PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

DOURADOS/MS

MARÇO/2011

FABIANO AVELINO GONÇALVES

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS
PRODUTORES DE CELULASES E
HEMICELULASES E SUA AVALIAÇÃO SOBRE A
PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**ORIENTADOR: PROF.^a DR.^a ELIANA JANET SANJINEZ
ARGANDOÑA**

CO-ORIENTADOR: PROF.^o DR.^o GUSTAVO GRACIANO FONSECA

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração em Tecnologia Ambiental.

DOURADOS/MS

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

662.669 Gonçalves, Fabiano Avelino.
G643o Bioprospecção de microrganismos produtores de celulases e hemicelulases e sua avaliação sobre a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar / Fabiano Avelino Gonçalves. – Dourados, MS: UFGD, 2011.
61f.

Orientadora: Profa. Dr. Eliana Janet Sanjinez Argandoña.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Etanol (álcool etílico) – Combustível. 2. Etanol – Produção. 3. Resíduos lignocelulósicos. I. Título.

AVALIAÇÃO

Após a apresentação, argüição e apreciação da banca examinadora, foi emitido o parecer _____, para a dissertação intitulada “Bioprospecção de microrganismos produtores de celulases e hemicelulases e sua avaliação sobre a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar” de autoria de Fabiano Avelino Gonçalves.

Eliana Janet Sanjinez Argandoña (Dr.^a, FAEN, UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Gustavo Graciano Fonseca (Dr.^o, FAEN, UFGD)
Membro Examinador

Rodrigo Simões Ribeiro Leite (Dr.^o, FCBA, UFGD)
Membro Examinador

Marney Pascoli Cereda (Dr.^a, UCDB)
Membro Examinador

Dourados/MS, 11 de março de 2011

*A Deus, aos meus pais, irmãos,
amigos e professores...
companheiros de todas as horas...*

AGRADECIMENTOS

Finalizada uma etapa particularmente importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos àqueles que me apoiaram nessa caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

A Professora Doutora Eliana Janet Sanjinez Argandoña e ao Professor Doutor Gustavo Graciano Fonseca, o meu maior agradecimento por toda a disponibilidade e orientação prestada, pelo apoio incondicional e compreensão, permitindo a excelência profissional e prestígio ao trabalho.

Ao Professor Doutor Rodrigo Simões Ribeiro Leite, agradeço pelo apoio, disponibilidade e conhecimento transmitido ao longo do trabalho.

Ao Professor Doutor Marcelo Fossa da Paz, agradeço pelo companheirismo.

Ao Professor Doutor Andreas Karoly Gombert e aos doutorandos Thiago Olitta Basso e Felipe Senne de Oliveira Lino, agradeço ao apoio, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho.

Ao Klerisson de Souza e Priscilla Narciso, funcionários do Laboratório de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal da Grande Dourados e a Orlinda Azevedo e Andrea da Silva, funcionárias do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, pela assistência e suporte.

Aos professores e alunos integrantes do Laboratório de Bioengenharia da Universidade Federal da Grande Dourados coordenado pelo Professor Doutor Gustavo Graciano Fonseca.

A Professora Doutora Vera Lúcia Lescano de Almeida da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul por me orientar durante a graduação e a orientadora de doutorado Professora Doutora Gorete Ribeiro de Macedo da Universidade Federal do Rio Grande do Norte em confiar no meu trabalho.

As Usinas São Fernando e Clealco, e a Associação dos Produtores de Bioenergia de Mato Grosso do Sul, agradeço pela cooperação e parceria.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus amigos, colegas de curso e a todos os professores que comigo partilharam do seu saber.

A todos o meu profundo agradecimento.

*"Ambiente limpo não é o que mais se limpa e
sim o que menos se suja".*

(Chico Xavier)

SUMÁRIO

Introdução geral

Artigo 1: Etanol celulósico: utilização de resíduos agroindustriais e urbanos de origem vegetal

Artigo 2: Bioprospecção de microrganismos com potencial para a produção de celulases e hemicelulases

Conclusão geral

INTRODUÇÃO GERAL

A demanda energética mundial aumenta de forma significativa desde a Revolução Industrial, motivado pelo aumento populacional, custo de produção, a busca pela eficiência, disponibilidade de recursos e questões ambientais. A procura por fontes renováveis de energia em substituição as fontes não renováveis são intensificados no início do século 21, com destaque a energia hidráulica, biomassa, solar, eólica, geotérmica, maremotriz, osmótica salina e de hidrogênio.

O aproveitamento da biomassa vegetal oriunda da expansão da atividade agroindustrial e a geração de resíduos urbanos de origem vegetal tornam-se uma das mais promissoras fontes de energia, em particular, na produção do etanol celulósico, evitando possível poluição orgânica e a possibilidade de agregar valor a esse material.

Na pesquisa objetiva a prospecção de microrganismos produtores de celulasas e hemicelulasas, além do uso de resíduos agroindustriais como o bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo na produção dessas enzimas.

Atualmente, existe crescente busca na utilização dos resíduos agroindustriais, devido à incessante demanda das atividades agrícolas, pois o acúmulo desses resíduos poderá gerar a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. Diversos processos estão em desenvolvimento para a utilização desses materiais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como etanol, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e outros (Pandey *et al.*, 2000; Pandey, 2003; Singhanian *et al.*, 2009). Esses resíduos agroindustriais podem ser uma alternativa às fontes de carbono comerciais para a produção de enzimas que contribuam na redução de problemas ambientais (Adsul *et al.*, 2004; Bon *et al.*, 2008). Dessa forma, a prospecção de microrganismos com potencial para a produção dessas enzimas, utilizando resíduos agroindustriais como substrato, pode ser alternativa viável em um país como o Brasil, com expressiva produção agrícola e elevada Biodiversidade, o que aumenta a possibilidade de obtenção de novas fontes microbianas produtoras de enzimas, contribuindo dessa forma para a redução do custo final da produção dessas enzimas (Buckeridge, 2008).

Etanol celulósico: utilização de resíduos agroindustriais e urbanos de origem vegetal

RESUMO

A busca por alternativas energéticas que possa amenizar o uso dos combustíveis derivados do petróleo são impulsionados pela sociedade contemporânea por razões ambientais, socioeconômicas e políticas. O etanol celulósico consiste no combustível líquido mais promissor para substituir os combustíveis fósseis, fortalecido pela utilização da logística criada para a sua distribuição, a sua inserção total ou parcial em motores automotivos e balanço positivo de carbono. O uso de resíduos agroindustriais e resíduos urbanos de origem vegetal, na obtenção de etanol, permitem agregar valor a esses compostos, além de utilizar energia orgânica desperdiçada e ainda, amenizar custos relacionados aos tratamentos para minimizar a poluição gerada, tornando-se o processo eco-eficiente. A biomassa lignocelulósica é a matéria orgânica mais abundante, sendo geralmente desperdiçada na forma de compostos sólidos. Ainda que não haja conflito entre direcionamento da terra para produção de biocombustíveis ou alimentos, o que poderá ocorrer a longo prazo, se o volume de petróleo a ser substituído for significativo. A situação poderá ser dramática no caso do etanol derivado do amido, tais como milho, sorgo, mandioca, entre outros. Diante disso, é de grande valia o incentivo para a consolidação do etanol celulósico. O objetivo desse artigo consiste em destacar o desperdício agroindustrial e urbano da matéria orgânica vegetal, que podem ser utilizados para a produção de etanol celulósico.

Palavras-chave: Biocombustível, Bioetanol, Subprodutos Agroindustriais, Preservação Ambiental, Eco-eficiência

INTRODUÇÃO

O crescimento populacional incentiva a busca por novos produtos, co-produtos e subprodutos para suprir a necessidade humana, além de impulsionar a mudança de rota tecnológica e biotecnológica consolidadas, principalmente na área de produção de

alimentos e energia. Na área de energia, destacam-se as energias renováveis, como: a energia hidráulica, biomassa, solar, eólica, geotérmica, maremotriz, osmótica salina e de hidrogênio.

O interesse em fontes alternativas de energia a partir da biomassa vegetal em substituição ao petróleo e seus derivados, tem sido influenciados pelo constante aumento do preço do barril de petróleo nos últimos anos, como evidenciado no início de 2011, motivado pelas incertezas sobre a situação política de países do Oriente Médio e do norte da África, os quais causaram impacto sobre a cotação do barril de petróleo, que atingiu valores acima de US\$ 120,00 na bolsa de valores de Londres e da fragilização da moeda americana (Valor online, 2011). Além da diminuição das reservas desse combustível fóssil, a sua influência nas mudanças climáticas, principalmente das emissões de partículas de Gases do Efeito Estufa (GEEs) com o agravamento do aquecimento global. As fontes renováveis e limpas de energia são buscadas na tentativa de mitigar os problemas ambientais e surgem como alternativas a produção de etanol e etanol do amido de milho. Segundo Prasad *et al.* (2007) em alguns países o aumento acentuado na produção do etanol a base de amido causará incerteza entre utilizar essa matéria prima na produção de biocombustível ou na alimentação, além da necessidade da grande demanda de terras agricultáveis e insumos agrícolas. Nesse contexto, o governo chinês incentiva apenas o etanol a partir de substratos não alimentícios, como as gramíneas perenes, casca e palha de vegetais (Li e Chan-Halbrendt, 2009), além de manter rigoroso controle na expansão territorial dos substratos alimentícios utilizados na produção de etanol (Fang *et al.*, 2010). Como alternativa aos biocombustíveis a base de amido e de sacarose tem se a produção de etanol a partir da biomassa vegetal (etanol celulósico) oriundo de resíduos agroindustriais (Sun e Cheng, 2002; Prasad *et al.*, 2007; Abril, 2008; Abril e Abril, 2009) e resíduos urbanos de origem vegetal (Qi *et al.*, 2005; Roig *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2009; Demirbas *et al.*, 2011), ambos em contínua expansão no século 21.

O objetivo do presente artigo consiste em rever as fontes de biomassas vegetais disponíveis e utilizadas na obtenção de etanol celulósico, as questões ambientais, socioeconômicas e políticas sobre o etanol celulósico, assim como o processo de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentativa, atribuídos a diversos substratos.

BIOMASSA VEGETAL

A conversão de material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis para produção de etanol consiste numa alternativa promissora para aumentar a sua produção e atender à demanda mundial de biocombustíveis.

A biomassa de origem vegetal constitui a fonte mais abundante de matéria orgânica na Terra, beneficiada por ser biodegradável e renovável (Abril e Abril, 2009). Oriunda de florestas, resíduos agroindustriais, silvicultura e resíduos urbanos (Billa *et al.*, 1993) com potencial na produção de etanol (Prasad *et al.*, 2007) e grande eficiência energética para substituir a gasolina (Abril e Abril, 2009). Os vegetais são constituídos de células compostas por parede celular, integrada por uma mistura de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais. Os polissacarídeos representam cerca de 90 % do peso seco da parede celular e consistem em celulose, que compõe de 20-40 %, hemicelulose (15-25 %) e pectinas (30 %). Além da presença não polissacarídica da lignina que proporciona rigidez a parede celular (Buckeridge *et al.*, 2008).

A celulose é o constituinte principal dos vegetais (Della, 2005), sendo considerada a matéria orgânica mais abundante. A celulose é homopolissacarídeo linear com 8.000-12.000 unidades de glicose unidas entre si por ligações 1,4-beta-glicosídicas, que resultam na perda de uma molécula de água (Fengel e Wegener, 1989).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo complexo composto por glicose, galactose, manose, xilose, arabinose, ácidos urônicos e grupos acetila. De cadeia ramificada, apresenta grau de polimerização inferior a 200 unidades (Fengel e Wegener, 1989).

A pectina é um heteropolissacarídeo complexo composto por ligações axiais de unidades de ácido α -1,4-D-galacturônico composto por ramosse, arabinose e galactose (De Vries e Visser, 2001).

A lignina é um polímero fenólico que contribui para a rigidez estrutural dos tecidos vegetais (Buckeridge *et al.*, 2008), formada por macromolécula sintetizada por via radicalar a partir de três álcoois *p*-hidróxi-cinâmílicos precursores: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Fengel e Wegener, 1989).

As moléculas de glicose unem-se através de ligações glicosídicas formando cadeias lineares (celulose) que interagem umas com as outras através de ligações de

hidrogênio, formando a estrutura denominada fibrila elementar, insolúvel em água e com alto grau de cristalinidade. Quatro fibrilas elementares são agrupadas por uma monocamada de hemicelulose, sendo posteriormente circundadas em uma matriz de hemicelulose e lignina, essa íntima associação denominada de microfibrila celulósica (Fengel e Wegener, 1989; Matulova *et al.*, 2005; Wyman *et al.*, 2005). Formando uma estrutura de difícil separação.

Material lignocelulósico consiste num termo genérico para descrever os constituintes principais dos vegetais, ou seja, a celulose, a hemicelulose e a lignina (Klass, 1998), e estão representados na Figura 1, cuja composição depende não apenas do tipo de vegetal (Tabela 1), mas também das condições de crescimento (Barl *et al.*, 1991; Wiseloge *et al.*, 1996) da parte da planta escolhida (Brown, 1999) e ainda difere dos produtos com alto índice de açúcar e amido (Galbe e Zacchi, 1993; Galbe *et al.*, 1997; Mcmillan, 1997; Abril e Abril, 2009).

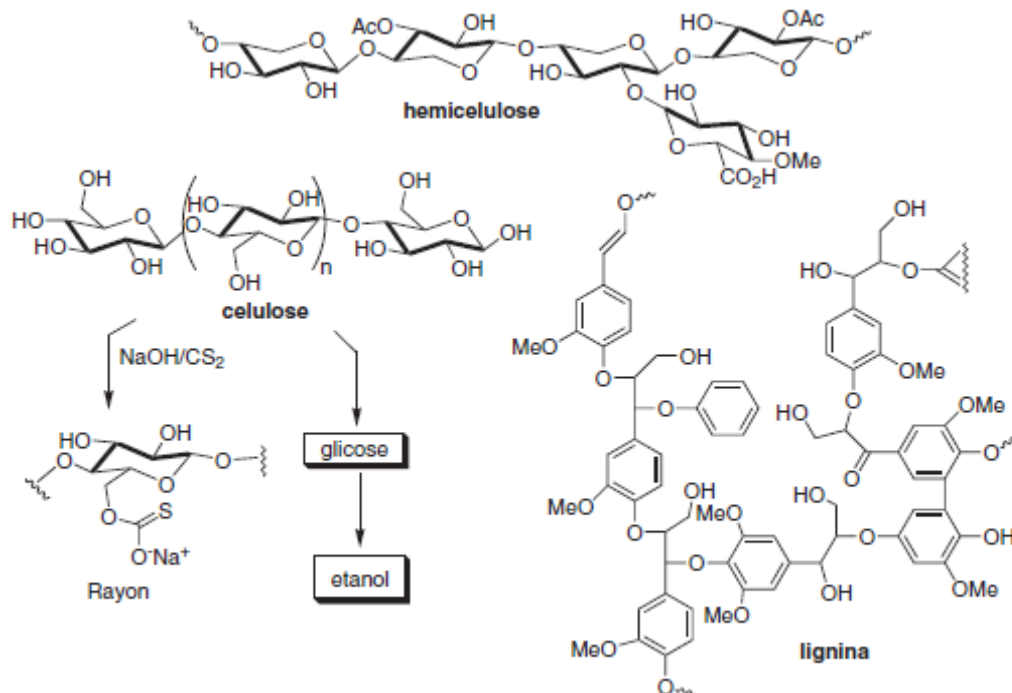


Figura 1. Cadeias estruturais de materiais lignocelulósicos (FERREIRA *et al.*, 2009).

Tabela 1. Conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina de algumas biomassas vegetais, resíduos agroindustriais e resíduos urbanos de origem vegetal.

Biomassa Vegetal	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Bagaço de cana-de-açúcar	33	30	29
Palha de trigo	30	24	18
Palha de sorgo	33	18	15
Palha de arroz	32	24	13
Palha de aveia	41	16	11
Espiga de milho	42	39	14
Caule do milho	35	15	19
Palha da cevada	40	20	15
Caule da alfafa	48,5	6,5	16,6
Casca de arroz	36	15	19
<i>Eucalyptus grandis</i>	38	13	37
<i>Eucalyptus saligna</i>	45	12	25
<i>Pinnus sp.</i>	44	26	29
Jornal	61	16	21
Papel processado	47	25	12
Madeira de angiosperma	40-50	24-40	18-25
Madeira de gimnosperma	45-50	25-35	20-30
Casca de nozes	25-30	25-30	30-40
Papel branco	85-99	0	0-15
Gramíneas	25-40	35-50	19-25
Folhas	15-20	80-85	0
Linter da semente de algodão	80-90	0-15	0

Fontes: [Kuhad e Singh, 1993](#); [Shleser, 1994](#); [Olsson e Hahn-Hägerdal, 1996](#); [Cheung e Anderson, 1997](#); [Boopathy, 1998](#); [Dewes e Hunsche, 1998](#).

A produção mundial de etanol se concentra em duas grandes potências, os Estados Unidos, na obtenção de etanol a partir do amido de milho e o Brasil a partir da sacarose da cana-de-açúcar ([Hahn-Hägerdal, 2006](#)), ambos baseiam-se na produção de etanol a partir de fontes alimentícias. Segundo [Pimentel et al. \(2009\)](#) cerca de 60 % dos seres humanos no mundo são subnutridos, sendo crítico destinar fontes alimentícias para a produção de biocombustíveis. O crescente investimento nessa área, chegará um momento insustentável entre produzir a matéria-prima para ser utilizada na obtenção de etanol ou na produção de alimentos. Com esse gargalo na manutenção e ampliação do mercado de biocombustíveis uma das alternativas, a curto prazo, seria utilizar integralmente esses vegetais e posteriormente utilizar apenas os materiais lignocelulósicos dos mesmos para a produção de etanol. Dessa maneira, possibilita mitigar a poluição ambiental e minimizar a utilização de fonte alimentícia na produção de etanol ([Demirbas et al., 2011](#)). Atualmente, a China é o maior produtor de arroz e de

trigo do mundo, segundo na produção de milho e inúmeros outros vegetais gerando aumento na quantidade de resíduos agroindustriais, que podem causar problemas ambientais, sendo uma alternativa a produção de etanol celulósico, assim, aumentando a oferta de combustível líquido de fonte não alimentícia (Yang e Lu, 2007; Fang *et al.*, 2009). O governo chinês diante desse problema, não incentiva a produção de etanol a partir de produtos alimentícios (Li e Chan-Halbrecht, 2009).

Novos caminhos estão sendo traçados para viabilizar a produção de etanol celulósico baseados em culturas como fonte de matéria prima, tais como o eucalipto e leucena (*Leucaena sp.*); gramíneas de rápido crescimento e alta produtividade, como o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), utilizado como forrageira na América do Sul; e o *switchgrass* (*Panicum virgatum*), espécie nativa na América do Norte, além do capim alto, do gênero *Miscanthus*, com maior interesse na Europa (BNDES, 2008). Embora, essa biomassa vegetal cultivada representa um avanço na produção de etanol celulósico, a utilização de resíduos agroindustriais e resíduos urbanos de origem vegetal são prioritários como substratos na produção de etanol celulósico (Austin e Gaywood, 1994; Koegel e Straub, 1996; Olsson e Hahn-Hägerdal, 1996; Bothast e Saha, 1997; Sharma *et al.*, 2002; Kadam e Mcmillan, 2003).

RAZÕES SÓCIO-AMBIENTAIS, ECONÔMICAS E POLÍTICAS

A modificação da matriz energética mundial possui interferência dos combustíveis derivados da matéria orgânica animal, vegetal e microbiana em substituição aos combustíveis fósseis, por ser geralmente menos poluidor e renovável. A busca por combustíveis mais baratos em países emergentes despertou uma promissora atividade econômica, a produção de biocombustíveis, por disporem de grandes extensões de terra, disponibilidade de água e condições climáticas favoráveis que proporcionam desenvolvimento regional (geração de emprego e renda, de divisas e desconcentração populacional). Entretanto, ressalta-se a necessidade de estudos estratégicos de zoneamentos agrícolas para evitar desastres ambientais e socioeconômicos promovidos por imensos desertos verdes, além do emprego dos biocombustíveis na substituição das fontes de energias não renováveis e não apenas na forma de adição de energia.

As fontes renováveis de energia são desejáveis por constituir de forma segura e sustentável o suprimento de energia, além de proporcionar a diminuição da emissão de

GEEs (Sun e Cheng, 2002; Demibras, 2005). Sendo a produção de etanol, utilizando-se a biomassa lignocelulósica é uma das mais importantes tecnologias para a produção sustentável de combustíveis renováveis (Wyman, 1996; Pitkanen *et al.*, 2003; Schell *et al.*, 2004; Demibras, 2005) e ecologicamente viável (Buckeridge, 2008) minimizando o impacto ambiental ocasionado pelos GEEs. Os seis principais GEEs são: dióxido de carbono, metano, óxido nitroso, hidrofluorcarbonos, perfluorcarbonos e o hexafluoreto de enxofre (IPCC, 2005). O dióxido de carbono proveniente da queima dos biocombustíveis é parcialmente reciclado no processo de fotossíntese, durante a formação da biomassa vegetal (Lin e Tanaka, 2006; Shreeve, 2006). O etanol possui balanço de carbono positivo (Broder *et al.*, 1992), ainda libera baixa quantidade de óxidos nitroso e dióxido de enxofre durante a combustão (Claassen *et al.*, 1999). O uso de resíduos urbanos de origem vegetal como substrato para obtenção de etanol pode proporcionar o aumento temporário de compostos orgânicos e de substâncias tóxicas no ambiente (Cardona *et al.*, 2004), entretanto, em quantidade reduzida quando comparado aos combustíveis líquidos derivados do petróleo (Hill *et al.*, 2009). De acordo com o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (2005) o problema relacionado às mudanças climáticas decorre do aumento excessivo dos GEEs na atmosfera, intensificado pelas atividades antrópicas, como o uso de combustíveis fósseis a partir do período pré-industrial. Além disso, um volume expressivo de dióxido de carbono é lançado anualmente na atmosfera. Em 2002, cerca de 24 bilhões de toneladas métricas de dióxido de carbono foram lançados pela queima de combustíveis fósseis, em 2015, essa quantidade deverá alcançar 33 bilhões (Shreeve, 2006).

Os estudos realizados por Sukimaran *et al.* (2009) sobre biocombustível, demonstram que o etanol apresenta potenciais comparáveis às do petróleo e atingem preços competitivos, o que torna viável a sua comercialização. Ademais, os autores ressaltam que o etanol tem uma taxa de octanagem maior que a gasolina e produz menor emissão de poluentes, sendo amplamente conhecido como aditivo e/ou um substituto para a gasolina. Na década de 90 as autoridades do Vale de Tennessee, nos Estados Unidos, desenvolveram uma tecnologia eficiente para a conversão de substância oriunda de resíduos vegetais de origem vegetal em etanol (Lamberto *et al.*, 1990), o material era composto por 45 % de glicose e 9 % de hemicelulose (Wyman e Goodman, 1993; Wyman, 1994; Prasad *et al.*, 2007) e permitiu a produção de etanol celulósico. Segundo Shi *et al.* (2009) a utilização de resíduos urbanos de origem vegetal na produção de

etanol em substituição aos combustíveis fósseis é uma estratégia promissora para suprir as nossas necessidades de energia e diminuir a emissão dos GEEs. A estimativa realizada por [Shi et al. \(2009\)](#) em relação ao desenvolvimento socioeconômico de 173 países, permite a produção global de 82.9 bilhões de litros de etanol a partir de resíduos urbanos de origem vegetal, substituindo 5.36 % do consumo de gasolina.

A análise realizada por [Hill et al. \(2009\)](#) comparou a eco-eficiência na produção de combustíveis líquidos, como a gasolina, etanol do amido de milho e etanol celulósico. Os resultados evidenciaram o etanol celulósico como o mais eco-eficiente e apresentaram os seguintes valores na produção de 1 bilhão de galões de combustível: na gasolina de US\$ 416 milhões, etanol do amido de milho de US\$ 614 milhões e etanol celulósico de US\$ 208 milhões. A [Figura 2](#) apresenta o período necessário para zerar a quantidade de dióxido de carbono liberado no processo de desmatamento, colheita e produção de alguns biocombustíveis, os resultados obtidos enfatizam a importância de produzir o etanol celulósico, além da possibilidade de agregar valor às biomassas de origem vegetal na produção de biocombustível sem a necessidade de expansão de terras agricultáveis.

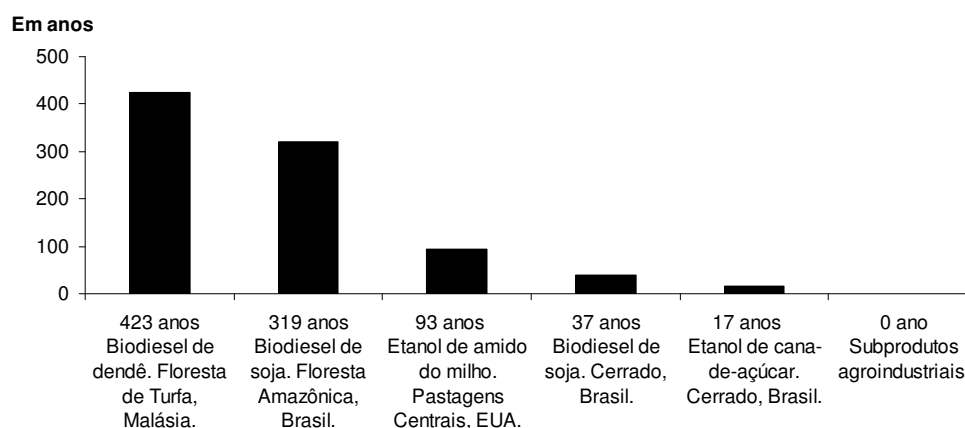


Figura 2. Conversão da cobertura vegetal natural para produção de biocombustíveis levando em consideração o tempo de zerar as emissões de dióxido de carbono liberado com desmatamento com a utilização do respectivo combustível produzido.

Fontes: [Fargione et al., 2008](#), apud [FAO, 2009](#), p. 37.

As projeções da Agência Internacional de Energia referente à demanda mundial por biocombustíveis (2008), mostram crescimento, de forma acentuada nas próximas décadas, com forte contribuição do setor de transporte rodoviário até 2030 ([IAE, 2008](#)). A expansão no uso de biocombustíveis é influenciada, principalmente, pelos Protocolos

de Montreal (1987), Quioto (1997) e Copenhagen (2009), entretanto, a Conferência do Clima (COP-16) realizada no México em 2010, traz incertezas para a segunda fase do Protocolo de Quioto, que estabelece metas obrigatórias e voluntárias para a redução de emissões dos GEEs entre os países industrializados. Porém, existe tendência de um período sem metas obrigatórias de preservação ambiental a partir de 2012. O aumento no consumo de biocombustíveis é influenciado pelas metas voluntárias e obrigatórias utilizadas por alguns países (Tabela 2). Segundo a [World Energy Assessment \(2004\)](#) e [Goldemberg \(2009\)](#) existe uma projeção otimista no cenário energético mundial até 2100, com aumento de fontes renováveis e consequente diminuição de fontes não-renováveis (Figura 3).

Tabela 2. Metas voluntárias e obrigatórias de alguns países no uso de biocombustíveis.

Países	Metas	Condições
Alemanha	Adição de 6,75 % de etanol anidro na gasolina em 2010, aumento para 8 % em 2015 e 10 % em 2020.	Obrigatória
Brasil	Mistura de 20 a 25 % de etanol anidro na gasolina, 5 % de biodiesel no diesel em 2010, expansão do uso de etanol hidratado.	Obrigatória
Canadá	Adição de 5 % de etanol anidro na gasolina em 2010 e adição de 2 % de biodiesel no biodiesel em 2012.	Obrigatória
China	O uso de 15 % de biocombustíveis no setor de transporte.	Voluntária
França	Adição de 7 % de etanol anidro na gasolina em 2010 ^a , aumento para 10 % em 2015 ^b .	Voluntária ^a Obrigatória ^b
Itália	Adição de 5,75 % de etanol anidro na gasolina em 2010 e aumento para 10 % em 2010.	Obrigatória
União Européia	Uso de 10 % de biocombustíveis em 2010.	Obrigatória
Reino Unido	Uso de 5 % de biocombustíveis em 2010.	Obrigatória

Fonte: [FAO, 2008](#).

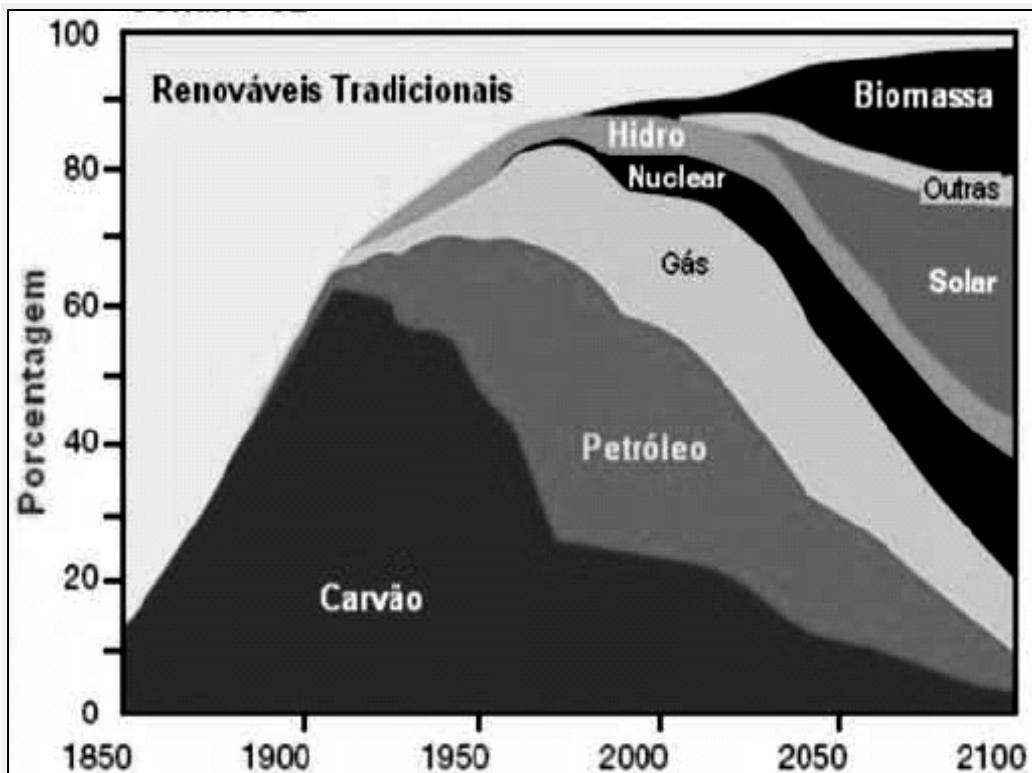


Figura 3. Projeções futuras no cenário energético mundial.

Fonte: [WEA, 2004](#).

PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO

A diferença entre a produção de etanol celulósico e de etanol obtido a partir do caldo de cana-de-açúcar se encontra, basicamente, na conversão dos compostos poliméricos presentes na biomassa celulósica em açúcares fermentescíveis e na fermentação de hexoses e pentoses. Nesse cenário, a produção de etanol no Brasil poderá ser impulsionada pela incorporação do etanol gerado a partir do bagaço de cana-de-açúcar, a ser produzido na mesma usina com menor custo de produção que do etanol, além de amenizar o período de entressafra da colheita da cana-de-açúcar e aumentar a disponibilidade de etanol sem a necessidade de expansão de terras agricultáveis, dessa forma, aplicando a eficiência econômica e ecológica ao processo. Esse conceito se fortalece com dados da colheita 2010/2011 de cana-de-açúcar no Brasil, mesmo sendo uma safra recorde de produção de cana-de-açúcar, a quantidade fica abaixo da quantidade necessária para atender a produção de etanol e açúcar. Na safra de 2011 o Brasil deve produzir 23% menos cana-de-açúcar que a demanda industrial. São aproximadamente 632 milhões de toneladas, enquanto a necessidade atual para atender

a demanda interna e externa é de 775,6 milhões de toneladas. E as projeções para 2020 são mais assustadoras. A oferta brasileira estará 41% menor do que a demanda, com expectativa de produção de 974 milhões de toneladas de cana-de-açúcar ante uma necessidade superior a 1,3 bilhão de toneladas (DCI, 2011).

O etanol celulósico envolve as seguintes etapas de produção: pré-tratamento físico e/ou químico, tratamento biológico, fermentação e a destilação (Zaldivar *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2002; Sun e Cheng, 2002; Fujita *et al.*, 2004; Yanase *et al.*, 2005; Abril e Abril, 2009).

Um dos processos para obter etanol a partir da celulose e hemicelulose é a hidrólise enzimática ou a hidrólise química de polissacarídeos em dissacarídeos e monossacarídeos para posterior fermentação. Entretanto, a recalcitrância do material lignocelulósicos exige pré-tratamento para facilitar a ação das enzimas (Adsul *et al.*, 2005; Bon *et al.*, 2008). Muitos métodos foram estudados para o pré-tratamento da biomassa vegetal, como: *organosolv* (Zhao *et al.*, 2009a, 2009b), deslignificação biológica (Li *et al.*, 2008), tratamento hidrotérmico (Yu *et al.*, 2009), explosão a vapor (Chen e Liu, 2007; Chen *et al.*, 2008), acidificação (Zhao *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2008), tratamento por micro-ondas e alcalino (Ma *et al.*, 2009). Outros pré-tratamentos da biomassa vegetal, empregados por alguns pesquisadores para obter etanol são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Pré-tratamentos realizados em materiais lignocelulósicos para obtenção de etanol.

Métodos	Processos	Referências
Físico	Moagem	Mais <i>et al.</i> , 2002
	Moagem	Tassinari e Macy, 1977
	Irradiação	Kumakura <i>et al.</i> , 1982
	Irradiação	Eskicioglu <i>et al.</i> , 2007
	Hidrotérmico	Garrote <i>et al.</i> , 1999
	Hidrotérmico	Boussarsar <i>et al.</i> 2009
	Pirólise	Yu e Zhang, 2003
	Pirólise	Jiang <i>et al.</i> , 2010
	Explosão a vapor	Ballesteros <i>et al.</i> , 2006
Físico-Químico	Explosão a vapor catalisada	Tucker <i>et al.</i> , 2003
	Explosão a vapor catalisada	Alizadeh <i>et al.</i> , 2005
	Explosão a vapor catalisada	Holtzapple <i>et al.</i> , 1991
	Explosão a vapor catalisada	Söderström <i>et al.</i> , 2003
	Explosão a vapor catalisada	Sassner <i>et al.</i> , 2006
	Hidrotermal alcalino	Yu <i>et al.</i> , 2010
Químico	Dióxido de carbono	Zheng e Tsao, 1996
	Dióxido de carbono	Kim e Hong, 2001
	Ácido	Taherzadeh e Karimi, 2007a
	Ácido	Taherzadeh e Karimi, 2007b
	Ácido	Schell <i>et al.</i> , 2003
	Dióxido de cloro, nitrogênio e ácido sulfúrico	Fan <i>et al.</i> , 1982
Biológico		Camassola e Dillon, 2009
		Pan <i>et al.</i> , 2005
		Ahring <i>et al.</i> , 1996
	Microbiano	Kurakake <i>et al.</i> , 2007
		Taniguchi <i>et al.</i> , 2005
		Roslan <i>et al.</i> , 2011

A busca pela obtenção de etanol a partir de compostos lignocelulósicos teve origem na Europa, em particular, na Alemanha e Rússia, há mais de 80 anos, pelo processo de sacarificação a partir da hidrólise ácida (Bastos, 2007). Atualmente, a obtenção de etanol a partir de carboidratos de menor valor agregado é realidade em alguns países, motivado pela busca constante de substratos e microrganismos eficientes na produção de etanol celulósico. Entretanto, as maiores expectativas para a

viabilização do etanol celulósico, em médio prazo, estão depositadas na possibilidade de utilizar o metabolismo microbiano na degradação e sacarificação da parede celular vegetal para minimizar a presença de inibidores durante a fermentação alcoólica (Abril e Abril, 2009) e maximizar a fermentação alcoólica das hexoses e pentoses (Stambuk *et al.*, 2008). A Tabela 3 apresenta diferentes substratos, microrganismos, pré-tratamentos e processos fermentativos referenciados por alguns pesquisadores para a produção de etanol celulósico.

Tabela 3. Produção de etanol a partir da biomassa vegetal por diferentes pré-tratamentos, processos fermentativos e microrganismos.

Substratos	Pré-tratamentos físicos e químicos	Microrganismos	Processos fermentativos	Etanol (g/g)	Referências
Casca e palha de algodão	Digestão alcalina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/SFS	0,48	Jeihanipour e Taherzadeh, 2009
Palha de trigo	Digestão ácida, <i>overliming</i>	<i>Escherichia coli</i>	Batelada/HSF	0,21	Saha <i>et al.</i> , 2005
Palha de trigo	Digestão ácida	<i>Escherichia coli</i>	Batelada/HSF	0,24	Saha <i>et al.</i> , 2005
Palha de trigo	Digestão ácida, <i>overliming</i>	<i>Escherichia coli</i>	Batelada/SFS	0,21	Saha <i>et al.</i> , 2005
Palha de trigo	Digestão ácida	<i>Escherichia coli</i>	Batelada/SFS	0,17	Saha <i>et al.</i> , 2005
Hastes do algodão	Não teve	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/FES/HSF	0,004	Shi <i>et al.</i> , 2009
Hastes do algodão	Não teve	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/HSF	0,027	Shi <i>et al.</i> , 2009
Casca de arroz	Digestão alcalina	<i>Escherichia coli</i>	Batelada/HSF	0,21	Saha e Cotta, 2007
Casca de arroz	Digestão alcalina	<i>Escherichia coli</i>	Batelada/SFS	0,20	Saha e Cotta, 2007
Palha de canola	Digestão ácida, hidrotérmica	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/HSF	0,21	Lu <i>et al.</i> , 2009
Bagaço de cana-de-açúcar	Digestão ácida, explosão a vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/SFS	0,44	Carrasco <i>et al.</i> , 2010
Bagaço de cana-de-açúcar	Digestão ácida, explosão a vapor	<i>Pichia stipitis</i>	Batelada/SFS	0,39	Carrasco <i>et al.</i> , 2010
Bagaço de cana selvagem	Digestão ácida, vapor	<i>Pichia stipitis</i>	Batelada/SFS	0,35	Scordia <i>et al.</i> , 2010
Palha de trigo	Digestão ácida, explosão a vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/SFS	0,13	Linde <i>et al.</i> , 2008
Sabugo de milho	Digestão ácida, vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/SCFS	0,39	Öhgren <i>et al.</i> , 2006
Palha de trigo	Digestão ácida, vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/SCFS	0,35	Olofsson <i>et al.</i> , 2010
Algaroba	Digestão ácida, vapor, deslignificado	<i>Pichia stipitis</i>	Batelada/HSF	0,39	Gupta <i>et al.</i> , 2009
Algaroba	Digestão ácida, vapor, deslignificado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/HSF	0,49	Gupta <i>et al.</i> , 2009
Bagaço de cana-de-açúcar	Móido	<i>Pichia stipitis</i>	Batelada/SFS	0,29	Buaban <i>et al.</i> , 2010
Bagaço de cana-de-açúcar	Móido	<i>Pichia stipitis</i>	Batelada/HSF	0,27	Buaban <i>et al.</i> , 2010
Palha de trigo	Explosão a vapor	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Batelada/SFS	0,27	Tomás-Pejó <i>et al.</i> , 2009
Palha de arroz	Digestão ácida, vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/SFS	0,093	Sukumaran <i>et al.</i> , 2009
Bagaço de cana-de-açúcar	Digestão ácida, explosão a vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/HSF	0,30	Santos <i>et al.</i> , 2010
Bagaço de cana-de-açúcar	Digestão ácida, explosão a vapor, deslignificado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/HSF	0,35	Santos <i>et al.</i> , 2010
Palha de trigo	Explosão a vapor	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Batelada/SFS	0,32	Ballesteros <i>et al.</i> , 2004
Bagaço do sorgo doce	Explosão a vapor	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Batelada/SFS	0,31	Ballesteros <i>et al.</i> , 2004
Resíduo de mostarda	Explosão a vapor	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Batelada/SFS	0,35	Ballesteros <i>et al.</i> , 2004
Sabugo de milho	Digestão ácida, vapor	<i>Pichia stipitis</i>	Batelada/ HSF	0,44	Lee <i>et al.</i> , 2010

Palha de arroz	Digestão ácida, vapor	<i>Mucor indicus</i>	Batelada/HSF	0,43	Abedinifar et al., 2009
Palha de arroz	Digestão ácida, vapor	<i>Rhizopus oryzae</i>	Batelada/HSF	0,41	Abedinifar et al., 2009
Palha de arroz	Digestão ácida, vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/HSF	0,45	Abedinifar et al., 2009
Spruce	Digestão ácida, explosão a vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/SFS	0,44	Bertilsson et al., 2009
Spruce	Digestão ácida, explosão a vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada alimentada/SFS	0,43	Bertilsson et al., 2009
Bagaço de cana-de-açúcar	Digestão ácida, explosão a vapor, deslignificado	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/SFS	0,32	Santos e Gouveia, 2009
Bagaço de cana-de-açúcar	Digestão ácida, explosão a vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/SFS	0,29	Santos e Gouveia, 2009
Papel ondulado velho	Digestão ácida	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Batelada/SFS	0,31	Kadár et al., 2004
Papel ondulado velho	Digestão ácida	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/SFS	0,32	Kadár et al., 2004
Papel fino	Digestão ácida	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Batelada/SFS	0,33	Kadár et al., 2004
Papel fino	Digestão ácida	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/SFS	0,33	Kadár et al., 2004
Flóculos de celulose	Digestão ácida	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Batelada/SFS	0,34	Kadár et al., 2004
Flóculos de celulose	Digestão ácida	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/SFS	0,31	Kadár et al., 2004
Espigas de milho	Digestão ácida, vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batelada/SFS	0,53	Shen et al., 2008
Bagaço de cana-de-açúcar	Digestão ácida, vapor, eletrodialise	<i>Pachysolen tannophilus</i>	Batelada	0,53	Cheng et al., 2008
Sabugo de milho	Digestão ácida	<i>Pichia stipitis</i>	Batelada	0,44	Agbogbo e Wenger, 2007
Resíduo celulósico da banana	Secagem	<i>Clostridium thermocellum</i> e <i>C. thermosaccharolyticum</i>	Batelada	0,36	Reddy et al., 2010
Resíduo celulósico da banana	Digestão ácida	<i>Clostridium thermocellum</i> e <i>C. thermosaccharolyticum</i>	Batelada	0,40	Reddy et al., 2010
Resíduo celulósico da banana	Digestão alcalina	<i>Clostridium thermocellum</i> e <i>C. thermosaccharolyticum</i>	Batelada	0,42	Reddy et al., 2010
Resíduo celulósico da banana	Secagem	<i>Clostridium thermocellum</i> e <i>C. ethanolicus</i>	Batelada	0,33	Reddy et al., 2010
Resíduo celulósico da banana	Digestão ácida	<i>Clostridium thermocellum</i> e <i>C. ethanolicus</i>	Batelada	0,36	Reddy et al., 2010
Resíduo celulósico da banana	Digestão alcalina	<i>Clostridium thermocellum</i> e <i>C. ethanolicus</i>	Batelada	0,39	Reddy et al., 2010
Sabugo de milho	Digestão ácida, <i>Overliming</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>	Batelada	0,42	Mohaghegi et al., 2004

HSF: Hidrólise separada da fermentação

SFS: Sacarificação e fermentação simultânea

SCFS: Sacarificação e co-fermentação simultânea

FES: Fermentação estado sólido

PERPECTIVAS E PRODUTOS A PARTIR DO ETANOL

A obtenção de etanol em escala industrial a partir da biomassa vegetal propiciará inúmeras vantagens à sociedade e ao meio ambiente, principalmente, pelo aproveitamento dos resíduos orgânicos de origem vegetal, o que possibilitará aumento da produção de biocombustível, utilização eficaz das unidades de produção (produção de etanol a partir dos resíduos na época de entressafra), aumento da vida útil dos aterros sanitários e diminuição da poluição orgânica, gerando benefícios eco-eficientes à região. No entanto, a produção de etanol celulósico ainda não apresenta processo biotecnológico consolidado, principalmente, nas etapas de pré-tratamento, hidrólise química e bioquímica, além do processo fermentativo da pentose ([Hinman et al., 1989](#);

Sun e Cheng, 2002; Negro *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2004; Palonen *et al.*, 2004; Lin e Tanaka, 2006; Camassola *et al.*, 2007; Abril e Abril, 2009).

Além disso, uma das dificuldades encontradas no processo é a ação da lignina devido à sua capacidade de adsorver enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas prejudicando a hidrólise enzimática (Bon *et al.*, 2008). Durante o processo de pré-tratamento a deslignificação do substrato por substância alcalina é desejada para minimizar a quantidade de lignina (Gouveia *et al.*, 2009).

A modificação genética de plantas é um caminho para produzir vegetais biodegradáveis a partir da redução do teor de lignina que influencia no pré-tratamento e na hidrólise enzimática (Buckeridge *et al.*, 2008).

O processo de pré-tratamento físico, químico ou físico-químico da biomassa vegetal libera compostos inibitórios que prejudicam o processo fermentativo, como o furfural, hidroximetilfurfural, compostos fenólicos e ácido acético (Almeida *et al.*, 2007; Wikandari *et al.*, 2010). Dependendo do processo utilizado, há presença de vinhaça e excesso de águas residuais.

As maiores expectativas para a viabilização do etanol celulósico estão depositadas na possibilidade de utilizar o metabolismo de microrganismos na degradação da parede celular vegetal; uma vez degradado em dissacarídeos e monossacarídeos, a fermentação alcoólica será possível (Bon *et al.*, 2008). A utilização eficiente da xilose juntamente com a hexose oferece a oportunidade de reduzir significativamente o custo de produção do etanol celulósico (Olsson e Hahn-Hägerdal, 1996) e a busca por microrganismos produtores de celulasas, hemicelulasas e ligninases, além do uso de substratos de baixos custos poderão influenciar na redução do preço das enzimas comerciais (Bon *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2011 *no prelo*). A busca por microrganismos industrialmente viáveis deverá ser oriunda da engenharia genética (Lau *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2010) ou da bioprospecção (Basso *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2009; Lotfi *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2011 *no prelo*) para uma fermentação eficiente do hidrolisado contendo hexoses e pentoses, e que também sejam resistentes à alta concentração de açúcares, presença de compostos inibitórios gerados no processo de hidrólise e na própria fermentação, como o etanol.

Após o pré-tratamento da biomassa vegetal, a fração rica em lignina, que é separada da hemicelulose pode ser queimada para fornecer energia às biorrefinarias ou convertida em gás de síntese (Fang *et al.*, 2009; Goldemberg, 2009). A lignina, quando

degradada em frações de massas menores, pode ser utilizada na fabricação de espuma de poliuretano, resina fenólica e epóxi, como fonte de fenol e etileno (Lora e Glasser, 2002) e pode ser convertida em fibras de carbono (Kadla *et al.*, 2002). Trabalhos realizados por Freudenberg e Adam (1941), Gonçalves (1995), Benar (1996), mostra que a lignina pode ser utilizada na produção de fenol, ácido acético, vanilina e na produção de resinas fenol-formaldeído. De acordo com os procedimentos utilizados no pré-tratamento e deslignificação a cinética de pirólise da lignina poderá ser diferenciada (Jiang *et al.*, 2010) afetando o seu aproveitamento. O furfural pode ser hidrolisado em ácido maléico ou formar resinas com adição de fenol ou uréia (Mckillip *et al.*, 1989). O hidroximetilfurfural clivados em ácidos fórmico e levulínico, esse último empregado como insumo na produção de poliésteres (Schuchardt *et al.*, 2001), o ácido acético utilizado como reagente químico e no condimento alimentar na forma de vinagre. E a vinhaça, quando presente, utilizada no processo de fertirrigação do solo.

O uso da biomassa vegetal na produção de etanol permite intensificar a geração de muitos co-produtos, como o uso do vapor de etanol na produção de hidrogênio visando a obtenção de células combustíveis (Benito *et al.*, 2003; Frusteri *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2007); a produção de etileno, etilenoglicol, acetaldeído, acetatos, etilacetato, glicóis, acrilatos, cloreto de etila, buteno, propileno e butadieno (Schuchardt *et al.*, 2001); a produção de eteno como resultado da desidratação do etanol, precursor de uma ampla gama de resíduos, como o polietileno, o polipropileno e o policloreto de vinila (BNDES, 2008). Esses co-produtos obtidos a partir do etanol estão em plena expansão no Brasil, devido ao aumento da produção de etanol para suprir as demandas futuras de consumo. Estima-se que o acréscimo de 10 % de etanol em substituição a outros insumos da indústria petroquímica e alcoolquímica necessitaria de 23 bilhões de litros de etanol (BNDES, 2008). Além disso, a intensificação do uso de etanol em substituição ao metanol, no processo de produção do biodiesel (García *et al.*, 2009); bem como, a conversão do etanol em etileno para a produção de bioplástico (Brasken, 2008) contribuem para o aumento na demanda de consumo de etanol.

É importante considerar que a produção de etanol gera dióxido de carbono, passível de gaseificação podendo ser utilizado em diversos produtos industrializados (BNDES, 2008); bem como, da fermentação alcoólica a biomassa microbiana pode ser empregada como suplemento alimentar protéico (Fang *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010).

A destinação dos resíduos agroindustriais e resíduos urbanos de origem vegetal a médio e longo prazo para a produção de biocombustíveis em substituição à gasolina, serão impulsionados pelo etanol celulósico e o biometanol. Segundo [Hasegawa *et al.* \(2010\)](#) e [Kohse-Höinghaus *et al.* \(2010\)](#), ambos biocombustíveis possuem muitos benefícios, principalmente relacionado à conversão de carbono, mitigação do dióxido de carbono e eficiência térmica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As modificações ambientais, influenciadas pela emissão dos Gases do Efeito Estufa e aquecimento global juntamente com as elevações de preço do barril de petróleo, de seus derivados e aumento da demanda de consumo, motivaram o desenvolvimento de inúmeros processos tecnológicos e biotecnológicos para minimizar a utilização de combustíveis fósseis no final do século 20 e início do século 21. Dentre essas inovações destacam-se os biocombustíveis, como o etanol, iniciado no Brasil em 1920 sendo mais efetivo a partir do Proálcool, em 1975, e desde então participa efetivamente na matriz energética brasileira, como uma das tecnologias mais limpas do mundo. Porém, a expansão populacional aliada a difusão do setor agroindustrial em busca do desenvolvimento sustentável possibilitou a produção de etanol oriundo da biomassa vegetal, além dos resíduos agroindustriais e resíduos urbanos de origem vegetal, sendo fontes de baixo custo para produção de etanol e torna-se um processo eco-eficiente.

Algumas dificuldades ainda são encontradas no processo de produção de etanol celulósico, relacionadas ao pré-tratamento; ao custo elevado das enzimas para promover a hidrólise enzimática do substrato; à formação de compostos inibitórios no hidrolisado; à utilização de microrganismos eficientes e viáveis na fermentação da hexose e pentose; à gaseificação do dióxido de carbono gerado durante essa fase; à retirada da lignina, furfural e hidroximetilfurfural do processo enzimático e fermentativo e sua adequada utilização, além do reuso da água durante o processo. Essas dificuldades se solucionadas ou minimizadas poderão proporcionar inúmeras vantagens sócio-ambientais, políticas e econômicas na produção de etanol celulósico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, a FUNDECT e UFGD pelo fomento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedinifer, S., Karimi, K., Khanahmadi, M., Taherzadeh, M.J., 2009. Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. *Biomass and Energy*, v. 33, p. 828-833.
- Abril, A., 2008. Etanol aditivo o alternativa para el combustible automotor. I Taller nacional de etanol celulósico. ICIDCA, Habana, Cuba.
- Abril, D., Abril, A., 2009. Ethanol from lignocellulosic biomass. *Ciencia e Investigación Agrária*, v. 36 (2), p. 177-190.
- Adsul, M.G., Ghule, J.E., Shaikh, H., Singh, R., Bastawde, K.B., Gokhale, D.V., Varma, A.J., 2005. Enzymatic hydrolysis of deslignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 6-10.
- Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hägerdal, B., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, p. 340-349.
- Agbogbo, F.A., Wenger, K.S., 2007. Production of ethanol from vorn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 34, p. 723-727.
- Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T.I., Dale, B.E., 2005. Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, p. 1133-1141.
- Almeida, J.R., Karhuma, K., Bengtsson, O., Gorwa-Grauslund, M.F., 2009. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* strains with respect to anaerobic growth in non-detoxified lignocellulose hydrolysate. *Bioresource Technology*, v. 100 (14), p. 3674-3677.
- Ahring, B.K., Jensen, K., Nielsen, P., Bjerre, A.B., Schmidt, A.S., 1996. Pretreatment of wheat straw and conversion of xylose and xylan to ethanol by thermophilic anaerobic bacteria. *Bioresource Technology*, v. 8 (2), p. 107-113.
- Austin, M.P., Gaywood, M.J., 1994. Current problems of environmental gradients and species response curves in relation to continuum theory. *Journal of Vegetation Science*, v. 5 (4), p. 473-482.

- Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I., 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1843-1848.
- Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabañas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2006. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 129/132, p. 496-508.
- Barl, B., Biliaderis, C.G., Murray, D.M., Macgregor, A.W., 1991. Combined chemical and enzymic treatments of corn husk lignocellulosics. *Journal Science Food and Agriculture*, v. 56, p.195-214.
- Basso, L.C., Amorim, H.V., Oliveira, A.J., Lopes, M.L., 2008. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, v. 8, p. 1155-1163.
- Bastos, V.D., 2007. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, v. 25, p. 5-38.
- Benar, P., 1996. *Ligninas acetosolv e formacell de eucalipto e de bagaço de cana: isolamento, fracionamento, caracterização e uso como componente de resinas fenólicas do tipo resol*. 1996. 129f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química - UNICAMP, Campinas.
- Benito, M., Sanz, J.L., Isabel, R., Padilha, R., Arjona, R., Daza, L., 2003. Bio-ethanol steam reforming: Insights on the mechanism for hydrogen production. *Journal of Power Sources*, v. 151, p. 11-17.
- Bertilsson, M., Olofsson, K., Lidén, G., 2009. Prefermentation improves xylose utilization in simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated spruce. *Biotechnology for Biofuels*, v. 2, p. 1-8.
- Billa, E., Monties, B., Choudens, C., 1993. Silica and phenolic acid derivatives in wheat straw and corresponding high yield pulps. Paper n. 4. *In: Conference Proceedings. Straw - a valuable raw material*, Cirencester, p. 20-22.
- BNDES - Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, 2008. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável, BNDES e CGEE – Rio de Janeiro: BNDES, 316 p.
- Bon, E.P.S.; Gírio, F.; Pereira Jr. N., 2008. Enzimas na produção de etanol. In: *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 506 p.
- Boopathy, R., 1998. Biological treatment of swine waste using anaerobic baffled reactors. *Bioresource Technology*, v. 64, p. 1-6.

- Boussarsar, H., Rogé, B., Mathlouthi, M., 2009. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xilose. *Bioresource Technology*, v. 100 (24), p. 6537-6542.
- Bothast, R.J., Saha, B.C., 1997. Ethanol production from agricultural biomass substrates. *Advances in Applied Microbiology*, v. 44, p. 261-286.
- Braskem. Inovação e tecnologia. São Paulo, 2008. Disponível em: <http://www.braskem.com.br/plasticoverde/_HOME.html>. Acesso em 10 nov. 2010
- Broder, J.D., Barrier, J.W., Lightsey, G.R., 1992. Conversion of cotton trash and other residues to liquid fuel. *In: J. S. Cundiff (Eds.). Liquid fuel from renewable resources. Proceedings of an alternative energy conference held in Nashville, Tennessee, USA., St. Joseph, Michigan, USA: American Society of Agricultural Engineers: p. 12-15, p. 198-200.*
- Brown, R.M., 1999. Cellulose structure and biosynthesis. *Pure and Applied Chemistry*, v. 71 (5), p. 767-775.
- Buaban, B., Inoue, H., Yano, S., Tanapongpipat, S., Ruanglek, V., Champreda, V., Pichyangkura, R., Rengpipat, S., Eurwilaichitr, L., 2010. Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 110, p. 18-25.
- Buckeridge, M.S., 2008. Rotas para o etanol celulósico em um cenário de mudanças climáticas. *Opiniões, Ribeirão Preto*, jul-set, p. 62-64.
- Buckeridge, M.S., Silva, G.B., Cavalari, A. A., 2008. Parede Celular. *In: Kerbauy, G.B. (ed). 2ed. Fisiologia Vegetal, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p. 165-181.*
- Camassola, M., Dillon, A.J.P., 2007. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 2196-2204.
- Camassola, M., Dillon, A.J.P., 2009. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. *Industrial Crops and Products*, v. 29, p. 642-647.
- Cardona, C., Sánchez, O., Ramírez, J., Álzate, L., 2004. Biodegradación de residuos orgánicos de plazas de mercado. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v. 6, p. 78-89.
- Carrasco, C., Baudel, H.M., Sendelius, J., Modig, T., Roslander, C., Galbe, M., Hahn-Hagerdal, B., Zacchi, G., Liden, G., 2010. SO₂ catalyzed steam pretreatment and fermentation n of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 64-73.

- Chen, H., Liu, L., 2007. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 666-676.
- Chen, H., Han, Y., Xu, J., 2008. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 1462-1466.
- Cheng, K., Cai, B., Zhang, J., Ling, H., Zhou, Y., Ge, J., Xu, J., 2008. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal*, v. 38, p. 105-109.
- Cheung, S.W., Anderson, B.C., 1997. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary waste water. *Bioresource Technology*, v. 59, p. 81-96.
- Claassen P.A.M., Van Lier, J.B., López, C.A.M., Van Niel, E.W.J., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., De Vries, S.S., Weusthuis, R.A., 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 52, p. 741-755.
- Della, P.V., 2005. *Síntese e caracterização do pigmento cerâmico de hematita, obtida a partir de carepa de aço, encapsulada em sílica amorfa obtida a partir de casca de arroz*. 2005. 168f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Demirbas, A., 2005. Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass. *Energy Sources*, v. 21, p. 327-337.
- Demirbas, M.F., Balat, M., Balat, H., 2011. Biowastes-to-biofuels. *Energy Conversion and Management*, v. 52, p. 1815-1828.
- De Vries, R.P., Visser, J., 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, v. 65, p. 497-522.
- Dewes, T., Hunsche, E., 1998. Composition and microbial degradability in the soil of farmyard manure from ecologically-managed farms. *Biological Agriculture and Horticulture*, v. 16, p. 251-268.
- DCI. Diário comércio, indústria e serviços. Safra da cana será menor que demanda das usinas. Disponível em: <http://www.dci.com.br/noticia.asp?id_editoria=7&id_noticia=368562&editoria=>. Acessado: 06 mar 2011.
- Dhouib, K., Gharbi, A., Ayed, S., 2006. Disponibilité et taux de production des lignes de transfert homogènes, Sans Stocks Intermédiaires. *International Conference JTEA'06, Hammamet, Tunisia*, p. 1145-1152.

- Emmel, A., Mathias, A.L., Wypych, F., Ramos, L.P., 2003. Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. *Bioresource Technology*, v. 86 (2), p.105-15.
- Eskicioglu, C., Terzian, N., Kennedy, K.J., Droste, R.L., Hamoda, M., 2007. Athermal microwave effects for enhancing digestibility of waste activated sludge. *Water Research*, v. 41, p. 2457-2466.
- Fan, L.T., Lee, Y.H., Gharpuray, M.M., 1982. The nature of lignocellulose and their pretreatment for enzymatic hydrolysis. *Advances in Biochemical Engineering*, v. 22, p. 158-183.
- Fang, X., Yano, S., Inoue, H., Sawayama, S., 2009. Strain improvement of *Acremonium cellulolyticus* for cellulase production by mutation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 107, p. 256-261.
- Fang, X., Shen, Y., Zhao, J., Bao, X., Qu, Y., 2010. Status and prospect of lignocellulosic bioethanol production in China. *Bioresource Technology*, v. 101 (13), p. 4814-4819.
- FAO - Food and Agriculture Organization, 2008. El estado mundial de la agricultura y la alimentación: Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades. Roma: FAO, 162 p.
- FAO - Food and Agriculture Organization, 2009. Agroenergia da biomassa residual: perspectivas energéticas, socioeconômicas ambientais. Foz do Iguaçu/Brasília: Itaipu Binacional, Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação, 140 p.
- Fengel, D., Wegener, G., 1989. *Wood chemistry, ultrastructure and reactions*, 1st ed., Walter de Gruyter: Berlin, 613p.
- Ferreira, C.S., Piedade, M.T.F., Tiné, M.A., Rossatto, D.R., Parolin, P., Buckeridge, M.S., 2009. The role of carbohydrates in seed germination and seedling establishment of *Himatanthus sucuuba*, an Amazonian tree with populations adapted to flooded and non-flooded conditions. *Annals of Botany*, v. 104, p. 1111-1119.
- Freudenberg, K., Adam, K., 1941. The Verschwe lung of the lignin in the hydrogen stream. *Reports of the German chemical society (A and B series)*, v. 74 (3), p. 387-397.
- Frusteri, F., Freni, S., Spadaro, L., 2004. H₂ production for MC fuel cell by steam reforming of ethanol over MgO supported Pd, Rh, Ni and Co catalysts. *Catalysis Communications*, v. 5, p. 611-615.
- Fujita, Y., Ito, J., Ueda, M., Fukuda, H., Kondo, A., 2004. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered

- yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 1207-1212.
- Galbe, M., Zacchi, G., 1993. Simulation processes for conversion of lignocelluloses. *In: J. N. Saddler (ed.). Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues*. CAB International. Wallingford, UK, p. 291-319.
- Galbe, M., Larsson, M., Stenberg, K., Tenborg, C., Zacchi, G., 1997. Ethanol from wood: Design and operation of a process development unit for techno-economic process evaluation. *In: ACS Symposium Series 666*. American Chemical Society, Washington DC, USA. p. 110-129.
- García, M.A., Gonzalo, A., Sánchez, L.J.A., Arauzo, J.A., Simões, C., 2009. Methanolysis and ethanolysis of animal fats: A comparative study of the influence of alcohols. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, v. 15 (1), p. 1-18.
- Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J.C., 1999. Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*, v. 74, p. 1101-1109.
- Godemberg, J., 2009. Biomassa e energia, *Química Nova*, v. 32 (3), p. 582-587.
- Gonçalves, A.R., 1995. *Oxidação de ligninas e modelos de lignina com oxigênio molecular em meio ácido*. 1995. 94f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química - UNICAMP, Campinas.
- Gonçalves, F.A., Leite, R.S.R., Sanjinez-Argandoña, E.J., Fonseca, G.G., 2011. Bioprospeção de microrganismos com potencial para a produção de celulases e hemicelulases. *Bioresource Technology*. No prelo 2011.
- Gouveia, E.R., Nascimento, R.T., Souto-Maior, A., Rocha, G.J.M., 2009. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, v. 32, (6), p. 1500-1503.
- Gupta, R., Sharma, K.K., Kuhad, R.C., 2009. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora* a wood substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* NCIM 3498. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1214-1220.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., Zacchi, G., 2006. Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, v. 24 (12), p. 449-556.
- Hasegawa, F., Yokoyama, S., Imou, K., 2010. Methanol or ethanol produced from woody biomass: Which is more advantageous? *Bioresource Technology*, v. 101 (1), p. 109-111.

- Hill, J., Polasky, S., Nelson, E., Tilman, D., Huo, H., Ludwig, L., Neumann, J., Zheng, H., Bonta, D., 2009. Climate change and health costs of air emissions from biofuels and gasoline. *Sustainability Science*, v. 106 (6), p. 2077-2082.
- Hinman, N.D., Wright, J.D., Hoagland, W., Wyman, C.E., 1989. Xylose fermentation: an economic analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 20/21 (1), 391-401.
- Holtzapple, M.T., Jun, J.H., Ashok, G., Patibandla, S.L., Dale, B.E., 1991. The ammonia freeze explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 28/29, p. 59-74.
- IEA. International Energy Agency, 2008. The International Energy Agency, supporting the genealogical plan of action. *In: support of the G8 Plan of Action*, Hokkaido, Japan, 16 p.
- IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change, 2005. Fourth assessment report: summary for policymakers.
- Jeihanipour, A., Taherzadeh, M.J., 2009. Ethanol *production from cotton-based waste textiles*. *Bioresource Technology*, v. 100 (2), p. 1007-1010.
- Jiang, G., Nowakowski, D.J., Bridgwater, A.V., 2010. A systematic study of the kinetics of lignin pyrolysis. *Thermochimica Acta*, v. 498, p. 61-66.
- Josefsson, T., Lennholm, H., Gellerstedt, G., 2002. Steam explosion of aspen wood. Characterisation of reaction products. *Holzforschung*, v.56, p. 289-297.
- Kadam, K.L., Mcmillan, J.D., 2003. Availability of corn stover as a sustainable feedstock for bioethanol production. *Bioresource technology*, v. 88, p. 17-23.
- Kadar, Z., Szengyel, Z., Reczey, K., 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*, v. 20, p. 103-110.
- Kadla, J. F., Kubo, S., Venditti, R.A., Gilbert, R.D., Compere, A.L., Griffith, W., 2002. Lignin-based carbon fibers for composite fiber applications. *Carbon*, v. 40, p. 2913-2920.
- Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S., Hong, S.I., Kim, S.W., 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 153-156.
- Kim, K.H., Hong, J., 2001. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*, v. 77, p. 139-144.
- Klass, D.L., 1998. *Biomass for renewable energy, fuels and chemicals*. 1^o Ed. San Diego: Academic Press. 651 p.

- Koegel, R.G., Straub, R.J., 1996. Fractionation of alfalfa for food, feed, biomass and enzymes. *American Society of Agricultural Engineers*, v. 39, p. 769-774.
- Kohse-Höinghaus, K., Oswald, P., Cool, T., Kasper, T., Hansen, N., Qi, F., Westbrook, C., Westmorel, P., 2010. *Biofuel combustion chemistry: From ethanol to biodiesel*. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 49, p. 3572-3597.
- Kuhad, R.C., Singh, A., 1993. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. *Critical reviews in biotechnology*, v. 13 (2), p. 151-172.
- Kumakura, M., Kojima, T., Kaetsu, I., 1982. Pretreatment of lignocellulosic wastes by combination of irradiation and mechanical crushing. *Biomass*, v. 2 (4), p. 299-308.
- Kurakake, M., Ide, N., Komaki, T., 2007. Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of officepaper. *Current Microbiology*, v. 54, p. 424-428.
- Lafitte-Trouqué, S., Forster, C.F., 2002. The use of ultrasound and γ -irradiation as pre-treatments for the anaerobic digestion of waste activated sludge at mesophilic and thermophilic temperatures. *Bioresource Technology*, v. 84 (2), p. 113-118.
- Lambert, R.O., Jr. Moore-Bulls, M.R., Barrier, J.W., 1990. An evaluation of two acid hydrolysis processes for the conversion of cellulosic feedstocks to ethanol and other chemicals. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 24/25, p. 773-783.
- Lau, M.W., Gunawan, C., Balan, V., Dale, B.E., 2010. Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, v. 3 p. 1-11.
- Li, L., Li, X.Z., Tang, W.Z., Zhao, J., Qu, Y.B., 2008. Screening of a fungus capable of powerful and selective delignification on wheat straw. *Letters in Applied Microbiology*, v. 47, p. 415-420.
- Li, S.Z., Chan-Halbrendt, C., 2009. Ethanol production in China: potential and technologies. *Applied Energy*, v. 4, p. 4-9.
- Li, X., Kondo, R., Sakai, K., 2002. Biodegradation of sugarcane bagasse with marine fungus *Phlebia sp.* MG-60. *Journal of Wood Science*, v. 48, p. 159-162.
- Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 69 (6), p. 627-642.
- Linde, M., Jakobsson, E.L., Galbe, M., Zacchi, G., 2008. Steam pretreatment of dilute H₂SO₄ impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loading for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 326-332.
- Lee, J.W., Rodrigues, C.L.B.R., Kim, H.J., Choi, I.G., Jeffries, T.W., 2010. The roles of xylan and lignin in oxalic acid pretreated corncob during separate enzymatic

- hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4379-4381.
- Lora, J.H., Glasser, W.G., 2002. Recent industrial applications of lignin: A sustainable alternative to nonrenewable materials. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 10, p. 39-48.
- Lotfi, A., Ghanbary, M.A.T., Ranjbar, G.A., Asgharzadeh, A., 2010. Screening of some *Zygomycetes* for cellulase activity. *African Journal of Biotechnology*, v. 9 (27), p. 4211-4216.
- Lu, X.B., Zhang, Y.M., Angelidaki, I., 2009. Optimization of H₂SO₄ catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: Focusing on pretreatment at high solids content. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3048-3053.
- Ma, H., Liu, W.W., Chen, X., Wu, Y.J., Yu, Z.L., 2009. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1279-1284.
- Maia, T.A., Bellido, J.D.A., Assaf, E.M., Assaf, J.M., 2007. Produção de hidrogênio a partir da reforma a vapor de etanol utilizando catalisadores Cu/Ni/-Al₂O₃. *Química Nova*, v. 30 (2), p. 339-345.
- Mais, U., Esteghlalian, A., Saddler, J., 2002. Influence of mixing regime on enzymatic saccharification of steam-exploded softwood chips. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98 (1), p. 463-472.
- Martin, C., Galbe, M., Wahlbom, C.F., Hahn-Hägerdal, B., Jönsson, L.J., 2002. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 274-282.
- Matulova, M., Nouaille, R., Capek, P., Péan, M., Forano, E., Delort, A.M., 2005. Degradation of wheat straw by *Fibrobacter succinogenes* S85: a liquid- and solid-state nuclear magnetic resonance study. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71 (3), p. 1247-1253.
- Mckillip, W.J., Collin, G., Höke, H., 1989. Furan and derivatives. In: Elvers, B.; Hawkins, S.; Ravenscroft, M.; Rounsaville, J. F.; Schulz, G. eds., *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th ed., *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th ed. VCH Publishers, v. 12, 119 p.
- McMillan, J.D., 1997. Bioethanol production: Status and prospects. *Renewable Energy*, v. 10, p. 295-302.
- Mohaghegi, A., Dowe, N., Schell, D., Chou, Y.E., Eddy, E., Zhang, M., 2004. Performance of a newly developed integrant of *Zymomonas mobilis* for ethanol production on corn stover hydrolysate. *Biotechnology Letters*, v. 26, p. 321-325.

- Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I., 2003. Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105, 87-100.
- Ohgren, K., Bengtsson, O., Gorwa-Grauslund, M.F., Galbe, M., Hahn-Hagerdal, B., Zacchi, G., 2006. Simultaneous saccharification and cofermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology*, v. 126 (4), p. 488-498.
- Olofsson, K., Wiman, M., Liden, G., 2010. Controlled feeding of cellulases improves conversion of xylose in simultaneous saccharification and co-fermentation for bioethanol production. *Journal of Biotechnology*, v. 145 (2), p. 168-175.
- Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B., 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18 (5), p. 312-331.
- Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G., Tenkanen, M., 2004. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *Journal of Biotechnology*, v. 107, p. 65-72.
- Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabee, W., Pye, K., Xiao, Z., Zhang, X., Saddler, J., 2005. Biorefining of softwoods using ethanol organosolve pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 90, p. 473-481.
- Pimentel, D., Marklein, A., Toth, M.A., Karpoff, M., Paul, G.S., McCormack, R., 2009. Food versus biofuels: environmental and economic costs. *Human Ecology*, v. 37, p. 1-12.
- Pitkanen, J., Aristidou, A., Salusjarvi, L., Ruohonen, L., Penttila, M., 2003. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. *Metabolic Engineering*, v. 5, p. 16-31.
- Prasad, S., Singh, A., Joshi, H.C., 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 50, p. 1-39.
- Qi, B.C., Aldrich, C., Lorenzen, L., Wolfaardt, G.W., 2005. Acidogenic fermentation of lignocellulosic substrate with activated sludge. *Chemical Engineering Communications*, v. 192 (9), p. 1221-1242.
- Reddy, H.K.Y., Srijana, M., Reddy, M.D., Reddy, G., 2010. Coculture fermentation of banana agro-waste to ethanol by cellulolytic thermophilic *Clostridium thermocellum* CT2. *African Journal of Biotechnology*, v. 9 (13), p. 1926-1934.

- Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guilléna, R., Fernández-Bolaños, J., 2008. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology*, v. 99 (13), p. 5261-5269.
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A., 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, v. 26 (9), p. 960-969.
- Rosa, S.E.S., Garcia, J.L.F., 2009. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. *Revista BNDES*, v. 32, p. 117-156.
- Roslan, M.A., Yee, P.L., Shah, U.K.M., Aziz, S.A., Hassan, M.A., 2011. Production of bioethanol from rice straw using cellulases by local *Aspergillus sp.* *Internacional Journal of Agricultural Research*, v. 6 (2), p. 188-193.
- Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., Wu, Y.V., 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3693-3700.
- Saha, B.C., Cotta, M.A., 2007. Enzymatic hydrolysis and fermentation of lime pretreated wheat straw to ethanol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82 (10), p. 913-919.
- Sanchez, R.G., Karhuma, K., Fonseca, C., Nogué, V.S., Almeida, J.R.M., Larsson, C. U., Bengtsson, O., Bettiga, M., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M.F., 2010. Improved xylose xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering. *Biotechnology for Biofuels*, v. 3, p. 1-11.
- Santos, J.R.A., Gouveia, E.R., 2009. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 11 (1), p. 27-33.
- Santos, J.R.A., Souto-Maior, A.M., Gouveia, E.R., Martín, C., 2010. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. *Química Nova*, v. 33 (4). p. 904-908.
- Sassner, P., Galbe, M., Zacchi, G., 2006. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 756-762.
- Schell, D.J., Farmer, J., Newman, M., Mcmillan, J.D., 2003. Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. Investigation of yields, kinetics and enzymatic digestibilities of solids. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105 (1/3), p. 69-85.
- Schell, D.J., Riley, C.J., Dowe, N., Farmer, J., Ibsen, K.N., Ruth, M.F., Toon, S.T., Lumpkin, R.E., 2004. A bioethanol process development unit: initial operating experiences and results with corn fiber feedstock. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 179-188.

- Schuchardt, U.L.F., Ribeiro, M.L., Gonçalves, A.R., 2001. The petrochemical industry in the next century: how to replace petroleum as raw material. *Química Nova*, v. 24, (2), 247-251.
- Scordia, D., Cosentino, S.L., Jeffries, T.W., 2010. Second generation bioethanol production from *Saccharum spontaneum* L. *ssp. aegyptiacum* (Willd.) Hack. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5358-5365.
- Sharma, S.K., Kalra, K.L., Grewal, H.S., 2002. Fermentation of enzymatically saccharified sunflower stalks for ethanol production and its scale up. *Bioresource Technology*, v. 85, p. 31-33.
- Shen, Y., Zhang, Y., Ma, T., Bao, X., Du, F., Zhuang, G., Qu, Y., 2008. Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated corncobs with a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing β -glucosidase. *Bioresource Technology*, v. 99 (11), p. 5099-5103.
- Shi, A.Z., Koh, L.P., Tan, H.T.W., 2009. The biofuel potential of municipal solid waste. *Global Change Biology Bioenergy*, v. 1 (5), p. 317-320.
- Shi, D.J., Wang, C.L., Wang, K.M., 2009. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 36 (1), p. 139-147.
- Shleser, R., 1994. Ethanol production in Hawaii, processes, feedstocks, and current economic feasibility of fuel grade ethanol production in Hawaii. State of Hawaii, Department of business, economic development and tourism. Honolulu, Hawaii, USA.
- Shreeve, J., 2006. Redesigning life to make ethanol. *Technology Review*, v. 109 (3), p. 66-68.
- Sidiras, D.K., Koukios, E.G., 1989. Acid saccharification of ballmilled straw. *Biomass*, v. 19 (4), p. 289-306.
- Silva, J.P.A., Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2010. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162 (5), p. 1306-1315.
- Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M., Zacchi, G., 2003. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, v. 24, p. 475-486.
- Stambuk, B.U., Eleutherio, E.C.A., Florez-Pardo, L.M., Souto-Maior, A.M., Bon, E.P.S., 2008. Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 67, p. 918-926.

- Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R., Mathew, G.M., Pandey, A., 2009. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v. 34 (2), p. 421-424.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2007a. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*, v. 2, 472-499.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2007b. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*, v. 2, 707-738.
- Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., Tanaka, T., 2005. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100 (6), p. 637-643.
- Tassinari, T., Macy, C., 1977. Differential speed two roll mill pretreatment of cellulosic materials for enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 19, p. 1321-1330.
- Tomás-Pejó, E., García-Aparicio, M., Negro, M.J., Oliva, J.M., Ballesteros, M., 2009. Effect of different cellulose dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 890-895.
- Tucker, M.P., Kim, K.H., Newman, M.M., Nguyen, Q.A., 2003. Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn stover and cellulase enzyme digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105/108, p. 165-177.
- Valor online. Petróleo é negociado na casa de US\$ 108 em NY e de US\$ 121 em Londres. Disponível em: <<http://extra.globo.com/noticias/economia/petroleo-negociado-na-casa-de-us-108-em-ny-de-us-121-em-londres-1518061.html>>. Acessado em: 06 março 2011.
- Wikandari, R., Millati, R., Syamsiyah, S., Muriana, R., Ayuningsih, Y., 2010. Effect of furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid on indigenous microbial isolate for bioethanol production. *Agricultural Journal*, v. 5 (2), p. 105-109.
- Wiseloge, A., Tyson, J., Johnsson, D., 1996. Biomass feedstock resources and composition. In: *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. Wyman, C. E., ed.; Taylor e Francis, Washington, 105 p.
- WEA - World Energy Assessment. 2004. *Energy and the challenge of sustainability*. United Nations Development Programme: Overview 2004 update, 88 p.

- Wyman, C.E., Goodman, B.J., 1993. Biotechnology for production of fuel, chemicals and materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 39/40, p. 41-59.
- Wyman, C.E., 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics and opportunities. *Bioresource Technology*, v. 50, p. 3-16.
- Wyman, C.E. 1996. Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. *Taylor and Francis Washington, USA*, 424 p.
- Wyman, C.E., Decker, S.R., Himmel, M.E., Brady, J.W., Skopec, C.E., Viikari, L., 2005. *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*; Dumitriu, S., ed.; Dekker: New York, p. 995-1033.
- Yanase, H., Yamamoto, K., Sato, D., Okamoto, K., 2005. Ethanol production from cellobiose by *Zymobacter palmae* carrying the *Ruminococcus albus* β -glucosidase gene. *Journal of Biotechnology*, v. 118, p. 35-43.
- Yang, B., Lu, Y., 2007. The promise of cellulosic ethanol production in China. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, p. 6-10.
- Young, E., Lee, S.M., Alper, H., 2010. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. *Biotechnology for Biofuels*, v. 3, p. 1-12.
- Yu, G., Yano, S., Inoue, H., Inoue, S., Endo, T., Sawayama, S., 2009. Pretreatment of rice straw by a hot-compressed water process for enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160 (2), p. 539-551.
- Yu, Q., Zhuang, X., Yuan, Z., Wang, Q., Qi, W., Wang, W., Zhang, Y., Xu, J., Xu, H., 2010. Two-step liquid hot water pretreatment of *Eucalyptus grandis* to enhance sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource Technology*, v. 101 (13), p. 4895-4899.
- Yu, Z., Zang, H., 2003. Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia sp. YZ-1* and *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy*, v. 24, p. 257-262.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., Olsson, L., 2001. Fuel ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56 (1/2), p. 17-34.
- Zhao, X.B., Wang, L., Liu, D.H., 2007. Effect of several factors on peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, p. 1115-1121.
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., 2009a. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 82, p. 815-827.

Zhao, X., Peng, F., Cheng, K., Liu, D., 2009b. Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 44, p. 17-23.

Zheng, Y., Tsao, G.T., 1996. Avicel hydrolysis by cellulase enzyme in supercritical CO₂. *Biotechnology Letters*, v. 18, 451-454.

Este artigo encontra-se de acordo com a norma da revista *Bioresource Technology*. Disponível em: <http://journals.elsevier.com/09608524/bioresourcetechology/> [Fevereiro 2011].

Bioprospecção de microrganismos com potencial para a produção de celulases e hemicelulases

RESUMO

Os resíduos agroindustriais como o bagaço de cana-de-açúcar e outros materiais lignocelulósicos podem ser utilizados como matéria-prima para a obtenção de diversos produtos como etanol celulósico, enzimas, alimentos e gomas. Existe interesse nas enzimas de degradação da biomassa vegetal. Dentre elas, destacam-se as celulases e hemicelulases, que apresentam potencial para hidrolisar os polissacarídeos constituintes da parede celular vegetal, sendo esses os carboidratos mais abundantes e renováveis encontrados na natureza. O objetivo da pesquisa foi prospectar microrganismos do meio ambiente e selecionar os que apresentavam maior produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Amostras de diferentes regiões foram colhidas e posterior ao plaqueamento, obtidos 36 microrganismos isolados em meio de cultivo seletivo à base de bagaço de cana-de-açúcar. Os microrganismos isolados foram replaqueados em meio contendo carboximetilcelulose como principal fonte de carbono, onde, todos apresentaram crescimento, confirmando o potencial de degradação de polímeros constituintes da parede celular vegetal. A produção enzimática foi avaliada pelo cultivo dos microrganismos isolados em fermentação estado sólido, utilizando duas fontes de carbono distintas, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. Dentre as espécies isoladas destacaram-se o Isolado 11 com produção de 15,58 U/ml de β -glicosidase, 2,41 U/ml de xilanase, 2,13 U/ml de CMCase e o Isolado 96 com 6,77 U/ml de β -glicosidase, 1,68 U/ml de xilanase e 1,33 U/ml de CMCase cultivados em farelo de trigo, o Isolado 96 produziu 1,81 U/ml de xilanase cultivados em substrato de bagaço de cana-de-açúcar. Devido a expressiva produção de β -glicosidase pelo Isolado 11 se realizou sua identificação taxonômica, obtendo como resultado *Lichtheimia ramosa*. Alterações na temperatura e tempo de cultivo do processo fermentativo favoreceram a maior produção de β -glicosidase, obtendo 17,26 U/ml no cultivo em farelo de trigo a 35 °C por 120 horas.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, β -glicosidase, *Lichtheimia ramosa*

INTRODUÇÃO

A biomassa vegetal é constituída por 75 a 80 % de polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e 20 a 25 % de lignina. A celulose e a hemicelulose são os principais componentes da biomassa vegetal (Della, 2005). Esses polímeros estão presentes principalmente nos materiais agroindustriais, resíduos urbanos de origem vegetal, e madeiras (Szengyel, 2000). Toda biomassa vegetal é constituída de uma base seca, que consiste quase que integralmente de lignocelulose, nome dado a um conjunto de três polímeros: celulose, hemicelulose e lignina (Klass, 1998). A celulose e hemicelulose, encontradas nas paredes celulares das plantas são componentes primários da biomassa vegetal na forma de carboidratos e, a lignina, polímero fenólico que contribui para a rigidez estrutural dos tecidos das plantas (Buckeridge, 2008). A celulose ocorre ligada a hemicelulose e essa, por sua vez, se liga a lignina (Matulova *et al.*, 2005).

Uma das possibilidades da degradação dos materiais lignocelulíticos consiste no uso de enzimas microbianas que apresentam potencial de hidrolisar a parede celular vegetal, como a carboximetilcelulase, avicelase e β -glicosidase, enzimas que atuam sobre a porção celulósica (celulases). As xilanases, mananases, glucanases e galactanases atuam sobre a porção hemicelulósica (hemicelulases). As enzimas oxidativas atuam sobre a lignina (ligninases), como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase (Wood e Garcia-Campayo, 1990; Tuor *et al.*, 1995). Devido à recalcitrância apresentada pela lignina, os polissacarídeos presentes na parede celular da biomassa vegetal não são facilmente convertidos em açúcares monoméricos, o que faz necessário o pré-tratamento físico, químico ou enzimático (Adsul *et al.*, 2004).

No complexo hemicelulolítico, destacam-se as β -1,4-endoxilanases, que despolimerizam a xilana pela hidrólise randômica do esqueleto principal e as β -xilosidases, que quebram pequenos oligossacarídeos liberando a xilose. No complexo celulolítico destacam-se três enzimas: endoglicanases, que clivam randomicamente o polímero de celulose, alterando rapidamente o grau de polimerização da celulose, as celobiohidrolases, que hidrolisam o polímero nos terminais não redutores, liberando celobiose e as celobiasas (β -glicosidase) que são responsáveis pela clivagem de pequenas cadeias de celooligossacarídeos e celobiose a glicose, permitindo a esse monossacarídeo ser utilizado nas vias metabólicas dos microrganismos (Lee *et al.*, 1997; Buckeridge, 2008).

As celulasas e hemicelulasas são enzimas comercializadas em grande volume devido as suas inúmeras aplicações nas indústrias de detergente, tratamento de resíduos agroindustriais e na hidrólise de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis para a produção de etanol celulósico (Aristidou e Penttilä, 2000; Bhat, 2000; Cao e Tan, 2002), produção de ração animal, extração e clarificação de suco de frutas e vegetais, indústria de papel e indústria têxtil (Ögel *et al.*, 2001), síntese de oligômeros (Heigtman e Vasella, 1999) e liberação dos aromas do vinho (Spagna *et al.*, 1998; Bhat, 2000), aplicado na produção de combustíveis gasosos e solventes (Kuhad e Singh, 1999).

O elevado preço, a baixa estabilidade das enzimas e a inibição pelo produto formado são os maiores problemas para aplicação industrial dessas enzimas (Kang *et al.*, 2004). Atualmente, existe crescente busca na utilização dos resíduos agroindustriais, devido à incessante demanda das atividades agrícolas, que incrementam o acúmulo de resíduos, o que pode gerar a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. Diversos processos estão em desenvolvimento para a utilização desses materiais, transformando-os em compostos químicos e bioquímicos, como o etanol, enzimas, ácidos orgânicos e aminoácidos (Pandey, *et al.*, 2000; Pandey, 2003; Singhania *et al.*, 2009). Esses resíduos agroindustriais podem ser uma alternativa como fontes de carbono comerciais para a produção de enzimas que pode contribuir na redução de problemas ambientais (Adsul *et al.*, 2004; Bon *et al.*, 2008). Dessa forma, a prospecção de microrganismos com potencial para a produção dessas enzimas, utilizando resíduos agroindustriais como substrato consiste numa alternativa promissora, principalmente num país como o Brasil, com expressiva produção agrícola e elevada Biodiversidade.

O objetivo desse trabalho foi bioprospectar, em diferentes ambientes naturais, microrganismos produtores de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas com o uso de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como principal fonte de carbono.

MATERIAIS E MÉTODOS

Substratos

Os substratos utilizados foram o bagaço de cana-de-açúcar, resíduo da produção de etanol, proveniente da Usina São Fernando S.A. e o farelo de trigo oriundo da

Farinheira Moinho Catarinense, ambas as empresas localizadas no município de Dourados-MS.

Isolamento de microrganismos (*screening*)

As amostras de material orgânico coletadas na região de Dourados-MS foram diluídas em solução salina de cloreto de sódio (9 g/L) e inoculadas em placas de Petri contendo meio a base de bagaço de cana-de-açúcar. O meio foi autoclavado, plaqueado e posteriormente procedeu-se à inoculação dos microrganismos, em duplicata, as placas foram mantidas a temperatura de 30 °C e 45 °C, com verificação do crescimento microbiano e retirada das colônias com morfotipos diferentes a cada 24 h, durante 7 dias. As colônias foram transferidas de acordo com as características dos microrganismos em meio PDA (*potato dextrose agar*) ou PCA (*plate counter agar*).

Manutenção dos microrganismos

Para a manutenção das linhagens isoladas foram utilizados três métodos de conservação de cultura: meio de cultivo PDA e PCA inclinados e imersos em óleo mineral, meio contendo leite desnatado e suspensão microbiana liofilizada (CEFAR, 2008).

Plaqueamento dos isolados em meio de cultivo com carboximetilcelulose

Os microrganismos isolados em meio seletivo composto por bagaço de cana-de-açúcar foram testados quanto a sua capacidade de crescer em meio contendo carboximetilcelulose como única fonte de carbono (Hankin e Anagnostakis, 1975). O crescimento radial foi aferido, sendo analisado da seguinte forma: ausente: 0 cm; crescimento 1: de 0,1 a 1,0 cm; crescimento 2: de 1,1 a 2,0 cm; crescimento 3: de 2,1 a 3,0 cm; crescimento 4: de 3,1 a 4,0 cm; crescimento 5: de 4,1 a 5,0 cm.

Fermentação estado sólido para produção de enzima

Preparo do inóculo

Os microrganismos foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 20 ml do meio ágar inclinado, PDA (para fungos) e PCA (para bactéria), mantidos por 48 horas à 30 °C e 45 °C. Os microrganismos foram suspensos em 25 ml de solução salina (0,1 % de sulfato de amônia, 0,1 % de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1 % de nitrato de amônia) devidamente esterilizada. A inoculação dos microrganismos no substrato se deu pela transferência de 10 ml dessa suspensão microbiana para os frascos Erlenmeyer contendo os meios fermentativos previamente preparados (Leite *et al.*, 2007).

Processo fermentativo

Os substratos de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar foram lavados com água destilada e posteriormente secos em estufa a 50 °C por 48 horas.

A fermentação se deu em frascos Erlenmeyer de 250 ml com 5 g de substrato separado e umedecido com 5 ml de solução salina (descrita anteriormente). O material foi autoclavado a 121 °C durante 20 minutos. Após a inoculação dos microrganismos, a fermentação ocorreu à 30 °C e 45 °C (de acordo com os microrganismos selecionados) durante 120 horas.

Extração enzimática aquosa

Para a extração da enzima foram adicionados 50 ml de água destilada nos frascos Erlenmeyer fermentados, a cultura foi colocada em agitador orbital por 1 hora a 60 rpm. Posteriormente filtrados em filtros sintéticos, obtendo assim o extrato enzimático bruto, para determinação das atividades (Leite *et al.*, 2007).

Atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada com 50 μ L do filtrado enzimático, 250 μ L de tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 e 250 μ L de 4-nitrofenol β -glicopiranosídeo 4 μ M, reagindo por 10 minutos à 50 °C. A reação enzimática foi paralisada com 2 ml de carbonato de sódio 2 M. O produto formado foi quantificado por espectrofotometria, no comprimento de onda de 410 nm (Leite *et al.*, 2007). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de nitrofenol por minuto de reação.

Atividade de xilanase e CMCase

A atividade de xilanase foi determinada com 0,1 ml do filtrado enzimático, 0,9 ml de tampão acetato 0,2 M, pH 5,0 e 0,5 % de xilana, reagindo por 10 minutos à 50 °C. A reação enzimática foi paralisada em banho de gelo. A atividade de CMCase foi determinada com 0,1 ml do filtrado enzimático, 0,9 ml de tampão acetato 0,2 M, pH 5,0 e 1 % de CMC, reagindo por 10 minutos a uma temperatura de 50 °C, a reação enzimática foi paralisada em banho de gelo.

As atividades de xilanase e CMCase foram medidas através da quantidade de açúcar redutor presente no final da reação enzimática, quantificado pelo método de DNS (Miller, 1959).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol dos respectivos produtos por minuto de reação.

Identificação do isolado 11

Devido à expressiva produção enzimática, o fungo filamentoso previamente enumerado foi encaminhado para especialistas em taxonomia microbiana. A identificação do microrganismo foi realizada de acordo com a seguinte sequência experimental: plaqueamento do microrganismo, extração do DNA, amplificação por PCR, purificação da reação e sequenciamento de 3 colônias diferentes, efetuado pela empresa *Genotyping* Biotecnologia, Botucatu-SP.

Determinação da temperatura ótima de crescimento

O isolado 11 foi analisado de acordo com crescimento radial (cm) em placa de Petri com PDA entre 25 a 45 °C durante 6 dias (Aguiar Filho, 2009).

Determinação da temperatura ótima para a produção de enzima

A temperatura ótima para produção das enzimas foi obtida pelo cultivo do isolado 11 em diferentes temperaturas, entre 25 a 45 °C. Nessa etapa, o tempo de fermentação foi fixado em 40 horas.

Produção enzimática em função do tempo de fermentação

O perfil de produção enzimática do isolado 11 em função do tempo de fermentação foi obtido pela retirada de amostras de 24 em 24 horas, perfazendo um total de 168 horas. Além das atividades enzimáticas foi analisado a variação do pH durante o processo fermentativo. Para a avaliação dos parâmetros fermentativos foram utilizados os substratos bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número reduzido de microrganismos descritos na literatura com elevada produção de celulases e hemicelulases motivaram o isolamento e a seleção de microrganismos a partir de amostras ambientais. Neste trabalho foi desenvolvido um meio de cultura seletivo constituído por bagaço de cana-de-açúcar, tendo em vista que, os meios comerciais são onerosos e geralmente possuem baixa seletividade.

O meio de cultivo a base de bagaço de cana-de-açúcar permitiu o isolamento de 36 microrganismos oriundos de 33 amostras (Figura 1 A). Os microrganismos foram isolados de diferentes ambientes e cultivados nas temperaturas de 30 °C e 45 °C,

numerados de acordo com as características apresentadas, local de coleta e morfotipo. De acordo com os morfotipos, os microrganismos foram separados em fungos leveduriformes (8), fungos filamentosos (27) e bactéria (1), mostrados na [Tabela 1](#). A [Tabela 2](#) mostra o crescimento dos microrganismos em meios com ágar composto por bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e por CMC. O crescimento de todos os microrganismos em meio composto de CMC, confirma o potencial do meio de cultura seletivo desenvolvido no presente trabalho como uma estratégia mais barata para o isolamento de microrganismos celulolíticos e hemicelulolíticos ([Figura 1 B e C](#)).

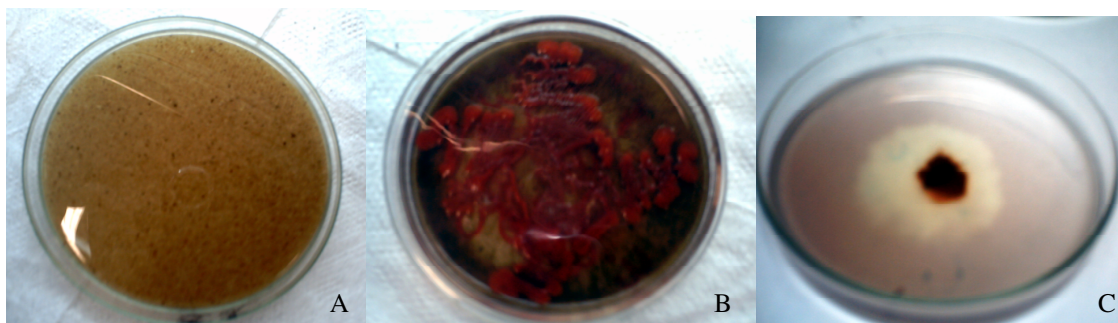


Figura 1. A: Meio de cultura seletivo a base de bagaço de cana-de-açúcar. B: Crescimento de microrganismos em meio a base de bagaço de cana-de-açúcar. C: Crescimento de microrganismos em meio CMC.

Tabela 1. Seleção de microrganismos em diferentes amostras e temperaturas.

Isolado	Local de coleta	Temperatura	Microrganismo
3	Compostagem de folha	30 °C	Fungo filamentoso
4	Solo horta	45 °C	Fungo filamentoso
5	Cama de frango	30 °C	Fungo filamentoso
6	Solo horta	45 °C	Fungo filamentoso
7	Bagaço de cana-de-açúcar	30 °C	Bactéria
8	Bagaço de cana-de-açúcar	30 °C	Fungo filamentoso
9	Vinhaça	30 °C	Fungo leveduriforme
10	Bagaço de cana-de-açúcar	30 °C	Fungo filamentoso
11	Bagaço de cana-de-açúcar	30 °C	Fungo filamentoso
12	Compostagem de folha	30 °C	Fungo filamentoso
14	Cama de frango	30 °C	Fungo filamentoso
15	Compostagem de folha	30 °C	Fungo filamentoso
20	Vinhaça	45 °C	Fungo leveduriforme
23	Vinhaça	30 °C	Fungo leveduriforme
24	Cama de frango	30 °C	Fungo filamentoso
50	Cama de frango	30 °C	Fungo filamentoso
60	Vinhaça	45 °C	Fungo leveduriforme
61	Vinhaça	45 °C	Fungo leveduriforme
62	Vinhaça	45 °C	Fungo leveduriforme
63	Vinhaça	45 °C	Fungo leveduriforme
69	Erva mate	30 °C	Fungo filamentoso
70	Pó-de-serra	45 °C	Fungo filamentoso
71	Pó-de-serra	45 °C	Fungo filamentoso
72	Pó-de-serra	45 °C	Fungo filamentoso
73	Bagaço de cana-de-açúcar	45 °C	Fungo filamentoso
86	Pó-de-serra	45 °C	Fungo filamentoso
87	Pó-de-serra	45 °C	Fungo filamentoso
89	Erva mate	30 °C	Fungo filamentoso
90	Vinhaça	45 °C	Fungo leveduriforme
91	Erva mate	30 °C	Fungo filamentoso
94	Solo da Horta	30 °C	Fungo filamentoso
95	Pó-de-serra	30 °C	Fungo filamentoso
96	Pó-de-serra	45 °C	Fungo filamentoso
97	Pó-de-serra	30 °C	Fungo filamentoso
98	Pó-de-serra	30 °C	Fungo filamentoso
99	Erva mate	45 °C	Fungo filamentoso

O crescimento radial dos microrganismos isolados em meio com bagaço de cana-de-açúcar e CMC corrobora com os resultados das atividades enzimáticas desses microrganismos, onde os melhores crescimentos radiais estão relacionados aos microrganismos que se destacaram na produção de pelo menos uma das enzimas testadas (Tabela 2 e 3). Os microrganismos que apresentaram maior produção de β -glicosidase foram os isolados 3, 4, 11, 15, 96 e 97, na produção de xilanase foram os

isolados 3, 4, 15, 96 e 97 e na produção de CMCase foram os isolados 4, 96 e 97 (Tabela 3), esses microrganismos também foram os que apresentaram maior crescimento radial (Tabela 2), o que confirma a seletividade do meio a base de bagaço de cana-de-açúcar, utilizado nas etapas iniciais do isolamento microbiano.

Tabela 2. Crescimento radial (cm) de microrganismos lignocelulósicos relacionados à produção de enzimas em meio com bagaço de cana de açúcar (BCA) e carboximetilcelulose (CMC).

Microrganismo	Crescimento radial		Microrganismo	Crescimento radial	
	Isolado	BCA		CMC	Isolado
3	4	1	62	1	1
4	4	3	63	1	1
5	2	2	69	1	2
6	2	1	70	2	2
7	2	2	71	2	2
8	1	2	72	1	2
9	1	1	73	2	2
10	3	2	86	3	2
11	5	2	87	1	1
12	3	2	89	1	2
14	2	2	90	1	1
15	4	3	91	1	1
20	2	2	94	2	3
23	2	2	95	3	3
24	2	2	96	4	4
50	2	2	97	5	4
60	1	1	98	4	4
61	2	1	99	2	1

Note: crescimento radial a partir do ponto central de inoculação (cm): ausência de crescimento = 0 cm; crescimento 1 = 0,1 a 1 cm; crescimento 2 = 1,1 a 2 cm; crescimento 3 = 2,1 a 3 cm; crescimento 4 = 3,1 a 4 cm; crescimento 5 = 4,1 a 5 cm.

Tabela 3. Atividade enzimática de β -glicosidase, xilanase e CMCase em diferentes microrganismos e substratos.

Microrganismos	Farelo de trigo (U/ml)			Bagaço de cana-de-açúcar (U/ml)			
	Isolado	β -glicosidase	xilanase	CMCase	β -glicosidase	xilanase	CMCase
3		6,24	1,01	0,89	0,18	0,51	0,64
4		5,96	1,40	1,40	0,06	0,62	0,58
5		0,05	0,81	0,92	0,01	0,97	0,57
6		1,74	0,17	0,67	0,05	0,63	0,51
7		0,01	0,54	0,54	0,02	0,47	0,50
8		0,02	0,56	0,47	0,01	0,53	0,45
9		0,01	0,44	0,58	0,01	0,44	0,44
10		0,09	0,48	0,48	0,01	0,61	0,52
11		15,58	2,41	2,13	0,28	0,48	0,46
12		4,54	0,78	0,90	0,04	0,68	0,46
14		0,10	1,10	0,94	0,03	0,71	0,55
15		5,55	1,35	1,03	0,02	0,48	0,54
20		0,02	0,52	0,53	0,01	0,46	0,45
23		0,02	0,61	0,57	0,01	0,53	0,44
24		0,04	1,59	0,52	0,01	0,83	0,53
50		0,04	1,23	0,44	0,02	1,16	0,44
60		0,02	0,50	0,56	0,01	0,46	0,45
61		0,01	0,54	0,56	0,01	0,48	0,41
62		0,01	0,53	0,55	0,01	0,50	0,51
63		0,01	0,56	0,57	0,01	0,49	0,48
69		0,06	0,67	0,45	0,02	0,54	0,44
70		0,02	2,31	0,93	0,01	1,20	0,77
71		1,68	1,07	0,96	0,01	0,44	0,92
72		0,04	1,50	1,61	0,02	0,88	1,65
73		0,09	0,46	0,53	0,01	0,48	0,70
86		3,95	1,34	1,11	0,03	0,63	0,66
87		0,02	1,40	0,53	0,01	1,37	0,51
89		0,30	0,62	0,91	0,03	0,48	0,51
90		0,01	0,54	0,50	0,01	0,52	0,45
91		0,05	1,22	0,47	0,03	0,65	0,48
94		0,08	0,68	0,74	0,02	0,57	0,55
95		0,08	0,96	0,65	0,02	0,57	0,61
96		6,77	1,68	1,33	0,04	1,81	0,65
97		2,76	2,68	0,74	0,01	1,06	0,65
98		0,28	0,58	0,68	0,04	0,49	0,62
99		0,02	1,11	0,55	0,01	0,66	0,52

A baixa atividade de β -glicosidase, xilanase e CMCase foram observadas no cultivo em bagaço de cana-de-açúcar quando comparado com a produção apresentada em farelo de trigo, os resultados seguintes são referentes ao cultivo em farelo de trigo em estado sólido de fermentação, o isolado 11 apresentou produção de 15,58 U/ml β -

glicosidase, os isolados 96 (6,77 U/ml), 3 (6,24 U/ml), 4 (5,96 U/ml) e 15 (5,55 U/ml) apresentaram as maiores concentrações dessa enzima. A atividade enzimática de xilanase se destacou nos isolados 97 (2,68 U/ml), 70 (2,31 U/ml) e 96 (1,68 U/ml). A atividade enzimática de CMCase foi maior no isolado 4 (1,4 U/ml) e o isolado 72 (1,61 U/ml).

As diferenças apresentadas entre o substrato de farelo de trigo em relação ao substrato de bagaço de cana-de-açúcar utilizados na produção enzimática em fermentação estado sólido foram também evidenciados por [Palma-Fernandez \(2002\)](#), [Leite et al. \(2007\)](#) e [Alves-Prado et al. \(2009\)](#). Segundo [Días et al. \(2003\)](#) o farelo de trigo possui maior quantidade de macro e micronutrientes disponíveis comparado com os demais resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, palha de trigo e farelo de arroz. O farelo de trigo consiste de um meio complexo rico em proteínas, carboidratos, minerais, lipídeos e vitaminas, sendo de fácil assimilação pelos microrganismos ([Haque et al., 2002](#)).

A utilização de resíduos agroindustriais, como o farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar, no processo de fermentação em estado sólido para obtenção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, pode ser uma alternativa para amenizar os problemas ambientais que esses resíduos ocasionam e ainda com a possibilidade de agregação de valor ([Pandey et al., 2000](#); [Pandey, 2003](#); [Singhania et al., 2009](#)). Segundo [Singhania et al. \(2009\)](#), a fermentação em estado sólido é um processo simples que requer baixo consumo de energia e de capital de investimento. Entretanto, fornece elevada produtividade. Nesse trabalho foi evidenciada a eficácia no processo de isolamento microbiano e na produção de enzimas, a partir do bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, além de possibilitar a redução do custo de produção e o impacto ambiental que os resíduos ambientais causam.

Embora tenha sido evidenciada a presença de CMCase e xilanases nos extratos enzimáticos dos microrganismos isolados, a produção dessas enzimas não foi expressiva quando comparada com alguns microrganismos descritos na literatura ([Tabela 4](#)).

Tabela 4. Microrganismos produtores de CMCase e xilanase.

Microrganismos produtores de CMCase			
Microrganismo	Substrato	Produção U/ml	Autor(es)
Isolado 04	Farelo de trigo	1,40	Este trabalho
<i>Lichtheimia ramosa</i>	Farelo de trigo	2,13	Este trabalho
Isolado 96	Farelo de trigo	1,33	Este trabalho
Isolado 72	Farelo de trigo	1,61	Este trabalho
Isolado 72	Bagaço de cana-de-açúcar	1,65	Este trabalho
<i>Trichoderma harzianum</i>	Farelo de trigo	1,64	Ruegger e Tauk-Tornisielo, 2004
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	0,08	Menezes <i>et al.</i> , 2009
<i>Chaetomium erraticum</i>	Farelo de trigo	0,04	Soni e Soni, 2010
<i>Chaetomium erraticum</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	1,25	Soni e Soni, 2010
<i>Rhizopus oryzae</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	1,80	Karmakar e Ray, 2010
<i>Lysinibacillus sp.</i>	Farelo de trigo	0,43	Alves-Prado <i>et al.</i> , 2009
<i>Lysinibacillus sp.</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	0,62	Alves-Prado <i>et al.</i> , 2009
<i>Trichoderma harzianum</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	0,03	Mendoza, 2009
<i>Streptomyces sp.</i>	Celulose cristalina	11,8	Alani <i>et al.</i> , 2007
<i>Neosartoryas spinosa</i>	Farelo de trigo	0,11	Alves-Prado <i>et al.</i> , 2009
<i>Neosartoryas spinosa</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	0,05	Alves-Prado <i>et al.</i> , 2009
Microrganismos produtores de xilanase			
Microrganismo	Substrato	Produção U/ml	Autor(es)
Isolado 04	Farelo de trigo	1,40	Este trabalho
<i>Lichtheimia ramosa</i>	Farelo de trigo	2,41	Este trabalho
Isolado 96	Farelo de trigo	1,68	Este trabalho
Isolado 70	Farelo de trigo	2,31	Este trabalho
Isolado 96	Bagaço de cana-de-açúcar	1,81	Este trabalho
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Farelo de trigo	20,43	Betini, 2006
<i>Pleurotus tailandia</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	0,11	Menezes <i>et al.</i> , 2009
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	0,11	Menezes <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	Farelo de trigo	1,59	Johnson <i>et al.</i> , 1988
<i>Streptomyces C-248</i>	Farelo de trigo	4,48	Johnson <i>et al.</i> , 1988
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Farelo de milho	130	Oliveira <i>et al.</i> , 2010
<i>Streptomyces C-254</i>	Farelo de trigo	6,44	Johnson <i>et al.</i> , 1998
<i>Aspergillus sidowii</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	0,56	Gosh <i>et al.</i> , 1993
<i>Aspergillus sidowii</i>	Farelo de trigo	1,10	Gosh <i>et al.</i> , 1993
<i>Trichoderma harzianum</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	0,06	Mendoza, 2009
<i>Lysinibacillus sp.</i>	Farelo de trigo	5,40	Alves-Prado <i>et al.</i> , 2009
<i>Lysinibacillus sp.</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	1,60	Alves-Prado <i>et al.</i> , 2009
<i>Neosartoryas spinosa</i>	Farelo de trigo	2,10	Alves-Prado <i>et al.</i> , 2009
<i>Neosartoryas spinosa</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	0,50	Alves-Prado <i>et al.</i> , 2009

A Tabela 5 mostra os microrganismos produtores de β -glicosidase, o *Lichtheimia ramosa* em substrato de farelo de trigo apresentou produção de β -glicosidase de 15,58 U/ml. O que torna esse microrganismo um dos maiores produtores de β -glicosidase já

reportados na literatura. [Leite et al. \(2008\)](#) cultivaram *Aureobasidium pulluans* durante 120 horas em farelo de trigo e obtiveram 1,3 U/ml de β -glicosidase, enquanto [Wen \(2005\)](#) cultivou *Trichoderma reesei* em estrume bovino e obteve 0,09 U/ml de β -glicosidase.

Tabela 5. Microrganismos produtores de β -glicosidase.

Microrganismos produtores de β -glicosidase			
Microrganismo	Substrato	Produção U/ml	Autor(es)
Isolado 3	Farelo de trigo	6,24	Este trabalho
Isolado 4	Farelo de trigo	5,96	Este trabalho
<i>Lichtheimia ramosa</i>	Farelo de trigo	15,58	Este trabalho
Isolado 96	Farelo de trigo	6,77	Este trabalho
<i>Chaetomium globosum</i>	Fibras de palma deslignificadas	9,8	Umikalsan et al., 1997.
<i>Sporotrichum thermophile</i>	Resíduos de grama	0,47	Latif et al., 1995.
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30	Lactose	0,31	Santos et al., 2009.
<i>Aspergillus Níger</i>	Farelo de trigo	2,84	Sukumaran et al., 2008.
<i>Trichoderma reesei</i>	Farelo de trigo	0,22	Sukumaran et al., 2008.
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Farelo de trigo	7,0	Leite et al., 2008.

A expressiva produção de β -glicosidase apresentado pelo fungo *L. ramosa* estimulou o estudo detalhado da influência da temperatura sobre o crescimento e produção enzimática desse microrganismo. A [Figura 2](#) ilustra diferentes cinéticas de crescimento em temperaturas variando de 25 °C a 45 °C em ágar PDA. Sendo a 35 °C melhor temperatura para o crescimento, definida em função do maior crescimento radial (5 cm) a partir do centro de inoculação, no menor intervalo de tempo depois de inoculado (40 horas). Os resultados obtidos confirmam a mesofilia do microrganismo descrita pelos taxonomistas. Segundo [Pitt e Hocking \(2009\)](#) os microrganismos pertencentes à classe dos Zygomycetes possuem significativa incorporação de biomassa e rápida produção de esporos permitindo eficiência na produção de bioprodutos.

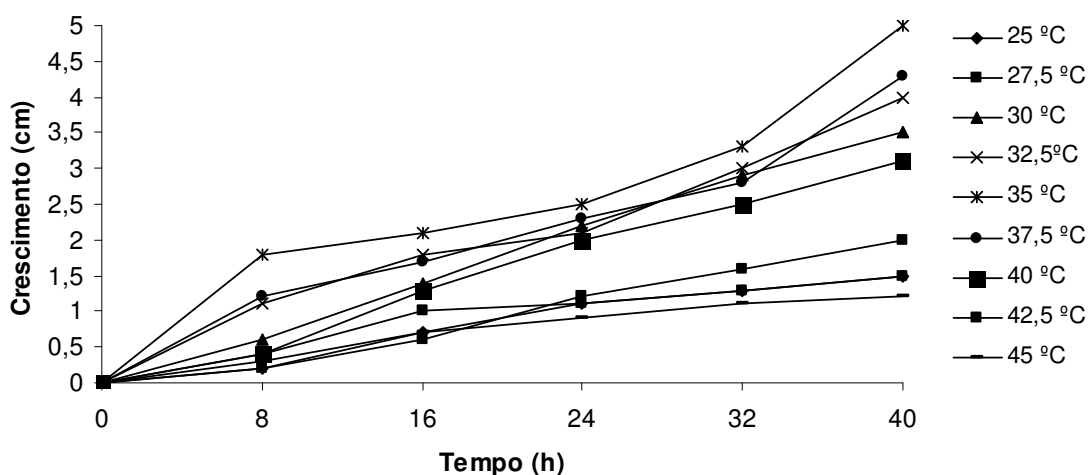


Figura 2. Cinética de crescimento radial de *L. ramosa* em diferentes temperaturas de cultivo em ágar PDA.

Embora o crescimento máximo do fungo *L. ramosa* ter sido obtido a 35 °C, a temperatura ótima para a produção de β -glicosidase em fermentação estado sólido pode não ser a mesma de crescimento. Como reportado por [Ryu e Mandels \(1980\)](#) cultivando *T. reesei* a temperatura ótima de crescimento foi entre 32 °C e 35 °C, enquanto que a temperatura ótima para produção de celulasas foi entre 25 °C e 28 °C.

Para avaliar o perfil de produção de enzima em função da temperatura e tempo de cultivo, o microrganismo foi cultivado tanto em farelo de trigo como em bagaço de cana-de-açúcar, entretanto, não são apresentados os resultados obtidos em cultivo em bagaço de cana-de-açúcar por apresentarem valores inexpressivos.

A avaliação do perfil de produção de enzima em função da temperatura, o microrganismo foi cultivado, entre 25 °C a 45 °C, com tempo de fermentação fixado em 120 horas.

A temperatura ótima para a produção de β -glicosidase foi obtida a 35 °C com a produção de 16,27 U/ml ([Figura 3](#)). A maior produção de xilanase por *L. ramosa* foi obtida a 35 °C, com produção de 2,54 U/ml ([Figura 3](#)). Resultados obtidos por [Da-Silva et al. \(2005\)](#), na produção de xilanase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* foi de 64 U/ml em cultivo de farelo de trigo. A maior produção de CMCase pelo fungo *L. ramosa* foi obtida na temperatura de 35 °C, com 2,36 U/ml ([Figura 3](#)). O fungo *T. aurantiacus*

produziu 30 U/ml e 3 U/ml de CMCase em cultivo de farelo de trigo (Da-Silva *et al.*, 2005).

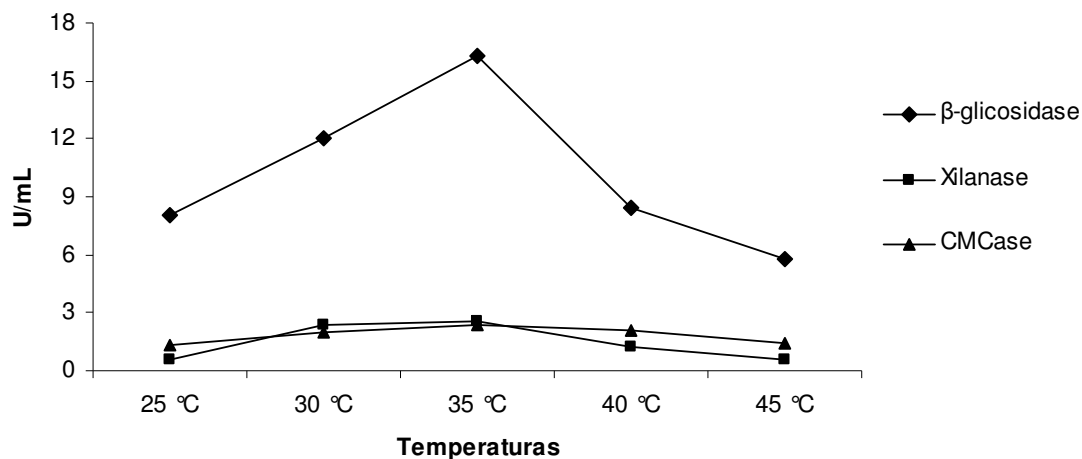


Figura 3. Cinéticas de produção de β-glicosidase, xilanase e CMCase por *L. ramosa* em diferentes temperaturas de cultivo em substrato de farelo de trigo.

A temperatura ótima de crescimento do fungo *L. ramosa* foi semelhante à temperatura ótima de produção das enzimas (35 °C), no entanto, todas as enzimas foram produzidas na ampla faixa de temperatura testada (25 °C à 45 °C), o que reflete a adaptação desse microrganismo às alterações térmicas frequentemente evidenciadas em condições ambientais. Essa característica microbiana é bastante desejável nos processos de fermentação em estado sólido, tendo em vista, a heterogeneidade do meio fermentativo devido à dificuldade de transferência de calor metabólico e à possibilidade da existência de regiões com diferentes temperaturas no mesmo meio fermentativo (Pandey *et al.*, 2000; Pandey, 2003).

Considerando a expressiva produção de β-glicosidase pelo *L. ramosa*, 35 °C, essa temperatura foi escolhida para o estudo da produção enzimática em função do tempo de cultivo. Análises semelhantes foram realizadas em relação à xilanase e CMCase. A maior produção de β-glicosidase foi evidenciada após 120 horas de cultivo, sendo de 17,26 U/ml (Figura 4). Os microrganismos *Aspergillus niger* e *T. reesei* apresentaram produção de 2,84 e 0,22 U/ml de β-glicosidase, respectivamente, em farelo de trigo após 96 horas de cultivo (Sukumaran *et al.*, 2008). Os microrganismos *A. pulluans* e *T. aurantiacus* obtiveram, após 72 horas de cultivo em farelo de trigo, produção de 1,0 e

7,0 U/ml β -glicosidase, respectivamente (Leite *et al.*, 2008). O que confirma a expressiva produção dessa enzima por *L. ramosa* nas condições testadas.

A maior produção de xilanase pelo fungo *L. ramosa* foi obtida após 120 horas de fermentação, apresentando o valor de 2,3 U/ml (Figura 4). Segundo Leite *et al.* (2007) o microrganismo *A. pulluans* apresentou maior produção de xilanase em 96 horas de cultivo (5,0 U/ml) e *T. aurantiacus* em farelo de trigo em relação a outros substratos testados (36 U/ml em 96 horas de fermentação), conforme Oliveira *et al.* (2010).

A produção de CMCase por *L. ramosa* foi obtida após 120 horas de cultivo, cerca de 2,16 U/ml (Figura 4). Sukumaran *et al.* (2008) obtiveram atividades de CMCase de *A. niger* de 6,77 U/ml e *T. reesei* de 14,98 U/ml em farelo de trigo após 96 horas de cultivo.

Como pode ser evidenciado nos resultados descritos, após a alteração de alguns parâmetros fermentativos o microrganismo *L. ramosa* apresentou um pequeno aumento na produção de xilanase e CMCase, no entanto, esta produção é significativamente baixa quando comparada com outros fungos descritos na literatura, confirmando os dados preliminares descritos na Tabela 4.

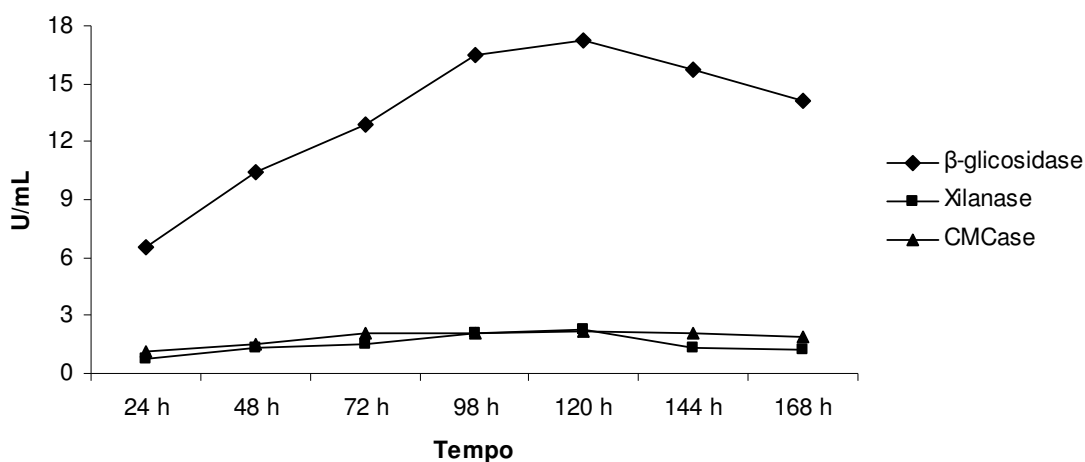


Figura 4. Atividade de β -glicosidase, xilanase e CMCase em função do tempo de fermentação por *L. ramosa* em substrato de farelo de trigo.

Em ambos os substratos foram observados o decréscimo contínuo no valor do pH durante o processo fermentativo, com pH inicial de 5,72 e final de 5,45 em substrato de bagaço de cana-de-açúcar e com pH inicial de 5,60 e final de 4,55 em substrato de farelo de trigo (Figura 5). Segundo Raimbault (1998) a variação do pH é influenciada

pela presença da atividade metabólica do microrganismo, podendo aumentar ou diminuir de acordo com o que é liberado ou consumido.

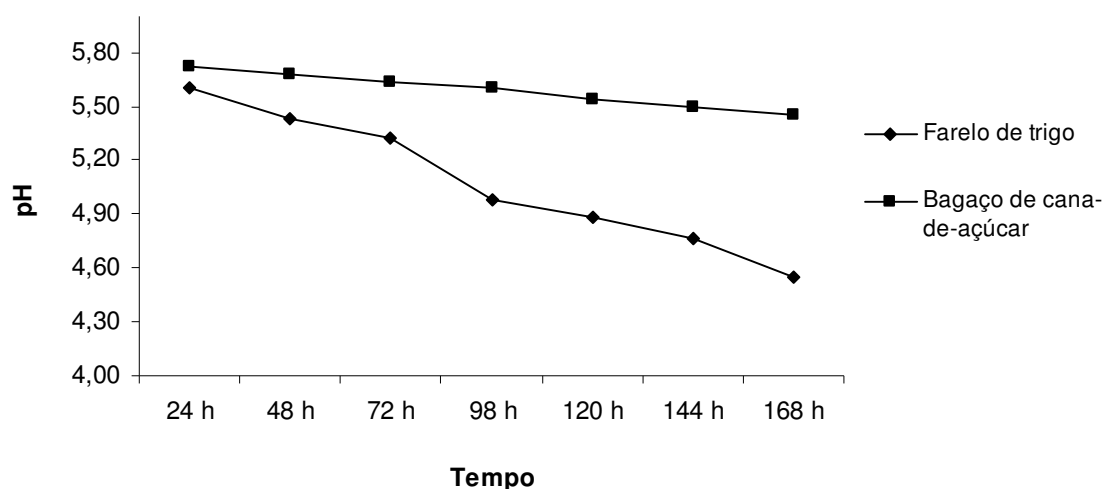


Figura 5. Variação do pH durante o processo fermentativo por *L. ramosa*.

Poucas contribuições científicas são encontradas na literatura, sobre a aplicação biotecnológica do fungo *L. ramosa* principalmente relacionado a produção de enzimas. De acordo com [Zhu et al. \(1989\)](#) a espécie apresenta potencial para a produção de α -galactosidases. Os resultados obtidos nesse trabalho permitem ainda enfatizar a elevada produção de β -glicosidase pelo fungo *L. ramosa*, sendo essa a maior já descrita na literatura científica. Dessa forma, é possível inferir que os estudos de isolamento e cultivo de microrganismos permitem encontrar espécies com potencial para produção enzimática ainda não descrita, isso justifica a continuidade de trabalhos de bioprospecção microbiana, principalmente em regiões pouco exploradas para essa finalidade, como é o caso do Cerrado Sul Matogrossense, como também evidenciado por [Alves-Prado et al. \(2009\)](#), na Região Norte de Mato Grosso do Sul, no isolamento e seleção de microrganismos produtores de xilanase, os autores obtiveram 50 linhagens de bactérias e 15 linhagens de fungos filamentosos, com destaque do fungo *Neosartoryas spinosa* P2D19 e da bactéria *Lysinibacillus* sp. P5B1, sendo o primeiro microrganismo sem relato na literatura da sua produção de xilanase e o segundo microrganismo sendo uma espécie nova.

CONCLUSÃO

Os resíduos agroindustriais além de inúmeras aplicações biotecnológicas, se apresentam como alternativa na formulação de meios seletivos para o isolamento de microrganismos, sendo o meio elaborado eficiente na seleção de microrganismos com potencial de degradação de compostos lignocelulósicos.

O farelo de trigo foi o melhor substrato para o cultivo do fungo *Lichtheimia ramosa* visando a produção de enzimas de degradação da parede celular vegetal, em relação ao farelo de trigo.

Os resultados obtidos demonstram a dificuldade de encontrar microrganismos com expressiva produção de celulases e hemicelulases, onde dos 36 microrganismos isolados a partir de meio seletivo, apenas um microrganismos se destacou na produção de uma das enzimas testadas (β -glicosidase).

O conhecimento da biodiversidade através da bioprospecção microbiana torna possível a obtenção de novas alternativas para solucionar problemas nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria. As técnicas modernas de prospecção de microrganismos como a genômica, proteômica e metabolômica são relevantes, entretanto as técnicas clássicas como utilizadas nesse trabalho também são importantes para a obtenção de novas fontes produtoras de enzimas microbianas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, a FUNDECT e a UFGD pelo fomento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adsul, M.G., Ghule, J.E., Shaikh, H., Singh, R., Bastawde, K.B., Gokhale, D.V., Varma, A.J., 2005. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 6-10.
- Aguiar Filho, J.M.M., 2009. *Análise enzimática de fungos lignocelulósicos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar*. 2009. 80f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Alani, F., Anderson, W.A., Moo-Young, M., 2007. New isolate of *Streptomyces sp.* with novel thermoalkalotolerant cellulases. *Biotechnology Letters*, v. 30 (1), p. 123-126.
- Alves-Prado, H.F., Pavezzi, F.C., Leite, R.S.R., Oliveira, V.M., Sette, L.D., Da-Silva, R., 2009. Screening and production study of microbial xylanase producers from brazilian Cerrado. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 333-346.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 1995. *Official methods of analysis of the AOAC International*. 16th ed. v. 1, Arlington.
- Aristidou, A., Penttilä, M., 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, p. 187-198.
- Bettini, J.H.A., 2006. *Estudos comparativos de xilanases produzidas por três espécies de Aspergillus visando a aplicação no biobranqueamento de polpa de celulose para fabricação de papel*. 2006. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology: review. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 355-383.
- Bon, E.P.S., Gírio, F., Pereira Jr.N., 2008. Enzimas na produção de etanol. In: *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 506 p.
- Buckeridge, M.S., 2008. Rotas para o etanol celulósico em um cenário de mudanças climáticas. *Opiniões*, Ribeirão Preto, jul-set, p. 62-64.
- Cao, Y., Tan, H., 2002. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydrate Research*, v. 337, p. 1291-1296.
- Cefar. 2008. Procedimentos para a conservação de microrganismos. *Informativo CEFAR de microrganismos*, v. 4, p. 1-4.
- Da-Silva, R., Lago, E.S., Merheb, C.W., Macchione, M.M., Park, Y.K., Gomes, E., 2005. Production of xylanase and CMCCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 235-241.
- Dias, E.S., Koshikumo, E.M.S., Schwan, R.F., Silva, R., 2003. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 27, p. 1363-1369.
- Della, P.V., 2005. *Síntese e caracterização do pigmento cerâmico de hematita, obtida a partir de carepa de aço, encapsulada em sílica amorfa obtida a partir de casca de arroz*. 2005. 168f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- Ghosh, M., Das, A., Mishra, A.K., Nanda, G., 1993. *Aspergillus sydowiib* MG 49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 15, p. 703-709.
- Hankin, L., Anagnostakis, S.L., 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, v. 67, p. 597-607.
- Haque, M.A., Shams-Ud-Dim., Haque, A., 2002. The effect of aqueous extracted wheat bran on the baking quality of biscuit. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 37, p. 453-468.
- Heigtman, T.D., Vasella, A.T., 1999. Recent insights into inhibition, structure and mechanism of conjugation retaining glycosidases. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 38, p. 750-770.
- Johnson, K. G.; Harrison, B. A.; Schneider, H.; Mac Kenzie, C. R.; Fontana, J.D., 1988. Xylan-Hydrolysing enzymes from *Streptomyces spp.* *Enzyme Microbiology Technology*, v. 10, p. 403-409.
- Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S., Hong, S.I., Kim, S.W., 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 153-156.
- Karmakar, M., Ray, R.R., 2010. Extra cellular endoglucanase production by *Rhizopus oryzae* in solid and liquid state fermentation of agro wastes. *Asian Journal of Biotechnology*, v. 2 (1), p. 27-36.
- Klass, D.L., 1998. *Biomass for renewable energy, fuels and chemicals*. 1° Ed. San Diego: Academic Press. 651 p.
- Kuhad, R.C., Singh, A., 1999. Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects. *Critical Review in Biotechnology*, v. 13, p. 151-172.
- Latif, F., Rajoka, M.I., Malik, K.A., 1995. Production of cellulases by thermophilic fungi grown on *Leptochloa fusca* straw. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 11 (3), p. 343-348.
- Lee, J., 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, v. 56 (1), p. 1-24.
- Leite, R.S.R., Bocchini, D.A., Martins, E.S., Da-Silva, D., Gomes, E., Da-Silva, R., 2007. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans* on solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 137, p. 281-288.
- Leite, R.S.R., Alves-Prado, H.F., Cabral, H., Pagnocca, F.C., Gomes, E., Da-Silva, R., 2008. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced

- by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, p. 391-395.
- Matulova, M., Nouaille, R., Capek, P., Péan, M., Forano, E., Delort, A.M., 2005. Degradation of wheat straw by *Fibrobacter succinogenes* S85: a liquid- and solid-state nuclear magnetic resonance study. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71 (3), p. 1247-1253.
- Mendoza, D.P.G., 2009. *Variação secretora de Trichoderma harzianum em resposta a diferentes fontes de carbono*. 2009. 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília.
- Menezes, C.R., Silva, I.S., Durrant, L.R., 2009. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. *Estudos Tecnológicos*, v. 5, p. 68-78.
- Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428.
- Ögel, Z.B., Yarangümel, K., Dü, H., Ifrij, I., 2001. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 7, p. 689-695.
- Oliveira, D.S., Meherb-Dini, C., Franco, C.M.L., Gomes, E., Da-Silva, R., 2010. Production of crude xylanase from *Thermoascus Aurantiacus* CBMAI 756 aiming the baking process. *Journal of Food Science*, v. 75 (7), p. 588-594.
- Palma-Fernandez, E.R.D., Gomes, E., Da-Silva, R., 2002. Purification and characterization of two β -glucosidases from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Folia microbiologica*, v. 47 (6), p. 685-690.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D., 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1153-1169.
- Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 81-84.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D., 2009. *Zygomycetes: Fungi and Food Spoilage*, v. 6, p. 145-168.
- Raimbault, M., 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 1 (3), p. 26-27.
- Ruegger, M.J.S., Tauk-Tornisielo, S.M., 2004. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia- Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira Botânica*, v. 27, p. 205-211.
- Ryu, D.D.Y.; Mandels, M. Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 2 (2), p. 291-102, 1980.

- Singhania, R.R., Patelb, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A., 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44 (1), p. 13-18.
- Soni, S.K., Soni, R., 2010. Regulation of cellulase synthesis in *Chaetomium erraticum*. *BioResources*, v. 5 (1), p. 81-98.
- Spagna, G., Barbagallo, R.N., Martino, A., Pifferi, P.G., 1998. A simple methodo for purifying glycosidases: α -L-arabinofuranosidase and β -D-glucopyranosidase from *Aspergillus Níger* to increase the aroma of wine. Part I. *Enzyme and Microbol Tecnology*, v. 22, p. 298-304.
- Szengyel, Z., 2000. *Ethanol from wood: Cellulase enzyme production*. 2000. 61f. Tese (Doutorado) - Lund University, Suécia.
- Sukumaran, R.K., Singhania, R.R., Mathew, G.M., Pandey, A., 2008. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Energy*, p. 1- 4.
- Tuor, U., Winterhalter, K., Fiechter, A., 1995. Enzymes of white-rot-fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology*, v. 41, p. 1-17.
- Umikalsom, M.S., Arif, f A.B., Zulkifli, H.S., Tong, C.C., Hassan, M.A., Karim, M.I.A., 1997. The Treatment of oil palm Empty Fruit Bunch fibre for subsequent use as substrate for cellulase production by *Chaetomium globosum*. *Bioresource Technology*, v. 62 (1-2), p. 1-9.
- Wen, Z., Liao, W., Chen, S., 2005. Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3087-3094.
- Wood, T.M., Garcia-Campayo, V., 1990. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation*, v. 1 (2/3), p. 147-167.
- Zhu, Y.Z.J., Zhu, M., Zhuzheng, Z., 1989. Purification and properties of α -galactosidase from *Absidia ramosa*. *Acta Microbiologica Sínica*, v. 4, p. 359-364.

Este artigo encontra-se de acordo com a norma da revista *Bioresource Technology*. Disponível em: <http://journals.elsevier.com/09608524/bioresource-technology/> [Fevereiro 2011].

CONCLUSÃO GERAL

A utilização da biomassa vegetal, na forma cultivada ou inserida em resíduos agroindustriais e urbanos permite a substituição de fontes energéticas não renováveis por fontes renováveis, como o etanol celulósico, com a vantagem de ser menos poluente, podendo favorecer principalmente, países emergentes como o Brasil, na geração de energia de forma sustentável.

A consolidação em escala industrial da produção do etanol celulósico apresenta como principal gargalo do processo a hidrólise enzimática dos compostos lignocelulósicos, devido ao alto custo das enzimas e dos inibidores gerados nesta etapa. A contribuição do trabalho na produção do etanol celulósico foi o isolamento e a seleção de microrganismos produtores de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, encontrados no ambiente natural e industrial, destacando-se o Isolado 11 identificado como *Lichtheimia ramosa*, pela significativa produção de β -glicosidase em substrato de farelo de trigo, o que permite aumentar a eficiência dos extratos enzimáticos (celobiohidrolases, endoglicanases, β -glicosidase e as hemicelulases) obtidos a partir do cultivo de fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus sp.* e melhorar a hidrólise enzimática.

A produção de β -glicosidase por *L. ramosa* em resíduo agroindustrial representa uma alternativa promissora para suplementar o extrato enzimático produzido pelo *T. reesei*, sua produção requer baixo custo e fornece elevado rendimento em comparação aos microrganismos utilizados.

O estudo também contribuiu com métodos para auxiliar no isolamento de microrganismos produtores de celulasas e hemicelulasas, durante a fase de *screening* destacando-se o meio a base de bagaço de cana-de-açúcar, que proporcionou o isolamento de 36 microrganismos e demonstrou significativo resultado quando comparado ao ágar composto por carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono, o que permite sua utilização como meio de isolamento de microrganismos produtores de celulasas e hemicelulasas.