

PRODUÇÃO DE CELULASES PELO MICRORGANISMO
TERMOFÍLICO *Bacillus* sp SMIA-2

ANDRÉIA BOECHAT DELATORRE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2010

PRODUÇÃO DE CELULASES PELO MICRORGANISMO
TERMOFÍLICO *Bacillus* sp SMIA-2

ANDRÉIA BOECHAT DELATORRE

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof^a. Meire Leis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 013/2010

Delatorre, Andréia Boechat

Produção de celulases pelo microrganismo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2 / Andréia Boechat Delatorre. – 2010.
55 f. : il.

Orientador: Meire Lelis Leal Martins
Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2010.
Bibliografia: f. 49 – 55.

1. *Bacillus* sp 2. Celulase 3. Termofílico I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 660.62

PRODUÇÃO DE CELULASES PELO MICRORGANISMO
TERMOFÍLICO *Bacillus* sp SMIA-2

ANDRÉIA BOECHAT DELATORRE

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 19 de Fevereiro de 2010

Comissão examinadora:

Prof^a. Mara de Menezes de Assis Gomes (Doutora, Biologia Vegetal) – FAETEC

Prof. Fabio da Costa Henry (Doutor, Medicina Veterinária) – UENF

Silvia Menezes de Faria Pereira (Doutora, Engenharia e Ciências dos Materiais) –
UENF

Prof^a. Meire Lelis Leal Martins (Ph.D. Microbiologia) – UENF
(Orientadora)

“No fim tudo dá certo, se ainda não deu certo é porque ainda não chegou ao fim”.

Fernando Sabino

Aos meus pais, *Sebastião e Angela*, por sempre estarem me apoiando, dando tudo de si, além de muito amor e carinho, pois não seria nada e não estaria onde estou sem a presença, esforço e compreensão deles. Amo Vocês!!!!

Ao meu noivo, *Marcio*, que esteve sempre comigo e que às vezes mesmo longe se fazia tão perto, obrigada por existir em minha vida, Te amo!!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por tudo que tenho e sou, pela proteção e por esta sempre ao meu lado, como lâmpada para os meus pés e luz para o meu caminho. Sem ele eu nada seria.

A minha Orientadora, Meire, por ter aceitado me orientar, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação, e, sobretudo por estar presente nos momentos mais difíceis, e principalmente por me acolher quando mais precisei.

Aos membros da banca, Mara e Fábio, por aceitarem fazer parte dessa banca de dissertação de mestrado.

A Silvia, pela preocupação e orientação tanto pessoal quanto profissional, pelo carinho e principalmente pelos momentos de descontração. Obrigada!!!!

As amigas, Caroline e Hellen, que não mediram esforço para me auxiliar em minhas análises. Obrigada pela disposição!!!!

Aos meus amigos de bancada, Luciana Konda, Luciana Coutinho e Natiele, obrigada pela amizade e pelo convívio ao longo desses anos.

Agradeço de forma especial ao João e a Silvania, pela ajuda, pelo carinho e preocupação que tiveram comigo, estando sempre do meu lado nos momentos que mais precisei. Sem vocês eu não teria conseguido. Obrigada pela amizade!

A técnica do laboratório Aninha e Valdinéia, pela colaboração e paciência.

Ao secretário do LTA, Paulo, pelo companheirismo e pela amizade, e por me quebrar muitos galhos e às vezes até mesmo árvores. Obrigada!!!!

Aos demais amigos do LTA, Vanessa, Priscila, Natalia, Shailine, Priscilla, Clara e Cristiano, pelos bons momentos que passamos juntos. Adoro vocês!!!!

Agradeço as sempre meninas do “AP”, Thais, Renata, Jéssica, Natalia e Priscilla, pela acolhida e por estarem sempre por perto, pelo carinho e amizade.

Em especial agradeço as irmãs que escolhi, Rogéria, Alice, Erica e Aline, pela amizade e cumplicidade, pelo carinho e atenção, por estarem comigo em em todos os momentos. Vocês são essenciais!!!!

Agradeço a uma pessoa muito especial, que ao longo desse tempo se tornou minha segunda mãe, Kátia, obrigada por me ouvir, por me acalmar, e por ser sempre prestativa. Adoro Você.

Agradeço a minha irmã, Edilaine, por está sempre disposta a me ajudar e aos meus sobrinhos, João Victor e Marcio Jr, a Dinda ama vocês.

Agradeço em especial a uma pessoa que DEUS colocou em minha vida, meu grande amor Marcio D’êça que não mediu esforços para que este trabalho fosse realizado, que esteve comigo em todos os momentos, principalmente os difíceis, que me consolou quando muita vezes chorei, que me levantou em todas as quedas e que me compreendeu durante todo essa caminhada, é por isso e por muito mais que eu TE AMO. Obrigada por mesmo longe se fazer sempre presente. Você é muito especial.

Aos meus pais, Sebastião e Ângela, que são minha fortaleza, meu orgulho, minha paixão. Agradeço por terem me apoiado em todos os momentos, me incentivando e me encorajando nas dificuldades. Vocês são tudo na minha vida, obrigado pelo alicerce familiar que me deram, isso foi fundamental. Essa conquista só foi possível porque vocês estavam comigo. Amo muito vocês.

E por fim, agradeço a uma pessoa única que passou em minha vida e de quem tenho muitas saudades, minha grande avó, Georgina, que rezou muito para que eu chegasse até o fim desta jornada desafiadora, mais que hoje infelizmente não pôde estar aqui, mais tenho certeza que de onde estiver estará recebendo o muito obrigado, pela pessoa que me ensinou a ser, pelo carinho e dedicação e principalmente pelo exemplo de ser humano que foi A você o meu ETERNO AMOR.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
2.1. Objetivo Geral.....	04
2.2. Objetivos Específicos	04
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
3.1. Produção de biomassa e sua degradação.....	05
3.2. Celulose	07
3.3. Hemicelulose	10
3.4. Lignina.....	11
3.5. Enzimas celulolíticas	11
3.6. Microrganismos termofílicos e suas enzimas.....	16
3.7. Aplicação industrial das celulasas	17
3.8. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Microrganismo	22
4.2. Meio de crescimento	22
4.3. Preparo do pré-inoculo	23

4.4. Crescimento do microrganismo	23
4.5. Ensaio enzimáticos	23
4.5.1. Atividade enzimática da carboximetilcelulase (<i>β-1,4-endoglicanase ou EC 3.2.1.4 endoglicanase</i>).....	23
4.5.2. Atividade enzimática da Avicelase (<i>EC 3.2.1.74</i>) ou <i>EXO β-1,4 GLUCANASE</i>	24
4.5.3. Atividade enzimática da <i>β-glicosidase</i>	24
4.6. Pré-tratamento do bagaço.....	25
4.7. Alterações físicas do bagaço	26
4.8. Determinação dos teores de lignina, celulose e hemicelulose	26
3.8.1. Determinação de fibra em detergente neutro (FDN)	26
4.8.2. Determinação de fibra em detergente ácido (FDA)	27
4.8.3. Determinação de hemicelulose	28
4.8.4. Determinação de lignina	28
4.8.5. Determinação de Celulose	29
3.9. Crescimento e atividade das celulasas em meio de cultura contendo como substrato o bagaço de cana de açúcar submetido a diferentes tratamentos	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Perfil do crescimento e da atividade da avicelase de <i>Bacillus</i> sp SMIA-2	30
5.2. Perfil do crescimento e da atividade da Carboximetilcelulase (CMCCase) de <i>Bacillus</i> sp SMIA-2.....	31
5.3. Perfil do crescimento e da atividade da avicelase, da β -glicosidase e da carboximetilcelulase (CMCase) de <i>Bacillus</i> sp SMIA-2 cultivado no bagaço de cana	32
5.4. Influência de diferentes tratamentos sobre a composição química e estrutura física do bagaço de cana.....	34
5.5. Crescimento e atividade de celulasas secretadas por <i>Bacillus</i> sp SMIA-2 utilizando o bagaço de cana submetido a diferentes tratamentos	38
5. CONCLUSÕES	44
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arranjo típico da parede celular vegetal (Murphy; Mccarthy, 2005).....	06
Figura 2. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica na celulose (adaptado de Sandgren et al., 2005).....	08
Figura 3. Posições de ligações intra e intermoleculares das moléculas de glicose.....	08
Figura 4. Estrutura cristalina da celulose. Representação das pontes de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra). (Adaptado de Radford et al. 1996).....	09
Figura 5. Representação das regiões amorfa e cristalina da fibra de celulose...	10
Figura 6. Representação esquemática da hidrólise de celulose pelo sistema celulolítico. O esquema mostra a região de ação de cada uma das celulasas (adaptado de Lynd et al., 2002).....	13
Figura 7. Esquema simplificado do pré-tratamento da biomassa (Moiser et al., 2005).....	15
Figura 8. Crescimento, teores de açúcares redutores e atividade da avicelase secretada pelo <i>Bacillus</i> sp SMIA-2 cultivado no meio mineral contendo 0,5% de avicel a 50 ^o C.....	30
Figura 9. Teores de glicose e atividade da carboximetilcelulase secretada pelo <i>Bacillus</i> sp SMIA-2 cultivado no meio mineral contendo 0,5% de carboximetilcelulose a 50 ^o C.....	32

Figura 10. Crescimento, teores de glicose e atividade das celulasas secretada pelo <i>Bacillus</i> sp SMIA-2 cultivado no meio mineral contendo 0,5% de bagaço de cana a 50° C.....	33
Figura 11. Estrutura do bagaço de cana de açúcar sem tratamento químico ou físico. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão mostradas em cada figura.....	36
Figura 12. Estrutura do bagaço de cana de açúcar bagaço tratado com hidróxido de cálcio. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão mostradas em cada figura.....	36
Figura 13. Estrutura do bagaço de cana de açúcar bagaço tratado com hidróxido de sódio. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão mostradas em cada figura.....	36
Figura 14. Estrutura do bagaço de cana de açúcar tratado com hidróxido de cálcio e sódio. Os aumentos e barras de comparação de medidas estão mostradas em cada figura.....	37
Figura 15. Crescimento, teores de açúcares redutores e atividade das celulasas secretada pelo <i>Bacillus</i> sp SMIA-2 cultivado no meio mineral contendo 0,5% de bagaço de cana tratado com hidróxido de cálcio.....	39
Figura 16. Crescimento, teores de açúcares redutores e atividade das celulasas secretada pelo <i>Bacillus</i> sp SMIA-2 cultivado no meio mineral contendo 0,5% de bagaço de cana tratado com hidróxido de sódio.....	41
Figura 17. Crescimento, teores de açúcares redutores e atividade das celulasas secretada pelo <i>Bacillus</i> sp SMIA-2 cultivado no meio mineral contendo 0,5% de bagaço de cana tratado com hidróxido de sódio e com hidróxido de cálcio.....	42

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Composição do bagaço de cana de açúcar submetido a diferentes tratamentos.....	35
---	----

LISTA DE ABREVIações

CMCase	Carboximetilcelulase
Ca(OH)₂	Hidróxido de cálcio
DNS	Ácido dinitrosalicílico
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
HCl	Ácido clorídrico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PNPG	p-nitrofenol
TRIS	Ácido tricloroacético

RESUMO

DELATORRE, Andréia Boechat, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro, 2010; Produção de Celulases pelo Microrganismo Termofílico *Bacillus* sp SMIA-2. Professora Orientadora: Meire Lelis Leal Martins, Ph.D. Banca Avaliadora: Mara de Menezes de Assis Gomes, DSc. Fabio da Costa Henry, DSc. Silvia Menezes de Faria Pereira, DSc.

A fabricação de açúcar e álcool gera o resíduo bagaço de cana, que é constituído principalmente de materiais lignocelulósicos, que possui como principais componentes a celulose, hemicelulose e lignina. A abundância de materiais lignocelulósicos, que podem ser utilizados como matéria prima, faz aumentar o interesse na produção de celulases. *Bacillus* sp SMIA-2, usada neste trabalho, foi isolada de solos da região Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro e sua habilidade para secretar proteases, amilases e pectinases foi verificada recentemente. Este trabalho, visando pesquisar novas cepas produtoras de celulases investigou a produção de carboximetilcelulase, avicelase e β -glicosidase por *Bacillus* sp SMIA-2 em culturas submersas contendo como substrato bagaço de cana de açúcar. Além disso, avaliou a influência de diferentes tratamentos químicos alcalinos (NaOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e NaOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sobre a alteração na estrutura física do bagaço e na atividade das celulases. Os resultados mostraram que a ação dos tratamentos químicos em especial aquele em que foi utilizada as bases conjuntamente, promoveu uma perda da estrutura das fibras do bagaço. Em relação a atividade das celulases foi observado que a síntese destas enzimas está associada ao crescimento do microrganismo e que a mesma foi produzida,

quando a cultura estava metabolicamente ativa. A utilização do bagaço de cana tratado com soluções alcalinas mostrou-se mais eficiente na síntese das enzimas do que o bagaço sem tratamento.

ABSTRACT

DELATORRE, Andréia Boechat, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro, 2010; Celulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2. Teacher Advisor: Meire Leis Leal Martins, Ph.D. Banking Appraiser: Mara de Menezes de Assis Gomes, DSc. Fabio da Costa Henry, DSc. Silvia Menezes de Faria Pereira, DSc.

The sugarcane and alcohol production process generate bagasse as a residue, which is mainly composed by lignocellulosic material, containing as main component cellulose, hemicelluloses and lignin. The amount of lignocellulosic wastes that can be used as raw material has increased the interest on cellulases production. *Bacillus* sp. strain SMIA-2, used in this work, was isolated from Brazilian soils of Fluminense North Region of Rio de Janeiro State and its ability to produce proteases, amylases and pectinases have been previously verified. This work, in order to search for new strains producers of cellulases, investigated the carboxymethylcellulase, avicelase and β -glucosidase production by *Bacillus* sp. strain SMIA-2 in submerged cultures containing sugarcane bagasse. In addition, evaluated the effect of different alkaline chemical (NaOH, Ca(OH)_2 e NaOH, Ca(OH)_2 treatments on the physical structure of the sugarcane bagasse fiber. The results showed that the action of the chemical treatments, in special of Ca(OH)_2 and NaOH combined, promoted a loss of structure of fibers. In respect to the cellulases activity was observed that the enzymes synthesis was growth associated and that the enzymes were produced when the culture was metabolic

active. The use of the sugarcane chemically treated with alkaline solutions showed more efficient than the sugarcane bagasse without treatments.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa um lugar de destaque tanto no setor produtivo quanto no aproveitamento dos resíduos de cana de açúcar. Este aproveitamento constitui-se numa prática bastante generalizada, tanto para os efluentes, principalmente a vinhaça, como também para os descartes sólidos, como as tortas de filtro e o bagaço de cana. Esses resíduos se destacam pela abundância em determinadas regiões do país e pelo baixo custo. De acordo com Pereira (2006) cerca de 350 milhões de toneladas de resíduos agrícolas são produzidos anualmente no Brasil, sendo os resíduos provenientes da cana-de-açúcar os que apresentam o maior volume de geração.

A utilização do resíduo de bagaço de cana como substratos para a produção de enzimas é uma alternativa racional, considerando o elevado teor de carboidratos presente nessa biomassa (Cunha *et al.*, 2005; Pandey *et al.*, 2000). O bagaço de cana contém cerca de 25 a 40% de celulose e o restante de hemicelulose (20 a 35%) e lignina (15 a 35%) (Cowling e Kirk, 1976).

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo e pode ser hidrolisada pela enzima denominada celulase a qual se encontra como um complexo multienzimático (Bayer e Lamed 1992). As celulases são enzimas que possuem capacidade de romper as ligações glicosídicas de microfibrilas da celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (Dillon, 2004). A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, se divide em três grandes grupos: as

endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; as exoglucanases, que atuam na região externa da celulose; e as β -glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis à glicose (Lynd *et al.*, 2002).

As celulasas são enzimas amplamente utilizadas em diversos ramos da indústria, como por exemplo: na indústria têxtil e de detergentes, na preparação do malte da cerveja, em processo de extração de sucos, óleos vegetais, pigmentos, alcalóides e amido. Na área de alimentação animal, é comercializada como componentes indutores de silagem e em ração para aves e suínos com a finalidade de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibras de celulose. Na área energética, essas enzimas vêm sendo empregadas em plantas piloto para obtenção de hidrolisado de celulose, que são utilizados na fermentação visando à fabricação de produtos de interesse, tal como etanol (Kubicek *et al.*, 1993). No entanto, o elevado custo de produção de enzima é o principal obstáculo para sua aplicação industrial, pois estima-se que por volta de 30-40% do custo envolvido na produção de proteases esteja relacionada ao meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo. Portanto sua otimização é de grande importância para a redução dos custos de sua produção (Kona *et al.*, 2001; Joo e chang, 2006).

No Brasil, em 2005, as importações de enzimas chegaram a US\$ 31 milhões e as exportações a US\$ 3 milhões, mostrando que o mercado brasileiro é essencialmente importador, indicando desvantagem tecnológica e estratégica em termos de produção e uso das enzimas no país, embora apresente um enorme potencial para produzi-las, por dois motivos em especial: abundância de matéria orgânica (resíduos agrícolas, como palha de arroz, soro de leite, bagaço de cana, entre outros, que constitui substrato de baixo custo para fermentações e a enorme diversidade biológica, ainda pouco explorada, para a descoberta de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial (LADEIRA, 2009).

As enzimas termoestáveis, secretadas por microrganismos termofílicos, apresentam vantagens para a aplicação na indústria, visto que processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm o risco de contaminação por microrganismos mesófilos significativamente reduzidos (Haki e Rakshit, 2003). As temperaturas mais elevadas favorecem a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos (Egorova e

Antranikian, 2005). Adicionalmente, a utilização de temperaturas mais altas faz com que a velocidade da reação seja aumentada, necessitando de uma menor quantidade de enzima, pois um aumento de 10°C na temperatura promove um aumento de aproximadamente duas vezes na velocidade da reação (Zamost et al., 1991).

Estudos estão sendo realizados visando à utilização de enzimas termoestáveis, sintetizadas por microrganismos termófilos, em vários processos industriais. A maioria das bactérias termofílicas investigadas pertencem ao gênero *Bacillus* e foram isoladas de ambientes termofílicos e mesofílicos. (Wang et al., 2007).

Apesar dessas vantagens que as enzimas termofílicas oferecem para o uso rotineiro na indústria, a aplicação biotecnológica de microrganismos termofílicos tem sido muito limitada até agora. As razões para esta contradição são muitas, mas a principal delas está relacionada com o escasso número de linhagens termofílicas para a pesquisa de enzimas termoestáveis específicas, disponíveis em coleções (Aquino, 2000).

Atualmente a escolha de novos microrganismos produtores enzimáticos é talvez o maior obstáculo na comercialização de novas enzimas. Sendo assim, à escolha de linhagens de microrganismos apropriados, a partir de fontes diversificadas e de baixo custo, como os resíduos agroindustriais, podem levar a uma melhor produção enzimática, além de reduzir os custos de produção. Dessa forma, o enfoque principal deste estudo está baseado na produção de celulases pelo microrganismo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 em culturas submersas contendo, como substrato, bagaço de cana de açúcar.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho, na busca por novas cepas produtoras de celulases, investigou a produção destas enzimas pelo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2, quando cultivado em culturas submersas contendo como substrato o bagaço de cana de açúcar.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil do crescimento e da atividade das celulases de *Bacillus* sp SMIA-2 utilizando como substratos a avicel e a carboximetilcelulose;
- Avaliar o perfil do crescimento e da atividade das celulases de *Bacillus* sp SMIA-2 utilizando como substrato o bagaço de cana de açúcar
- Avaliar a influência de diferentes tratamentos químicos sobre a composição química e estrutura física do bagaço de cana.
- Avaliar o crescimento e atividade de celulases secretadas por *Bacillus* sp SMIA-2 utilizando o bagaço de cana submetido a diferentes tratamentos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Produção de biomassa e sua degradação

As plantas através do processo da fotossíntese capturam energia do sol e transformam em energia química. Esta energia pode ser convertida em eletricidade, combustível ou calor. As fontes orgânicas que são usadas para produzir energias usando este processo são chamadas de biomassa (Sandgren *et al.*, 2005). Os combustíveis mais comuns da biomassa são os resíduos agrícolas, madeira e plantas como a cana-de-açúcar, que são colhidos com o objetivo de produzir energia (Zhang, 2006).

A cana de açúcar, cultivada em regiões tropicais e subtropicais, apresenta a propriedade de sintetizar e armazenar quantidade significativa de sacarose em seus tecidos de reserva. Esta planta é composta por duas partes: uma subterrânea (raiz e rizomas) e outra aérea (colmo, folhas e flores). No colmo está presente a fase sólida constituída de celulose, hemicelulose e lignina além da fase líquida constituída de caldo contendo substâncias orgânicas e 90% de sacarose (Nogueira e Venturini Filho, 2005).

No Brasil, em 2008, foram produzidos cerca de 500 milhões de toneladas de cana de açúcar (ÚNICA, 2008) e segundo Burgi (1995) de cada tonelada de cana moída na indústria obtêm-se 700 litros de caldo de cana e 300 Kg de bagaço. Este último é oriundo da moagem do material vegetal e é composto por fibras e resíduos de caldo.

Materiais lignocelulósicos na forma de biomassa de plantas, como o bagaço de cana-de-açúcar, são os mais abundantes complexos orgânicos de carbono e são constituídos de aproximadamente 50% de celulose; 27% de hemicelulose e 23% de lignina como mostrado na Figura 1 (Badhan *et al.*, 2007; Banerjee; Pandey, 2002; Caraschi *et al.*, 1996).

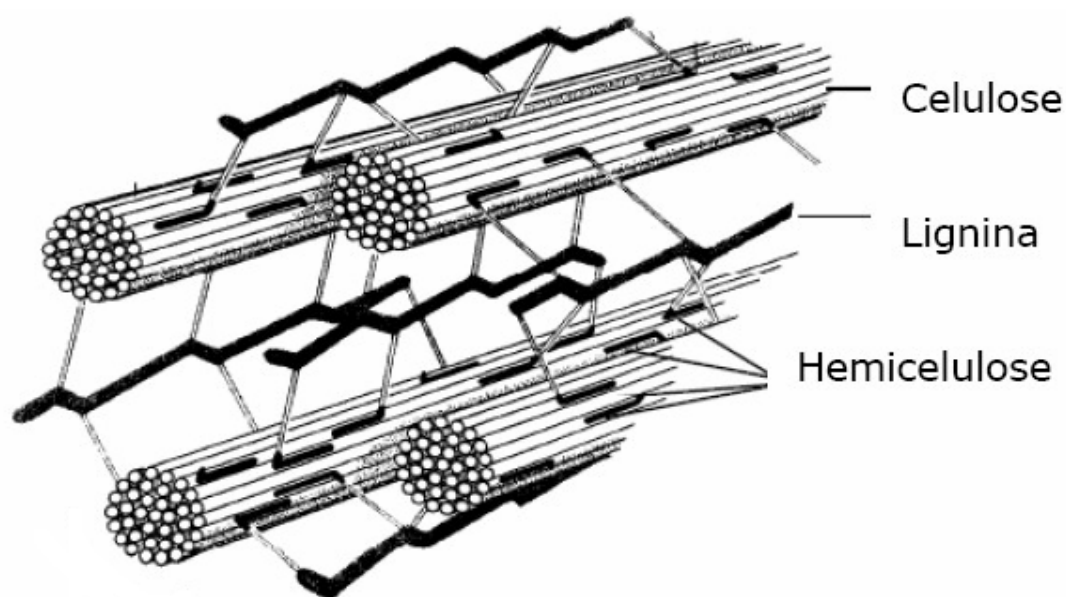


Figura 1. Arranjo típico da parede celular vegetal (Murphy; Mccarthy, 2005).

Na indústria do açúcar e do álcool são gerados aproximadamente 270 kg de bagaço com 50% de umidade por tonelada de cana de açúcar (Baudel *et al.*, 2004). No mundo são produzidos aproximadamente 54 milhões de toneladas de bagaço de cana seco por ano (Liu *et al.*, 2006). Estes resíduos agrícolas representam uma fonte abundante e barata, além de dispor de biomassa lignínica celulósica renovável.

A degradação da lignocelulose, nome dado ao conjunto dos três polímeros, celulose, hemicelulose e lignina, por fungos e bactérias têm um papel importante na biosfera, pois geram mono e oligossacarídeos que servem de fonte de energia para esses e outros seres vivos e, conseqüentemente, reciclam o carbono para a atmosfera e contribuem para o ciclo de carbono no planeta. Existe um grande espectro de microrganismos que degradam biomassa, principalmente celulose,

produzindo diferentes complexos de enzimas, que agem em conjunto. Os microrganismos celulolíticos possuem formas diferentes de degradar a celulose, que ocorrem naturalmente na forma de partículas insolúveis ou associadas a polímeros de hemicelulose e lignina (Lynd *et al.*, 2002).

A celulose é o polímero orgânico mais abundante do planeta, além de ser um polissacarídeo de alto peso molecular constituído de um único tipo de monosacarídeo. A hemicelulose forma uma mistura homogênea de polissacarídeos de baixo peso molecular, que se apresenta em cadeias ramificadas, composta de vários tipos de monossacarídeos (pentoses e hexoses), e está associado com a celulose na planta. A lignina é um polissacarídeo amorfo tridimensional com estruturas complexas que, juntamente com a hemicelulose, confere firmeza e solidez ao conjunto de fibras da celulose, fornecendo à parede celular proteção contra o ataque de microrganismos celulolíticos (Miller, 1959; Sandgren *et al.*, 2005).

3.2. Celulose

A celulose é um dos principais constituintes da biomassa vegetal (cerca de 33% do peso da planta), em combinação com a lignina, com hemicelulose e pectina. Pode ser encontrada na forma pura, como no algodão, ou mais comumente, associada a lignina e hemicelulose na parede celular.

A molécula da celulose é um homopolissacarídeo linear ou fibrosa e não ramificado, e apresenta configuração β , na qual as unidades de glicose estão unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$, que é encontrado tanto em vegetais primitivos quanto em plantas evoluídas. Estes polímeros de β -D-glicose, podem ser representados por uma série de anéis piranosídicos rígidos conectados por um átomo de oxigênio que faz ponte entre dois átomos de carbono. A extremidade da cadeia em que se encontra o resíduo de glicose cujo carbono anomérico não está livre é chamada de extremidade redutora. Já a outra extremidade é conhecida como não redutora (Sandgren *et al.*, 2005), como mostrado na Figura 2.

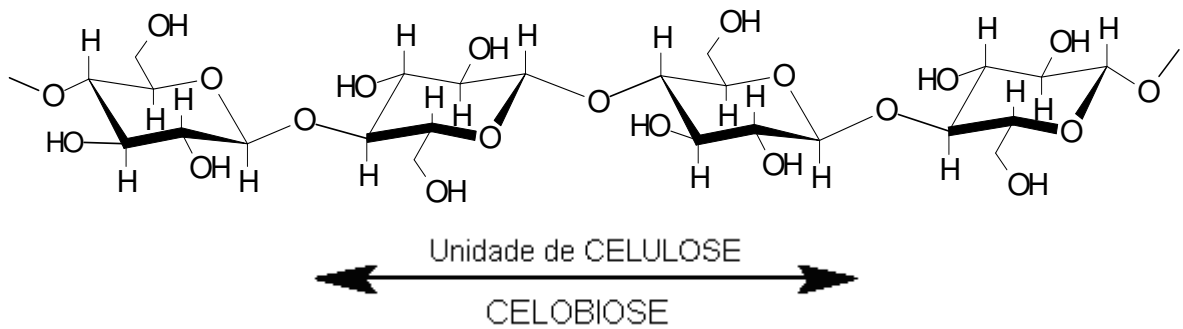


Figura 2. Estrutura da celobiose e da ligação β -glicosídica na celulose (adaptado de Sandgren *et al.*, 2005).

Estas moléculas de celulose tem forte tendência para formar ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, na qual se estabelecem múltiplas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das distintas cadeias juntapostas de glicose, fazendo-as impenetráveis à água e, portanto, insolúveis, originando fibras compactas e que constituem a parede celular dos vegetais como mostra a Figura 3.

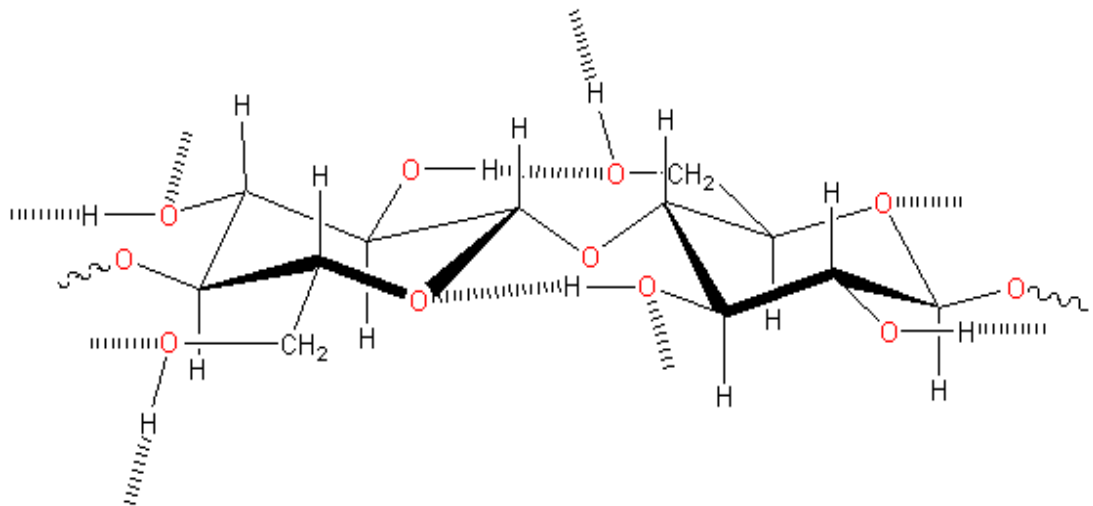


Figura 3: Posições de ligações intra e intermoleculares das moléculas de glicose.

Os grupos hidroxila (OH) são os responsáveis pelo comportamento físico e químico da celulose, sendo capazes de formar dois tipos de pontes de hidrogênio, em função de seu posicionamento na unidade glicosídica. Existem ligações de hidrogênio entre os grupos OH de unidades adjacentes da mesma molécula de celulose (intramoleculares) e ocorrem ligações entre grupos OH de moléculas

adjacentes de celulose (intermoleculares). Os feixes de cadeias moleculares são unidas por pontes de hidrogênio (forças de Van der Waals) como mostrado na Figura 4.

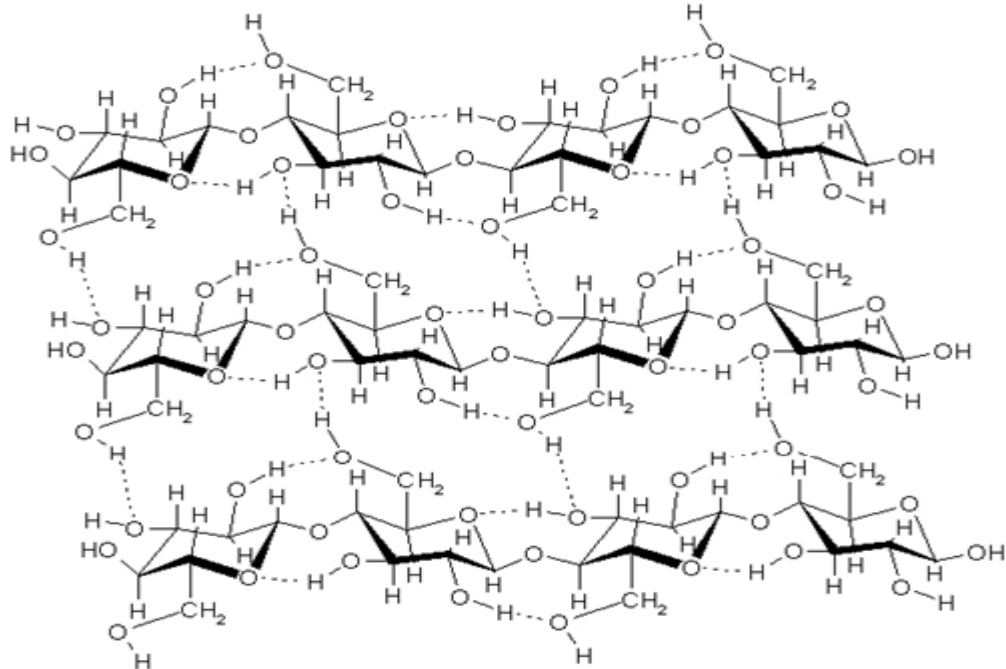


Figura 4. Estrutura cristalina da celulose. Representação das pontes de hidrogênio entre cadeias (inter) e entre resíduos de glicose da mesma cadeia (intra). (Adaptado de Radford *et al.* 1996).

Os feixes de moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas na qual regiões altamente compactada (cristalinas) se alternam com regiões menos ordenadas (amorfas), onde as fibras apresentam maior distância uma das outras (Figura 5). Estas estruturas cristalinas fazem com que as enzimas e até mesmo moléculas pequenas, como a da água, não consigam penetrá-la. Por outro lado, as fibras de celulose apresentam falhas onde são encontrados microporos, que permitem tanto o acesso de moléculas de água, quanto ao ataque enzimático (Lynd *et al.*, 2002).

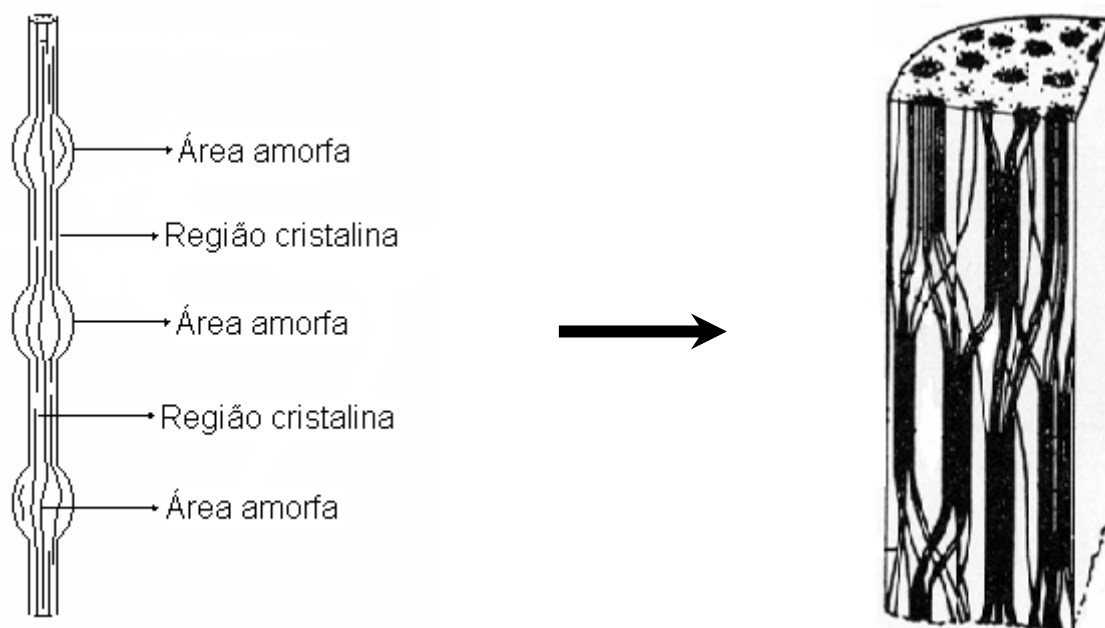


Figura 5. Representação das regiões amorfa e cristalina da fibra de celulose

3.3. Hemicelulose

Em contraste a celulose (polímero formado apenas por glicose), a hemicelulose é um polímero formado por D-xilose, D-galactose, D-glicose, D-manose e L-arabinose (Chandel *et al.*, 2007). As cadeias de hemicelulose podem ser constituídas por uma ou mais unidades de monossacarídeos. A sua natureza química varia, nas plantas, de acordo com o tecido vegetal e com a espécie a que pertence, na madeira, por exemplo, ela participa entre 20 e 30% do total da composição, enquanto que, nas gramíneas, estes valores podem variar de 20 a 40% (Sjostrom, 1992).

A hemicelulose compreende um grupo heterogêneo de polissacarídeos amorfos e de baixo peso molecular em relação à celulose. Sua cadeia é formada por açúcares curtos, linear e altamente ramificados, que se ligam firmemente entre si e as superfícies das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas, via ponte de hidrogênio, em uma rede complexa (Carvalho, *et al.*, 2005). Sua estrutura é mais parecida com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior a lignificação. Sua estrutura de ramificações e cadeias laterais interage facilmente com a celulose dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (Ramos, 2003).

3.4. Lignina

A lignina é um dos constituintes da parede celular de todas as plantas vasculares, ela é um composto heterogêneo, de alto peso molecular e estrutura irregular (Hofrichter, 2002; Onnerud, 2002). Além de ser considerada uma macromolécula constituída de unidades de fenilpropano, apresentando uma conformação tridimensional e amorfa, representando de 20 a 30% do total dos lignocelulósicos. Além de ser um dos biopolímeros mais abundantes da biosfera (Azevedo, 2004).

Embora haja uma estreita associação entre a celulose, hemicelulose e a lignina, estes compostos não estão uniformemente distribuídos na parede celular das plantas. Esta é composta de diferentes camadas, que diferem de acordo com a estrutura e a composição química. Basicamente, a celulose forma um esqueleto que é formado por substâncias estruturais (hemicelulose) e envoltórias (lignina).

A lignina tem a função biológica de fornecer suporte estrutural à parede celular das plantas, pois a parede celular lignificada pode ser vista como um complexo com microfibrilas de celulose e hemicelulose, além de conferir resistência ao material lignocelulósico impedindo os ataques microbianos (Onnerud, 2002; Lee, 2003). Sendo assim a lignina é o principal obstáculo ao ataque enzimática da fibra (Jung, 1996). A lignina é formada por um complexo polímero-fenólico, encontrada como um componente da parede celular e não é facilmente degradada pelas enzimas geralmente encontradas na natureza (Van, 1994).

Contudo, para utilizar estes materiais lignocelulósicos em processos biológicos é necessário deslignificar o material para liberar celulose e hemicelulose, que em seguida despolimeriza os polímeros de carboidrato e libera os açúcares que são utilizados na fermentação (Polonen, 2004). Esta degradação permite que as enzimas hidrolíticas, como as celulases, atuem nessas fontes de carbono.

3.5. Enzimas celulolíticas

A hidrólise da celulose por celulases resulta na produção final de glicose. Estas, porém, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, dessa forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui o principal problema para o

desencadeamento desse processo de degradação (Thiemann *et al.* 1980). Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulasas; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exo-glicosidases e para medir a atividade do complexo celulolítico (Ruegger *et al.*, 2004).

O mecanismo de hidrólise das celulasas produzidas por bactérias é menos conhecido que o de fungos. Toda bactéria celulolítica secreta endoglucanase com propriedades diferentes, a maioria mostra uma pequena atividade na estrutura cristalina da celulose. Embora algumas celulasas de origem bacteriana possuam mecanismo de hidrólise muito similar aquele descrito para as enzimas produzidas por fungos, algumas exoglucanases de origem bacteriana já foram caracterizadas, mas apenas duas foram identificadas como exoglucanases e apenas uma atuou sinergicamente com a endoglucanase na hidrólise da estrutura cristalina da celulose (Beguin, 1990).

De acordo com Lynd (2002), existem mecanismos de controle de síntese e secreção de celulasas. Na maioria dos organismos a produção de celulasas é reprimida em concentrações elevadas da fonte de carbono metabolizado. Além disso, em vários sistemas, a síntese de celulase é induzida por um substrato, como, celobiose, que é gerada da celulose em baixa concentração, compondo a celulase e β -glucosidase associada à atividade da transglucosidase.

Três principais enzimas estão envolvidas na degradação da celulose para glicose: endoglucanase (endo-1,4- β -D-glucanase, EC 3.2.1.4), celobioidrolase (exo-1,4- β -D-glucanase, EC 3.2.1.91) e β -glicosidase (1,4- β -D-glicosidase, EC 3.2.1.21). A endoglucanase age de forma aleatória, clivando ligações beta, dentro da molécula da celulose; a celobioidrolase remove as unidades de celobiose a partir das extremidades da cadeia da celulose e β -glicosidase quebra celobiose em duas unidades de glicose (Lee *et al.*, 2003).

As carboximetilcelulasas (endoglucanases) são enzimas do complexo celulolítico que clivam as ligações das regiões menos compactadas (amorfa) da celulose, diminuindo o comprimento da fibra e gerando novas extremidades livres. Já as avicelases (exoglucanases) agem de maneira progressiva em extremidades redutoras ou não-redutoras da celulose, com maior afinidade por celulose

insolúvel ou microcristalina, liberando glicose e principalmente celobiose como produtos; Por outro lado, as β -glicosidases atuam nos resíduos de celobiose liberados e os hidrolisam a glicose como mostra a Figura 6 (Phillipidis e Smith, 1995; Teeri, 1997; Lynd *et al.* 2002).

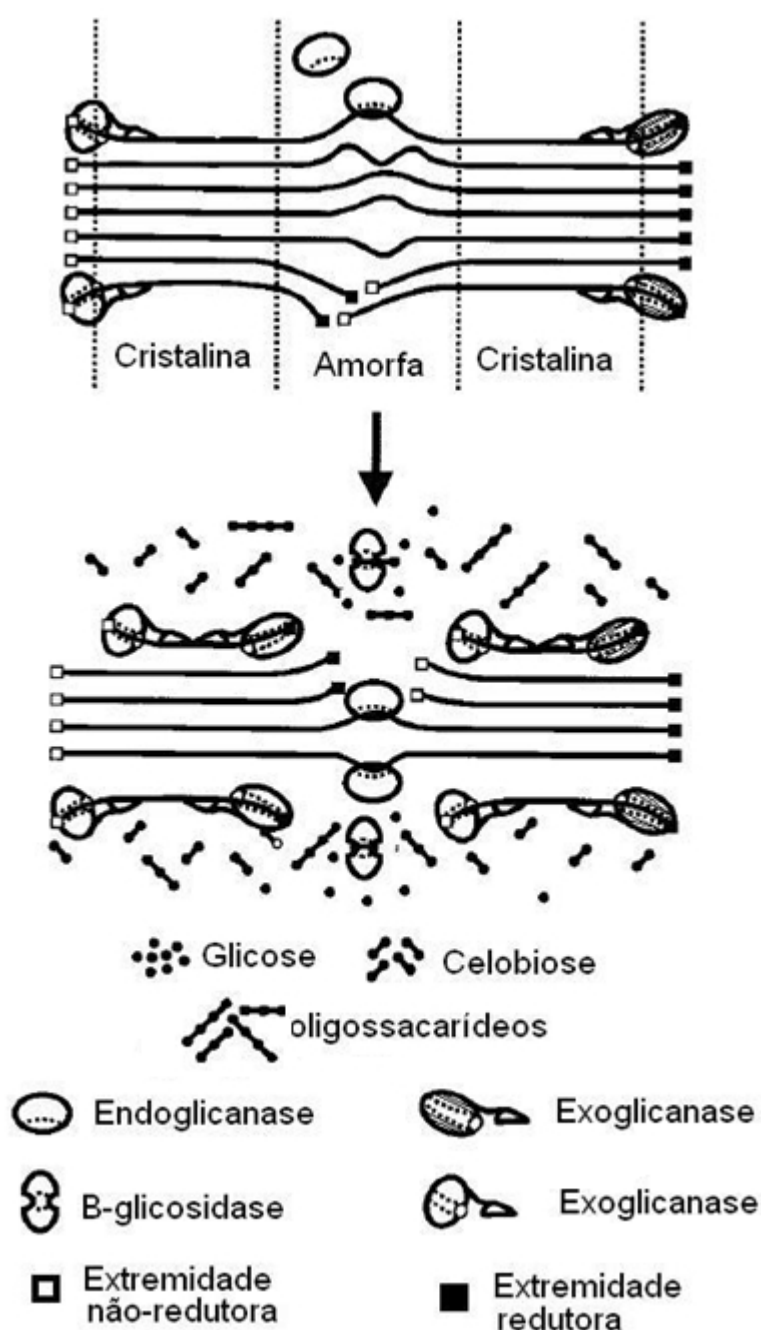


Figura 6: Representação esquemática da hidrólise de celulose pelo sistema celulolítico. O esquema mostra a região de ação de cada uma das celulases (adaptado de Lynd *et al.*, 2002).

Essas enzimas são encontradas em diferentes organismos, desde fungos e bactérias até protozoários (Takenaka *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2001; Suda e Giorgini *et al.*, 2003) e representam uma pequena parte das celulases, apenas 20% do total de enzimas produzidas (Lynd *et al.*, 2002). A diversidade de endoglucanases garante ao microrganismo que a produz atividade em diferentes substratos e essa atividade permite a hidrólise da hemicelulose, além de ajudar na remoção da lignina e permitir uma ação mais eficiente do sistema celulolítico sobre a celulose cristalina (Maheshwari *et al.*, 2000).

A habilidade em decompor biomassa celulósica em glicose, a qual poderá ser convertida em produtos de valor agregado e energia, tem tornado as celulases um dos sistemas enzimáticos multicomponentes mais investigados. Entretanto, biomassas lignocelulósicas contêm, além de 75-80% de polissacarídeos (celulose e hemicelulose), 20-25% de lignina e, por isso, não podem ser facilmente convertidos em simples açúcares monoméricos, devido à natureza recalcitrante dessas moléculas. Para tornar a celulose disponível ao ataque das celulases, pré-tratamentos físicos e químicos são geralmente utilizados. Algumas opções de pré-tratamento são: tratamento com ácido, com álcali, com vapor, com solventes orgânicos e com água quente (Adsul *et al.*, 2005).

Dentre os pré-tratamentos, a hidrólise ácida utilizando ácido sulfúrico é o mais utilizado para plantas industriais (Hamelinck *et al.*, 2005) devido aos seus bons resultados, como alto rendimento de recuperação de açúcares. Porém pontos contrários, como a necessidade de neutralização antes da fermentação, para que não haja inibição e o custo da instalação para que os materiais suportem as condições agressivas do fluido reagente dificultam a viabilidade econômica desta tecnologia.

Outro tratamento que vem sendo muito estudado é o alcalino, utilizando como principais catalisadores o hidróxido de sódio e o hidróxido de cálcio. Uma vantagem importante neste tipo de tratamento é que praticamente toda a lignina e parte da hemicelulose são removidas, resultando em uma maior disponibilidade da celulose. Por outro lado, a desvantagem deste processo é o tempo de residência, visto que este pode durar horas, diferentemente dos outros processos (Moiser *et al.*, 2005).

Quando se compara os dois pré-tratamentos, verifica-se que as condições de operação da hidrólise alcalina é menos corrosiva, resultando em um custo de

implantação menor do que ao da hidrólise ácida. Entretanto, o custo de operação desse processo é superior ao da hidrólise ácida, devido ao custo do reagente e da alta quantidade necessária (Hamelinck *et al.*, 2005).

Uma característica a ser considerada na escolha do pré-tratamento da biomassa, é a questão dos resíduos que são gerados, pois estes não podem ser prejudiciais para as etapas posteriores, principalmente na hidrólise da celulose e na fermentação. Outro ponto importante é que esta etapa é significativa em termos de custo no processo de aproveitamento da celulose (Hamelinck *et al.*, 2005), já que ela representa um custo superior a 33%.

Sendo assim, é necessário ressaltar a importância da etapa de pré-tratamento, visto que o rendimento do processo é superior a 90% quando há pré-tratamento e inferior a 20% quando esta etapa não é realizada (Hamelinck *et al.*, 2005). A Figura 7 mostra de forma simplificada como o pré-tratamento realiza a separação dos componentes da matéria-prima, possibilitando que a lignina e a hemicelulose sejam separadas por solubilização.

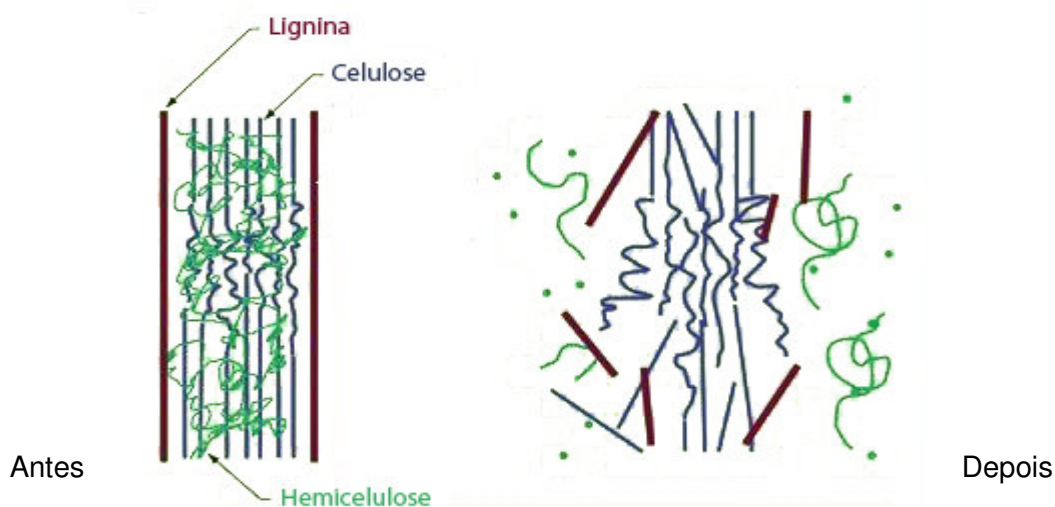


Figura 7: Esquema simplificado do pré-tratamento da biomassa (Moiser *et al.*, 2005).

Segundo Pires *et al.* (2004) tratamento de materiais com produtos alcalinos provoca a solubilização parcial da hemicelulose e a expansão da celulose, o que facilita o ataque de microrganismos à parede celular, com conseqüente aumento na digestibilidade do material tratado.

3.6. Microrganismos termofílicos e suas enzimas

Microrganismos capazes de crescer em temperaturas altas são chamados termofílicos ou termófilos, este termo, apesar de ser muito usado não tem uma definição aceita universalmente, pois as temperaturas cardinais variam muito nos diversos trabalhos. De acordo com Sonnleitner (1983) e Madigan *et al.* (1996) um organismo é considerado termofílico quando a temperatura ótima de crescimento é maior ou igual a 45°C e podem ser considerados termotolerantes quando sua temperatura mínima de crescimento for maior que 30°C.

Os microrganismos são classificados em termófilos moderados, quando a faixa de temperatura de crescimento está entre 20°C e 55°C. Em termófilos extremos, quando seu crescimento se dá em temperaturas de 65°C a 85°C e hipertermófilos, quando crescem entre 85°C e 110°C (Gomes *et al.*, 2007).

Entre os microrganismos, os termofílicos são encontrados em todos os principais grupos. Dentre as arqueobactérias, os gêneros *Sulfolobus*, *Thermoplasma*, *Thermoproteus*, *Methanobacterium*, *Pyrococcus* e *Thermococcus* (Sonnleitner, 1983; Uzawa *et al.*, 2002). Entre as eubactérias, os principais organismos termofílicos aeróbios pertencem ao gênero *Bacillus*, *Thermus* e *Thermomicrobium*, enquanto os anaeróbios facultativos são representados pelo gênero *Thiobacillus* e os anaeróbios estritos pelos gêneros *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermobacteroides* e *Methanobacterium* (Madigan *et al.*, 1996).

O gênero *Bacillus* é um dos principais grupos de bactérias. Este gênero possui mais de 200 espécies descritas e é constituído de bactérias oportunistas, com altas taxas de obtenção de nutrientes e alta resistência dos endosporos, os quais germinam quando o substrato se torna disponível (Sneath, 1986). Geralmente os *Bacillus* termofílicos são neutrófilos, auxotróficos para metionina e crescem principalmente em meio de cultivo com 3% de NaCl (Sonnleitner, 1983). Sakai *et al.*, (1998) propôs agrupar todos os *Bacillus* termofílicos em um novo gênero, *Thermobacillus*, independente dos *Bacillus* mesofílicos .

De acordo com Haki e Rakshit (2003), enzimas de microrganismos termofílicos apresentam vantagens para a aplicação industrial, pois processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas, têm o risco de uma menor contaminação por microrganismos mesófilos.

Para a degradação da celulose microcristalina, que é insolúvel em água devido a sua estrutura altamente compacta, é interessante a utilização de celulasas termoestáveis ativas a altas temperaturas (Haki e Rakshit, 2003). Devido a este fato, as celulasas termoestáveis de microrganismos termofílicos passaram a ser mais estudados e caracterizados (Krishna e Varma, 1990; Maheshwari *et al.*, 2000).

Já que a demanda de celulasas pelo setor industrial é grande, a obtenção destas enzimas por meio de microrganismos torna-se interessante devido à grande diversidade bioquímica, facilidade de manipulação genética dos mesmos e rapidez com que estas moléculas são obtidas (Rao *et al.*, 1998).

Segundo Schallmey *et al.* (2004), a habilidade de produzir e secretar grandes quantidades de enzimas extracelulares e apresentar espécies termófilas capazes de fermentar numa ampla variedade de valores de pH, faz com que as cepas do gênero *Bacillus* sp. sejam dominantes nos processos de fermentação microbiológica, gerando produtos enzimáticos comerciais com aplicabilidades específicas.

A busca por enzimas termoestáveis e por microrganismos que sejam bons produtores de enzimas é de grande interesse, pois além da utilização industrial, é importante se obter informações que sejam úteis para engenharia de proteínas (Haki e Rakshit, 2003)

3.7. Aplicação industrial das celulasas

Na indústria alimentícia, as celulasas são usadas em vários processos, principalmente, na extração de componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (Orberg, 1981).

Existe uma tendência mundial para a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, buscando açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol em larga escala (Zhang *et al.*, 2006). O uso de celulasas para este fim tem como entrave o custo de produção, que pode ser superado utilizando organismos geneticamente modificados (bactérias, leveduras e plantas) para a produção das enzimas e a necessidade de produzir enzimas mais eficientes (Sun e Cheng, 2002). A expectativa é de que o mercado de celulasas seja superior a 400

milhões de dólares por ano com a possível utilização das enzimas na hidrólise de palha de milho nos Estados Unidos da América para a produção de etanol de biomassa (Zhang *et al.*, 2006).

As celulasas são usadas nas rações de animais monogástricos e ruminantes. Nos animais monogástricos elas atuam em conjunto com as xilanases, na hidrólise de polissacarídeos não amiláveis (Bhat e Bhat, 1997; Bhat, 2000). Já nos ruminantes, a utilização de celulasas em conjunto com pectinases e hemicelulasas, vêm da necessidade de aumentar a digestão das plantas forrageiras, base da alimentação dos animais, e assim poder incrementar a qualidade e digestibilidade da ração (Bhat, 2000).

Na indústria de polpa e papel, as celulasas estão presentes na fabricação de papel reciclado, pois sua ação enzimática colabora no processo de despigmentação da matriz celulósica, permitindo o aumento da drenagem da água presente na polpa de papel para a formação de folhas de papel (Bhat e Bhat, 1997; Lima *et al.*, 2001).

Na indústria de detergentes apresentam um espectro de ação e de utilização bastante amplo, havendo, conseqüentemente, necessidade de especialização das formulações. A principal vantagem da formulação de detergentes que contenha enzimas é a substituição de produtos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos, que agredem o meio ambiente e que provocam o desgaste de materiais e de instrumentos. O uso diversificado das enzimas deve-se à sua característica de atuar como biocatalisadores especializados. As enzimas adicionadas às formulações de detergentes de uso hospitalar, doméstico e industrial agem digerindo e dissolvendo resíduos orgânicos (sangue, fezes, urina, vômitos, manchas diversas), higienizando as partes externas e internas de instrumentos cirúrgicos, desobstruindo canais com resíduos e coagulados, eliminando resíduos fecais dos canais e superfícies dos fibroscópios e removendo contaminantes da roupa hospitalar (Godfrey, 1996). Os principais tipos de enzimas utilizadas nessa indústria incluem: a) amilases - degradam amido e outros glicídios de carboidratos; b) proteases - degradam ligações peptídicas; c) lipases - degradam lipídeos; d) celulasas - degradam celulose (Bon, 1995). Dentre esse grupo, as celulasas se destacam por degradar o tecido das roupas que contém algodão. O efeito nesse caso é a remoção de fibrilas de celulose que com o tempo passam a aparecer como penugem no exterior da fibra principal. O efeito das celulasas

sobre os tecidos é então o de melhorar a aparência quanto ao brilho, a maciez e facilitar a remoção de partículas sólidas do tecido (muitas vezes partículas do próprio algodão que forma o tecido).

Uma nova geração de detergentes sem fosfato e sem cloro alvejante, contendo apenas uma mistura de enzimas, com formulação mais segura e menos cáustica, foi introduzida na Europa há vários anos. O uso de enzima sem processos industriais satisfaz as exigências das normas de ISO 14000 de baixo impacto ambiental, além da redução de gastos energéticos associados ao aumento da qualidade do produto (Bon, 1995).

Devido à sua eficiência, ação específica, condições moderadas nas quais atuam e, à alta biodegradabilidade, as enzimas são ferramentas importantes para uma extensiva aplicação industrial. As projeções indicam que combinações variadas de misturas de enzimas venham a substituir, cada vez mais, os componentes menos aceitáveis do ponto de vista ambiental, nas formulações de detergentes (Novozyme, 2000). A partir daí o surgimento de novas tecnologias e novas pesquisas não param de ser realizadas com intuito de descobrir novos produtores de celulasas e novas propriedades que levem sempre a obtenção de um detergente mais eficaz.

3.8. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos

A economia brasileira é uma das mais importantes economias do mundo baseadas na agricultura, produzindo e exportando café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas entre outros. Entretanto, a grande produção desses produtos agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos (Soccol e Vandenberghe, 2003), que quando acumulados gera a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais como fonte de carbono em bioprocessos, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos de aroma, entre outros (Pandey *et al.*, 2000; Uenojo e Pastore, 2007; Medeiros *et al.*, 2000; Soccol e Vandenberghe, 2003).

Nos últimos anos, uma diversidade de subprodutos da indústria agrícola ou resíduos agroindustriais têm sido estudados com a finalidade de formular

substratos para produção de enzimas (Mukherjee *et al.*, 2008). Por exemplo, soro de queijo, melão e bagaço de cana de açúcar e água de maceração de milho são resíduos provenientes da agroindústria que apresentam grande potencial de reuso devido a sua composição e características físico-químicas, além dos benefícios ambientais (Ladeira *et al.*, 2010). Aproximadamente, 80% do volume do leite destinado à fabricação de queijos correspondem a soro gerado. No Brasil são produzidos cerca de 1.000.000 t/ano de soro, resultando em 7500 t de proteínas de soro de queijo. Sendo assim, a utilização deste resíduo como substrato biotecnológico para produção de enzimas microbianas foi realizada por diversos pesquisadores (Nascimento e Martins, 2004; Silva *et al.*, (2007); Carvalho, *et al.*, (2008); Delatorre *et al.*, (2009); Ladeira *et al.*, (2010). Já a água de maceração de milho, resíduo gerado no processamento de milho e outros grãos, resulta em um subproduto rico em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais vitaminas e fosfato (Rivas *et al.*, 2004). Vários autores (Silva *et al.*, 2007; Delatorre *et al.*, 2009; Andrade, 2009; Ladeira *et al.*, 2010) sugeriram a utilização da água de maceração de milho para a redução do custo do meio de cultura utilizado para o crescimento e produção de enzimas por microrganismos. Por outro lado, melão e o bagaço de cana de açúcar, subproduto da indústria açucareira, apresenta uma alta concentração de sacarose e outros açúcares redutores, além de substâncias importantes para processos fermentativos. Neste caso em particular, o bagaço de cana de açúcar é um resíduo agroindustrial abundante em vários países e pode ser utilizado como matéria-prima para o desenvolvimento de vários processos biotecnológicos de interesse industrial, dentre eles, o bagaço pode ser usado como suporte na produção de pectinases pelo *A. niger* (Pal *et al.*, 1995 e Solis-Pereyra *et al.*, 1996). Além de ser empregado como substrato com a finalidade de reduzir os custos de meios de cultura para a produção de celulases.

A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos, por um lado, fornece substratos alternativos e, por outro, ajuda a solucionar os problemas de poluição que sua disposição no meio ambiente poderia causar. Com o advento de inovações biotecnológicas, principalmente na área de tecnologia de enzimas e fermentação, muitos caminhos novos têm sido abertos para sua utilização (Pandey *et al.*, 2000b).

Com base no exposto, cria-se a necessidade de se desenvolver tecnologias que permitam a produção de enzimas a um custo competitivo é de grande importância não só para a indústria de biocombustíveis, mas para diversas aplicações biotecnológicas e de outros setores, incluindo o de produtos químicos, alimentos, bebidas, rações para animais, têxtil, papel e celulose. Dentre suas aplicações nas indústrias têxteis, destacam-se a bioestonagem e o biopolimento por modificação das fibras celulolíticas, melhorando assim a qualidade do tecido (Jurgen, 2001).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

Para realização deste estudo, foi utilizado uma cultura bacteriana termofílica, *Bacillus* sp SMIA-2, isolada por Nunes e Martins (2001) a partir de amostras do solo do município de Campos dos Goytacazes, no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual do norte Fluminense (UENF). Segundo os mesmos autores, a comparação das seqüências de 16S rRNA indicaram que o isolado possui 94% de similaridade com *B. caldoxylyticus* e *Bacillus* sp. espécie AK1.

4.2. Meio de crescimento

Para a produção do complexo enzimático (carboximetilcelulase, avicelase e β -glicosidase), foi utilizado o meio de cultura contendo os seguintes nutrientes (g L^{-1} de água destilada): peptona, 1,0; KCl, 0,3; K_2HPO_4 , 0,87; CaCl_2 , 0,29; MgSO_4 , 0,5; e traços de metais (CaCl_2 , $2,2 \times 10^{-3}$; ZnO, $2,5 \times 10^{-3}$; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $2,7 \times 10^{-2}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $1,0 \times 10^{-2}$; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $8,5 \times 10^{-4}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $2,4 \times 10^{-3}$; $\text{NiCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $2,5 \times 10^{-4}$; H_3BO_3 , $3,0 \times 10^{-4}$; Na_2MoO_4 , $1,0 \times 10^{-3}$). A este meio basal foi adicionado 0,5% da fonte de carbono (avicel, carboximetilcelulose, bagaço de cana de açúcar e bagaço de cana de açúcar submetido a diferentes tratamentos). O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,5 com NaOH 1,0M e logo após foi esterilizado por autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

4.3. Preparo do pré-inoculo

O inoculo foi preparado semeando o microrganismo em placas de petri contendo o meio TSY (triptona 20 g/L; NaCl 10 g/L; extrato de levedura 10 g/L; ágar 20 g/L e água 1 L).

As placas foram incubadas em estufa QUIMIS modelo Q 315 D26 a 50°C por 18 horas. Após este período, 0,5 mL do meio de crescimento foram transferidas para as placas para ressuspender as células que foram posteriormente sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril. Estas células foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL do respectivo meio de crescimento, incubadas por mais 24 horas em shaker rotatório à 50°C sob agitação de 150 rpm, e posteriormente utilizadas para inocular o meio de crescimento.

4.4. Crescimento do microrganismo

O meio de cultura foi inoculado com 1,0 mL de uma cultura de véspera (pré-inóculo) e incubado a 50°C em um “shaker” rotatório (Thermo forma Orbital Shaker, Ohio, USA) operando a 150 rpm. A intervalos de 24 horas foram retiradas amostras para determinação do crescimento e da atividade das celulasas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

O crescimento do microrganismo foi determinado pela medida da turbidez do meio de crescimento, medindo-se a densidade ótica a 600nm com a utilização de um espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240.

4.5. Ensaio enzimáticos

Para a remoção das células, o meio de cultura foi centrifugado em centrífuga HERMLE-Z 382 K 4500 rpm a 5°C por 15 minutos para obtenção do extrato livre de células e o sobrenadante livre de células utilizado para a dosagem da atividade enzimática.

4.5.1. Atividade enzimática da carboximetilcelulase (*β -1,4-endoglicanase ou EC 3.2.1.4 endoglicanase*)

Para a dosagem da atividade da carboximetilcelulose, uma mistura contendo 1,0 mL da preparação enzimática (sobrenadante livre de células) e 0,5

mL de uma solução de carboximetilcelulose 1,0% (p/v) em tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) foi incubada em banho-maria à 70°C durante 30 minutos. Após este período, a reação foi paralisada com adição de 1,0mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) à mistura. Em seguida, esta mistura foi colocada em água em ebulição por 10 minutos e resfriada em banho de gelo por 5 minutos (Miller, 1959). A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, com comprimento de onda de 540 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, porém a adição de 0,5 mL do tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) no lugar do sobrenadante, e esta mistura foi colocada em água em ebulição, como descrito anteriormente. Uma unidade de carboximetilcelulase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor por minuto por mL da enzima. A curva padrão foi feita a partir de glicose nas concentrações de 0,2 a 1,0 g/L.

4.5.2. Atividade enzimática da Avicelase (EC 3.2.1.74) ou EXO β -1,4 GLUCANASE

A Avicelase teve sua atividade determinada através de uma mistura contendo 0,5 mL da enzima e 0,5 mL de uma solução de avicel 1,0% (p/v) em tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) foi incubada em banho-maria à 70°C durante 10 minutos. Após este período, a reação foi paralisada pela adição de 1,0mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) à mistura. Em seguida, esta mistura foi colocada em água em ebulição por 10 minutos e resfriada em banho de gelo (Miller, 1959) por 5 minutos. A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 540 nm. O mesmo procedimento foi feito com o controle, porém foi adicionado 0,5 mL do tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) no lugar do sobrenadante, e esta mistura foi colocada em água em ebulição, como descrito anteriormente. Uma unidade de avicelase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de açúcar redutor por minuto por mL da enzima. A curva padrão foi feita a partir de glicose nas concentrações de 0,2 a 1,0 g/L.

4.5.3. Atividade enzimática da β -glicosidase

A atividade da β -glicosidase foi determinada em tubo de ensaio contendo uma mistura de 0,5 mL da enzima e 2,0 mL de uma solução de p-nitro-phenol- β -

D-glicosideo (PNPG) 0,026% (p/v) em tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) foi incubada em banho-maria à 70°C durante 60 minutos. Após este período, a reação foi paralisada pela adição de 2,0 mL de carbonato de sódio 1,0M (Na₂CO₃) à mistura.

Em seguida, esta mistura foi agitada e a coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 420 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, porém foi adicionado 0,5 mL do tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) no lugar do sobrenadante, e esta mistura foi colocada em água em ebulição, como descrito anteriormente. Uma unidade de β-glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de p-nitrofenol por minuto por mL da enzima. A curva padrão foi feita a partir p-nitrofenol (PNPG) 200 μg/mL.

4.6. Pré-tratamento do bagaço

O bagaço de cana utilizado neste trabalho foi fornecido pelos ambulantes da cidade de Campos dos Goytacazes, e logo em seguida foi levado ao laboratório onde foi primeiramente lavado com água destilada e após a retirada da água da última lavagem, o bagaço de cana foi seco em desidratador profissional marca Pardal em bandejas de tela a aproximadamente 70°C por 48 horas. Em seguida foi triturado em moinho de facas tipo Wily, peneira 30 mesh, e peneirado em peneira de 60 mesh e estocado em saco plástico, sob refrigeração, até o uso.

Para facilitar o acesso das enzimas celulolíticas nas frações de celulose e hemicelulose, o bagaço foi submetido aos seguintes pré-tratamentos:

- Tratamento (1) – Bagaço sem tratamento nenhum (controle);
- Tratamento (2) – Bagaço tratado com solução de hidróxido de sódio (NaOH - 4%);
- Tratamento (3) – Bagaço tratado com solução de hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂ - 4%);
- Tratamento (4) – Bagaço tratado com uma mistura das soluções de hidróxido de sódio (NaOH - 4%) e hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂ - 4%).

Após cada tratamento, o bagaço foi autoclavado a 121°C por 30 minutos e após 12 horas de incubação a temperatura ambiente, o bagaço foi filtrado e lavado com água destilada previamente sua esterilização até pH neutro.

4.7. Alterações físicas do bagaço

Os efeitos dos tratamentos alcalinos sobre o bagaço foram observados em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tais observações foi feita uma preparação do bagaço tratado quimicamente.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada com as amostras de bagaço obtida nos quatro tratamentos, como descrito no item 4.6. A metodologia para a preparação das amostras a serem analisadas foi conduzida de acordo com o seguinte procedimento: O material foi limpo com um pincel fino, hidratado gradualmente com água destilada e limpo com uma solução de detergente (imerso por uma semana em formol 37% e detergente a 1:10). A cada dois dias a solução foi trocada e lavada com água destilada até não haver mais resíduos do detergente (neste ponto, se necessário e apenas por alguns segundos, o ultrassom foi utilizado para finalizar a limpeza). Em seguida a água foi substituída por uma solução de Tetraóxido de Ósmio 1%, que foi deixada em repouso por 2 a 3 horas e desidratada progressivamente com etanol (10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%) por 10 minutos. O álcool 100% foi trocado três vezes, sendo a última troca no máximo 1 h antes de levar ao ponto crítico.

A análise da morfologia das amostras foi realizada em microscópio eletrônico SHIMADZU, disponível no Laboratório de Materiais Avançados – LAMAV–CCT/ UENF, sendo as amostras metalizadas com ouro e as imagens geradas a partir de elétrons secundários a vácuo.

4.8. Determinação dos teores de lignina, celulose e hemicelulose

Com o intuito de verificar a eficiência da hidrólise dos materiais pré-tratados quimicamente, foram determinados os teores de lignina, celulose e hemicelulose presentes nas amostras submetidas aos tratamentos descritos anteriormente, sendo o controle o bagaço *in natura*.

As análises foram realizadas de acordo com as metodologias propostas por Van Soest (1965 e 1967), pelo Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal – LZNA – CCTA/UENF.

3.8.1. Determinação de fibra em detergente neutro (FDN)

Para a determinação de fibra em detergente neutro, foram pesados 0,5g de cada amostra tratada, seca ao ar livre e triturada em moinho com peneira de 30

“mesh”. Essas amostras foram colocadas em um copo de 600 mL do aparelho digestor e foram adicionados 50 mL de solução de detergente neutro, preparado segundo o método de Van Soest. Em seguida a amostra foi aquecida até a fervura por aproximadamente 10 minutos e a temperatura ajustada para evitar a espuma. A amostra permaneceu por 60 minutos no digestor e logo após, ainda quente foi filtrada por sucção a vácuo e lavada, também a quente com água, em cadinho filtrante, previamente pesado. A lavagem foi repetida por três vezes e em seguida foi feita uma lavagem com acetona, depois os cadinhos filtrantes foram secos em estufa a 105°C por 24 horas, resfriados em dessecador e pesados. A diferença entre as pesagens é considerada como a porcentagem de fibra em detergente neutro dos constituintes celulares, (Equação 1).

$$\% \text{ de FDN} = 100 (a-Pc)/P \quad (1)$$

Em que:

FDN - Fibra em Detergente Neutro

a - amostra após a secagem

Pc - peso do cadinho

P - Peso da amostra seca (g)

4.8.2. Determinação de fibra em detergente ácido (FDA)

Para a determinação de fibra em detergente ácido ou da lignocelulose, foram pesados 0,5g de cada amostra tratada, seca ao ar livre e triturada em moinho com peneira de 30 “mesh”. Essas amostras foram colocadas em um copo de 600 mL do aparelho digestor e foram adicionados 50 mL de solução de detergente ácido, preparado segundo o método de Van Soest. Em seguida a amostra foi aquecida até a fervura por aproximadamente 10 minutos e a temperatura ajustada para evitar a espuma. A amostra permaneceu por 60 minutos no digestor e logo após, ainda quente foi filtrada por sucção a vácuo e lavada, também a quente com água, em cadinho filtrante, previamente pesado. A lavagem foi repetida por três vezes e em seguida foi feita uma lavagem com acetona, depois os cadinhos filtrantes foram secos em estufa a 105°C por 24 horas, resfriados em dessecador, pesados e encaminhados para a determinação de lignina. A fração de hemicelulose foi calculada pela diferença entre a fibra de detergente neutro (FDN) e fibra de detergente ácido (FDA), (Equação 2).

$$\% \text{ de FDA} = 100 (a-Pc)/P \quad (2)$$

Em que:

FDA - Fibra em Detergente Ácido

a - amostra após a secagem

Pc - peso do cadinho

P - Peso da amostra seca (g)

4.8.3. Determinação de hemicelulose

O valor de hemicelulose foi calculado pela diferença entre as porcentagens de fibra em detergente neutro e de fibra de detergente ácido, como mostra a Equação 3.

$$\% \text{ de Hemicelulose} = \% \text{ de FDN} - \% \text{ de FDA} \quad (3)$$

Em que:

FDN - Fibra em Detergente Neutro

FDA - Fibra em Detergente Ácido

4.8.4. Determinação de lignina

A determinação da lignina foi realizada a partir da fibra de detergente ácido (FDA). O método de determinação utilizado foi o do ácido sulfúrico a 72%. Para isso, os cadinhos submetidos ao detergente ácido foram colocados em uma bandeja contendo uma camada de água destilada. Em seguida adicionou-se 5,0 mL da solução de ácido sulfúrico a 72% onde a amostra permaneceu por 90 minutos (a medida que o volume da solução de ácido sulfúrico diminuía adicionava-se mais 5,0 mL da mesma solução, pois a amostra tem que ficar submersa na solução de ácido sulfúrico). Logo após, os cadinhos foram lavados a quente com água e succionados a vácuo por três vezes, a última lavagem foi feita com acetona. Depois os cadinhos foram secos em estufa a 105°C por 24 horas, resfriados em dessecador e pesados. (2ª secagem), resfriados em dessecador e pesados. O valor de lignina foi calculado pela perda de peso de fibra em detergente ácido como mostra a Equação 4.

$$\% \text{ de Lignina} = 100(a-b)/P \quad (4)$$

Em que:

a - amostra após a 1ª secagem

b - amostra após a 2ª secagem

P - Peso da amostra seca (g)

4.8.5. Determinação de Celulose

A determinação da celulose foi realizada a partir da determinação de lignina. Para isso os cadinhos das amostras, que foram submetidas a solução de detergente ácido (1ª secagem) e logo após, através da mesma amostra, a determinação de lignina (2ª secagem), a partir desta última secagem as amostras foram incineradas em mufla a 500°C (3ª secagem) por 3 horas, esfriados em dessecador e pesados. A porcentagem de celulose foi calculada pela diferença nas pesagens, antes e depois da incineração, (Equação 5).

$$\% \text{ de Celulose} = 100(\mathbf{b-c})/\mathbf{P} \quad (5)$$

Em que:

b - amostra após a 2ª secagem

c - amostra após a 3ª secagem

P - Peso da amostra seca (g)

3.9. Crescimento e atividade das celulasas em meio de cultura contendo como substrato o bagaço de cana de açúcar submetido a diferentes tratamentos.

O bagaço utilizado neste experimento foi previamente tratado como citado no item 3.6, sendo o controle o bagaço de cana de açúcar sem tratamento. Depois do pré-tratamento, o bagaço foi adicionado ao meio mineral na concentração de 0,5% . Após a esterilização e inoculação do meio, a cultura foi incubada por 192 horas a 50°C em um “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm, e em intervalos de tempo de 12h a densidade ótica da cultura e a atividade do complexo enzimático foram determinadas como citado nos itens 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Perfil do crescimento e da atividade da avicelase de *Bacillus* sp SMIA-2

O crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2, a atividade da avicelase e teores de açúcares redutores em função do tempo de fermentação, foram observados por 192 horas em meio líquido contendo 0,5% de avicel como fonte de carbono (Figura 8). O crescimento exponencial do microrganismo foi observado por um período longo de tempo, iniciando logo após a incubação da cultura e finalizando após 120 horas. A partir deste tempo, a velocidade do crescimento foi reduzida e a cultura entrou na fase estacionária.

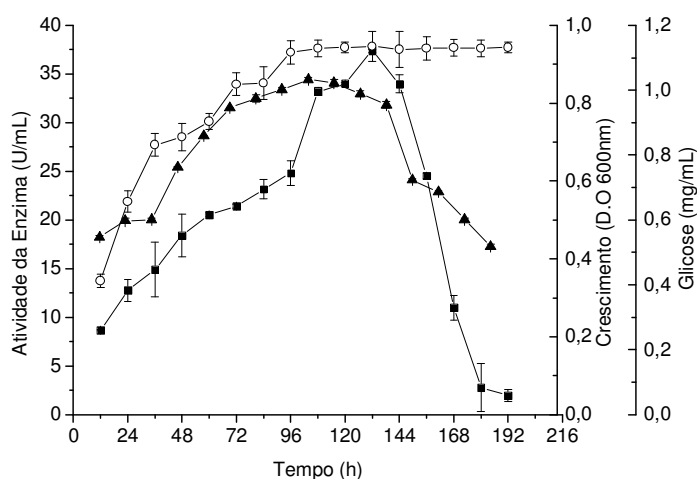


Figura 8. Crescimento (○), Teores de glicose (▲) e atividade da avicelase (■) secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio mineral contendo 0,5% de avicel por 192 horas a 50^o C. As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor do que o símbolo.

A atividade da avicelase aumentou concomitantemente com a densidade ótica da cultura, alcançando a atividade máxima após 120 horas de incubação do microrganismo, com níveis de 37,38 U/mL, quando o crescimento já havia sido cessado e a cultura se encontrava na fase estacionária. Durante esta fase, quando a cultura já havia alcançado a máxima produtividade enzimática, a atividade da avicelase foi reduzida drasticamente, o que sugere que a produção desta enzima está associada ao crescimento e que a mesma foi produzida, quando a cultura estava metabolicamente ativa.

De acordo com Kubicek *et al.* (1993), as celulases, assim como as demais enzimas extracelulares de hidrólise, são induzidas quando há a necessidade de serem secretadas pelos microrganismos, para que estes cresçam em celulose.

O perfil dos açúcares redutores presentes no meio de cultura ao longo do crescimento do microrganismo foi também determinado. Como observado na Figura 8 os teores dos açúcares redutores (glicose) aumentaram à medida que a atividade da avicelase também aumentou.

5.2. Perfil do crescimento e da atividade da Carboximetilcelulase (CMCase) de *Bacillus* sp SMIA-2

O crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2, a atividade da CMCase e teores de açúcares redutores em função do tempo de fermentação, foram observados por 192 horas em meio líquido contendo 0,5% de carboximetilcelulose como fonte de carbono (Figura 9).

O microrganismo apresentou um comportamento similar àquele encontrado quando cultivado no meio de cultura contendo 0,5% de avicel. Entretanto foi observada uma fase exponencial mais longa, com a fase estacionária sendo alcançada após 144 horas de incubação da cultura. Além disso, a densidade ótica máxima de crescimento, foi de 0,9 enquanto, que no experimento anterior, utilizando a avicel foi de 1,22. A produção da CMCase teve início logo após a incubação da cultura e foi aumentando com o crescimento microbiano, atingindo valor máximo após 144 horas de crescimento, com níveis de 124,84 U/mL. Após este período a atividade decresceu drasticamente, atingindo cerca de 1/4 da atividade máxima, em 180 horas de crescimento. Segundo Keum e Li (2004), a instabilidade das enzimas ligninolíticas pode ser atribuída a vários fatores, como desnaturação por valores muito baixos de pH, degradação por proteases e

desnaturação irreversível pela exposição prolongada a radicais produzidos pelas enzimas dentre outros.

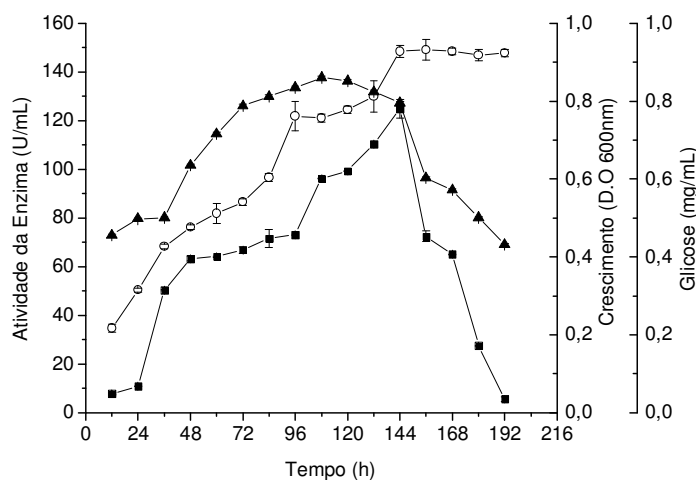


Figura 9. Crescimento (○), Teores de glicose (▲) e atividade da carboximetilcelulase (■) secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio mineral contendo 0,5% de carboximetilcelulose por 192 horas a 50° C. As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor do que o símbolo.

5.3. Perfil do crescimento e da atividade da avicelase, da β -glicosidase e da carboximetilcelulase (CMCase) de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado no bagaço de cana

As fontes de carbono, carboximetilcelulose (0,5%) e a avicel (0,5%), do meio de cultura foram substituídas pelo bagaço de cana (0,5%) e a atividade das celulases foram determinadas (Figura 10).

Bacillus sp SMIA-2 demonstrou capacidade para produzir o complexo celulolítico a partir de bagaço de cana, fonte de carbono abundante e barata no Brasil.

O crescimento do microrganismo foi lento até 72h de incubação da cultura. Porém a secreção das enzimas avicelase e CMCase iniciaram logo após a incubação da cultura, alcançando o valor máximo na fase estacionária de crescimento, com níveis de 20,12 U/mL e 21,65 U/mL. Estes valores de atividade foram inferiores aos encontrados quando o microrganismo foi cultivado no meio de cultura contendo a avicel e a carboximetilcelulose, possivelmente, devido à presença de inibidores contidos no bagaço de cana.

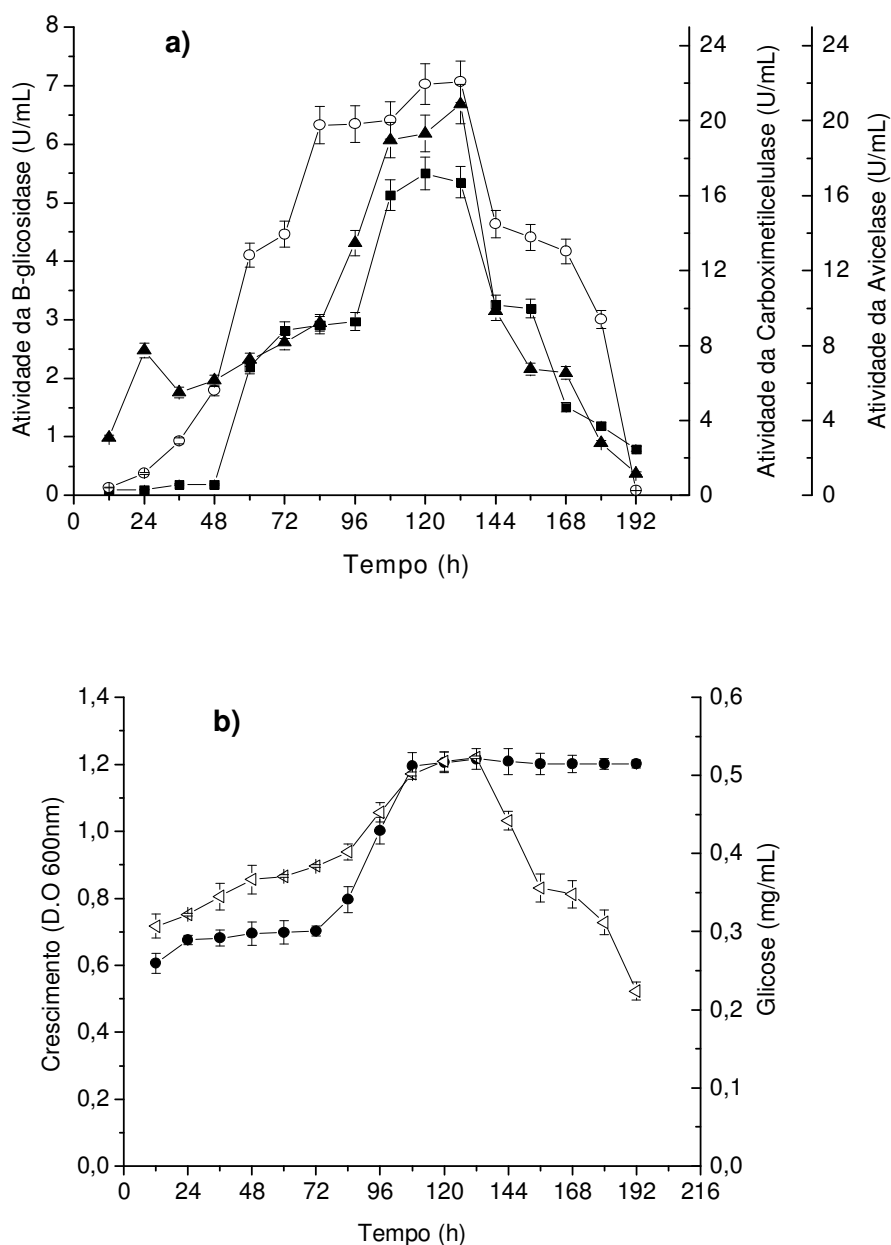


Figura 10. Gráfico (a): atividade do complexo enzimático, carboximetilcelulose (○), avicelase (▲) e β-glicosidase (■), secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2. Gráfico (b): crescimento (●) e teores de glicose (Δ), quando cultivado no meio mineral contendo 0,5% de carboximetilcelulose por 192 horas a 50° C. As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor do que o símbolo.

A atividade da avicelase e da CMCase utilizando o bagaço de cana alcançou 59,09% e 16,89% do valor obtido com a avicel e a carboximetilcelulose, respectivamente, possivelmente, devido ao maior teor de lignina presente no

bagaço. Os valores dos teores de açúcares redutores presentes no meio de cultura também foram inferiores.

Em relação à atividade da β -glicosidase foi observada que a secreção desta enzima ocorreu somente após 60 h de crescimento do microrganismo. A secreção mais tardia desta enzima se justifica pelo fato de a mesma atuar sobre a celobiose produzindo a glicose. A máxima atividade desta enzima foi alcançada em torno de 120 h com níveis de 5,5 U/mL, quando o microrganismo se encontrava na fase estacionária de crescimento.

A celulose de plantas é composta por estruturas cristalinas e amorfas, sendo que a primeira é mais resistente à degradação microbiana (Karunanandaa *et al.*, 1995). Estudos realizados por Silva (2001) demonstraram que o bagaço de cana não foi uma boa fonte de carbono para a produção de enzimas celulolíticas pelas linhagens do gênero *Pleurotus*. Reddy *et al.* (2003), estudaram a atividade enzimática celulolítica de fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju*, utilizando substrato de resíduos lignocelulósicos de banana em fermentação semi-sólida, obtendo também baixa atividade celulolítica.

A produção de celulasas por *Aspergillus niger* utilizando diferentes resíduos agroindustriais tais como o bagaço de cana, bagaço de laranja, casca de arroz e farelo de soja como substratos foi investigado por Farinas *et al.*, 2008. De acordo com estes autores o substrato que proporcionou maior atividade das celulasas foi o farelo de soja e que os outros substratos avaliados forneceram valores bastante inferiores provavelmente, devido à composição dos diferentes substratos, uma vez que a hemicelulose e a lignina conferem uma limitação para a assimilação da fonte de carbono pelo microrganismo agente da fermentação.

5.4. Influência de diferentes tratamentos sobre a composição química e estrutura física do bagaço de cana.

O bagaço de cana de açúcar é composto principalmente por materiais lignocelulósicos, possuindo como constituintes principais a celulose, a hemicelulose e a lignina. A lignina é um dos materiais mais recalcitrantes na natureza e, conseqüentemente, dificulta o acesso de enzimas aos carboidratos fermentáveis, reduzindo a eficiência da degradação da celulose e da fermentação. Neste contexto foram realizados vários tratamentos com o intuito de promover

uma alteração física na estrutura da fibra do bagaço de cana e posteriormente avaliar a eficiência do mesmo, como substrato para a produção de celulases.

Os teores de hemicelulose, lignina e celulose do bagaço de cana submetido aos diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 1. Com respeito aos teores de celulose, os bagaços tratados apresentaram valores menores do que o bagaço de cana sem tratamento. O tratamento conjugado de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) e hidróxido de sódio (NaOH), apresentou maior teor de celulose e menor quantidade de lignina, que é uma barreira física à ação dos extratos enzimáticos. A literatura já descreve que pré-tratamentos alcalinos ocasionam uma diminuição do teor de hemicelulose solubilizando-a. As soluções alcalinas possuem a capacidade de extração de hemiceluloses e lignina e assim, este tipo de solução provoca modificações na composição química das fibras (Caraschi, 1997; Tita *et al.*, 2002).

Segundo Menezes e Hennies (1991) o bagaço de cana tratado com soluções alcalinas mostrou-se mais eficiente na síntese das diferentes frações enzimáticas do que o bagaço sem tratamento.

Tabela 1. Composição do bagaço de cana de açúcar submetido a diferentes tratamentos.

Tratamento	Hemicelulose(%)	Lignina (%)	Celulose (%)
controle	18,98	22,28	50,85
NaOH	15,27	18,32	45,57
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	13,53	26,77	43,32
NaOH - $\text{Ca}(\text{OH})_2$	16,37	13,22	48,46

A ação dos tratamentos químicos sobre a estrutura física do bagaço de cana foi avaliada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na análise de superfície do bagaço exposto aos tratamentos foi possível verificar as diferenças estruturais das fibras. Na Figura 11, onde se encontra a fibra do bagaço não tratada, observa-se a disposição das fibras intactas sem nenhuma

alteração ou ruptura da parede celular. Já nas Figuras 12, 13, 14, é possível notar alterações na estrutura das fibras do bagaço de cana.

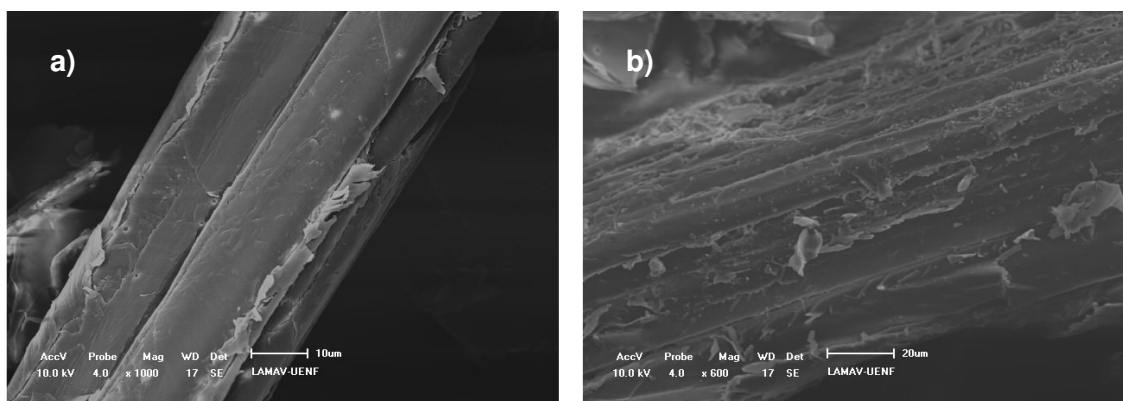


Figura 11. Estrutura do bagaço de cana de açúcar sem tratamento químico ou físico. (a) Aumento de 1000 vezes e (b) Aumento de 600 vezes.

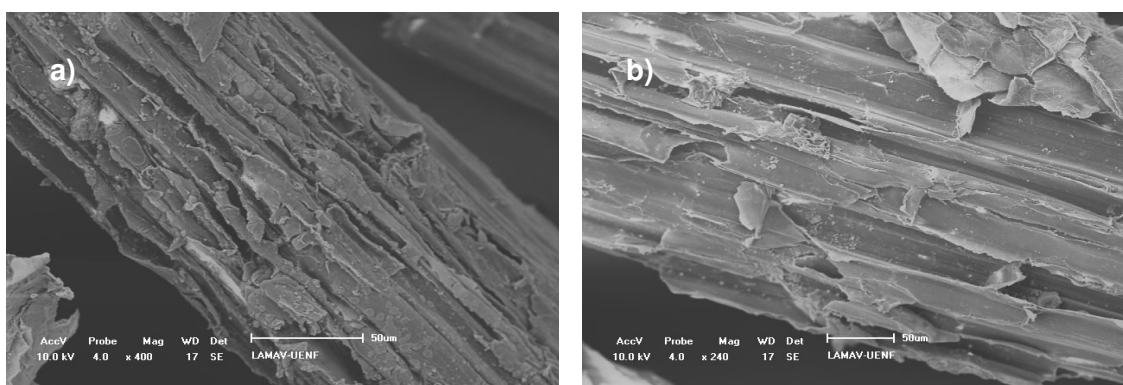


Figura 12. Estrutura do bagaço de cana de açúcar tratado com hidróxido de cálcio. (a) aumento 400 vezes e (b) aumenta 240 vezes.

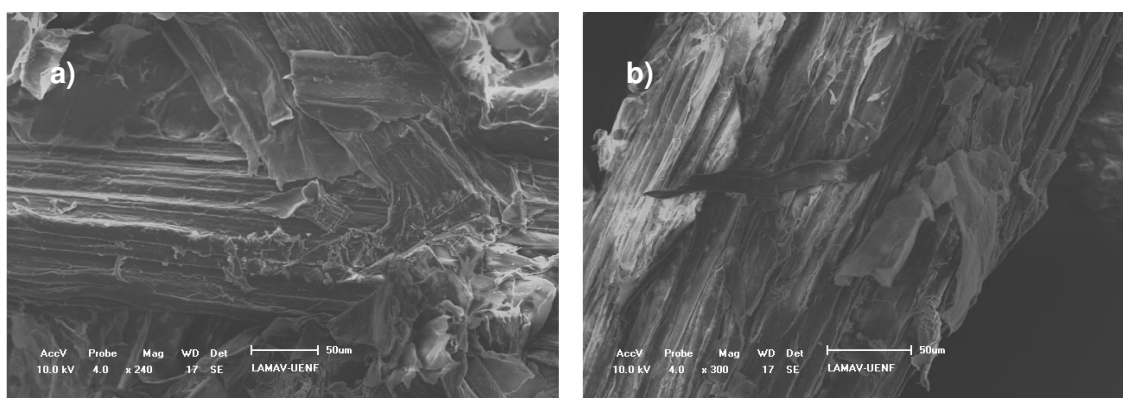


Figura 13. Estrutura do bagaço de cana de açúcar tratado com hidróxido de sódio. (a) aumento de 240 vezes e (b) aumento de 300 vezes.

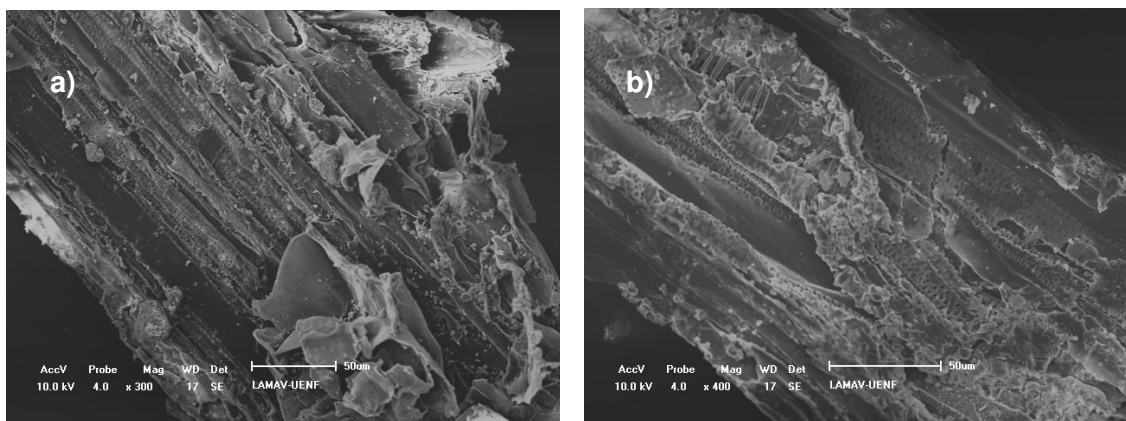


Figura 14. Estrutura do bagaço de cana de açúcar tratado com conjugado hidróxido de cálcio e sódio. (a) aumento de 300 vezes e (b) aumento de 400 vezes.

Comparando os tratamentos em que foram utilizados o hidróxido de cálcio e o hidróxido sódio separadamente e o tratamento em que os hidróxidos foram utilizados conjuntamente nota-se que as mudanças na área superficial da fibra foram menores nos tratamentos em que os hidróxidos foram utilizados separadamente (Figuras 12, 13 e 14).

No tratamento em que foi utilizado apenas o hidróxido de cálcio foi observado um comportamento padrão ao observado para o tratamento em que foi utilizado o hidróxido de sódio, ou seja, uma pequena quebra na estrutura da fibra com pouca estratificação (Figura 12 e Figura 13). Entretanto, esta quebra estrutural da fibra foi ligeiramente inferior no tratamento em que se utilizou o hidróxido de sódio. Por outro lado, quando foi aplicado o tratamento químico conjugado de $(\text{Ca}(\text{OH})_2)$ e NaOH , foi possível notar uma alteração maior na superfície da fibra, evidenciada pela parede celular estratificada. Além disso, observou-se quebra na estrutura da fibra, o que indica perda da consistência fibrilar e desestruturação da lignina. Segundo Triana et al., 1990, os tratamentos com soluções alcalinas mais concentradas provocam alterações estruturais mais significativas na parede celular.

De acordo com Ferreira *et al.* (2006), o tratamento com NaOH além de remover impurezas e tornar a superfície da fibra mais rugosa retira parcialmente a lignina da fibra e solubiliza a hemicelulose deixando a celulose mais exposta ao ataque enzimático. A solubilização da hemicelulose em meio alcalino também foi comprovada por Caraschi, 1997 e Tita *et al.*, 2002.

Pires *et al.* (2004) avaliaram o tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com amônia anidra e/ou sulfeto de sódio e constataram que a amônia anidra (4%) melhorou a degradabilidade, enquanto o sulfeto de sódio (2,5%) não foi eficiente no tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, mesmo quando associado à amônia anidra (2,5% de Na₂S + 4% de NH₃ da massa seca).

5.5. Crescimento e atividade de celulases secretadas por *Bacillus* sp SMIA-2 utilizando o bagaço de cana submetido a diferentes tratamentos.

A atividade das enzimas avicelase, CMCase e β -glicosidase no extrato bruto, obtido do meio de cultura contendo o bagaço de cana tratado com hidróxido de cálcio foi determinada. Os resultados desta alteração do substrato estão demonstrados na Figura 15, onde pode se observar que a CMCase apresentou uma atividade máxima de 84,12 U/mL. Este valor corresponde a um aumento de cerca de 4 vezes na atividade desta enzima encontrada no meio de crescimento contendo o bagaço de cana sem nenhum tratamento. Possivelmente, o maior teor de lignina no bagaço sem tratamento tenha dificultado a indução da atividade enzimática. Em relação a avicelase e β -glicosidase foram encontrados níveis similares de atividade máxima. Entretanto, a máxima atividade da avicelase e da β -glicosidase foram após 144 horas e 96 horas de incubação do microrganismo, isto é, a primeira retardou a sua síntese, enquanto a segunda teve sua secreção mais adiantada em relação ao meio de cultura, contendo o bagaço não tratado.

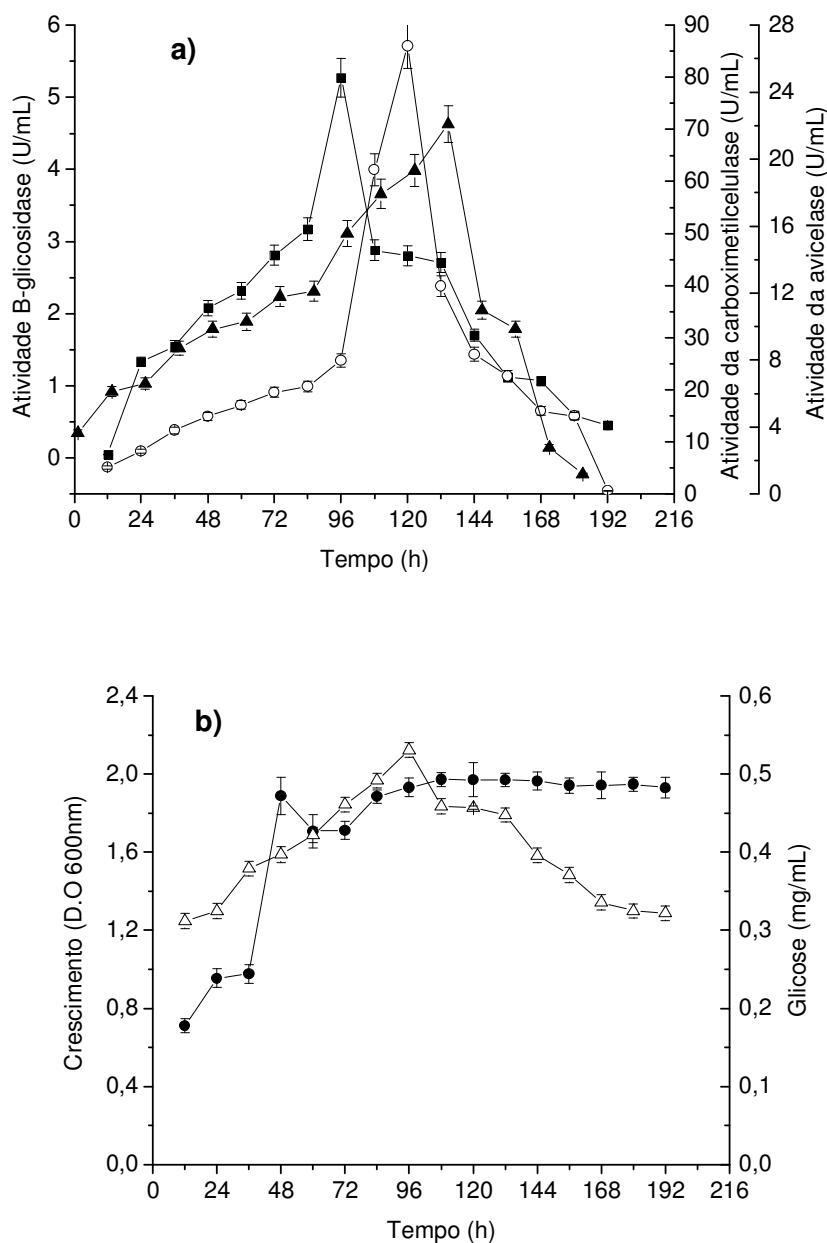


Figura 15. Gráfico (a): atividade do complexo enzimático, carboximetilcelulose (○), avicelase (▲) e β-glicosidase (■), secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2. Gráfico (b): crescimento (●) e teores de glicose (Δ), quando cultivado no meio mineral contendo 0,5% de bagaço de cana tratado com hidróxido de cálcio.

Segundo Menezes e Hennies (1991) o bagaço de cana tratado com soluções alcalinas mostrou-se mais eficiente na síntese das diferentes frações enzimáticas do que o bagaço sem tratamento.

Ainda de acordo com os resultados mostrados na Figura 15, o tratamento com cálcio, além de desestruturar a fibra do bagaço de cana, promoveu o

crescimento mais rápido do microrganismo, que atingiu a fase estacionária de crescimento com 48 horas de incubação da cultura. Estes resultados foram similares aos encontrados por Esposito e Azevedo (2004) em que um pré-tratamento químico do bagaço de cana possibilitou uma maior colonização pelo fungo *Penicillium* sp.

Quanto á produção das celulasas secretadas no meio contendo o bagaço de cana tratado com hidróxido de sódio, não foi observada diferença marcante nos níveis de atividade da avicelase, quando comparada com o meio em que foi utilizado o bagaço não tratado (Figura 16). Entretanto, a atividade da CMCase foi maior, embora quando comparada com aquela obtida do meio em que foi utilizado o bagaço de cana tratado com cálcio, tenha sido menor. Em relação á β -glicosidase, esta apresentou maior atividade quando comparada com o meio contendo bagaço sem tratamento e tratado com cálcio.

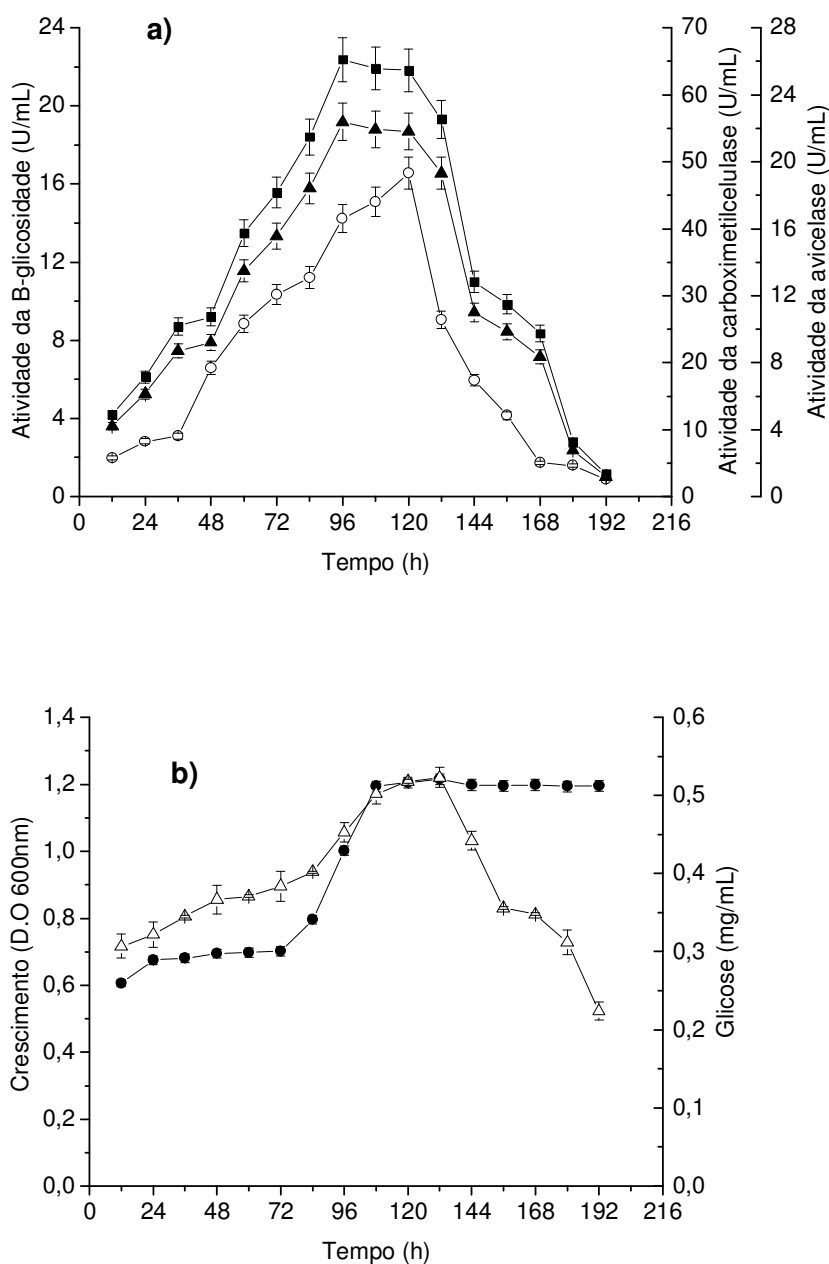


Figura 16. Gráfico (a): atividade do complexo enzimático, carboximetilcelulose (\circ), avicelase (\blacktriangle) e β -glicosidase (\blacksquare), secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2. Gráfico (b): crescimento (\bullet) e teores de glicose (Δ), quando cultivado em meio mineral contendo 0,5% de bagaço de cana tratado com hidróxido de sódio.

Um mesmo perfil de crescimento do microrganismo e dos teores de açúcares redutores foi observado, quando comparado com o meio contendo o bagaço de cana não tratado.

Na Figura 17 estão mostrados os resultados do crescimento, teores de açúcares redutores e a atividade das enzimas avicelase, CMCase e β -glicosidase

secretadas no meio de cultura por *Bacillus* sp contendo como substrato o bagaço de cana tratado com hidróxido de sódio junto com o hidróxido de cálcio.

Os níveis da atividade da CMCase encontrados foram similares aos encontrados para o meio contendo o bagaço de cana tratado com cálcio e inferiores ao do meio cujo bagaço foi tratado com sódio. Além disso, foi observado que a máxima atividade desta enzima foi alcançada mais tardiamente em relação aos meios em que o tratamento com as bases foi realizado separadamente.

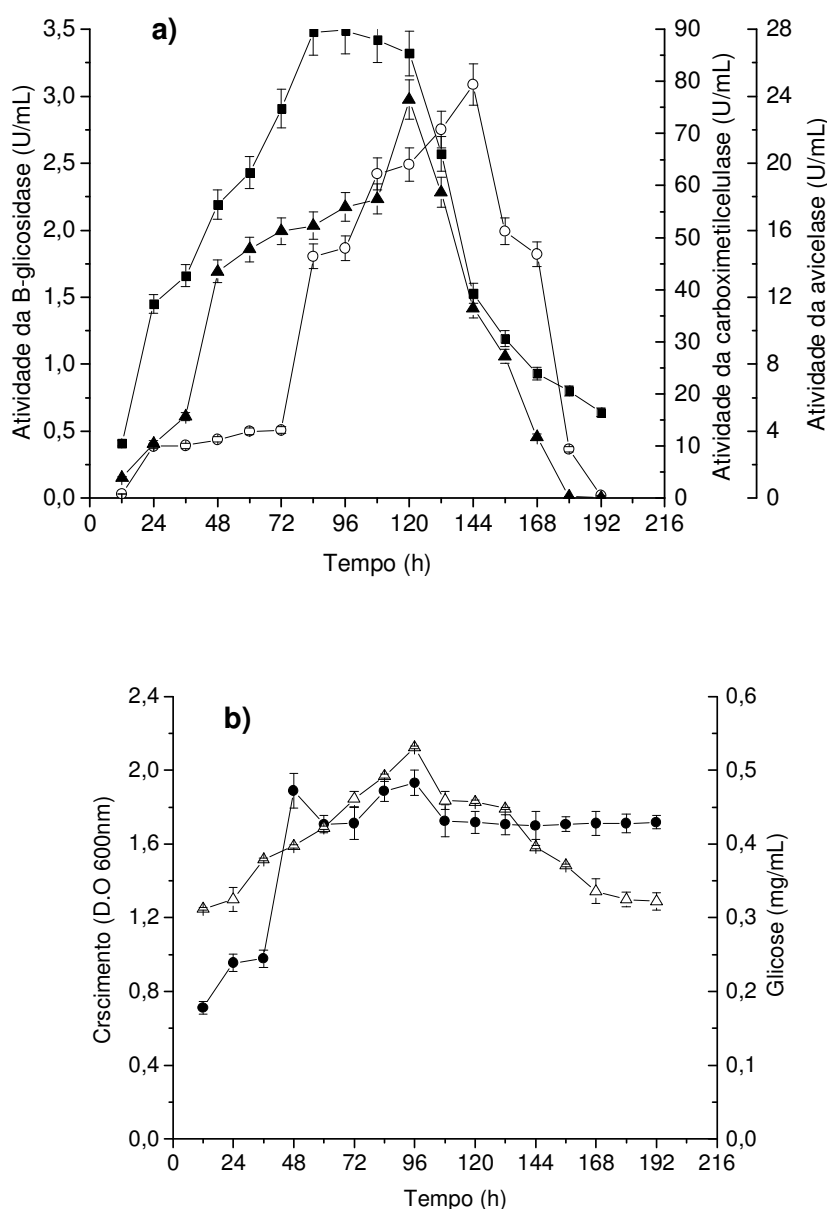


Figura 17. Gráfico (a): atividade do complexo enzimático, carboximetilcelulose (\circ), avicelase (\blacktriangle) e β -glicosidase (\blacksquare), secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2. Gráfico (b): crescimento (\bullet) e teores de glicose (Δ), quando cultivado em meio mineral contendo 0,5% de bagaço de cana tratado com o conjugado de hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio.

A máxima atividade da avicelase foi alcançada após 120 horas de crescimento do microrganismo e a máxima atividade da β -glicosidase após 72 horas. O crescimento do microrganismo foi iniciado logo após a incubação da cultura e alcançou a máxima densidade ótica em 96 horas. Um mesmo perfil dos teores de açúcares redutores foi encontrado em comparação aos meios de cultura em que se utilizou o bagaço tratado com sódio ou cálcio.

5. CONCLUSÕES

Bacillus sp SMIA-2 secretou carboximetilcelulase e avicelase quando cultivado em um meio de cultura contendo como fonte de carbono carboximetilcelulose e avicel, respectivamente.

A utilização do bagaço de cana de açúcar como substrato no meio de cultura (em substituição a carboximetilcelulose e avicel) induziu a síntese das enzimas carboximetilcelulase, avicelase e β -glicosidase. Os níveis de atividade encontrados foram inferiores aqueles observados quando carboximetilcelulose e avicel foram utilizadas como fonte de carbono no meio.

O pré-tratamento do bagaço de cana com uma combinação dos álcalis Ca(OH)_2 e NaOH foi o que causou uma maior quebra na estrutura da fibra, observada pela microscopia eletrônica de varredura.

Os níveis de atividade da avicelase foram similares para os três tratamentos utilizados. Já para a carboximetilcelulase os maiores níveis foram encontrados quando o bagaço foi tratado com Ca(OH)_2 e com Ca(OH)_2 em combinação com NaOH. Os maiores níveis de atividade da β -glicosidase foram encontrados para o tratamento do bagaço com NaOH.

As enzimas carboximetilcelulase, avicelase e β -glicosidase foram produzidas por *Bacillus* sp SMIA-2 de maneira indutiva quando em contato com o substrato celulolítico.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Adsul, M.G.; Ghuleb, J.E.; Singhb, R.; Shaikhb, H. (2005) Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v.62, p.6-10.
- Andrade, M. V. V. (2009) Otimização de um Meio de Cultura para a Produção de Poligalacturonases pelo Termofílico *Bacillus* Sp. Smia-2 e Propriedades da Enzima. Tese (Mestrado em Produção vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 98p.
- Aquino, A.C.M.H. (2000) Purificação e determinação de propriedades bioquímicas das atividades da glucoamilase e α -amilase produzidas pelo fungo termofílico *Scytalidium thermophilum* 15.1. Tese (Mestrado em Biologia comparada)-Ribeirão Preto-SP,FFCLRP/USP,121P.
- Arunanandaa, K.; Varga, G.A.; Akin, D.E.; Rigsby, L.L.; Royse, D.J. (1995) Botanical fractions of rice straw colonized by white-rot fungi: changes in chemical composition and structure. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 55:179-199.
- Azevedo, J.L. (2004) Genética de fungos. In: ESPÓSITO, E. Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul. Educs, Cap. 5, p. 173-214.

- Badhan, A.K.; Chadha, B.S.; Kaur, J.; Saini, H.S.; Bhat, M.K. (2007) Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresource Technology*. v. 98, p. 504- 510.
- Banerjee, R.; Pandey, A. (2002) Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: a technological perspective. *International Sugar Journal*. Glamorgan, V. 104, n.1238.
- Baudel, H.M. (2006) Pré-tratamento e hidrólise. In: Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para produção de etanol, Projeto Programa de Pesquisas em Políticas Públicas. Campinas. Disponível em: <http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Baudel%20Apreenta%E7%E3o.pdf>. Acesso em: 20 janeiro de 2010.
- Bayer, E.A., Lamed. R. (1992) The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Biodegradation* 3: 171-188.
- Béguin, P. (1990) Molecular Biology of Cellulose Degradation. Annual Reviews in Microbiology, *Annu. Rev. Microbiol.* 44:219-48.
- Bhat, M.K. (2000) Cellulase and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, New York, v. 18, p. 355-383.
- Bhat, M. K.; Bhat, S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 15: 585–620.
- Burgi, R. (1995) Utilização de resíduos culturais e de beneficiamento de na alimentação de bovinos. *Anais do 6º simpósio sobre nutrição de bovinos da FEALQ*. Piracicaba-SP: FEALQ, 1995. p. 153-169.
- Caraschi, J.C. (1997) Estudo das relações estrutura/propriedades de carboximetilcelulose obtida por derivatização de polpa de bagaço de canade – açúcar (Doutorado em Física) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 188p.

- Caraschi, J.C.; Campana Filho, S.P.; Curvelo, A.A.S. (1996) Preparação e caracterização de polpas para dissolução, obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.31, p.24-29.
- Carvalho, G.B. M. et al. (2005) Estudos do hidrolisado de eucalipto em diferentes concentrações utilizando evaporação a vácuo para fins fermentativos. *Revista Analyca*, 14, p. 54-57.
- Chandel, A.K.; Es, C.; Rudravaram, R.; Narasu, M.L.; Rao, L.V.; Ravindras, P. (2007) Economics and environmental impacts of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, Nairobi, v. 2, p. 14-32, 2007.
- Cowling, E.B.; Kirk, T.K. (1976) Properties of cellulose and lignocellulose materials and substrats for enzymatic conversion processes. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6:95-123.
- Cunha, M.A.A.; Solva, S.S.; Carvalho, W.; Santos, J.C. (2005) Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para a produção de xilitol a partir do bagaço de cana de açúcar. *Ciências Agrícolas*, Terezina, v. 26, p. 61-70.
- Delatorre, A. B.; Andrade, M. V. V.; Ladeira, S. A.; Perez, V. H.; Martins, M. L. L. (2009) Utilização De Resíduos Agroindustriais Para A Produção De Proteases Por Fermentação Submersa Usando O Termofílico *Bacillus* sp Smia-2. *Ciências e Cultura*. Vol. 04, n. 1, p. 41-48
- Dillon, A. (2004) Celulases. *In: Said, S.; Pietro, R.C.L. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa*, p. 243-270.
- Egorova K. e Antranikian G. (2005) Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 649-655.

- Esposito, E.; Azevedo, J.L. (2004) Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Ed. Educs.
- Faaij, A.P.C. (2006) Bio-energy in Europe: changing technology choices. *Energy Policy*, n. 34, p. 322-342.
- Farinas, C. S.; Lemo, V.; Zúñiga, U. F. R.; Neto, V. B.; Couri, S. Avaliação de Diferentes Resíduos Agroindustriais como Substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2009
- Ferreira, A.; Hanna, R.K.; Lebrão, G.W.; Lebrão, S.M.G.; Nagashi, L.; Su, M.T.; Vicentini, T. (2006) Avaliação de compósito de poliéster e fibra de cana-de-açúcar. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais. *Anais Foz do Iguaçu*. Foz do Iguaçu.
- Gomes, E.; Guez M.A.U.; Martin, N.; Silva, R. (2007) Enzimas termostáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*. Vol 30, nº1.136-145.
- Haki, G.D.; Rakshit, S.K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89:17-34.
- Hamelinck, C.N.; Hooijdonk, G.V.; Faaij, A.P.C. (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. *Biomass and Bioenergy*, n. 28, p.384-410.
- Hofrichter, M. (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. New York, v. 30, p. 454-466.
- Joo,H.S.;Chang,C.S.(2006). Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaophilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergentadditive. *Enzyme and Microbial Technology*, 38:176–183.

- Jung, H.G.; Buxton, D.R.; Hatfield, D.R.; Mertens, D.R.; Weimer, P.J. (1996) Improving forege fibre digestibility. *Feed Mix*, 4, 30-34.
- Jurgen, A. (2001) A aplicação das celulases em processos de desbotamento. *Química têxtil*. n. 64, p. 5-17.
- Kona, R.P.; Qureshi, N; Pai, J.S.(2001) Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technology*, 78:123-126.
- Kubicek, C.P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R.L.; Kubicek-Pranz, E.M. (1993) The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 90-99.
- Ladeira, S. A.; Andrade, M. V. V.; Delatorre, A. B.; Perez, V. H.; Martins, M. L. L. (2010). Utilização De Resíduos Agroindustriais Para A Produção De Proteases Pelo Termofílico *Bacillus* sp em Fermentação Submersa: Otimização Do Meio De Cultura Usando A Técnica De Planejamento Experimental. *Química Nova* (online). Vol. 33, N^o. 2, p. 324-328.
- Ladeira, S. A. (2009). Otimização de um Meio de Cultura Para a Produção de Proteases por *Bacillus* sp. Smia-2 e Propriedades da Enzima. Tese (Mestrado em Produção vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 108 p.
- Lee, K.; Moon, S.H. (2003) Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 102, p. 261-268.
- Lima, R.C.A.; Lima, J.A.A.; Souza Jr, M.T. Pio-Ribeiro, G.; Andrade, G.P. (2001a) Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 26: 689-702.

- Lima, U.A.; Basso, L.C.; Amorim, H.V., (2001b) Produção de etanol. In: Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. (Ed.) *Biotechnology Industrial*, São Paulo: Edgard Blücher LTDA, cap. 1, p. 11- 20.
- Liu, J.; Qian, L.; Wessells, R.J.; Bidet, Y.; Jagla, K.; Bodmer, R. (2006) Hedgehog and RAS pathways cooperate in the anterior-posterior specification and positioning of cardiac progenitor cells. *Dev. Biol.* 290(2): 373--385.
- Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; Van Zyl, W.H.; Pretorius, I.S. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews. American Society for Microbiology.*, n.3, v.66., p.506-577.
- Lynd, L.R., Baskaran, S.; Casten, S. (2001) Salt accumulation associated with KOH added for pH control, and not ethanol, limits growth of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* HG-8 at elevated feed xylose concentrations in continuous culture. *Biotech. Prog.* 17:118–125.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (1996) Brock: Biology of microorganisms. Prentice – Hall, *Upper Saddle River*, NJ.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M.K. (2000). Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 34 (3): 461-488
- Medeiros, A. B. P., Pandey, A., Freitas, R. J. S., Christen, P., Soccol, C. R. (2000) Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v. 6, 33-39.
- Menezes, T.J.B.; Hennies, P.T. (1991) Influência do prétratamento do bagaço de canadeaçúcar com peróxido alcalino e hidróxido de sódio no sistema celulolítico de *A. niger*. *Coletânea do ITAL*, v.21, n. 2, p. 213219.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v.31, n.3, p.426-429.

- Mosier, N. et al. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biomass Technology*, n. 96, p. 673-686.
- Mukherjee, A.K.; Adhikari, H.; Rai, S.K.(2008) Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata* cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*, 39:353–361.
- Murphy, J.D.; Mccarthy, K. (2005) Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. *Applied Energy*, n. 82, p. 148-166.
- Nascimento, W. C. A., Martins, M. L. L. (2004) Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.*, 35:91-96.
- Nogueira, A.M.P.; Venturini Filho, W.G. (2005) *Aguardente de cana*. Dissertação. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu,
- Nunes, A.S.; Martins, M.L.L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:p. 271-275.
- Onnerud, H.; Zhang, L.; Gelerstedt, G.; Henriksson, G. (2002) polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation. *The Plant Cell, Rockville*, v. 14, p. 1953-1962.
- Pal, M., Calvo, A. M., Terrón, M. C., González, A. E., (1995). Solid-state fermentation of sugarcane bagasse with *Flammulina velutipes* and *trametes versicolor*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11, pp.541-545.
- Pandey, A.; Soccol, C.R. (2000) Economic utilization of crop residues for value addition: a futuristic approach. *Journal of Scientific & Industrial Research*,v. 59, p. 12–22.

- Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Soccol, V. T.; Vandenberghe, L. P. S.; Mohan, R. (2000b) Technological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresouce Technology*, Amsterdam 74:81-87.
- Pereira, R.E. (2006) Avaliação do Potencial Nacional de Geração de Resíduos Agrícolas para a Produção de Etanol. Dissertação (Mestrado em Ciências) - *Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ*, Rio de Janeiro.
- Pires, A.J.V.; Garcia, R.; Valadares Filho, S.C. et al. (2004) Degradabilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratado com amônia anidra e, ou, sulfeto de sódio. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.4, p.1071-1077.
- Pölönen, I. (2000) Preservation efficiency of formic acid and benzoic acid in the ensiling of slaughterhouse by-products and their subsequent metabolism in farmed fur animals. Helsinki: Faculty of Agriculture and forestry of the University of Helsinki. *Academic dissertation Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki*. 63p.
- Radford, S.J.E.; Downes, D.; Solomon, P.M.; Barrett, J.; Sage, L.J. (1996) *Astron. J.* 111:1021-4.
- Ramos, L.P. (2003) The Chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, p. 863-871.
- Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 62, no. 3, p. 597-635.
- Reddy, G.V.; Babu, R.; Komaraiah, P.; Roy, K.R.R.M.; Kothari, I.L. (2003) Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P.ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process of Biochemistry*, 38:1457-1462.

- Rivas, B.; Moldes, A.B.; Dominguez, J.C. (2004) Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *Inter.J of Food Microbiol.* 97:93-98.
- Ruegger, M.J.S.; Tauk-Tornisielo, S.M. (2004) Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. *Revista Brasileira de Botânica*, n.2, v.27, p.205-211.
- Sandgren, M.; Sahlberg, J.; Mitchinson, C. (2005) Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Bioph. Mol. Biol.* 89: 246-291.
- Sakai, K.; Yokota, A.; Kurokawa, H.; Wakayama, M.; Moriguchi, M. (1998) Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH – 1, isolated from chitin – containing compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3397-3402.
- Schallmeyer, M., Singh, A.; Ward, O.P. (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for Industrial Production, *Canadian J. Microb.*, 50, 1-17.
- Silva, D.; Felix, E.; Fischer, G.; Tavares, L.B.B. Biodegradação de resíduos por *Lentinus edodes* para produção de uma enzima xilanolítica. In: Melo, I.S.; Scramin, S.; Silva, C.M.M.S.; Spessoto, A. Workshop sobre Biodegradação, Campinas : Embrapa, 2001.
- Silva, C.R.; Delatorre, A.B.; Martins, M.L.L. (2007) Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian J. Microbiology*, 38:253-258.
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. S. (2003) Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, 205-218.

- Solis-Pereyra, S., Favela-Torres, E., Gutiérrez-rojas, M., Saucedo-Castañeda, G., Gunaseparan, P., Viniegra-González, G., (1996) Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 12, pp.257-260.
- Sjöström, Ch. (1992) Durability and sustainable use of building materials. *In: Sustainable use of materials. J.W. Llewellyn & H. Davies editors. London BRE/RILEM.*
- Sneath, P.H.A. (1986) Endospore – forming Gram positive rods and cocci. *In: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; Holt, J.G. (Eds.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1105-1139.*
- Sonnleitner, B., (1983) Biotechnology of thermophilic bacteria – growth, products and application, 70-137.
- Suda, C.N.K., Giorgini, J.F. (2003) Multiple forms of endo-1,4- β glucanases in the endosperm of *Euphorbia heterophylla* L. *J. Experim. Bot.* 54 (390): 2045-2052.
- Sun, Y.; Cheng, J. (2002) Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural residues for ethanol production. Proceedings of 2002 ASAE Annual International Meeting / CIGR XVth World Congress, July 28-31, Chicago, Illinois, USA. Paper nº. 02-6198.
- Tanaka, K.T.; Kawaguchi, Y.; Imada, T.; Arai, M. (1995) Purification and properties of cellobiose phosphorylase from *Clostridium thermocellum*. *J. Ferment. Bioeng.* 79:212–216.
- Thiemann, J.E.; Xavier, M.S.S.P.; Colen, G.; Guia, M.M. (1980) Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. *In Fermentações Industriais e Transformações Microbianas no solo (coord.: Furtado, J.S.). Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo, p.168-185.*

- Tita, S.P.S.; Paiva, J.M.F.; Frollini, E. (2002) Resistência ao impacto e outras propriedades de compósitos lignocelulósicos: matrizes termofixas fenólicas reforçadas com fibras de bagaço, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 228-239.
- Triana, O.; Leonard, M.; Saavedra, F.; Fernández, N.; Gálvez, G.; Peña, E. (1990) Atlas del bagazo de la caña de azúcar. México: GEPLACEA/ ICIDCA.
- União da Agroindústria Canavieira de São Paulo – ÚNICA. (2008) Disponível em <http://www.portalunica.com.br>. Acesso em: 15 janeiro de 2009.
- Uzawa, T.; Yamagishi, A.; Oshima, T. (2000) Polypeptide synthesis directed by DNA as a messenger in cell – free polypeptide synthesis by extreme thermophiles, *Thermus thermophilus* HB27 and *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*. 121(6): 840-852.
- Uenojo, M; Pastore, G.M.(2007) Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, 30:388-394.
- Van Soest, P.J. (1994) Nutritional ecology of the ruminant. Ithaca: *Cornell University Press*. 476p.
- Van Soest, P.J. (1963) Use of detergents in the analysis of fibrous feed II. A rapid method for determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Agriculture Chemistry*, London, v. 46, n. 5, p. 829-35.
- Wang, F.; Podell, E.R.; Zaug, A.J.; Yang, Y.; Baciú, P.; Cech, T.R.; Lei, M. (2007) The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor, *Nature*, v.445, p.506-510.
- Zamost, B. L.; Nielsen, H.K; Starnes, R.L. (1991). Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*, 8:71-82.
- Zhang, P.; Himmel, M.E.; Mielenz, J.R. (2006) Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. 24, 452-481.