



ANGÉLICA CRISTINA DE SOUZA

**UTILIZAÇÃO DE CELULASES DE
LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO DE
BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

LAVRAS – MG

2011

ANGÉLICA CRISTINA DE SOUZA

**UTILIZAÇÃO DE CELULASES DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO
DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Disney Ribeiro Dias

Coorientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS – MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Souza, Angélica Cristina de.

Utilização de celulasas de leveduras para produção de bioetanol de segunda geração / Angélica Cristina de Souza. – Lavras : UFLA, 2011.

89 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Disney Ribeiro Dias.

Bibliografia.

1. Enzimas. 2. Pré-tratamento. 3. Hidrólise enzimática. 4. Etanol.
5. Biocombustível. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.62

ANGÉLICA CRISTINA DE SOUZA

**UTILIZAÇÃO DE CELULASES DE LEVEDURAS PARA PRODUÇÃO
DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2011.

Dra. Rosane Freitas Schwan UFLA

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista UFLA

Dr. Disney Ribeiro Dias
Orientador

LAVRAS – MG

2011

À memória do meu pai, Jorge.

A minha mãe, Vera.

Ao meu irmão, Thiago.

A minha tia Bel.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, a oportunidade de realizar mais um sonho e por me conceder força em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia.

Ao professor Dr. Disney Ribeiro Dias, pela orientação, amizade e confiança.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pelos ensinamentos e confiança.

À professora Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista, pelo apoio e contribuição para a concretização deste trabalho.

Aos professores doutores Eustáquio, Romildo e Patrícia, pelos valiosos ensinamentos.

A Cíntia, pela ajuda na identificação molecular.

Ao Whasley e Juliana, pela contribuição na realização das análises cromatográficas.

A Amanda Rodrigues, pelo apoio na realização da microscopia eletrônica de varredura.

Ao Departamento de Bioquímica da Escola de Engenharia de Lorena-USP, em especial ao professor Sílvio Silvério da Silva, pela ajuda na etapa de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Ao Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, em especial a Tina, pelas análises das amostras.

À FAPEMIG, pela concessão de bolsa de estudos.

Aos pós-doutorandos Carla, Simone, Ligiane e Euziclei.

Aos colegas de laboratório Kelly, Dani, Larissa, Amanda, Francesca, Cíntia, Vanessa, Gabi, Alenir, Monique, Emerson, Maiara, Thiago, Bia, Mariana Dias, Mariana Rabelo, Claudia, Ana Luiza, Noelly, Sarita, Leandro, Marcela,

Milena, Mariana Lino e Gilberto, pelo carinho e pelos momentos de descontração. Carol Collela e meninas do “Bic”, Jéssica e Emilly, pela enorme força. Em especial, à doutoranda Fernanda Paula, pela confiança e amizade e por ter sido fundamental na realização deste trabalho.

A todos os funcionários envolvidos no nosso dia a dia de trabalho. Especialmente a Ivani, Cidinha, Paulinho, Rose, Dona Irondina, Sandra e Du.

Agradeço a minha querida mãe, Vera, fundamental em minha vida, pelo amor incondicional; ao meu irmão, Thiago, e a meus tios e primos, que sempre estiveram ao meu lado, pelo eterno amor e carinho.

Ao querido professor de biologia Waldimir, pelo incentivo e amizade sempre.

Às amigas de república Mari, Ju, Kátia e Nelly, pela convivência e momentos de descontração. Ao amigo Jessé, pela alegria contagiante e pelo incentivo em diversos momentos. Ao Romário, pelo carinho e apoio constante.

Às especialíssimas amigas Aline, Amanda Ávila, Amanda Rodrigues, Carlinha, Fernanda Gandra, Kamila, Kedma e Mariana Junqueira, pelos momentos mais que divertidos, por todo carinho e amizade.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“Todas as obras do Senhor são boas;
Ele põe cada coisa em prática quando
chega o tempo”*

Eclesiástico 39:39

RESUMO

A produção de etanol lignocelulósico está emergindo como uma das tecnologias mais importantes para o desenvolvimento sustentável. Para a utilização desta biomassa é preciso contornar as barreiras físicas e químicas causadas pela associação coesa dos principais componentes da biomassa, os quais dificultam a hidrólise da celulose e hemicelulose a açúcares fermentescíveis. O pré-tratamento altera a estrutura lignocelulósica para facilitar a ação das enzimas e a hidrólise enzimática disponibiliza os açúcares para o processo de fermentação. Um dos fatores limitantes para a ampliação desta tecnologia é o alto custo das enzimas envolvidas neste processo. Este trabalho teve como principal objetivo o isolamento de leveduras celulolíticas do solo e a produção do extrato enzimático para avaliação da capacidade hidrolítica das enzimas sobre substrato lignocelulósico. Foram avaliadas leveduras isoladas do solo do cerrado e da região amazônica produtoras de celulase e as melhores selecionadas para a produção do extrato enzimático. Posteriormente avaliou-se a sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 diluído. Dentre as leveduras isoladas, 103 do cerrado mineiro e 20 da região Amazônica, 17,47% e 55%, respectivamente, foram produtoras de celulase. Os isolados selecionados para quantificação enzimática apresentaram atividade de β -glicosidase superior às atividades de endo e exoglucanase. O extrato enzimático utilizado promoveu a conversão da celulose de aproximadamente 16%, após 72 horas de hidrólise enzimática. Os resultados aqui apresentados ressaltam a importância em isolar estirpes microbianas, produtoras de enzimas de interesse biotecnológico, tendo em vista sua grande área de aplicação na produção de biocombustível.

Palavras-chave: Leveduras. Celulase. Pré-tratamento. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

The production of lignocellulosic ethanol is emerging being an important technology for the sustainable development. For the utilization of the lignocellulosic material is necessary change in the physical and chemical barriers of the cohesive association of the main components of biomass, that difficult the hydrolysis of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars. The pretreatment changes the lignocellulosic structure in order to facilitate the enzyme activity and therefore generate sugars for the fermentation process. One of the factors that limited the enlargement of this technology is the high cost of the microbial enzymes involved in this process. The objectives of this work were the isolation of cellulolytic yeast from soil and evaluate the hydrolytic capacity of microbial enzymes in the lignocellulosic substrate. Cellulolytic yeasts were isolated from soil of Brazilian savannah and Amazon region. The enzymatic saccharification of sugar cane bagasse pretreated with diluted sulfuric acid (H_2SO_4) was also evaluated. A total of 123 yeast was isolated, 103 from Cerrado and 20 from Amazonia region, and 17.47% and 55% were cellulose producer, respectively. The better isolate was selected to enzyme quantification and presented β -glycosidase activity higher than endo and exoglucanase activities. The enzymatic extract was efficient to convert 16% of cellulose approximately after 72 hours of incubation. The results showed the importance of isolating indigenous microbial strains able to produce enzymes of biotechnology interest, such as biofuel production.

Keywords: Yeast. Cellulose. Pretreatment. Enzymatic hydrolyze.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Processo para produção de bioetanol	16
2.2	Microrganismos fermentadores	17
2.3	Bioquímica da fermentação	19
2.4	Matérias-primas para a produção de etanol	21
2.5	Substratos alternativos para produção de etanol	23
2.6	Composição da parede celular vegetal	25
2.7	Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	28
2.8	Mecanismos de hidrólise enzimática	30
2.8.1	Degradação enzimática da celulose	30
2.8.2	Degradação enzimática da hemicelulose	32
2.8.3	Degradação enzimática da lignina	33
2.9	Microrganismos celulolíticos	33
	REFERÊNCIAS	37
	CAPÍTULO 2 Utilização de celulasas de leveduras para produção de bioetanol de segunda geração	44
1	INTRODUÇÃO	46
2	MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1	AMOSTRAGEM	50
2.2	Isolamento de leveduras	51
2.3	Atividade enzimática qualitativa	52
2.4	Atividade enzimática quantitativa	53
2.4.1	Atividade de exo β-1,4 glucanase (EC 3.2.1.91)	54
2.4.2	Atividade de endo β-1,4 glucanase (EC 3.2.1.4)	55
2.4.3	Atividade de β-glicosidase (EC 3.2.1.21)	55
2.4.5	Dosagem de proteínas totais	56
2.5	Análise estatística	56
2.6	Identificação molecular de leveduras produtoras de celulase	57
2.7	Avaliação da capacidade hidrolítica das enzimas sobre substrato lignocelulolítico	57
2.7.1	Bagaço de cana-de-açúcar	57
2.7.2	Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído ...58	58
2.7.3	Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar	58
2.7.4	Análises cromatográficas	59
2.7.5	Caracterização estrutural do bagaço de cana-de-açúcar, por microscopia eletrônica de varredura	60

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.1	Isolamento de leveduras	61
3.2	Atividade enzimática qualitativa	62
3.3	Identificação molecular de leveduras produtoras de celulase	67
3.4	Atividade enzimática	70
3.5	Avaliação da capacidade hidrolítica das enzimas sobre substrato lignocelulolítico	73
3.5.1	Composição química e pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	73
3.5.2	Hidrólise enzimática	76
3.5.3	Caracterização estrutural do bagaço de cana-de-açúcar, por microscopia eletrônica de varredura	78
4	CONCLUSÕES	81
5	PERSPECTIVAS FUTURAS	83
	REFERÊNCIAS	84

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios para a sociedade do século XXI é atender à crescente demanda de energia para transporte, aquecimento e processos industriais, além de fornecer matéria-prima para a indústria de forma sustentável.

A utilização de combustíveis renováveis tem despertado interesse cada vez maior em todo o mundo. Além de reduzir a dependência externa de petróleo e os gastos com energia, o uso de tais combustíveis resulta em uma diminuição significativa das emissões de gases tóxicos para a atmosfera. Esse último aspecto constitui um apelo cada vez maior para a utilização de fontes renováveis de energia, como os chamados "biocombustíveis".

A produção de etanol foi introduzida em escala industrial no Brasil e nos Estados Unidos e já é comercializado a preços competitivos. Além disso, tecnologias como a dos carros biocombustíveis tendem a aumentar ainda mais a sua utilização.

A importância do etanol na matriz energética do Brasil é crescente e impulsionada pelo fato de representar uma forma renovável e menos poluente do que o petróleo. O Brasil vem, desde 1975, com o início do ProÁlcool, desenvolvendo tecnologias nos diversos segmentos da indústria sucroalcooleira, com ganhos expressivos em rendimento e eficiência. De todas as opções disponíveis, o etanol da cana-de-açúcar (bioetanol) é o maior sucesso comercial dos combustíveis de biomassa em produção atualmente.

O bioetanol é produzido quase que exclusivamente de matérias-primas açucaradas, como cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino e melações ou matérias amiláceas e feculentas, como grãos amiláceos, raízes e

tubérculos, utilizando, geralmente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para realizar a fermentação.

Atualmente, há um grande interesse na utilização de recursos renováveis. Por este motivo, estão sendo cada vez mais estudados métodos que utilizam resíduos agrícolas para a obtenção de produtos com grande valor agregado. Os excedentes da indústria de cana-de-açúcar, como o bagaço e a palha, que não são queimados para a obtenção de energia, constituem um problema ambiental e, ao mesmo tempo, uma fonte renovável de recursos. O biocombustível produzido de material lignocelulósico, também chamado de bioetanol de segunda geração, pode apresentar vantagens energéticas, econômicas e ambientais, e vem sendo estudado como fonte de açúcares fermentáveis para a produção de etanol, devido à sua grande disponibilidade e baixo custo.

Um dos grandes desafios para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica é contornar as barreiras físicas e químicas causadas pela associação coesa dos principais componentes da biomassa (celulose, hemicelulose e lignina), os quais dificultam a hidrólise da celulose e hemicelulose a açúcares fermentescíveis.

Em geral, para o bom aproveitamento da biomassa lignocelulósica, são necessárias as seguintes etapas: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e separação/purificação de produtos.

Diversas estratégias de pré-tratamento têm sido empregadas para a conversão da biomassa lignocelulósica e podem ser físicas, químicas ou biológicas ou, ainda, uma combinação deles. O objetivo do pré-tratamento é alterar a estrutura lignocelulósica, para facilitar a ação subsequente das enzimas. Cada pré-tratamento tem um efeito na fração de celulose, hemicelulose e lignina.

A hidrólise utilizando enzimas adequadas representa mais um método eficaz para liberar os açúcares a partir de materiais celulósicos. Um fator

limitante para a ampliação desta tecnologia é o alto custo das enzimas envolvidas no processo, o que torna a busca por novas fontes de biomoléculas capazes de contribuir para a produção de bioetanol a partir de resíduos agroindustriais algo de grande interesse. Nesse contexto, é importante ressaltar a necessidade em isolar estirpes microbianas, produtoras de enzimas de interesse biotecnológico, tendo em vista sua grande área de aplicação na produção de biocombustível.

Este trabalho foi realizado com os principais objetivos de: promover o isolamento de leveduras do solo produtoras de enzimas celulolíticas; selecionar os melhores isolados para a produção do extrato enzimático e avaliar a capacidade hidrolítica das enzimas sobre substrato lignocelulósico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O mundo enfrenta o progressivo esgotamento de sua energia, principalmente com base nos recursos não-renováveis de combustíveis. A utilização intensiva de combustíveis fósseis tem levado ao aumento na geração de gases poluentes liberados na atmosfera, o que tem causado mudanças no clima global (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

A preocupação maior para a segurança do abastecimento de petróleo e o impacto negativo dos combustíveis fósseis no ambiente têm pressionado a sociedade para encontrar alternativas de combustíveis renováveis (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Os biocombustíveis, definidos como qualquer combustível de origem biológica, desde que não seja combustível fóssil, especialmente o etanol e o biodiesel, surgem como alternativa com capacidade de competir no mercado com combustíveis derivados do petróleo (CARDONA; SANCHEZ, 2006). Um esforço global para desenvolver fontes de energia sustentáveis tem sido feito, a fim de preservar os recursos naturais e diminuir os efeitos das emissões de CO₂ (MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009).

O etanol é, ainda, um dos mais importantes produtos originários da indústria biotecnológica. Dois terços da produção mundial de etanol combustível estão localizados no Brasil e nos Estados Unidos. A expectativa deste mercado é a de que ocorra crescimento substancial na produção de etanol para um futuro próximo. Existem fortes incentivos econômicos para incrementar os processos de produção de etanol (NISSEN et al., 2000).

De acordo com Kadam (2002), o etanol pode ser produzido de duas formas: mediante a fermentação direta de mostos açucarados ou mediante a hidrólise e a fermentação de amido ou material celulósico contido na biomassa.

2.1 Processo para produção de bioetanol

No Brasil, as indústrias de açúcar e de álcool estiveram sempre intimamente ligadas, desde o tempo do descobrimento. Deduz-se que a produção de álcool iniciou-se na capitania de São Vicente, onde foi montado o primeiro engenho de açúcar do país, em 1532. Por meio dele, transformava-se o melaço residual da fabricação do açúcar em cachaça e, diretamente da garapa fermentada, produzia-se aguardente. Por séculos as bebidas destiladas foram o único álcool produzido (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

O grande investimento do Brasil na tecnologia de produção de etanol ocorreu na década de 1970, quando o país se viu obrigado a buscar substitutos para os combustíveis derivados de petróleo, devido à crise energética mundial da época. Hoje, o Brasil é o país com maior ou mais avançada tecnologia de processo fermentativo alcoólico do mundo e tem mercado garantido, devido à adição do álcool anidro à gasolina e ao desenvolvimento do motor multicomcombustível (MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009).

A obtenção do álcool por meio de fermentação ocorre em três etapas fundamentais: o preparo do substrato, a fermentação e a destilação. A primeira fase é o tratamento da matéria-prima para a extração dos açúcares fermentescíveis e é distinto para os diferentes materiais utilizados. A fermentação é a etapa de transformação dos açúcares em etanol e dióxido de carbono. Enfim, a destilação consiste em duas operações: a primeira refere-se à retirada de uma mistura hidroalcoólica impura do fermentado e a segunda, na purificação dessa mistura (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

A cana-de-açúcar é a matéria-prima de maior importância econômica para a produção de etanol (ZANIN et al., 2000). No Brasil, este processo industrial de produção de álcool combustível emprega o caldo da cana ou melaço (subproduto da fabricação do açúcar), como substratos misturados em

diferentes proporções, em batelada alimentada ou sistema contínuo, ambos com reutilização de células de leveduras (WHEALS et al., 1999).

2.2 Microrganismos fermentadores

A fermentação industrial é normalmente realizada pelos microrganismos mesofílicos, como bactérias dos ácidos lático e acético, fungos e diferentes cepas de leveduras. Embora algumas bactérias termofílicas tenham sido relatadas por serem úteis na fermentação do etanol (em especial *Zymomonas mobilis*), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada em processos para produção de álcool combustível (ABDEL-BANAT et al., 2010). *S. cerevisiae* é o microrganismo mais utilizado para fermentação e produção industrial de etanol. É capaz de fermentar glicose, manose, frutose e galactose, em anaerobiose e condições ácidas de pH (WALKER, 1998); (VAN MARIS et al., 2006).

A levedura *S. cerevisiae* é conhecida há milhares de anos e é rotineiramente utilizada em muitos processos biotecnológicos tradicionais, incluindo panificação e produção de várias bebidas alcoólicas. Conseqüentemente, tem sido extensivamente estudada e, assim, é considerada um sistema modelo para análises do metabolismo, em biologia molecular e estudos genéticos dos organismos eucariotos (BADOTTI et al., 2008).

A importância industrial das leveduras vem se estendendo além da fermentação tradicional. Atualmente, os produtos da biotecnologia a partir das leveduras afetam muitos setores comerciais importantes, como as indústrias de alimentos, bebidas, biocombustíveis, produtos químicos, enzimas para aplicações industriais, produtos farmacêuticos e agrícolas. Prevê-se que a produção tradicional de álcool etílico, por indústrias cervejeiras, vinícolas, indústrias de bebidas destiladas e de combustíveis, continuará a fornecer a maior quantidade de produtos fermentados do mundo. Esta suposição está baseada no

fato de que a levedura *S. cerevisiae* é responsável pela produção dos principais produtos de fermentação (PRETORIUS; TOIT; RENSBURG, 2003).

Uma das limitações de utilizar somente *S. cerevisiae* na produção de bioetanol a partir de material lignocelulósico é que ela não apresenta habilidade para utilizar pentoses como xilose e arabinose (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). Porém, se a xilose for convertida a xilulose por meio da enzima xilose isomerase, *S. cerevisiae* pode fermentar a xilulose a etanol. Outra maneira de utilizar xilose por *S. cerevisiae* é pelo desenvolvimento de linhagens recombinantes com genes que codifiquem as vias enzimáticas para utilização da xilose (MATSUSHIKA et al., 2009).

Certas leveduras, como *Pichia stipitis*, *P. segobiensis*, *Candida tenuis*, *C. shehatei* e *Pacchysolen tannophilus*, são capazes de fermentar xilose a etanol, devido à dupla especificidade das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase (TOIVOLA et al., 1984). As taxas de etanol, no entanto, são mais baixas, quando comparadas às da fermentação de glicose por *S. cerevisiae* (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008)

Dentre as leveduras que fermentam xilose, *P. stipitis* configura-se como a mais promissora para aplicação industrial, uma vez que fermenta xilose a etanol com elevado rendimento (CHO et al., 2010).

Além de *S. cerevisiae*, a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* também tem sido estudada para a produção de etanol em processos de sacarificação e fermentação simultâneos, devido à sua capacidade de crescer e fermentar glicose com bom rendimento de etanol a temperaturas de 40°C (TOMÁS-PEJÓ et al., 2009).

Jamai et al. (2007) utilizaram a levedura *C. tropicalis* livre e imobilizada para a produção de etanol a partir do amido, relatando que apenas o pré-tratamento do amido com α -amilase foi suficiente para obter a fermentação completa por *C. tropicalis*.

Entre as bactérias produtoras de etanol, merece destaque a espécie *Zymomonas mobilis*, por apresentar atributos tecnológicos que potencializam o seu emprego na fermentação alcoólica em escala industrial e possuir habilidades promissoras de transformar açúcares em etanol e gás carbônico, em condições comparáveis àquelas exigidas pelas leveduras (SPRENGER, 1996).

Segundo Bai, Anderson e Moo-Young (2008), a bactéria *Z. mobilis* tem sido intensamente estudada, devido às suas características de alto rendimento de etanol e menor produção de biomassa. Embora *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* fermentem glicose a etanol rápida e eficientemente, elas não podem fermentar outros açúcares, como xilose e arabinose a etanol (SAHA, 2003). Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas visando obter novas estirpes microbianas que sejam capazes de fermentar uma ampla variedade de substratos e também, por meio da engenharia genética, desenvolver microrganismos que possam ser utilizados em processos inovadores para a produção de etanol.

2.3 Bioquímica da fermentação

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico que ocorre com a transformação de açúcares em etanol e CO₂ e envolve 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Este processo é realizado, principalmente, por leveduras, no citoplasma, com o objetivo de produzir energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas e, ainda, para seu crescimento e reprodução, sendo o etanol tão somente um subproduto desse processo (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Segundo Badotti et al. (2008), quando as leveduras crescem em anaerobiose ou em altas concentrações de açúcar, a fermentação é favorecida, pois o carbono excedente não direcionado para a respiração é metabolizado pela enzima piruvato descarboxilase. Já na presença de oxigênio, com baixa

concentração de açúcar, ou quando a captação de açúcar pelas células é lenta, o complexo da enzima piruvato desidrogenase direciona o fluxo glicolítico para a respiração.

A fermentação alcoólica é um processo de grande importância, realizado por vários microrganismos, pelo qual se obtém todo o álcool industrial e ampla variedade de bebidas alcoólicas, destiladas ou não (LIMA, BASSO; AMORIM, 2001). É composta por reações exotérmicas que liberam 23 a 24k cal por mol de glicose fermentado (REED; NAGODAWITHANA 1991).

O processo da fermentação alcoólica caracteriza-se como uma via catabólica, na qual há a degradação de moléculas de açúcar (glicose ou frutose), no interior da célula dos microrganismos (leveduras ou bactérias), até a formação de etanol e CO₂. A glicólise é a via central do catabolismo da glicose, sendo o piruvato o produto final desse processo, o qual pode seguir diferentes vias metabólicas: fermentação alcoólica, fermentação láctea e respiração por meio do ciclo de Krebs e cadeia respiratória. Na fermentação alcoólica, o piruvato é descarboxilado formando acetaldeído que, posteriormente, é reduzido a etanol (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Os microrganismos utilizam o açúcar para obter energia para suas funções vitais. Dessa forma, a biossíntese do álcool é uma consequência, e não uma finalidade, da fermentação. Ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, há formação de energia (trifosfato de adenosina, ATP), que será empregada na realização de vários trabalhos fisiológicos, tais como absorção, excreção e outros, além daqueles de biossíntese, necessários à manutenção da vida (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

2.4 Matérias-primas para a produção de etanol

O bioetanol pode ser produzido a partir de matérias-primas contendo açúcares fermentáveis como cana-de-açúcar e beterraba, que são ricos em sacarose. Além disso, o etanol também pode ser produzido a partir de alguns polissacarídeos que são hidrolisados para a obtenção de açúcares simples que podem ser convertidos a álcool etílico, como grãos amiláceos, raízes e tubérculos. Outra fonte para a produção de álcool é a partir da biomassa lignocelulósica (complexo de vários polissacarídeos), incluindo palhas, madeiras e resíduos agrícolas, que é a matéria-prima mais promissora, considerando a sua grande disponibilidade e baixo custo (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

O processo fermentativo é o mais viável, economicamente, para a produção de etanol, devido, principalmente, à grande variedade de matérias-primas naturais ricas em açúcares (sacarose, glicose, frutose e lactose), amiláceas (grãos de milho, mandioca, trigo, cevada, batata) e lignocelulósicas (resíduos agroindustriais e florestais) que podem, direta ou indiretamente, servir de substrato para a fermentação alcoólica (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008).

A produção de bioetanol de cana-de-açúcar pode se basear na fermentação tanto de caldo da cana direto quanto de misturas de caldo e melaço, como é mais frequentemente utilizado em regiões tropicais e países subtropicais. Em países europeus, melaço de beterraba é outra fonte de açúcares fermentáveis. Além dessas culturas, o sorgo sacarino tem sido frequentemente proposto como potencial fonte de matéria-prima (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

Segundo Goldemberg (2008), de todas as opções disponíveis, o etanol da cana-de-açúcar é o maior sucesso comercial dos combustíveis de biomassa em produção, atualmente. Este biocombustível tem balanço energético positivo e tem sido beneficiado pelo apoio de políticas governamentais em vários países,

inclusive no Brasil que, atualmente, abastece aproximadamente 40% do combustível para veículos de passeio (um terço da sua demanda total de energia para transporte) com etanol da cana-de-açúcar.

O sorgo sacarino tem sido motivo de investigação como fonte complementar de matéria-prima para a produção de etanol. Os seus colmos podem ser processados na mesma instalação destinada à produção de etanol de cana-de-açúcar, oferecendo também uma quantidade de resíduo fibroso (bagaço). Pode, portanto, ser uma cultura complementar à cana-de-açúcar para a produção de etanol (TEIXEIRA; JARDINE; BEISMAN, 1997).

A produção mundial de etanol não se restringe à utilização de matérias-primas açucaradas, como a cana-de-açúcar. Outras fontes de biomassa são aproveitadas em diversos países.

A maior parte do etanol produzido atualmente nos Estados Unidos utiliza o milho como matéria-prima e é responsável por 98% da produção desse biocombustível. Este país lidera a produção de milho em todo o mundo e responde por quase metade do volume produzido. O amido é o principal carboidrato armazenado no milho, compreendendo 70%-72% do peso seco dos grãos (BOTHAST; SCHLICHER, 2005).

Ao contrário do que ocorre com o uso do caldo de cana-de-açúcar, a produção de etanol do amido envolve uma etapa de pré-tratamento deste material a açúcares fermentáveis.

O processo de produção de álcool de milho é similar ao processo fermentativo de caldo de cana-de-açúcar. As principais diferenças estão no preparo da matéria-prima e no sistema de fermentação. No caso da cana, o açúcar para fermentação está no seu colmo, sendo necessária apenas a extração. No caso da produção de etanol a partir de materiais amiláceos, é preciso converter o amido em açúcares simples para depois fermentá-lo, o que é feito por meio da cocção e hidrólise enzimática, pela combinação de duas enzimas α -

amilase e glicoamilase, antes de ser fermentado pela levedura (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

2.5 Substratos alternativos para produção de etanol

Toda a produção mundial de biocombustíveis se baseia, hoje, nas chamadas tecnologias de primeira geração, o que significa produção de etanol a partir de carboidratos, principalmente sacarose ou amido (cana, sorgo, milho, trigo, mandioca) e biodiesel de óleos vegetais ou gordura animal (soja, mamona, dendê, óleo de fritura e sebo).

Estão em desenvolvimento várias tecnologias que utilizam os materiais lignocelulósicos, oriundos de resíduos de cultura, como matérias-primas (bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, palha de trigo, palha de arroz, casca de arroz) e, além disso, madeira, pinheiros, abetos, resíduos de celulose (papel de jornal, papel de escritório), gramíneas, capim-elefante, entre outros, que são mais baratos, mais abundantes e podem ser produzidos nas mais variadas condições de solo e clima (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

A biomassa lignocelulósica é considerada como matéria-prima do futuro para a produção de etanol, devido ao seu baixo custo e grande disponibilidade (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). Por ser considerada fonte renovável de etanol e outros produtos utilizados em diversas indústrias farmacêuticas e químicas, tem sido objeto de vários estudos (SUN; CHENG, 2002).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por uma mistura de carboidratos polimerizados (celulose e hemicelulose) e lignina. A composição exata varia de espécie para espécie com relação aos constituintes e às proporções entre eles (MOSIER et al., 2005).

A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos, além de fornecer substratos alternativos para a produção de etanol, também contribui

para diminuir os problemas de poluição. Com as inovações biotecnológicas, principalmente na áreas de tecnologia enzimática e de fermentações, muitos caminhos têm sido abertos para a sua utilização (PANDEY et al., 2000)

Hoje, o custo de produção de etanol a partir de substratos lignocelulósicos é ainda muito elevado, que é a principal razão para que o etanol a partir desta matéria-prima não esteja sendo utilizado em escala industrial (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

Para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, segundo Carrasco et al. (2010), é necessário, primeiramente, disponibilizar seus açúcares para que possam ser fermentados e a hidrólise enzimática é necessária para a conversão de polissacarídeos da lignocelulose a açúcares fermentescíveis. Entretanto, para uma hidrólise enzimática eficiente, é necessário, primeiramente, submeter o material lignocelulósico a um pré-tratamento, para disponibilizar a celulose ao ataque enzimático. Os processos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto (SUN; CHENG, 2002).

As enzimas celulasas e hemicelulasas, juntamente com pré-tratamento adequado, disponibilizam a maior parte dos açúcares para fermentação. Alguns especialistas asseguram que está na obtenção de enzimas, capazes de reduzir os custos de produção de etanol celulósico, a chave do sucesso do mercado mundial de biocombustíveis nos próximos anos (TENGERDY; SZAKACS, 2003).

Neste contexto, tem aumentado progressivamente a pesquisa sobre microrganismos produtores de celulase para a hidrólise enzimática da celulose em glicose, servindo como uma importante alternativa para os métodos convencionais empregados na indústria (LYND et al., 2002).

2.6 Composição da parede celular vegetal

A parede celular dos vegetais consiste em celulose, hemicelulose e pectinas, além da lignina (ARO; PAKULA; PENTTILA, 2005) (Figura 1).

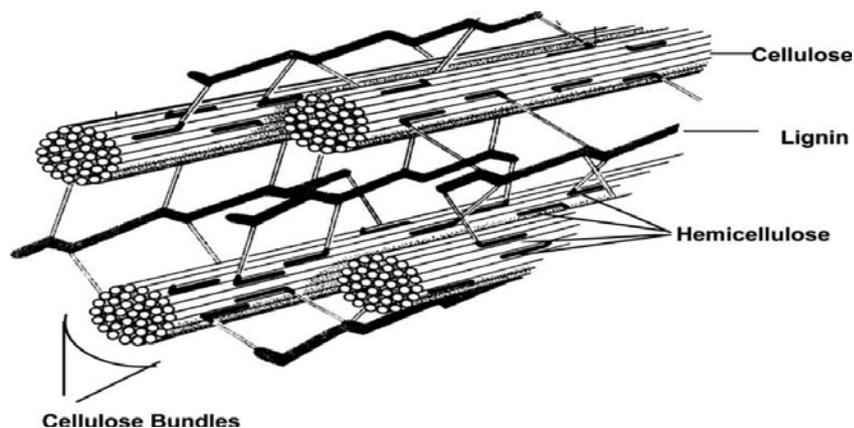


Figura 1 Representação esquemática da parede celular vegetal (YU; LOU; WO, 2008)

Cellulose: a celulose é o constituinte principal dos vegetais, consistindo na matéria orgânica mais abundante do mundo. A estrutura básica desse material consiste de um polímero linear com 8.000-12.000 unidades de glicose, unidas entre si por ligações β -D(1-4)glicosídicas. Nos vegetais, a molécula de celulose é arranjada em fibrilas, consistindo de várias moléculas de celulose paralelas unidas por pontes de hidrogênio, as quais ocorrem ligadas à lignina e à hemicelulose (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

A celulose é quimicamente simples, constituindo-se apenas de glicose, mas, em particular sua forma cristalina muito rígida, é um dos materiais mais resistentes encontrados na natureza (ARO; PAKULA; PENTTILA, 2005). As moléculas paralelas de celulose são ligadas entre si devido a pontes de

hidrogênio, sendo divididas em duas regiões: região cristalina, que torna a celulose insolúvel e mais resistente à ação enzimática, à tração e a agentes químicos. A região amorfa, mais facilmente hidrolisável, pode ser facilmente hidratada e é mais acessível às enzimas (LYND et al., 2002).

Hemicelulose: presente na lamela média das células vegetais, trata-se de um polímero composto por uma variedade de monossacarídeos, principalmente D-xilose, e por outras subunidades, com D-manose, D-glicose, L-arabinose, D-galactose, ácido glicorônico e ácido galacturônico (POLIZELI et al., 2005).

Além de variar conforme os diferentes grupos de plantas, a composição da hemicelulose varia conforme os tipos de célula. A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008).

A hemicelulose é ligada fortemente à celulose por grupos de pontes de hidrogênio e também por meio de ligações covalentes e não covalentes com lignina, celulose e outros polímeros essenciais à parede da célula (RAVEN, 2001). Diferentemente da celulose, a estrutura hemicelulósica não contém regiões cristilinas e é, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008).

As hemiceluloses, ao contrário da celulose, são quimicamente muito variáveis e sua hidrólise leva à formação de uma variedade de pentoses, hexoses e ácidos (ARO; PAKULA; PENTTILA, 2005).

Substâncias pécticas: genericamente denominada pectina, trata-se de um polissacarídeo ramificado, sendo constituído, principalmente, de polímeros de ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. É um dos principais componentes da parede celular das plantas, encontrando-se na lamela média (JAYANI; SHIVALIKA; GUPTA, 2005).

A pectina é menos proeminente do que a celulose e a hemicelulose na biomassa, no entanto, alguns resíduos agrícolas, como casca de cítricos, são extremamente ricos em pectina (VAN MARIS et al., 2006).

Devido ao caráter hidrofílico da pectina, o que confere a parede celular propriedades plásticas e flexíveis, a água é capaz de penetrar através da parede celular, favorecendo a formação de géis (RAVEN, 2001).

Lignina: a lignina corresponde à fração não polissacarídica mais abundante presente nos materiais lignocelulósicos. Juntamente com a hemicelulose e a pectina, preenche os espaços entre as fibras de celulose, além de atuar como material ligante entre os componentes da parede celular. Apresenta estrutura não uniforme, altamente complexa, com massa molecular extremamente elevada. É formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que se caracterizam por possuírem um anel aromático com diferentes substituintes (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008).

Em geral, plantas herbáceas, como gramíneas, possuem menor teor de lignina, enquanto as madeiras possuem maior teor, como as madeiras de coníferas (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

À medida que ocorre o envelhecimento da planta, a quantidade de lignina tende a aumentar (RAVEN, 2001). Dependendo da sua severidade, os pré-tratamentos utilizados nos materiais lignocelulósicos podem modificar a lignina quimicamente, tornando este material impróprio ou de difícil manejo para o uso como combustível e como insumo para a indústria química (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008).

2.7 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento é uma das operações unitárias fundamentais para o sucesso da conversão de materiais lignocelulósicos em etanol. Isso é devido à estreita associação que existe entre os três principais componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), que impõe dificuldades para a recuperação dos açúcares constituintes na forma de monômeros (SUN; CHENG, 2002).

Dessa forma, o pré-tratamento tem por finalidade alterar ou remover a hemicelulose e ou a lignina, aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose, o que acarreta aumento na digestibilidade enzimática e, conseqüentemente, no rendimento em açúcares fermentescíveis (MOSIER et al., 2005) (Figura 2)

Ao longo dos anos diferentes tecnologias têm sido desenvolvidas para o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos (JØRGENSEN, KRISTENSEN; FELBY, 2007). Diferentes materiais lignocelulósicos possuem diferentes propriedades físico-químicas, sendo necessária a adoção de adequadas tecnologias baseadas nas diferentes propriedades de cada matéria-prima. Além disso, a escolha de certos pré-tratamentos tem um grande impacto em todas as etapas subsequentes (ALVIRA et al., 2010).

Em geral, os diversos pré-tratamentos podem ser classificados em: físicos (moagem, aquecimento, irradiação), os quais não alteram quimicamente os componentes da biomassa; químicos (ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa, processo *orfanosolv*); físico-químicos (explosão com vapor, explosão com amônia, explosão com CO₂) e biológicos (tratamento com fungos da podridão branca). Cada processo apresenta características que afetam, de forma positiva ou negativa, as etapas

subsequentes. Além disso, as diferentes severidades respondem por um maior ou menor grau de degradação da biomassa (SUN; CHENG, 2002).

Em geral, a fase líquida após o pré-tratamento será constituída por açúcares (xilose, glicose e arabinose), produtos da decomposição das hemiceluloses (como ácido acético gerado a partir da hidrólise de grupos acetil ligado aos açúcares) e ou da decomposição dos monossacarídeos liberados (como furfural, produto da desidratação de pentoses e hidrometilfurfural, produto de desidratação de hexoses) (GÁMEZ et al., 2006)

Os produtos da degradação formados durante o pré-tratamento podem ser considerados potenciais inibidores da fermentação, de acordo com sua estrutura (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004).

O ácido acético forma-se quando os radicais acetila da hemicelulose são hidrolisados (OLSSON; HAHA-HÄGERDAL, 1996). Entre os compostos não fermentecíveis, o ácido acético tem sido o ácido orgânico mais dominante. Em pH ótimo para a fermentação ($5,5 \pm 6,0$), o ácido acético se encontra na forma não dissociada. Quando a forma não dissociada do ácido acético se difunde para o citoplasma da célula, o pH intracelular diminui, resultando no colapso do gradiente de prótons através da membrana e o comprometimento do transporte de nutrientes (SREENATH; JEFFRIES, 2000). Dessa forma, o nível de ácido acético no hidrolisado é um fator importante para a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica (CHO et al., 2010).

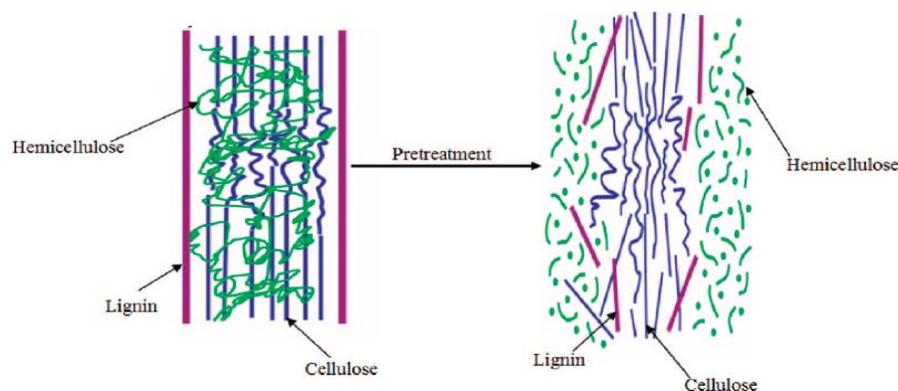


Figura 2 Esquema dos principais objetivos dos pré-tratamentos na conversão da biomassa em combustível (KUMAR et al.,2009)

2.8 Mecanismos de hidrólise enzimática

2.8.1 Degradação enzimática da celulose

Para realizar a degradação da celulose, os microrganismos produzem uma mistura complexa de enzimas denominada de celulases. As celulases atuam em conjunto para a hidrólise da celulose cristalina a seu componente monomérico, a glicose (POTHRAJ; BALAJI; EYINI, 2006).

As celulases são classificadas, por suas diferentes formas de ação, em:

- a) **endoglucanases:** endo1,4-D-glicana gliconohidrolase (EC 3.2.1.4), são também conhecidas como endo- β -1,4 glicanases e carboximetil celulases. Catalisam a hidrólise interna de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose aleatoriamente, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e, conseqüentemente, novas cadeias terminais. Atuam somente na porção amorfa da celulose, e sua atividade diminui conforme o encurtamento da cadeia de celulose (LYND et al., 2002);

- b) **exoglucanases ou celobiohidrolase (CBHs):** atua de maneira progressiva, em porções redutoras e não redutoras das cadeias de celulose, podendo liberar tanto glicose quanto celobiose como produtos principais. São capazes de atuar sobre a celulose microcristalina, encurtando cadeias do polissacarídeo (LYND et al., 2002). São conhecidos dois tipos de celobiohidrolases: as CBHs I e CBHs II, as quais se diferenciam pelo local em que se adsorvem na molécula de celulose. As CBH I e II iniciam a hidrólise da molécula de celulose a partir de terminais redutores e não redutores, respectivamente (ZANG et al., 2006). As celobiohidrolases apresentam em sua estrutura uma região responsável pela ligação da molécula ao substrato (CBD- *cellulose binding domain*) e sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose (AWAFO; CHAHAL; SIMPSON, 1998);
- c) **β -glicosidases:** completando a degradação da celulose a glicose, as denominadas β -D-glicosídeo glicohidrolases (E.C. 3.2.1.21) são necessárias para hidrolisar oligossacarídeos de cadeia curta e celobioses solúveis em glicose (LYND et al., 2002) (Figura 3);

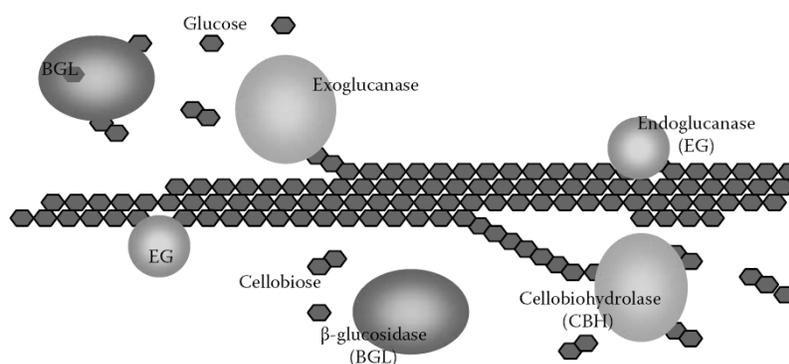


Figura 3 Mecanismo de hidrólise da celulose por ação das celulases (SUKUMARAN, 2009)

Celulosomos: em bactérias anaeróbias, ocorre a presença de celulosomos, termo introduzido primeiramente a partir do estudo da bactéria anaeróbica *Clostridium thermocellum* (DESVaux, 2005). Os celulosomos são definidos com um complexo multienzimático que possui celulasas que atuam de modo agrupado. Os microrganismos que secretam os celulosomos sobre o substrato são tipicamente encontrados em ambientes anaeróbicos, como trato digestivo de ruminantes (LYND et al., 2002). A presença de celulosomos em bactérias garante a adesão direta e específica no substrato de interesse, permitindo melhor eficiência na competição por nutrientes com outros microrganismos presentes na mesma biota e a proximidade entre a célula e a celulose (DESVaux, 2005).

2.8.2 Degradação enzimática da hemicelulose

A característica heteropolissacarídica das hemiceluloses torna complexo o mecanismo de ataque enzimático e sua hidrólise completa requer a atuação de várias enzimas de forma cooperativa (BON, GÍRIO & PEREIRA JUNIOR, 2008).

Para degradação total de xilanas em geral são necessárias diversas enzimas acessórias. Endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas que clivam aleatoriamente o esqueleto de arabinoxilana, produzindo, principalmente, oligossacarídeo de xilose. É uma das principais enzimas envolvidas na degradação deste polímero. β -1,4-xilosidades (EC 3.2.1.37) catalisam a hidrólise de xilooligossacarídeos e xilobiose a partir de terminais não redutores, liberando xilose (SAHA, 2003).

Para a completa hidrólise da macromolécula, é ainda necessária a ação das seguintes enzimas desramificadoras dos grupos laterais ligados à cadeia principal de xilana: α -glicuronosidase (EC 3.2.1.39), β -arabinosidase (EC

3.2.1.55) e acetil xilana esterease (EC 3.1.1.72) (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008).

2.8.3 Degradação enzimática da lignina

A biodegradação da lignina é um processo oxidativo que envolve um complexo sistema enzimático extracelular de baixa especificidade, produzido por fungos que colonizam madeiras. As principais enzimas envolvidas são lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase. Essas enzimas apresentam grande potencial de utilização na indústria (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008).

2.9 Microrganismos celulolíticos

A pesquisa básica e aplicada sobre celulasas microbianas não só gerou conhecimento científico significativo, mas também revelou seu enorme potencial na biotecnologia. Atualmente, as celulasas são amplamente utilizadas em diversos segmentos da indústria e a demanda por estas enzimas têm sido a força motriz para as intensas investigações, principalmente com microrganismos produtores de celulase (BHAT, 2000).

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 total (RUEGGER; TORNISIELO, 2004).

Enzimas celulolíticas são produzidas por uma variedade de bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos. No entanto, relativamente

poucos fungos e bactérias produzem altos níveis de celulase extracelular capaz de solubilizar a celulose cristalina extensivamente (BHAT; BHAT, 1997).

Muitos desses microrganismos são capazes de fazer a bioconversão desses substratos lignocelulósicos em compostos de fácil assimilação para o seu metabolismo. As enzimas hidrolíticas têm papel fundamental nessa bioconversão e agem conjunta e sinergisticamente na formação de um complexo com várias enzimas, destacando-se celobiohidrolases, endoglucanases, beta-glucosidases e xilanases (VALASKOVÁ; BALDRIAN, 2006).

Espécies de *Pleurotus* são relatadas como sendo eficientes colonizadores e degradadores de lignoceluloses. Estes fungos realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela elaboração das enzimas como celulases, β -glicosidase, xilanases, lacases, manganês-peroxidases e lignina peroxidases que estão envolvidas na degradação de lignoceluloses (PALMIERI et al., 2000).

Espécies de *Acremonium* foram estudadas para a produção de celulase e hemicelulase. O fungo *Acremonium cellulolyticus* produz celobiohidrolase, β -glicosidase, endoglucanase e xilanase (IKEDA et al., 2007).

Além dos fungos, muitas bactérias têm sido investigadas em relação à produção de celulase. Entre procariotos, as actinobactérias constituem uma parte importante da comunidade microbiana responsável pela degradação e reciclagem de biopolímeros naturais como a celulose (SÊMEDO, 2000). *Streptomyces* são actinobactérias gram-positivas encontradas principalmente no solo, são produtores de uma grande variedade de antibióticos e também são capazes de degradar muitas macromoléculas, como proteínas, celulose, amido, lipídeos e quitina. Para a degradação de celulose, hemicelulose e lignina abundantes na biomassa vegetal, diferentes cepas de *Streptomyces* sp. têm sido estudadas e consideradas boas produtoras de celulase (JANG; CHEN, 2003)

A vantagem das enzimas de origem bacteriana é que elas, geralmente, são termoestáveis. A β -glicosidase da bactéria termofílica *Caldicellusiruptor saccharolyticus* demonstrou ampla especificidade ao substrato celooligossacarídeo, hidrolisando-o completamente à glicose, no período de 16 horas, a 70°C e permaneceu estável por 250 horas, a 60°C. Devido à sua termostabilidade, a β -glicosidase desta bactéria pode ser utilizada efetivamente na degradação de materiais celulósicos (HONG, 2009).

Dentre as bactérias, existe a presença de microrganismos decompositores da celulose tanto aeróbios como anaeróbios. Considerando as bactérias anaeróbias são descritos como produtores de celulasas o gênero *Cellulomonas*, espécies de *Bacillus*, como *Bacillus subtilis*, *B. polymixa*, *B. brevis*, *B. licheniformis* e *B. cereus*. Entre as bactérias anaeróbias estão os gêneros *Acetivibrio*, *Clostridium* e *Ruminococcus*, capazes de formar celulosomas (LYND et al., 2002).

Embora em muitos trabalhos haja relatos, principalmente, da eficiente degradação da celulose a partir de fungos filamentosos como *Trichoderma reesei*, *T. viride*, *T. lignorum*, *Chrysosporium pruinatum*, *C. lignorum* e *Fusarium solani*, poucas pesquisas têm sido realizadas na identificação de leveduras produtoras de celulase (THONGEKKAEW et al., 2008). Algumas leveduras, com as do gênero *Trichosporium* sp., são produtoras de xilanase e celulase (STEVENS; PAYNE, 1977).

Com o objetivo de tornar os processos de bioconversão mais eficientes, vários pesquisadores têm empregado estratégias para melhorar a produção e a eficiência de celulasas. Para tanto, os genes de interesse podem ser inseridos por transformação genética em determinados organismos. Assim, podem ser criados microrganismos designados para atividades específicas, os quais, muitas vezes, não ocorrem na natureza e podem ser aplicados em determinados processos industriais (LIMA; RODRIGUES, 2007).

Diversos microrganismos, incluindo fungos e bactérias, são capazes de produzir enzimas celulases (TSAO et al., 2000). Dessa forma, a triagem de novos microrganismos celulolíticos é de grande interesse para a biotecnologia de biocombustíveis.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-BANAT, B. M. A. et al. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, n. 4, p. 861-867, Jan. 2010.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, Jul. 2010.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 719-739, Sept. 2005
- AWAFO, V. A.; CHAHAL, D. S.; SIMPSON, B. K. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 60868) and *Pichia stipitilis* Y-7124. A response surface model for simultaneous hydrolysis and fermentation of wheat straw. **Journal of Food Biochemistry**, Gainesville, v. 22, n. 6, p. 489-510, Dec.1998.
- BADOTTI, F. et al. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 7, n. 4, p. 1-11, Fev. 2008.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 15, n. 3-4, p. 583-620, 1997.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, Aug. 2000.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 1, p. 89-105, Jan./Feb. 2008.
- BOM, E. P. S.; GÍRIO F.; PEREIRA JUNIOR. N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E.P.S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 241-271.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 67, n. 1, p. 19-25, Apr. 2005.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Energy Consumption Analysis of Integrated Flowsheets for Production of Fuel Ethanol from Lignocellulosic Biomass. **Energy**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 2447-2459, Oct. 2006.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process desing trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, Sept. 2007.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresouce Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, Jul. 2010.

CARRASCO, C. et al. SO₂- catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 46, n. 2, p. 64-73, Feb. 2010.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W. et al. (Ed.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 2. p. 193-204

CERQUEIRA, D. A.; RODRIGUES, G.; MEIIRELES, C.D. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. **Carboydrate Polymer**, New York, v. 69, n. 3, p. 579-582, Jun. 2007.

CHO, D. H. et al. Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4947-4951, Jul. 2010.

DESVAUX, M. The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, n. 4, p. 373-385, Sept. 2005.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: SCHMIDELL, W. et al. (Ed.) **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 2. p. 223-246.

GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 74, n. 1, p. 78-88, May 2006.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 1, n. 6, p. 1-7, May 2008.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. **TRENDS in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 12, p. 549-556, Dec. 2006.

HONG, M. R. Characterization of a recombinant β -glucosidase from the thermophilic bacterium *caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.108, n. 1, p. 36-40, Jul. 2009.

IKEDA, Y. et al. Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **Biotechnology Progress**, New York, v. 23, n. 2, p. 333-338, Mar./Apr. 2007.

JAMAI, L. et al. Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amylase. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 14, p. 2765-2770, Oct. 2007.

JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 263-268, Apr. 2003.

JAYANI, R. S.; SHIVALIKA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, Sept. 2005.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 119-134, Oct. 2007.

KADAM, K. L. Environmental benefits on a Life cycle basis of using bagasse-derived ethanol as a gasoline oxygenate in India. **Energy Policy: the political, economics, planning and social aspects of energy**, Surrey, v. 30, n. 5, p. 371-384, Apr. 2002.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pretreatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 66, n. 1, p. 10–26, Nov. 2004.

KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, Apr. 2009.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípio de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: SARVIER, 1995. 839 p.

LIMA, A. O. S.; RODRIGUES, A. L. Sacrificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 1, n. 2, p. 5-18, 2007.

LIMA, U.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A. et al. (Ed.) **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blucher, 2001. v. 3. p. 1-43.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 3, p. 506-577, Sept. 2002.

MATSUOKA, S. FERRO, J. ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **In Vitro Cellular & Developmental Biology: plant**, Columbia, v. 45, n. 3, p. 372-381, June 2009.

MATSUSHIKA, A. et al. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 8, p. 2392-2398, Apr. 2009.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 6, p. 673-686, Apr. 2005.

NISSEN, T. L. et al. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. **Metabolic Engineering**, Orlando, v. 2, n. 1, p. 69-77, Jan. 2000

OLSSON, L., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 18, n. 5, p. 312-331, Apr. 1996.

PALMIERI, G. et al. Cooper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 920-924, Mar. 2000.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 69-80, Aug. 2000.

PRETORIUS, I. S.; TOIT, M.; RENSBURG, P. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 3-10, Jan. 2003.

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 67, n. 5, p. 577-591, June 2005.

POTHRAJ, C.; BALAJI, P.; EYINI, M. Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 20, p. 1882-1885, Oct. 2006.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EINHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast technology**. 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 454 p.

RUEGGER, M. J. S.; TORNISIELO, S. M. T. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da estação ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 205-211, jun. 2004.

SAHA, B. C. Hemicellulose Bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 30, n. 5, p. 279-291, May 2003.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, Sept. 2008.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W. et al. (Ed.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 2. p. 179-192.

SÊMEDO, L. T. A. S. Endocellulase and exocellulase activities of two *Streptomyces* strains isolated from a forest soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 84-86, n. 1-9, p. 267-276, Mar. 2000.

SPRENGER, G.A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 145, n. 3, p. 301-307, Dec. 1996.

SREENATH, H. K.; JEFFRIES, T. W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. **Bioresource Technology**, Essex, v. 72, n. 3, p. 253-260, May, 2000.

STEVENS, B. J. H.; PAYNE, J. Cellulase and xylanase production by yeast of the genus *Trichosporon*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 100, p. 381-393, 1977.

SUKUMARAN, R. K. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 421-424, Feb. 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 1, p. 1-11, May 2002.

TEIXEIRA, C. G.; JARDINE, J. G.; BEISMAN, D. A. Utilização do sorgo sacarino como matéria-prima complementar à cana-de-açúcar para obtenção de etanol em microdestilaria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 221-229, set./dez. 1997.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2-3, p.169-179, Mar. 2003.

THONGEKKAEW, J. et al. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 60, n. 2, p. 140-146, Aug. 2008.

TOIVOLA, A. et al. Alcoholic Fermentation of deuterium-xylose by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, n. 6, p. 1221-1223, June 1984.

TOMÁS-PEJÓ, E. et al. Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. **Fuel**, London, v. 88, n. 11, p. 2142-2147, Nov. 2009.

TSAO, G. T. et al. Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* for cellobiase production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 84-86, n. 1-9, p. 743-749, Mar. 2000.

VALASKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Estimation of bound and free fractions of lignocelluloses-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Pictoporus betulinus*. **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, n. 2, p. 119-124, Mar. 2006.

VAN MARIS, A. J. A. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 90, n. 4, p. 391-418, Nov. 2006.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: Wiley, 1998. 362 p.

WHEALS, A. E. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, n. 12, p. 482-487, Dec. 1999.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. **Energy and Fuels**, Washington, v. 22, n. 1, p. 46-60, Jan. 2008.

ZANIN, G. M. et al. Brazilian biotethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 84-86, N. 1-9, p. 1147-1161, Mar. 2000.

CAPÍTULO 2

Utilização de celulases de leveduras para produção de bioetanol de segunda geração

RESUMO

A produção de etanol combustível a partir da biomassa lignocelulósica está emergindo como uma das tecnologias mais importantes para o desenvolvimento sustentável. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de isolar e identificar leveduras do solo produtoras de enzimas celulolíticas, selecionar os melhores isolados para a produção do extrato enzimático e avaliar a sacarificação enzimática da celulose presente no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 . Realizou-se, primeiramente, a coleta das amostras de solo do cerrado e da região amazônica para o isolamento das leveduras e, em seguida, a triagem de leveduras produtoras de celulase em meio sólido contendo CMC (carboximetilcelulose) como única fonte de carbono. Realizou-se a identificação molecular dos isolados e foram selecionados os cinco melhores para a quantificação enzimática de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase. Os isolados com as maiores atividades celulolíticas foram selecionados para a produção de enzima em meio líquido. O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi pré-tratado com 2% H_2SO_4 , durante 30 minutos, a $150^\circ C$ e, em seguida, o resíduo fibroso obtido foi submetido à hidrólise enzimática, por 72 horas. Dentre as leveduras isoladas, 103 do cerrado mineiro e 20 da região amazônica, 17,47% e 55%, respectivamente, foram produtoras de celulase, tendo a espécie *Cryptococcus laurentii* sido prevalente. Todos os isolados selecionados para quantificação enzimática apresentaram alta atividade de β -glicosidase, superior às atividades de endo e exoglucanase. O extrato enzimático utilizado promoveu a conversão de aproximadamente 16% da celulose, após 72 horas de hidrólise enzimática, tendo 2,26% sido encontrado na forma de glicose, o que leva à conclusão de que o microrganismo *C. laurentii* é um bom produtor de β -glicosidase.

Palavras-chave: Leveduras. Celulase. Pré-tratamento. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Bioethanol from lignocellulosic biomass is emerging as one of the most important technologies for sustainable development. This study aimed to isolate cellulase producing yeasts from cerrado (Brazilian savannah) and to evaluate the hydrolytic activities of these cellulolytic enzymes over acidic pre-treated sugarcane bagasse. Cellulolytic activities of yeasts previously isolated from Amazon region were also evaluated. A total of 103 yeast isolates were obtained from cerrado and 20 from Amazon. Five of these 123 isolates showed higher cellulolytic activity (enzymatic index, $EI \geq 3.0$) and were later evaluated for endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase activities. Among these, the best cellulase producer was selected to obtain an enzyme extract. The crushed sugarcane bagasse was pre-treated with 2% H_2SO_4 for 30 minutes at 150 ° C. After pre-treating, the fibrous residue was subjected to enzymatic hydrolysis for 72 hours under a load of enzymes equivalent to 42.22 U/mg of exoglucanase, 71.64 U/mg of endoglucanase and 369.24 U/mg of β - glucosidase. The bagasse was also characterized, by scanning electron microscopy, for morphological changes caused by pre-treatment. Among the 103 cerrado isolated yeasts 17.47% were able to secrete cellulose while 55% of the 20 isolates from the Amazon region showed cellulolytic activity. All five isolates selected for enzyme measurement showed high activity of β -glucosidase. Pretreatment with 2% H_2SO_4 accounted for 43% of cellulose and 32.34% of hemicellulose solubilization. After 72 h of hydrolysis of pre-treated sugarcane bagasse by exoglucanase, endoglucanase and β - glucosidase, approximately 16% of cellulose was degraded, being 2.26% found as glucose.

Keywords: Yeast. Cellulase. Pretreatment. Enzymatic hydrolysis.

1 INTRODUÇÃO

A produção de etanol combustível a partir da biomassa lignocelulósica está emergindo como uma das tecnologias mais importantes para o desenvolvimento sustentável. Nos últimos anos, crescente atenção tem sido dedicada à conversão de certas biomassa em etanol combustível. O etanol é uma alternativa para reduzir as emissões de gases do efeito estufa do setor de transportes e tem sido amplamente reconhecido como substituto e ou aditivo à gasolina (SUKUMARAN, 2009). Em função do inevitável esgotamento da oferta de energia do mundo, há um interesse crescente por fontes alternativas de energia (LIN; TANAKA, 2006).

A atual produção de bioetanol ocorre pela fermentação de sacarose e amido, oriundos, por exemplo, de cana-de-açúcar, milho e mandioca, mas existe um debate considerável sobre sua sustentabilidade. Neste contexto, o bioetanol produzido a partir da biomassa lignocelulósica é uma alternativa interessante, pois as matérias-primas não competem com as culturas alimentares, além de serem mais baratas do que as culturas agrícolas convencionais (ALVIRA et al., 2010)

Os materiais lignocelulósicos representam a fração mais expressiva da biomassa vegetal. São constituídos por três frações principais que, juntas, perfazem mais de 90% da massa seca total. São elas: celulose, hemicelulose e lignina (PANDEY et al., 2000).

A celulose é o constituinte mais abundante da biomassa vegetal, representando cerca de 30% a 50% do tecido vegetal e conferindo-lhe rigidez. (PANDEY et al., 2000). Dado seu caráter renovável, a celulose constitui uma matéria-prima potencial para a produção de biocombustível, produtos químicos, energia e outros materiais de interesse na indústria (POTHIRAJ; BALAJI; EYINI, 2006).

Os monossacarídeos contidos nas frações celulósica (glicose) e hemicelulósica (xilose, arabinose, manose e galactose) representam os substratos que podem ser utilizados para a produção de etanol por via fermentativa. Entretanto, a íntima associação entre as três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) é tal que impõe dificuldades para a recuperação dos açúcares constituintes na forma de monômeros (SUN; CHENG, 2002).

Muitos materiais lignocelulósicos têm sido testados para a produção de bioetanol. Em geral, as matérias-primas potenciais para produção de etanol são: resíduos de cultura (bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, palha de trigo, palha de arroz, casca de arroz), madeira, pinheiros, abetos, resíduos de celulose (papel de jornal, papel de escritório), gramíneas e capim-elefante, entre outros. Nos países tropicais, em especial no Brasil, um dos principais materiais lignocelulósicos encontrados em grandes quantidades é o bagaço de cana-de-açúcar ou *sugarcane bagasse* (SCB), o resíduo fibroso obtido após a extração do caldo da cana no processo de produção de açúcar (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). Cerca de 50% desse resíduo é utilizado em usina de destilaria como fonte de energia e o restante ficará estocado. Portanto, em virtude da importância do bagaço como resíduo industrial, existe um grande interesse no desenvolvimento de métodos para o aproveitamento do bagaço para a produção de combustíveis e outros produtos de interesse econômico (PANDEY et al., 2000).

Para a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica são necessárias as seguintes etapas: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e separação/purificação de produtos. O conceito geral envolve pré-tratar a matéria para, então, submetê-la à hidrólise enzimática. A tarefa de hidrolisar em monossacarídeos fermentescíveis é ainda tecnicamente difícil, devido à baixa digestibilidade da celulose por muitos fatores físicos-químicos e estruturais.

Devido a essas características estruturais, o pré-tratamento é um passo essencial para a obtenção de açúcares fermentescíveis na etapa de hidrólise.

O objetivo do pré-tratamento é quebrar a estrutura da lignina, romper a estrutura cristalina de celulose para melhorar a acessibilidade das enzimas durante a etapa de hidrólise enzimática (MOSIER et al.,2005).

A hidrólise utilizando enzimas adequadas representa mais um método eficaz para liberar os açúcares a partir de materiais celulósicos. No processo enzimático, a hidrólise da celulose é catalisada por enzimas específicas denominadas de enzimas celulolíticas ou celulases (TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010). As enzimas celulolíticas podem ser produzidas por fungos, como *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* ou bactérias como *Clostridium cellulovorans*. A maioria das pesquisas para produção comercial de celulases tem se concentrado sobre fungos, pois a maioria das bactérias produtoras é anaeróbia, com uma taxa de crescimento muito baixa (TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

O primeiro passo para o desenvolvimento de um processo industrial para a produção de uma enzima é isolar as cepas potenciais. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de celulases são de imensa importância, tendo em vista a procura de novas enzimas e a melhoria de suas aplicações biotecnológicas (KASANA et al.,2008). Diante disso, o presente trabalho foi realizado com os objetivos de isolar leveduras do solo produtoras de enzimas celulolíticas, selecionar os melhores isolados para a produção do extrato enzimático e avaliar a capacidade hidrolítica do extrato enzimático sobre o bagaço de cana pré-tratado com H₂SO₄ diluído.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Um esquema das etapas realizadas para o desenvolvimento do trabalho está apresentado na Figura 1.

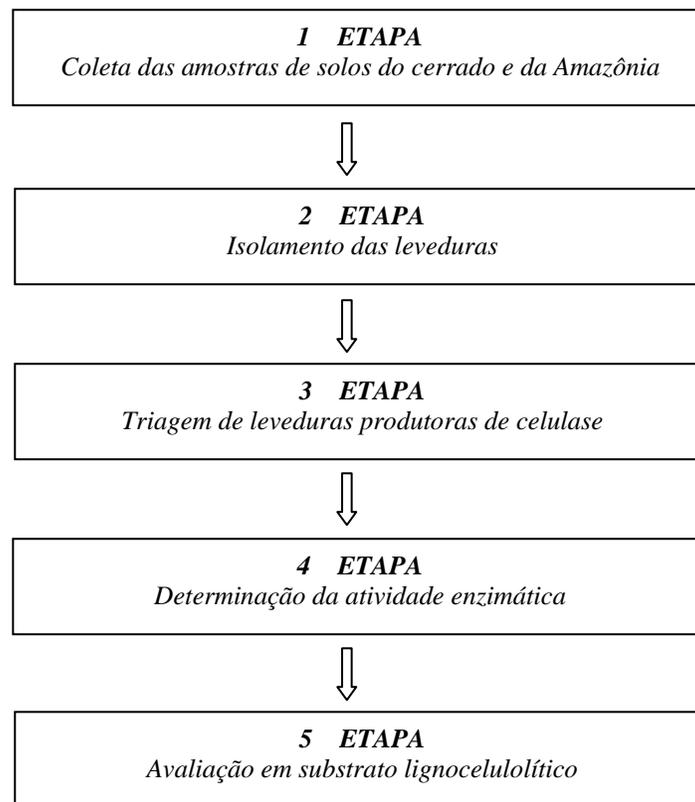


Figura 1 Esquema das etapas realizadas para o desenvolvimento do trabalho

2.1 Amostragem

A amostragem de solo foi realizada na estação chuvosa, no cerrado de Minas Gerais, em áreas dos municípios de Arcos, Passos e Luminárias.

Arcos: localizada na zona do Alto São Francisco, região centro-oeste de Minas Gerais (20°17'29" S 45°32'23" W).

Luminárias: situa-se no Sul de Minas e tem a posição geográfica determinada pelas coordenadas 21°31'26"S e 44°54'11"W.

Passos: encontra-se na região sul do estado de Minas Gerais, nas coordenadas 20°43'08"S de latitude e 46°36'35" W de longitude.

Foram coletadas 5 amostras compostas (A, B, C, D e E) por área de estudo, totalizando 15 amostras compostas. Cada amostra composta foi constituída por 12 subamostras simples, coletadas à profundidade de 0-20 cm. Para cada ponto de amostragem, as subamostras foram coletadas em dois círculos concêntricos com raio de 3 e 6 m do centro (Figura 2).

As amostras de solo foram extraídas com o auxílio de um trado previamente lavado com álcool e flambado, acondicionadas em sacos plásticos estéreis e transportadas ao laboratório e conservadas em câmara fria até o início do experimento (MOREIRA et al., 2009).



Figura 2 Esquema do ponto de amostragem: uma amostra composta de solo (12 subamostras) foi coletada ao redor do ponto de amostragem (MOREIRA et al., 2009). Representa, além dos esquemas de amostragem, um mapa com a localização aproximada das cidades

Para a amostragem de solo da região amazônica, as coletas foram realizadas entre as coordenadas 4°21' e 4°26' sul e 69°36' e 70°1' oeste, tendo uma área de, aproximadamente, 54.000 m², região do Alto Solimões, oeste do estado do Amazonas, no município Benjamin Constant (COELHO et al., 2005). As amostras foram coletadas, em fevereiro de 2008, pelos pesquisadores do projeto BiosBrasil. O esquema amostral seguiu a metodologia proposta por Fidalgo et al. (2005)

2.2 Isolamento de leveduras

As leveduras foram isoladas pela técnica de enriquecimento das amostras de solo. Para isso, 10 g da amostra foram suspensos em 90 mL de meio *yeast extract peptone glucose* (YEPG) líquido (glicose 2%, peptona 1%, extrato

de levedura 0,5%, m/v) e incubados, a 28°C, em agitador rotativo (130 rpm), durante 2 a 7 dias.

A partir das amostras enriquecidas, alíquotas foram obtidas para realizar diluições decimais seriadas em 900 µL de água peptonada (peptona 0,1%), até a obtenção da diluição 10^{-5} .

Para a obtenção de colônias cultiváveis, foi realizado plaqueamento por espalhamento em superfície, com auxílio de alça de Drigalski, em meio de cultura ágar YEPG (pH 3,5, para inibição do crescimento bacteriano), sendo as placas incubadas a 28°C, por um período de 24 a 72 horas. O número de isolados selecionados para a purificação foi determinado pela raiz quadrada do número total de isolados contados, conforme mencionado em *Bacteriological Manual for Foods* (FOOD DRUGS ADMINISTRATION, 1998). As colônias dos diferentes morfotipos foram caracterizadas quanto ao tamanho, à forma, à elevação, à cor, à textura e ao bordo (DIAS; SCHWAN, 2010).

As colônias obtidas foram posteriormente purificadas em meio ágar YEPG (pH 3,5) e repicadas rotineiramente para obtenção de colônias isoladas. Após o crescimento, foram preparadas lâminas a fresco, para a certificação da pureza dos isolados.

Os isolados obtidos foram preservados a -86°C, em criotubos contendo YEPG líquido, acrescido de glicerol na concentração final de 20%.

2.3 Atividade enzimática qualitativa

Para selecionar cepas potenciais produtoras de celulases, foi realizada análise qualitativa pelo método proposto por Kasana et al. (2008).

Foram avaliadas leveduras isoladas das regiões de cerrado, nas cidades de Passos, Arcos e Luminárias, MG e leveduras previamente isoladas na região amazônica, município de Benjamin Constant, AM, nas vegetações denominadas

Floresta 6, Floresta 57 e Capoeira Nova 19 A. As leveduras isoladas são pertencentes à coleção de Microrganismos do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos do DBI/UFLA.

A determinação da produção e da atividade da enzima celulase foi realizada em meio ágar carboximetilcelulose (CMC) contendo (em % m/v) 2% de CMC, 0,2% de NaNO_3 , 0,1 % de K_2HPO_4 , 0,05% de MgSO_4 , 0,05%, 0,02% de peptona e 1,5% de ágar. Aproximadamente 10^7 cel/mL foram inoculadas pela técnica de plaqueamento por microgota. As placas foram incubadas por 48 horas, a 28°C e a revelação foi realizada adicionando-se solução aquosa de iodo (KI 0,67%, iodo 0,33% m/v) na superfície, deixando-a em contato por 3-5 minutos. A hidrólise da carboximetilcelulose foi evidenciada pela formação de um halo de coloração clara ao redor da colônia.

A atividade enzimática qualitativa foi estratificada por meio da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, expressa como índice enzimático de atividade (IE). Foram consideradas fortes produtoras de celulasas as leveduras cujo IE foi igual ou superior a 3.

2.4 Atividade enzimática quantitativa

Foram selecionados cinco isolados de levedura que apresentaram maiores índices enzimáticos ($\text{IE} \geq 3$), a partir do teste qualitativo. Para o teste de quantificação enzimática, os isolados foram cultivados em meios de cultura específicos (descritos a seguir) e os diferentes extratos enzimáticos foram caracterizados quanto às atividades de exoglucanase, endoglucanase e β -glicosidase e aos teores de proteínas totais.

2.4.1 Atividade de exo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.91)

Os isolados foram incubados em Erlenmeyer contendo 50 mL de meio CMC líquido modificado (NaNO_3 0,2%, K_2HPO_4 0,1%, MgSO_4 0,05%, KCl 0,05%, CMC 0,2%, peptona 0,02%, glicose 0,01%, m/v), substituindo-se a CMC pelo indutor Avicel^R. Os frascos foram mantidos sob agitação, a 150 rpm, a 28°C, durante 48 horas.

Para a separação do extrato bruto, fez-se a centrifugação a 6.000 rpm, por 10 minutos, à temperatura de 10°C. Os sobrenadantes foram armazenados em freezer para posterior determinação da atividade enzimática.

A atividade de exoglucanase foi mensurada por método espectrofotométrico indireto, utilizando-se hidrazida do ácido ρ -hidroxibenzóico 1% m/v (PAHBAH) para a dosagem de glicose liberada pela ação da enzima (LEVER, 1972). Para a reação, foram utilizados 50 μL da fonte enzimática e 450 μL de Avicel^R 1% (m/v), em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0), como substrato. Após 30 minutos de incubação a 50°C, a reação foi paralisada com adição de 1,5 mL PAHBAH 1%. Em seguida, a mistura foi aquecida a 100°C, por 5 minutos e, logo após, resfriada em gelo.

A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm contra branco (1,5 mL de PAHBAH + 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M). Para cada amostra foram realizadas 3 repetições. As leituras das amostras foram subtraídas do controle (mistura sem incubação prévia) e os resultados plotados em curva padrão de glicose. A atividade enzimática (U/ml) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μg de glicose por minuto. A atividade específica (U/mg) foi obtida pela razão entre U/mL e a quantidade de proteínas (em mg/mL) determinada (BRADFORD, 1976) no extrato enzimático

2.4.2 Atividade de endo β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.4)

Para a determinação da atividade de endo β -1,4 glucanase foi realizado o cultivo dos isolados em meio CMC líquido, como descrito no item anterior, tendo como indutor carboximetilcelulose.

Para a reação, foram utilizados 50 μ L da fonte enzimática e 450 μ L de CMC 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0). A mistura foi incubada, a 50°C, por 30 minutos e a reação foi paralisada com adição de 1,5 mL de PAHBAH 1% (m/v). Em seguida, a mistura foi aquecida a 100°C, por 5 minutos e, logo após, resfriada em gelo.

A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm contra branco (1,5 mL de PAHBAH + 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,05M). As leituras das amostras foram subtraídas do controle (mistura sem incubação prévia) e os resultados plotados em curva padrão de glicose, representando a produção em atividade específica. A atividade enzimática (U/ml) de endo β -1,4 glucanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μ g de glicose por minuto. A atividade específica (U/mg) foi obtida pela razão entre U/mL e a quantidade de proteínas (em mg/mL) determinada (BRADFORD, 1976) no extrato enzimático.

2.4.3 Atividade de β -glicosidase (EC 3.2.1.21)

Para a quantificação da atividade β -glicosidase, foi utilizado como indutor a celobiose, nas mesmas condições descritas no item 2.4.1

A atividade de β -glicosidase foi determinada pela reação que consistiu de 300 μ L de p-nitrofenil glucopiranosídeo como substrato e 200 μ L da fonte enzimática. A mistura da reação foi incubada, a 50°C, por 30 minutos, sendo paralisada pela adição de 1 mL de Na₂CO₃ 1M. Os resultados da atividade foram

obtidos subtraindo-se os valores das absorvâncias das amostras e controle obtidas em leitura a 405 nm e plotando-se em curva padrão de p-nitrofenol. A atividade enzimática (U/ml) de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μ g de p-nitrofenol por minuto. A atividade específica (U/mg) foi obtida pela razão entre U/mL e a quantidade de proteínas (em mg/mL) determinada (BRADFORD, 1976) no extrato enzimático.

2.4.5 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas foi obtida segundo o método de Bradford, (1976) que consistiu em reação com 100 μ L de amostra e 1.000 μ L de reagente de Bradford concentrado, adicionado sob agitação. Após 5 minutos procedeu-se à leitura em espectrofotômetro a 595 nm. O aparelho foi calibrado com 100 μ L de água ou tampão e 1000 μ L do reagente concentrado de Bradford. A concentração de proteínas foi expressa mg de proteína/mL e obtida pela plotagem em curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

2.5 Análise estatística

Os dados de índice enzimático, bem como para comparação do melhor isolado produtor das enzimas endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, foram submetidos à análise de variância (ANAVA), seguida de teste de Skott Knott, a 5% de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 1999).

2.6 Identificação molecular de leveduras produtoras de celulase

O sequenciamento da região ITS foi empregado para a identificação das leveduras, utilizando metodologia descrita por Ramos et al. (2010). A região ITS foi amplificada utilizando-se os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C, por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C, por 1 minuto; 52°C, por 45 segundos e 72°C, por 1 minuto. Uma extensão final a 72°C foi realizada por 7 minutos. Os produtos amplificados foram enviados para Macrogen (Coreia do Sul) para sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas com sequências conhecidas no banco de dados do GenBank, usando a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.7 Avaliação da capacidade hidrolítica das enzimas sobre substrato lignocelulolítico

2.7.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço, após secagem à atmosfera ambiente, foi moído em moinho de facas e, posteriormente, peneirado (20 mesh). Em seguida, foi determinado o teor de umidade, por meio da balança determinadora de umidade (Marte-ID50).

A amostra do bagaço *in natura* foi caracterizada quanto à sua composição química, teor de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, de acordo com a metodologia descrita por Van Soest (1967), no Departamento de Ciências de Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras.

2.7.2 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado no Laboratório de Fermentação IV, no Departamento de Bioquímica da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP).

Utilizou-se reator de aço inoxidável (marca Parr, modelo 4848) com capacidade de 2 L, nas seguintes condições: 15% de teor de sólidos (bagaço) (m/v), 500 mL da solução de H₂SO₄ (2,0% m/v), durante 30 minutos, à temperatura de 150°C.

Após o tempo reacional, foi realizada filtração a vácuo em filtro de porcelana, obtendo-se uma fração líquida e uma massa residual de sólidos (resíduo fibroso). As frações obtidas foram armazenadas a 4°C, para posterior caracterização.

O resíduo fibroso, após várias lavagens com água, foi seco em estufa, a 65°C, até massa constante. A composição química deste material foi determinada conforme descrito no item 2.7.1, no Departamento de Ciências de Alimentos (DCA) da Universidade Federal de Lavras.

2.7.3 Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar

O resíduo fibroso obtido no item anterior foi submetido à hidrólise enzimática. Para isso, após a avaliação quantitativa, produziu-se o extrato enzimático do melhor isolado produtor das celulasas (β -glicosidase, exo e endoglucanases), nas mesmas condições descritas no item 2.4.

Os ensaios de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, em triplicata. A mistura reacional foi composta de 75 mL de tampão acetato de sódio (0,05M, pH 5,0), 2% da biomassa pré-tratada, autoclavados por 15 minutos, a 121°C, e 75ml do coquetel

de enzimas produzida para a hidrólise enzimática do bagaço de cana (composto de 35mL de exoglucanase, 25mL de endoglucanase e 15mL de β -glicosidase, equivalente a carga enzimática de 42,22 U/mg de exoglucanase, 71,64 U/mg endoglucanase e 369,24 U/mg β -glicosidase). Do mesmo modo, o substrato sem coquetel enzimático foi realizado como controle, completando-se o volume com tampão acetato de sódio (0,05M, pH 5,0).

A hidrólise foi realizada a 45°C, sob agitação mecânica, a 150 rpm, por 72 horas. Nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de hidrólise enzimática foram retiradas alíquotas de 2 mL, as quais foram congeladas, para posteriores análises cromatográficas.

O resíduo fibroso remanescente foi caracterizado quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina, como descrito no item 2.7.1.

2.7.4 Análises cromatográficas

A fração líquida obtida após o pré-tratamento com H_2SO_4 foi submetida a análises cromatográficas para a determinação das concentrações de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético e furfural.

As amostras retiradas a cada 24 horas da hidrólise enzimática também foram submetidas a análises cromatográficas para a determinação dos mesmos compostos.

As análises de glicose e ácido acético foram realizadas em cromatógrafo de fase líquida Shimadzu, modelo LC-10Ai, equipado com detectores de índice de refração, modelo RID-10A, e de ultravioleta, modelo SPD-10Ai. A coluna utilizada foi de troca catiônica (poliestireno divinilbenzeno), modelo Shim-pack SCR-101 de 30 cm de comprimento e 7,9 mm de diâmetro. As concentrações de furfural foram analisadas pela cromatografia gasosa (CG) Shimadzu, modelo 17 A, equipado com detector de chama

ionizada (FID). As análises foram realizadas segundo a metodologia de Duarte et al. (2009).

Para a determinação das concentrações de celobiose, xilose e arabinose, foram utilizadas as seguintes condições: coluna NH₂ – SPHERISORH 5µm (4,6 x 150mm), temperatura 37°C, solução de acetonitrila/água (80:20), fluxo 1mL/min e volume da amostra injetada 20 µL.

2.7.5 Caracterização estrutural do bagaço de cana-de-açúcar, por microscopia eletrônica de varredura

Para a caracterização estrutural foi feita microscopia eletrônica de varredura das amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, pré-tratado com H₂SO₄ e após a hidrólise enzimática (72 horas), utilizando o microscópio eletrônico de varredura LEO, modelo EVO 40. As amostras foram montadas em suporte de alumínio “stubs” e, em seguida, submetidas ao recobrimento metálico com ouro (metalizador Bal-Tec SCD 050).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento de leveduras

A população de leveduras foi avaliada após enriquecimento das amostras de solo em meio YEPG, a 28°C, por 48 horas. A densidade leveduriforme (UFC/g de solo) variou de 8,90 UFC/g (pontos A e D de Arcos) a 3,34 UFC/g (ponto B de Passos), encontrada após o enriquecimento e é apresentada no Gráfico 1.

Foram obtidos 103 isolados de leveduras, tendo todos eles apresentado as mesmas características morfológicas.

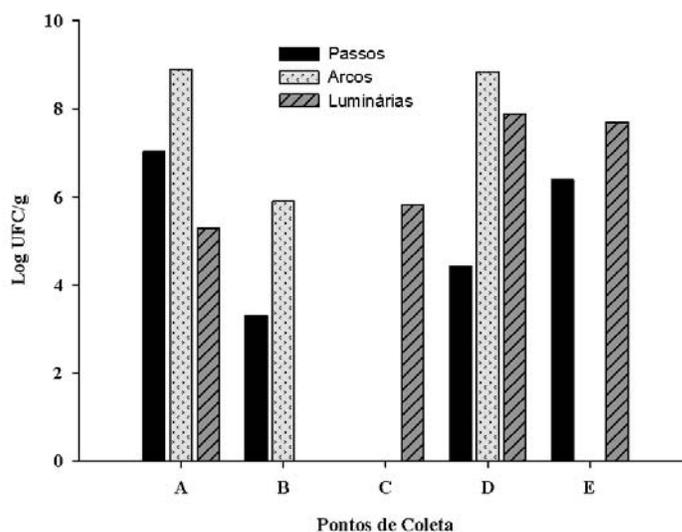


Gráfico 1 Densidade microbiana em Log de Unidades Formadoras de Colônia/g de solo. Os pontos A, B, C, D e E referem-se às cinco amostras compostas coletadas para as regiões de Passos, Arcos e Luminárias

Por se tratar de amostras procedentes do meio ambiente, nenhum resultado é inesperado quanto ao tamanho populacional e à diversidade de microrganismos. A população leveduriforme presente no solo é variada e é influenciada por vários fatores, como longevidade de espécies, junto com a habilidade de competirem com outros organismos do solo, composição do solo, estação do ano, clima, temperatura, exposição ao sol e umidade, entre outros. Esses resultados podem estar relacionados com estes fatores, uma vez que podem ser encontradas de poucas células até milhares de células por grama de solo em diferentes amostras provenientes de um mesmo ambiente (DIAS; SCHWAN, 2010).

É comumente conhecido que as leveduras ocorrem em ampla variedade de tipos de solo e uma vasta diversidade de áreas geográficas que vão desde as zonas árticas até os trópicos. Inúmeras espécies são habitantes típicas, exercendo uma contribuição significativa para biodiversidade. Muitas diferentes leveduras ascomicetos e basidiomicetos já foram encontradas no solo (BOTHÁ, 2006).

Morais et al. (1995) sugeriram que atividades antropogênicas em fragmentos florestais diminuem a riqueza de espécies de leveduras nas áreas perturbadas. No entanto, por se tratar de regiões conservadas do cerrado mineiro, o baixo número de morfotipos de leveduras pode estar relacionado com características intrínsecas desta região. Na maioria dos casos, a população leveduriforme e a composição de espécies estão distribuídas de forma desigual no solo (BOTHÁ, 2011).

3.2 Atividade enzimática qualitativa

Para a seleção de leveduras produtoras de celulase, foram avaliadas as 103 leveduras isoladas das regiões de cerrado, nas cidades de Passos, Arcos e Luminárias, MG, e 20 leveduras isoladas na região amazônica, município de

Benjamin Constant, AM, nas vegetações denominadas Floresta 6, Floresta 57 e Capoeira Nova 19 A.

Dos 103 isolados nas regiões de cerrado mineiro, 18 foram positivas, ou seja, 17,47% apresentaram halo de degradação ao redor da colônia, evidenciando a produção de celulase (Gráfico 1). Dentre as produtoras, destacaram-se as leveduras isoladas no ponto E da cidade de Passos. As leveduras isoladas nos demais pontos de Passos e nas regiões de Arcos e Luminárias não apresentaram atividade celulolítica considerada satisfatória ($IE \geq 3$) para serem avaliadas nos testes quantitativos (Tabela 1).

Em relação aos isolados da região amazônica (Tabela 2), das 20 linhagens de leveduras avaliadas, 11 foram produtoras de celulase, correspondendo a 55% do total de isolados. Destes, 55%, a maioria das leveduras isoladas da Capoeira Nova 19 A, apresentaram atividade celulolítica satisfatória ($IE \geq 3$).

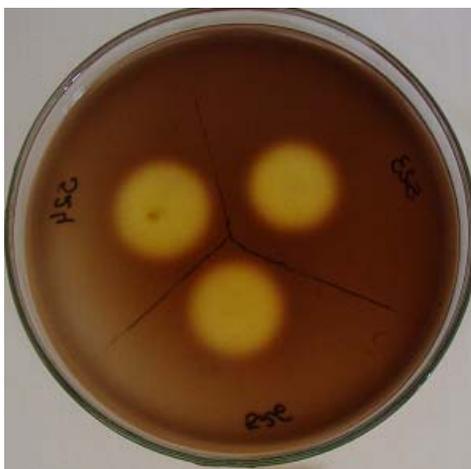


Figura 3 Placas com ágar CMC inundadas com iodo de Gram
Halo ao redor das colônias de leveduras produtoras de celulase

Dentre os isolados com atividade celulolíticas das regiões de cerrado mineiro estudadas, 94% apresentaram índice enzimático $\geq 2,0$. Verificou-se $IE > 3,0$ para os isolados UFLA CES PA-E 523 e PA-E 526, sendo considerados bons produtores de celulase. Na região amazônica, todos os isolados com atividade celulolítica apresentaram $IE > 2,0$ e, destes, 63,6% tiveram $IE \geq 3,0$.

Apesar de não apresentarem diferença estatística entre os índices enzimáticos, tanto dos isolados do cerrado quanto da região amazônica, foram selecionadas para o teste de produção de celulase em meio líquido as leveduras que apresentaram o maior dado numérico de índice enzimático (TABELA 3).

Tabela 1 Resultado qualitativo do teste para a produção enzimática de celulase, leveduras isoladas do solo do cerrado mineiro. Os melhores produtores estão marcados em negrito

Local de coleta	Isolado	Índice enzimático (média)
	UFLA CES 519	2,25 ^a
	UFLA CES 520	2,00 ^a
	UFLA CES 521	2,11 ^a
	UFLA CES 522	2,37 ^a
	UFLA CES 523	3,16^a
	UFLA CES 524	2,85 ^a
	UFLA CES 525	2,71 ^a
	UFLA CES 526	3,16^a
Passos	UFLA CES 546	2,57 ^a
	UFLA CES 547	2,67 ^a
	UFLA CES 548	1,89 ^a
	UFLA CES 549	2,43 ^a
	UFLA CES 550	2,57 ^a
	UFLA CES 551	2,57 ^a
	UFLA CES 552	2,29 ^a
	UFLA CES 553	2,57 ^a
	UFLA CES 554	2,83 ^a
	UFLA CES 555	2,25 ^a

Índice enzimático (IE) = $\frac{\text{Ø halo}}{\text{Ø Colônia}}$

*Letras iguais na linha não diferem entre si, pelo teste Skott-Knott, a 5% de probabilidade

Tabela 2 Resultado qualitativo do teste para a produção enzimática de celulase, leveduras isoladas do solo da região amazônica. Os melhores produtores estão marcados em negrito

Local de coleta	Isolado	Índice enzimático (média)
	UFLA AMS 95.1B	3,30^a
	UFLA AMS 95.5B	3,00 ^a
	UFLA AMS 96.2	3,00 ^a
	UFLA AMS 98.1 A	3,50^a
	UFLA AMS 98.2 A	2,85 ^a
Capoeira Nova 19 A	UFLA AMS 99.1 A	3,00 ^a
	UFLA AMS 99.2 A	3,30^a
	UFLA AMS 102.1	2,71 ^a
	UFLA AMS 103.2	3,14 ^a
	UFLA AMS 106.2	2,85 ^a
	UFLA AMS 106.8	2,85 ^a

Índice enzimático (IE) = $\frac{\text{Ø halo}}{\text{Ø Colônia}}$

*Letras iguais na linha não diferem entre si, pelo teste Skott-Knott, a 5% de probabilidade.

3.3 Identificação molecular de leveduras produtoras de celulase

A maioria dos isolados que apresentaram resultados positivos para produção de celulase, em meio sólido, foi identificada como *Cryptococcus laurentii*, a partir do sequenciamento da região ITS e posterior comparação no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST. As sequências exibiram uma similaridade superior a 98% (Tabela 3). Os isolados que apresentaram similaridade inferior a 95% ou que não foram identificados foram novamente sequenciados para a confirmação das espécies.

Tabela 3 Espécie de levedura produtoras de celulase, isoladas do solo do cerrado mineiro e da região amazônica, identificadas por sequenciamento de DNA

Região	Isolado	% similaridade	Espécie
Cerrado	UFLA CES 519	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 520	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 521	92%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 522	80%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 524	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 526	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 547	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 548	90%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 549	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 550	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 551	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 552	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 553	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 554	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA CES 555	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
Amazônia	UFLA AMS 95.1B	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA AMS 96.2	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA AMS 98.1 A	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA AMS 98.2 A	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA AMS 99.1 A	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA AMS 99.2 A	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA AMS 102.1	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA AMS 103.2	90%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	UFLA AMS 106.2	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>

O gênero *Cryptococcus* é caracterizado por células redondas ou ovais envoltas por uma cápsula (BEHAM, 1955). As espécies deste gênero são basidiomycetos anamórficos (WALKER, 1998); (VAN STADEN et al., 2007)). As células são globosas ou subglobosas, com brotamento polar ou multilateral; hifas e pseudo-hifas podem estar presentes (HALL; WATSON, 2002). Por possuírem uma cápsula, as espécies do gênero *Cryptococcus* são capazes de sobreviver em diversos habitats e podem ser encontradas nos mais variados tipos de solos (BOTHA, 2006).

O isolamento de espécie *Cryptococcus laurentii* já foi anteriormente relatado por Vital et al. (2002), em solos amazônicos, em solos agrícolas e de floresta temperada (SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2003); (SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2000), caracterizando-a como típicas do ambiente. No presente trabalho, foi encontrada a levedura *Cryptococcus laurentii* a partir de solos do cerrado mineiro e da região amazônica.

Segundo Pavlova et al. (2001), alguns isolados de *Cryptococcus* são psicrófilicos, criotolerantes, com temperatura ótima de crescimento de 15°C. No entanto, alguns isolados podem crescer à temperatura de 37°C, o que revela a capacidade adaptativa destas leveduras a diversos ambientes.

As leveduras basidiomicetos possuem considerável importância econômica, agrícola e médica e as estimativas indicam que o número de leveduras conhecidas representa cerca de 1% das espécies que vivem na natureza. Há um crescente interesse em descobrir estas espécies para exploração econômica e há necessidade de compreender a sua biodiversidade e funções ecológicas (FELL et al., 2000).

3.4 Atividade enzimática

As leveduras selecionadas foram cultivadas em meio líquido, por 48 horas, com os respectivos indutores carboximetilcelulose, celulose microcristalina e celobiose, para verificar a capacidade de produção das enzimas endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, respectivamente.

No Gráfico 2 é apresentado o resultado da atividade enzimática de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase. Todas as leveduras selecionadas na triagem em placa ($IE \geq 3$) foram capazes de produzir enzimas celulolíticas nos diferentes meios de indução, sendo a atividade de β -glucosidase superior à de exo e endoglucanase.

Não houve diferença na produção de endo e exoglucanase, para os cinco isolados avaliados (UFLA CES 523, UFLA CES 526, UFLA AMS 95.1B, UFLA AMS 98.1A e UFLA AMS 99.2A). No entanto, para a enzima β -glicosidase, alguns isolados apresentaram diferenças na atividade enzimática, tendo o isolado UFLA AMS 95.1 B se destacado como melhor produtor ($24,61 \text{ U.mg}^{-1}$).

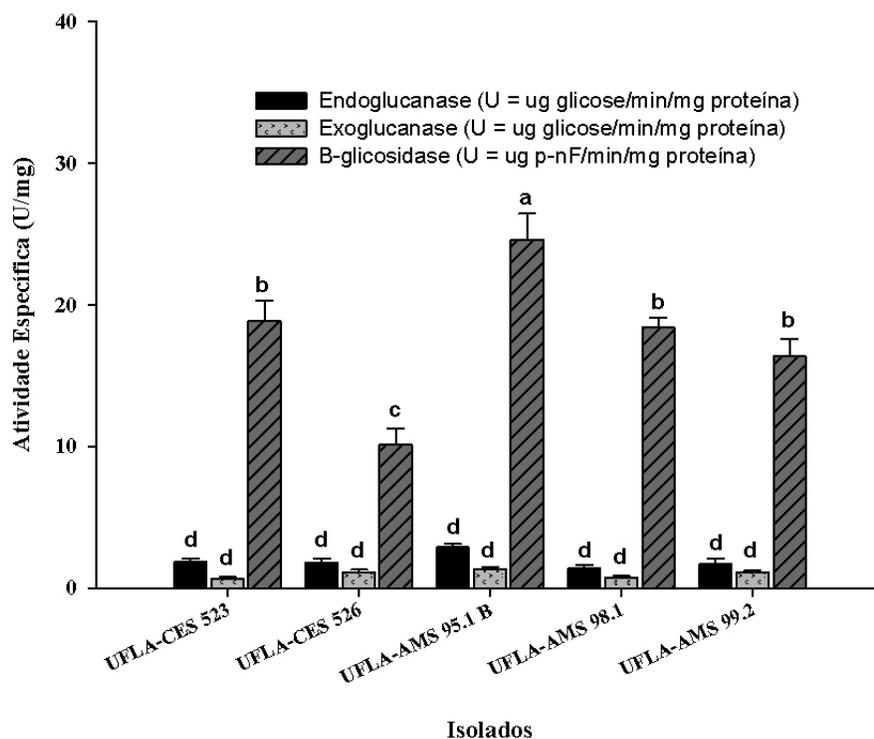


Gráfico 2 Atividade enzimática específica de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase (U/mg) das leveduras selecionadas para a produção de celulase em meio líquido, por 48 horas. As letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade. As barras indicam o desvio padrão das médias

Essa atividade de β -glicosidase ($24,61 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) pode ser devido ao fato de a maioria das espécies de leveduras que ocorrem em solos possuir amplo espectro de habilidade metabólica, permitindo a utilização de vários produtos resultantes da degradação de plantas e outros microrganismos. Além disso, quase todas as leveduras do solo podem crescer em presença de celobiose como fonte de carbono, produzida durante a quebra da celulose (SLÁVIKÓVA KOSIKOVÁ; MIKULÁSOVÁ, 2002). Dessa forma, mesmo que as β -

glicosidases não atuam diretamente sobre a celulose, elas convertem a celobiose e celo-oligosacarídeo, produzidos pelas endo e exoglucanase, à glicose (JOB; SUKUMARAN; JAYACHANDRAN, 2010).

Embora em muitos trabalhos haja relatos, principalmente, da eficiente degradação da celulose por fungos filamentosos, como *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma lignorum*, *Chrysosporium pruinatum*, *Chrysosporium lignorum* e *Fusarium solani*, poucas pesquisas têm sido realizadas na identificação de leveduras produtoras de celulase (THONGEKKAEW et al., 2008). Dessa forma, as comparações neste estudo são difíceis, devido à diferença nas diversas condições utilizadas nos experimentos.

Hatano et al. (1991), estudando 127 cepas isoladas do solo, selecionaram 8 cepas de leveduras com altas habilidades para utilizar a carboximetilcelulose (CMC). No entanto, as leveduras isoladas no presente trabalho não exibiram altas atividades de endoglucanase quando foi utilizado carboximetilcelulose como indutor.

Espécies de *Cryptococcus laurentii*, segundo Botha (2006), são capazes de assimilar aerobicamente carboidratos como a celobiose, o que justifica as maiores atividades de β -glicosidase encontradas neste trabalho na presença do indutor celobiose. No estudo realizado por Thongekkaew et al. (2008), os autores relatam a purificação e a caracterização de endoglucanase (carboximetilcelulase) da levedura *Cryptococcus* sp S-2. Este microrganismo libera carboximetilcelulase em meio de cultura na presença do indutor CMC, em 72 horas de cultivo, sob agitação de 120 rpm. A carboximetilcelulase purificada de *Cryptococcus* sp, S-2 exibiu máxima atividade (4,93 U/mg proteína) em pH 3,5, a 40°-50°C. Essa enzima se manteve estável na faixa de pH 5,5-7,5 e temperatura de até 90°C. Desse modo, esta enzima torna-se adequada para uso em sacarificação da celulose em pH baixo e ampla faixa de temperatura.

Diversos microrganismos, incluindo fungos, bactérias e protozoários, são capazes de produzir enzimas celulases. Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* são os mais conhecidos microrganismos celulolíticos. O fungo *Trichoderma reesei* é um excelente produtor de endoglucanase e exoglucanase, mas há baixo conteúdo de β -glicosidase no extrato bruto, o que é apontado como uma desvantagem para a completa hidrólise da celulose. Por outro lado, as cepas de *Aspergillus niger* têm sido estudadas devido à sua capacidade de produzir elevados níveis de β -glicosidase, embora a produção da enzima endoglucanase seja deficiente (TSAO et al., 2000).

Em escala comercial, a conversão da biomassa celulósica requer o uso de celulases que torna o processo dispendioso. Assim, a produção de celulase a partir de microrganismos tem sido amplamente estudada. Portanto, a triagem e a caracterização de novos isolados são essenciais para tornar o processo de produção de enzima possível (SOHAIL et al., 2009).

De modo geral, as atividades enzimáticas aqui reveladas ainda são reduzidas em comparação com outros microrganismos já estudados com maior detalhamento. No entanto, estes resultados mostram que esses isolados de leveduras são promissores para produzirem enzimas de interesse biotecnológico.

3.5 Avaliação da capacidade hidrolítica das enzimas sobre substrato lignocelulolítico

3.5.1 Composição química e pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e após o pré-tratamento com H_2SO_4 . A composição do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* consistiu de 51,44% de

celulose e 30,42% de hemicelulose e, após o pré-tratamento, foi de 29,42% celulose e 20,58% de hemicelulose (g/100 g matéria seca-MS).

Tabela 4 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado com H₂SO₄ (g/100 g MS)

Componentes	Bagaço <i>in natura</i>	Bagaço pré-tratado com H ₂ SO ₄	% na massa residual sólida após pré-tratamento
Celulose	51,44±0,40	29,42±0,75	57
Hemicelulose	30,42±0,70	20,58±0,20	68
Lignina	11,30±0,30	8,04±0,10	71
Cinzas	3,20±0,26	0,88±0,01	28

Os dados apresentados são médias das análises realizadas em triplicata

Em geral, as fibras do bagaço de cana-de-açúcar (*in natura*) são compostas principalmente de celulose (30~50%), hemicelulose (20~30%), lignina (~20%) e cinzas (2,4%) (PANDEY et al., 2000).

Após o pré-tratamento com 2% de H₂SO₄, a 150°C, por 30 minutos, aproximadamente 43% do conteúdo de celulose do bagaço de cana foi liberado na fração líquida, 11,08/100 g MS de glicose (Tabela 5). O restante da celulose (57%) presente no resíduo fibroso foi submetido à hidrólise enzimática por 72 horas.

Em relação à hemicelulose, 32,34% foram liberados na fração líquida após o pré-tratamento do bagaço de cana, tendo 36,83 g/100 g MS sido encontrado na forma de xilose. Não foram detectados arabinose e furfural após o pré-tratamento. No entanto, houve a formação de 15,08 g/100 g MS de ácido acético, produto da decomposição das hemiceluloses (Tabela 5). Os rendimentos de glicose e xilose em diferentes pré-tratamentos fornecem indicação da eficiência da conversão da celulose e hemicelulose aos monossacarídeos correspondentes (MARTÍN et al., 2002). Durante a degradação da estrutura lignocelulósica, além dos açúcares fermentecíveis, grande quantidade de compostos inibitórios podem ser liberados. Os principais compostos inibitórios

que influenciam negativamente as etapas subsequentes do processo são ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (OLSSON; HAHA-HÄGERDAL, 1996).

Tabela 5 Produção de glicose, xilose e ácido acético, após o pré-tratamento com H₂SO₄, a 150°C, por 30 minutos, g/100 g matéria seca (MS)

Glicose	Xilose	Ácido acético
11,08	36,83	15,08

Martín et al. (2002) realizaram um pré-tratamento com o mesmo catalisador e resíduo utilizado neste trabalho (ácido sulfúrico e bagaço de cana), porém, em condições diferentes: 1% de ácido sulfúrico, a 205°C, por 10 minutos. Após o pré-tratamento, obteve-se, na fração líquida, maior produção de glicose (22,6 g/100g de bagaço seco) e menor rendimento de xilose (3,6 g/100g) e arabinose (0,4 g/100g). No entanto, foram encontradas elevadas concentrações de compostos inibitórios da fermentação, como furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e ácido acético. Neste estudo, após o pré-tratamento com 2% H₂SO₄, a 150°C, por 30 minutos, foram encontrados glicose, xilose e ácido acético e não foi detectado furfural, um importante composto inibitório da fermentação. Saha et al. (2005) não detectaram furfurais no hidrolisado da palha de trigo pré-tratado a 140° e 160°C, porém, a 180°C, foram produzidos 11 e 32 mg de furfural/g de matéria seca, nas concentrações de ácido sulfúrico de 0,25% e 0,50% (v/v), respectivamente. Também não foi detectado hidroximetilfurfural nos hidrolisados. Porém, o ácido acético foi encontrado em todos os hidrolisados e sua concentração aumentou significativamente com a elevação da temperatura.

O efeito do pré-tratamento é dependente da composição da biomassa e das condições operacionais. Todos os pré-tratamentos têm suas vantagens e desvantagens e pesquisas futuras são necessárias para a sua otimização. A estratégia para lidar com inibidores da fermentação é uma questão-chave para converter resíduos lignocelulósicos em etanol (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009)

3.5.2 Hidrólise enzimática

Após o pré-tratamento, o resíduo fibroso, contendo 29,42 g de celulose/100g de MS, 20,58 g de hemicelulose/100g de MS e 8,04 g de lignina/100g de MS, foi submetido à hidrólise enzimática, por 72 horas.

O extrato enzimático utilizado para hidrolisar o resíduo fibroso do bagaço de cana-de-açúcar foi preparado a partir da levedura *Cryptococcus laurentii*, previamente isolada da região amazônica. A carga enzimática utilizada na hidrólise foi de 42,22 U/mg de exoglucanase, 71,64 U/mg endoglucanase e 369,24 U/mg β -glicosidase.

A conversão da celulose após 72 horas de hidrólise foi de aproximadamente 16%. No Gráfico 3 observa-se o tempo de hidrólise utilizando o preparado enzimático obtido a partir da levedura *Cryptococcus laurentii*, que resultou na formação de 0,147 g/L de glicose correspondente a 2,26%. Os rendimentos de sacarificação enzimática neste estudo foram menores quando comparados com os resultados obtidos por Martín et al. (2002) que obtiveram uma maior produção de glicose (35,9 g/100g de bagaço seco) após pré-tratamento com 1% de H_2SO_4 e hidrólise enzimática com enzimas comerciais (Celluclast 2L e Novozym 188), correspondendo a mais de 80% do rendimento teórico.

Como não foi detectada celobiose no hidrolisado, a quantidade de glicose encontrada pode ser justificada pela baixa atividade das enzimas endoglucanase e exoglucanase (as quais liberaram pouca celobiose). Em contrapartida, a atividade de β -glicosidase foi eficaz na conversão da celobiose à glicose. Santos et al. (2010) avaliaram diferentes cargas enzimáticas de enzimas obtidas a partir de *Trichoderma reesei* e β -glicosidase de *Aspergillus* sp. para hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 . Estes autores encontraram que os menores valores de conversão da celulose estão associados à

baixa carga enzimática. Esses resultados demonstram a importância da carga enzimática na sacarificação da celulose contida em materiais lignocelulósicos.

Nem todas as enzimas comerciais encontradas no mercado apresentam uma atividade excelente das três enzimas do complexo celulolítico, sendo necessário complementar a carga enzimática utilizando um coquetel de enzimas para a degradação completa da biomassa lignocelulósica.

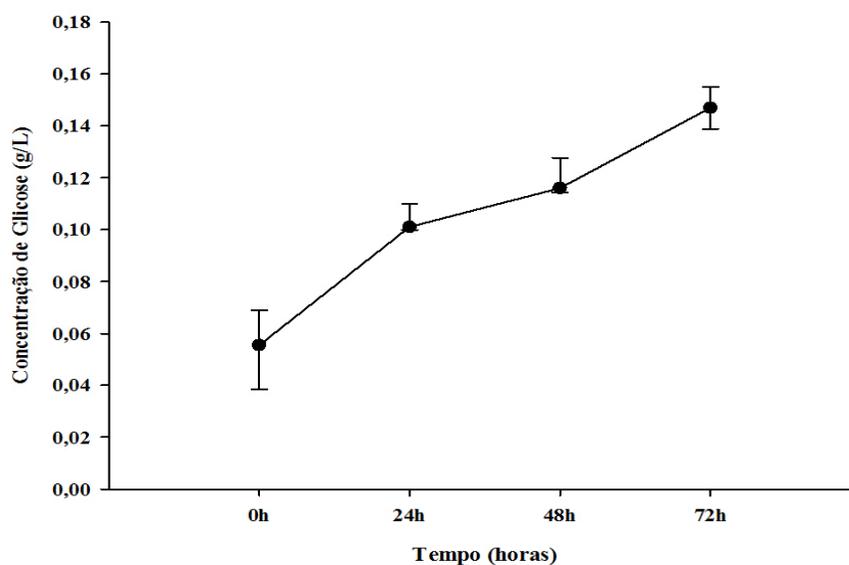


Gráfico 3 Quantidade de glicose liberada durante a hidrólise enzimática, por 72 horas, do bagaço de cana pré-tratado, utilizando extrato enzimático preparado a partir da levedura *Cryptococcus laurenti*. As barras indicam desvio padrão da média

Em geral, a carga enzimática de 10-30 FPU/g celulose é frequentemente utilizada em estudos laboratoriais, pois resulta em uma eficiente hidrólise enzimática com a produção de glicose em um tempo razoável de 48-72 horas (TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

A eficiência com que a celulose é hidrolisada depende de alguns fatores que envolvem o sistema enzimático e também as características do substrato. A

presença de hemicelulose (68%) e lignina (71%) após o pré-tratamento utilizado neste trabalho pode ser mais um dos motivos pelos quais a conversão enzimática da celulose tenha sido baixa. Assim, a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é uma reação complicada devido a estruturas heterogêneas e propriedades das matérias-primas (HSU et al., 2010).

Alguns trabalhos comprovaram que a hemicelulose e lignina contida no material lignocelulósico forma uma barreira física influenciando negativamente na hidrólise enzimática (VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIKARI, 2010); (HSU et al., 2010). Öhgren et al. (2007) deslignificaram a palha de milho após o pré-tratamento a vapor e utilizaram xilanase na hidrólise da hemicelulose para aumentar a acessibilidade das celulases. Sob estas condições, o rendimento total da glicose após a hidrólise enzimática com celulases comerciais Celluclast 1.5L e Novozyme 188 ficou em torno de 87%. Dessa forma, neste trabalho, o processo de deslignificação e suplementação dos extratos celulásicos com xilanases durante a hidrólise enzimática poderia ter aumentado a conversão da celulose em açúcares.

3.5.3 Caracterização estrutural do bagaço de cana-de-açúcar, por microscopia eletrônica de varredura

Com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura, foi possível identificar as características morfológicas das amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (Figura 4A), pré-tratado (Figura 4B) e após a hidrólise enzimática (Figura 4C).

Como pode ser observado, o bagaço de cana *in natura* apresentou estrutura fibrosa, totalmente recoberta por células de parênquima. O pré-tratamento com H₂SO₄ não destruiu a estrutura fibrosa do bagaço, porém, diminuiu o aspecto compacto, ou seja, promoveu fragmentação da estrutura

morfológica do material lignocelulósico. Em contrapartida, após a hidrólise enzimática conduzida por 72 horas, não foram visualizadas modificações evidentes no bagaço de cana, em comparação ao pré-tratamento com H_2SO_4 , justificando a baixa quantidade de glicose liberada nesta etapa.

Os processos de pré-tratamentos são empregados para alterar a característica estrutural da biomassa lignocelulósica (celulose, hemicelulose e lignina). O principal objetivo do pré-tratamento ácido é solubilizar a fração hemicelulósica, proporcionando alterações na estrutura da lignina e aumento da área superficial da celulose para disponibilizar os sítios de ação para as enzimas (ALVIRA et al., 2010).

De acordo com a literatura, pode-se obter um material ainda mais modificado quando são utilizados pré-tratamentos que visam à remoção da lignina, que podem diminuir a barreira física encontrada pelas enzimas, aumentando a área de superfície de contato para a melhoria da hidrólise enzimática (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

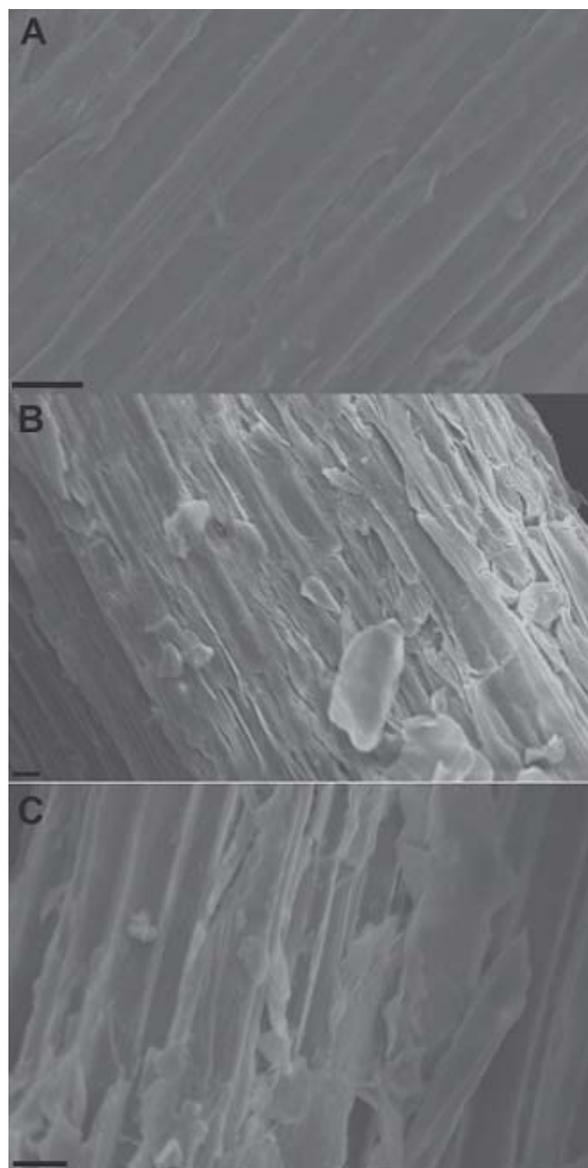


Figura 4 Eletromicrografias de varredura do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (A), após pré-tratamento com 2% H_2SO_4 (B) e após hidrólise enzimática por 72 horas (C). As barras A, B e C equivalem a 30 μm , 20 μm e 20 μm , respectivamente

4 CONCLUSÕES

Após o plaqueamento das 15 amostras de solo das regiões de Passos, Arcos e Luminárias, foram obtidos 103 isolados de leveduras, tendo todos apresentado as mesmas características morfológicas;

Em relação à atividade celulolítica, das 103 linhagens de leveduras isoladas nas regiões de cerrado, 18 foram positivas, ou seja, 17,47% apresentaram halo de degradação ao redor da colônia, evidenciando a produção de celulase.

Das 20 linhagens de leveduras avaliadas da região amazônica, 11 foram produtoras de celulase, correspondendo a 55% do total de isolados.

Dentre os 18 isolados com atividade celulolíticas da região do cerrado, 15 (83%) apresentaram IE entre 2,0 e 3,0, e 2 (11%) apresentaram $IE \geq 3,0$. Na região amazônica, todos os 11 isolados com atividade celulolítica apresentaram $IE > 2,0$ e 63,6 % tiveram $IE \geq 3,0$.

As leveduras produtoras de celulase foram identificadas como *Cryptococcus laurentii*.

Todos os isolados apresentaram atividade β -glicosidase superior as atividade de endo e exoglucanase, com destaque para o isolado UFLA 95.1B.

Após o pré-tratamento com 2% de H_2SO_4 , a 150°C, por 30 minutos, aproximadamente 43% do conteúdo de celulose e 32,34% da hemicelulose presente no bagaço de cana-de-açúcar foram liberados.

A concentração de glicose após 72 horas de hidrólise enzimática foi de 0,147 g/L, que corresponde a 16% de conversão da celulose, o que nos leva a concluir que o microrganismo *Cryptococcus laurentii* é um bom produtor de β -glicosidase.

Foi possível visualizar, por microscopia eletrônica de varredura, que o pré-tratamento aplicado ao bagaço de cana-de-açúcar alterou a estrutura morfológica do bagaço.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Otimizar a produção de enzimas.

Aumentar a carga enzimática para a melhoria da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

Após hidrólise enzimática, realizar a fermentação alcoólica e avaliar cinética de fermentação.

REFERÊNCIAS

- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, Jul. 2010.
- BENHAM, R. W. The genus cryptococcus: the present status and criteria for the identification of species. **Transactions of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 17, n. 5, p. 418-429, Mar. 1955.
- BRADFORD, M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 7, n. 72, p. 248-254, May 1976.
- BOTHA, A. Yeast in soil. In: ROSA, C.A., PÉTER, G. (Ed.). **The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Springer, 2006. p. 221-240.
- BOTHA, A. The importance and ecology of yeast in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 43, n. 1, p. 1-8, Jan. 2011
- CARDONA, C.A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, Jul. 2010.
- CASTRO, A. M. *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant β -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 162, n. 7, p. 2111-2122, Nov. 2010.
- CLOETE, K. J. et al. Evidence of symbiosis between the soil yeast *Cryptococcus laurentii* and a Sclerophyllous medicinal shrub, *agathosma betulina* (Berg.) pillans. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, n. 4, p 624-632, May 2009.
- COELHO, M.R. et al. Solos das áreas-piloto do projeto BiosBrasil (Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity: Phase I) município de Benjamin Constant, estado do Amazonas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, n. 67, dez. 2005.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Isolamento e identificação de leveduras. In: MOREIRA, F. M. S., HUISING, E. J., BIGNELL, D. E. (Org.). **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, 2010, p. 227-277.

DUARTE, W. F. et al. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 36, n. 4, p. 557–569, Apr. 2009.

FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, n. 3, p. 1351-1371, May 2000.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: um programa para análises e ensino de estatística. Lavras, 1999. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

FIDALGO, E. C. C. et al. Levantamento do uso e cobertura da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto BiosBrasil (Consevation and Sustainable Management of Below – Ground Biodiversity: phase I), município de Benjamim Constant (AM). **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, Rio de Janeiro, n. 71, 2005.

FOOD DRUGS ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 8. ed. Washington: AOAC International, 1998.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 51, n. 1-2, p. 72-78, Aug. 2010.

HALL, S. T.; WATSON, K. *Cryptococcus nyarrowii* sp. nov., a basidiomycetous yeast from Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, n. 3, p. 1033-1038, May 2002

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect C_x cellulose activity of Micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, London, v. 98, n. 1, p. 109-115, Jan. 1977.

HATANO, T. et al. Purification and caracterização of a Carboxymethylcellulose-degrading enzyme secreted by a yeast strain newly isolated from soil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 71, n. 5, p. 313-317, 1991.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioressouse Technology**, Essex, v. 100, n. 1, p. 10-18, Jan. 2009.

HSU, T.-C. et al. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4907-4913, Jul. 2010

JOB, J.; SUKUMARAN, R. K.; JAYACHANDRAN, K. Production of a highly glucose tolerant β -glucosidase by *Paecilomyces variotii* MG3: optimization of fermentation conditions using Plackett–Burman and Box–Behnken experimental designs. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 1385-1391, Aug. 2010.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 119-134, Oct. 2007.

KASANA, R. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulose on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, New York, v. 57, n. 5, p. 503-507, Nov. 2008.

KURTZMAN, C.; FELL, J.W. Yeasts. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G.; FOSTER, M.S. (Ed.). **Biodiversity of fungi**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 337-342.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.47, n. 1, p. 273-79, May 1972.

LIN, Y., TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 69, n. 6, p. 627-642, Feb. 2006.

MARTÍN, C. et al. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 98-100, n. 1-9, p. 699-716, Mar. 2002.

- MORAIS, P. B. et al. Yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n. 12, p.4251-4257, Dec.1995.
- MOREIRA, F. M. S. et al. Differentiation in the fertility of inceptisols as related to land use in the upper Solimões river region, western Amazon. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 2, p. 349-355, Dec. 2009.
- MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for treatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Issex, v. 96, p. 673-686, Apr. 2005.
- ÖHGREN, K., et al. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, Issex, v. 98, n. 13, p. 2503-2510, Sept. 2007.
- OLSSON, L., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 18, n. 5, p. 312-331, Apr. 1996.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 69-80, Aug. 2000.
- PAVLOVA, K. et al. Yeast strains from Livingston Island, Antarctica. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 46, n. 5, p. 397-401, Oct. 2001.
- POTHRAJ, C.; BALAJI, P.; EYINI, M. Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 20, p. 1882-1885, Oct. 2006.
- RAMOS, C. L. et al. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 2-3, p. 225-231, June 2010.
- SAHA, B. C. et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 12, p. 3693-3700, Dec. 2005.

SANTOS, V. T. O. et al. Characterization of commercial cellulases and their use in the saccharification of a sugarcane bagasse sample pretreated with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 37, Oct. 2010.

SLÁVIKOVÁ, E., VADKERTIOVÁ, R. The occurrence of yeast in the forest soil. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 40, n. 3, p. 207-212, Jul. 2000.

SLÁVIKOVÁ, E., KOSIKOVÁ, B., MIKULÁSOVÁ, M. Biotransformation of waste lignin products by the soil-inhabiting yeast *Trichosporon pullulans*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. 3, p.200-203, Mar. 2002.

SLÁVIKOVÁ, E., VADKERTIOVÁ, R. The diversity of yeast in the agricultural soil. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 43, n. 5, p. 430-436, Sept. 2003.

SOHAIL, M. et al. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 25, n. 6, p. 437-441, Sept. 2009.

SUKUMARAN, R. K. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 421-424, Feb. 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 1, p. 1-11, May 2002.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAK, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, Issex, v. 101, n. 13, p. 4744-4753, Jul. 2010.

THONGEKKAEW, J. et al. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 60, n. 2, p. 140-146, Aug. 2008.

THYGENSEN, A. Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidised wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 5, p. 606-615, Apr. 2003.

TSAO, G. T. et al. Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* for cellobiase production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 84-86, n. 1-9, p. 743-749, Mar. 2000.

VITAL, M. J. S. et al. Mycotoxinogenic yeast isolated from Amazon soils of the Maracá ecological station, Roraima- Brazil. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 230-235, Jul./Sept. 2002.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 26, n. 1, p.119-128, Jan. 1967.

VAN STADEN, J. et al. Phytase activity in *Cryptococcus laurentii* ABO 510. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 442-448, May 2007.

VÁRNAI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 46, n. 3-4, p. 185-193, Mar. 2010.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: Wiley, 1998. 362 p.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, New York, n. 24, n. 5, p. 452-481, Sept./Oct. 2006.