

ELZI RESENDE TAMBURINI

OBTENÇÃO DE ALCÓOL DO RESÍDUO CELULÓSICO
DE MANDIOCA POR DIFERENTES PROCESSOS
DESLIGNIFICANTES E HIDROLÍTICOS

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências dos Alimentos.

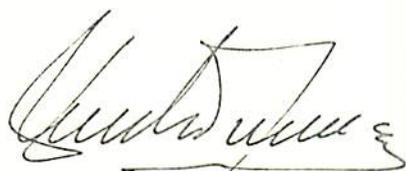
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS -- MINAS GERAIS

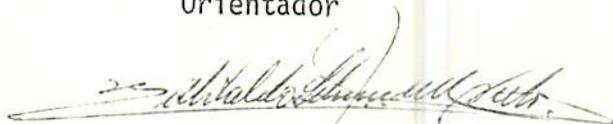
1981

OBTENÇÃO DE ALCÓOL DO RESÍDUO CELULÓSICO DE MANDIOCA POR
DIFERENTES PROCESSOS DESLIGNIFICANTES E HIDROLÍTICOS.

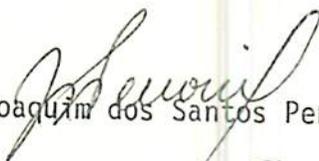
APROVADA



Prof. Raul Castro Gomes
Orientador



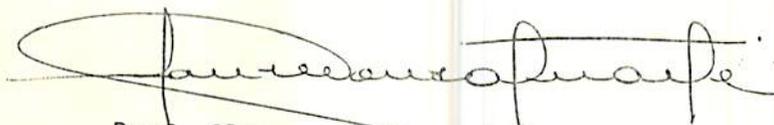
Prof. Willibaldo Schimidell Neto



Prof. Joaquim dos Santos Penoni



Prof. Paulo César Lima



Prof. Clauzer de Souza Duarte

À memória de meu Pai;

À minha mãe e irmãos com carinho.

Meu esposo Vínio,

Meus filhos

July Martha

Elnio

Herman Vínio

René Victor

Elzi Tereza

Glauco

pelo amor, compreensão,

e pelas horas de carinho

perdidas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

À Escola Superior de Agricultura de Lavras-MG, na pessoa de seu ilustre Diretor Prof. João Márcio Rios, pelo apoio recebido.

Ao Prof. Hélio de Souza, como Diretor da Escola de Farmácia Odontologia de Alfenas, pelo apoio à consecução deste trabalho.

À CAPES Coordenadoria do Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro.

À FAEPE Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, na pessoa do Secretário Executivo Prof. Luiz Carlos Gonçalves da Costa pelo apoio.

Ao Dr. Paulo Augusto Correa da Silva, Chefe da Usina de Álcool de Curvelo-MG., pelo apoio dado ao fornecimento do material necessário à realização deste trabalho.

Ao Geraldo Santos, Supervisor do Laboratório da Usina de Álcool de Curvelo-MG., pela atenção na coleta e remessa do resíduo.

Ao Professor Raul Castro Gomez, pelo estímulo, dedicação e paciência demonstrada durante a orientação da Tese.

Aos Profs. Maria Isabel Fernandes Chitarra e Adimilson Bosco Chitarra pelo apoio, incentivo e colaboração amiga.

Aos Profs. do Departamento de Ciências dos Alimentos, pelas atenções e ensinamentos recebidos.

Ao Prof. Paulo César Lima, pela colaboração e orientação estatística.

À Vânia Dea de Carvalho, Pesquisadora da EPAMIG, pelas orientações dadas e pela convivência amiga.

Aos funcionários do Departamento de Ciências do Alimentos e da EPAMIG, pela colaboração nas análises e agradável convívio.

Aos Departamentos de Química da ESAL, pelo apoio prestado.

Ao Wilson Ferreira de Carvalho Júnior, funcionário do Departamento de Química pela colaboração.

Aos funcionários da Biblioteca Central da ESAL, especialmente a Maria Aparecida Carvalho Silva, pela atenção e ajuda na revisão bibliográfica.

À Maria Tereza da Costa Esteves pela amizade.

Ao Dr. Roque N. Tamburini pela dedicação na revisão deste trabalho.

À Fátima de Souza Costa, pela colaboração na montagem dos gráficos.

Aos funcionários do Setor Administrativo da EFOA, Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pela colaboração valiosa nos serviços de datilografia e montagem desta.

Aos colegas: Conceição, Ângela, Wilson, José Antônio, Said e Evanor pelo saudável convívio.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste meu trabalho.

S U M Á R I O

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Material.....	15
3.2. Métodos.....	15
3.2.1. Deslignificação.....	15
3.2.2. Balanço de materiais.....	17
3.2.3. Hidrólise.....	17
3.2.4. Preparo do inóculo.....	18
3.2.5. Fermentação.....	18
3.2.6. Características avaliadas.....	19
3.2.7. Concentração alcoólica.....	20
3.2.8. Análise estatística.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Característica do resíduo.....	23
4.2. Tratamento de deslignificação.....	23
4.3. Hidrólise.....	48
4.4. Fermentação.....	55
4.5. Rendimento alcoólico.....	60
5. CONCLUSÕES.....	63
6. RESUMO.....	65
7. SUMMARY.....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos econômicos da política do petróleo ditada pelos países árabes, motivaram uma preocupação generalizada nos países consumidores em decorrência de ser o petróleo sua principal fonte de energia.

Encontrando-se o Brasil entre estes países e devido ao elevado custo e escassez do petróleo, surgiu, entre outras, a necessidade de desenvolvimento de pesquisas sobre fontes alternativas de energia.

ALMEIDA (1) informa ter a produção de álcool aumentado de forma acentuada nos últimos anos, sendo o seu emprego, como combustível, um imperativo econômico no país.

A crise energética que atualmente afeta a humanidade é sentida de modo mais acentuado pelos países em desenvolvimento, em vista da sua grande dependência do petróleo. Diante de tal conjuntura, torna-se imperativa a adoção de um elenco de medidas capazes de, a médio e longo prazo, minimizar os efeitos adversos da atual crise energética. O Brasil, graças à sua extensão territorial e disponibilidade de terras para cultivo, conta com amplos recursos para intensificar a exploração de culturas ricas em carboidratos para a produção de álcool.

O álcool originário da mandioca poderá contribuir para atenuar o problema, constituindo uma opção como combustível. É um recurso renovável, afastando-se portanto, a possibi-

lidade de esgotamento a qual se evidencia para o caso do petróleo.

BARROS, citado por GONÇALVES (13), informa que, com a crescente crise energética, a potencialidade e importância dos produtos derivados da mandioca cresceram não somente pela viabilidade de se fabricar álcool, mas porque a mandioca é uma cultura que apresenta ótima eficiência fotossintética líquida e boa taxa de produção de matéria seca. Desta forma, este vegetal surge como fonte capaz de transformar eficientemente a energia solar em alimentos e combustíveis.

A produção de etanol proveniente da fermentação da matéria prima de origem vegetal, constitui, na atualidade, uma das formas de aproveitamento da energia solar, pela sua conversão em combustível.

Pela literatura consultada, constatou-se que o resíduo celulósico da mandioca não despertou interesse, quanto ao seu emprego na produção de álcool, motivando assim a pesquisa proposta, que apresenta como objetivos.

- . Aproveitamento do resíduo celulósico da mandioca para a produção de etanol.
- . Por diferentes processos de deslignificação e de hidrólises, comparar os rendimentos alcoólicos após fermentação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

Conforme citação de Joly (22) a mandioca, pertencente à Família Euphorbiaceae, botanicamente conhecida como Manihot utilissima Pohl, possui raízes tuberosas ricas em carboidratos, constituindo uma cultura importante para a população de baixa renda das regiões tropicais, devido à grande utilização de suas raízes e ramos para fins alimentícios e industriais.

Segundo SACRAMENTO (41), a mandioca já era cultivada pelos índios brasileiros antes do descobrimento do Brasil. Os continentes que detêm as maiores produções são a África e a Ásia. A produção mundial atingiu, em 1978, 119.374.000 toneladas. O Brasil, no mesmo ano (1978) apresentou uma produção de 25.358.539 toneladas de mandioca, sendo a mesma cultivada em todos os Estados da Federação, por ser planta de fácil adaptação. Dentre os estados, a Bahia apresenta-se como maior produtor. Em Minas Gerais, a produção foi de 1.864.166 toneladas (1978), sendo a maior concentração da cultura em termos industriais, na região metalúrgica.

Das substâncias fotossintetizadas, a celulose é a mais abundante na face da terra; por isto, justificando os variados estudos que tem sido feitos visando ao seu melhor aproveitamento na obtenção de combustíveis. Mas, segundo afirmação de COWLING e KIRK (8), muita celulose na natureza permanecerá inadequada para bioconversão, a menos que um processamento efetivo

e economicamente viável seja desenvolvido para remover ou modificar uma parte da lignina, aumentando significativamente a suscetibilidade às enzimas.

PEITERSEN e ROSS (37) observaram que a fibra de celulose é composta de muitas microfibrilas, consistindo de longas cadeias de celulose. Esta é composta de monômeros de glicose, em ligações glicosídicas β 1-4, e segundo PIGDEN e HEANEY (38) o número de unidades de glicose constitui o grau de polimerização, que varia entre as diferentes fontes de celulose. Segundo PEITERSEN e ROSS (37) as moléculas de celulose estão sempre unidas por ligações de hidrogênio entre as fibras. Algumas regiões são mais firmemente unidas (ordenadas ou cristalinas) que outras (amorfas ou paracristalinas), provavelmente com transição regular entre estas duas regiões. Afirmam ser a celulose cristalina consideravelmente mais difícil de ser hidrolisada que a amorfa.

De acordo com HAWORT, citado por HEUSER (18), as ligações cruzadas de celulose podem ser responsáveis pela sua insolubilidade em água, porque suprime o efeito do grupo hidroxila em suas posições acessíveis ao longo da cadeia. Este fato encontra apoio nas afirmações de ZABRISKE et alii (51), quando afirmam que na molécula de celulose existem ligações de hidrogênio inter e intra cadeia, na estrutura secundária. A ligação de hidrogênio impõe rigidez ao polímero e impede sua solubilização em água. De acordo com RANBY (39), foi sugerido, que estas ligações também ocorrem na celulose amorfa.

KING, citado por COWLING e KIRK (8), sugere que a

grande resistência da celulose cristalina, quando comparada com a amorfa, pode não ser somente devido à sua inacessibilidade física às moléculas de enzimas, mas também à conformação e rigidez estérica das unidades de glicose. Nestas regiões, as unidades de glicose ocorrem na conformação de cadeira, com unidades glicopiranosose orientadas em direções opostas e cruzadas.

Segundo COWLING e KIRK (8), a celulose, na sua forma cristalina é depositada nas paredes celulares das plantas, num contato físico íntimo com a lignina, tornando assim seus tecidos fortes e duráveis; são benefícios biológicos, mas, um efetivo impedimento para que ocorra bioconversão eficiente.

Consideram ser a cristalinidade e lignificação que limitam marcadamente a acessibilidade e, portanto, a suscetibilidade da celulose às enzimas celulolíticas e outros agentes hidrolíticos. Segundo MENEZES et alii (33), estas características, bem como a sua insolubilidade em água, dificultam o processo de degradação, constituindo um impecilho para seu emprego como fonte de carbono na produção de biomassa e de álcool.

De acordo com GREGOR e JEFFRIES (14), a biomassa de plantas é composta primariamente de celulose, hemicelulose e lignina em várias proporções, dependendo da espécie e localização na planta.

De acordo com KIRK e HARKIN (26) ROBERTSON et alii (40) GADEN (10), depois da celulose, a lignina é o composto orgânico mais abundante na natureza. É um polímero amorfo, formado por monômeros de fenil propano, aromático altamente ramificado, tridimensional constituído por unidades de álcool coniferil nas

nas gimnospermas e siringil nas angiospermas. Está sempre associado fisicamente e, em alguma extensão, quimicamente com polissacarídeos nas paredes celulares das plantas.

YANG et alii (50) afirmam que entre os mais abundantes recursos orgânicos renováveis estão os lignocelulósicos e que provavelmente o maior impedimento técnico para o desenvolvimento do processo de bioconversão é a proteção física da celulose pela lignina. O rompimento desta barreira por pré-tratamento físico ou químico permite maior eficiência do processo.

KELSEY e SHAFIZADEH (25) reforçam afirmando que a deslignificação ou quebra das ligações de lignina, aumenta a acessibilidade das fibras celulósicas.

Segundo COWLING e KIRK (8), a suscetibilidade da celulose, como substrato para o processo de conversão enzimática, é determinada pela sua acessibilidade às enzimas extra celulares ou metabólicos secretados por microorganismos celulolíticos. Consideram o contato físico direto entre estes agentes catalíticos e substrato como pré requisito para a hidrólise.

SUDO et alii (44) afirmam que os materiais lignocelulósicos, para atingirem sacarificação completa, devem ser modificados, em alguma extensão, por processos físicos, químicos ou tratamentos biológicos, precedentes à digestão enzimática.

Outro composto que aparece associado à celulose nos vegetais, é a hemicelulose que, segundo LEE et alii (29), não tem despertado muito interesse como fonte de combustível ou produtos químicos, embora conte com 10 a 40% do conteúdo de carboidrato e lignina de vários resíduos. Conforme citação de

COWLING e EROWN (7) a hemicelulose é um heteropolímero de glicose, xilose, galactose, manose, arabinose etc. As unidades de monossacarídeos se encontram em ligações glicosídicas 1-3, 1-6 e 1-4. Muitas são moléculas lineares, mas algumas possuem curtas ramificações. Possui peso molecular menor que a celulose.

COWLING e KIRK (8) informam que o grau de polimerização da hemicelulose raramente excede a 200 unidades. LEE et alii (29) afirmam ser a hemicelulose consideravelmente mais fácil de ser hidrolisada em seus monômeros que a celulose, ocorrendo a possibilidade de ser seletivamente hidrolisada da biomassa, tornando assim o resíduo mais suscetível à hidrólise subsequente por enzimas ou por ácidos.

Como a celulose, hemicelulose e lignina estão associadas na parede celular dos vegetais; e para que ocorra, um maior ou melhor aproveitamento, torna-se imprescindível pré tratamento que venha liberar estes polímeros da ligação com a lignina, favorecendo assim, u'a melhor interpretação dos agentes hidrolíticos, quer seja por enzimas ou ácidos, na estrutura dos carboidratos restantes; pois segundo TANISSARI et alii (46), a finalidade do pré tratamento é aumentar, de forma econômica, a suscetibilidade do material celulósico à degradação enzimática e modificação completa de certas propriedades. Alguns dos efeitos desejáveis do pré tratamento inclui aumento de deslignificação da celulose amorfa, diminuição da cristalinidade, do tamanho das partículas e do grau de polimerização. Afirmam também que, dependendo da fonte e tipo do material celulósico, a composição e estrutura podem variar significativamente e podem influ

enciar o pré tratamento e eficiência do rendimento de hidrólise.

DUNLAP et alii (9), citam o tratamento com o hidróxido de sódio como sendo o melhor método para aumentar a digestibilidade e que, a aplicação de álcali, resulta no rompimento da estrutura da lignina, no intumescimento da celulose e na diminuição da cristalinidade.

KARUBE et alii (23) informam que o desenvolvimento de um processo simples, eficiente e econômico para a conversão da celulose, pode suavizar os problemas da poluição, causadas ao homem pelos resíduos, podendo, assim, por degradação da mesma, liberar monossacarídeos de valor para a fermentação.

Afirmam MONTENECOURT et alii (35), que a biomassa celulolítica fornece atualmente uma excelente fonte de açúcares fermentecíveis. Entretanto, em muitos casos, estes açúcares ocorrem como polissacarídeo de alto peso molecular e não são diretamente disponíveis para a fermentação microbiana. Para a conversão desses açúcares, dois métodos são geralmente usados como praticáveis e econômicos: hidrólise ácida e enzimática. Afirmam também que cada método tem suas vantagens e desvantagens, mas, os fatores dominantes na operação devem ser o baixo consumo de energia e a baixa poluição, a custos compatíveis como fonte alternativa de energia.

HOWELL e STUCK (19) consideram que a cinética da hidrólise da celulose depende de vários fatores: a natureza do sistema de enzima empregado, estrutura da celulose e efeito inibitório do substrato, produto intermediário ou final, con-

teúdo de água e outras substâncias como a lignina.

Com relação à hidrólise por ácido, HELENE et alii (16') consideram que as condições de temperatura, pressão, acidez e tempo de reação devem ser escolhidos, não somente pelos critérios impostos pela cinética da reação, mas também segundo critérios econômicos e tecnológicos.

GRETHLEIN (15) considera a hidrólise ácida da celulose como um processo viável e potencialmente econômico.

PEITERSEIN e ROSS (37) classificam as enzimas celulolíticas em exo e endo glucanases. KOENINGS (28), complementa que a decomposição microbiana da celulose é geralmente atribuída à interação dessas duas enzimas. Segundo PEITERSEIN e ROSS (37), seu mecanismo exato é ainda discutido.

De acordo com HUMPHREY (21), a dificuldade no uso da celulose é que esta ocorre como um material cristalino, altamente ordenado, associado regularmente com substâncias estáveis como a lignina e hemicelulose. Assim, na sua forma natural, não é, geralmente, suscetível de fácil degradação. Degradação típica da celulose ocorre com o microorganismo Trichoderma viride que possui onze enzimas, mas, somente três reações enzimáticas são envolvidas. A enzima endoglucanase ataca a região amorfa, deslocando a celulose cristalina e produzindo oligossacarídeos solúveis. Estes são atacados pela celobiose glucanase que age sinergicamente com a endo glucanase, produzindo celobiose. Este dissacarídeo é atacado pela glicosidase para produzir glicose, que é utilizada pelo microorganismo para seu crescimento. Segundo GHOSE e DAS, citados por HUANG (20), o produto final,

celobiose e glicose, são os inibidores competitivos da ação da celulase.

BRACANNOT, citado por HEUSER (18), admitiu que a hidrólise da celulose, com ácido sulfúrico, deve ser conduzida em duas etapas. Conforme citação de SITTON (43) a primeira etapa envolve o tratamento com ácido sulfúrico diluído para conversão de pentosanas, seguido por tratamento com ácido sulfúrico concentrado para a conversão de hexosanas. FLECHSIG, citado por HEUSER (18), acrescentou ser este procedimento necessário para obter alto rendimento de glicose e que, o uso de ácido forte somente, não é aconselhável, pois a celulose tende a ser carbonizada.

Segundo WALSETH (48) a diferença entre o mecanismo de sacarificação da celulose por ácido e por enzimas; mostra que a hidrólise enzimática da celulose causa menor redução, no grau de polimerização, que a hidrólise por ácido. A mais provável razão para tal diferença é o relativo tamanho dos dois catalizadores e sua habilidade para penetrar na estrutura da celulose. Grandes moléculas de celulase, (peso molecular em torno de 25.000-67.000), penetram somente entre os grandes espaços inter cristalinos. Devido à sua alta atividade catalítica, toda ligação glicosídica β 1-4 da cadeia que pode ter contato, é realmente hidrolisada para formar açúcares solúveis. Por outro lado, moléculas de ácidos inorgânicos são relativamente pequenas e são capazes de se difundir entre os pequenos espaços inter cristalinos, atacando as ligações glicosídicas, que de outro modo não são disponíveis às enzimas.

Conforme citação de CAMHI (5), os processos utilizados na produção de álcool através da fermentação, dependem da natureza da matéria prima; assim, as que contêm amido ou celulose, necessitam de um tratamento com enzimas específicas; já as matérias primas que contêm açúcares simples, são fermentadas, sem hidrólise prévia, depois de certos ajustes rotineiros do mosto. Recomenda-se utilizar leveduras capazes de produzir e tolerar altas concentrações de álcool, assim como apresentar características uniformes e estáveis durante a fermentação.

SU e PAULAVICIUS (45) afirmam que o baixo índice de sacarificação da celulose prolonga o tempo de fermentação.

SANTINI e VAUX (42) relataram que o grau e extensão de fermentação da glicose a álcool, são controlados por algumas variáveis como: pH, tempo, temperatura, concentração de leveduras, glicose e nutrientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

As amostras usadas no experimento, foram do resíduo proveniente da fermentação alcoólica de hidrolisado do amido de mandioca, procedentes da Usina de Álcool de Curvelo MG. (USAC) (figura 1), obtendo-se aproximadamente 192 Kg de resíduo por tonelada de mandioca processada.

O material era coletado mensalmente, no período de março de 1980 a março de 1981; enviados ao Laboratório do Departamento de Ciências dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura de Lavras-MG. No Laboratório, após a secagem as amostras eram pulverizadas em moinho tipo "Willey"; tamizadas em malha de 0,42 mm, acondicionadas em vidros âmbar, hermeticamente fechados e mantidos à temperatura ambiente.

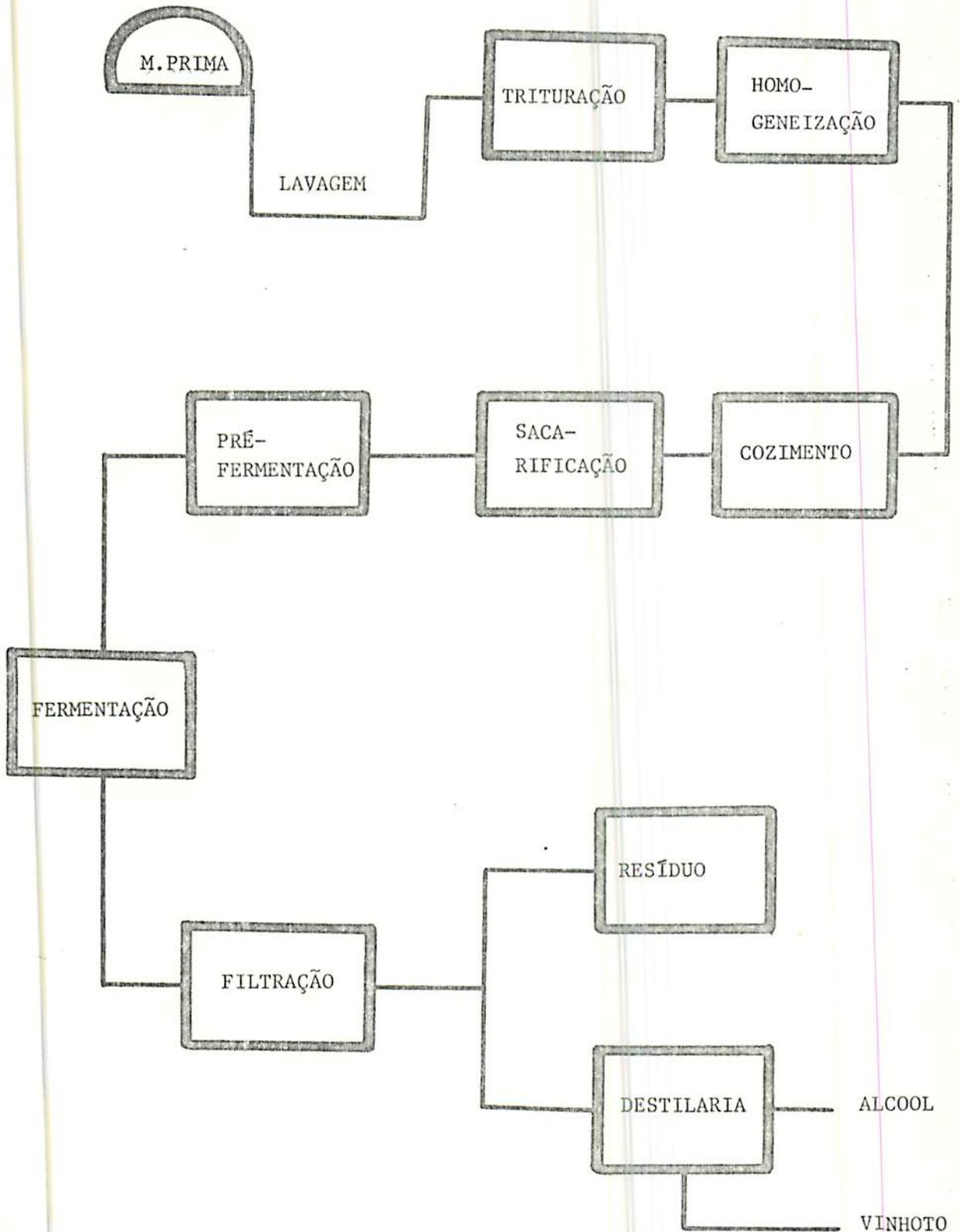


FIGURA 1 - Fluxograma da Usina de Álcool de Curvelo-MG USAC

3.2. Métodos

3.2.1. Deslignificação

Do resíduo, foram retiradas, ao acaso, três amostras, nos meses de março, julho e novembro, com 20 subamostras de 10g cada, submetidas aos tratamentos de deslignificação seguintes:

a) Deslignificação com etanol

Este tratamento foi realizado segundo a técnica de SUDO et alii (44) modificado.

O resíduo com 40 ml de etanol a 95%, levado à ebulição por 30 minutos; filtrado e levado à estufa, a 60°C, durante à noite. As amostras com água destilada foram levadas ao micro digestor modelo 175 por 12 horas a 40°C; foram filtradas, lavadas com acetona e secadas por 30 minutos a 60°C. A seguir, foram adicionados por g de resíduo: 32 ml de água destilada, 0,3g de cloreto de sódio e 2 gotas de ácido acético glacial; a mistura colocada em banho-maria a 37°C, por quatro horas (a cada hora, acrescentaram-se 10 gotas de ácido acético); logo após, submetida à filtração. Ao filtrado, foi adicionado 100 ml de hidróxido de potássio 1N, mantendo-se a temperatura ambiente por duas horas, agitando-se a cada 10 minutos. Filtrou-se, adicionando-se ao resíduo 100 ml de hidróxido de potássio 4N mantendo-se a temperatura ambiente por duas horas. A seguir, foi novamente filtrado e secado a 60°C, durante a noite. Ao resíduo foi adicionado 50 ml de ácido acético a 20%, deixando por 10 minutos; foi filtrado e levado à estufa a 60°C por três horas.

b) Deslignificação com álcali

Este tratamento foi realizado segundo a técnica de TOYAMA e OGAWA (47). O resíduo foi autoclavado a 120°C com solução de hidróxido de sódio a 1% por uma hora; a seguir lavado com água, filtrado e seco ao ar e subsequente ebulição em solução a 1/5 da mistura v/v de peróxido de hidrogênio e ácido acético, por uma hora, filtrado e levado à estufa a 60°C, durante a noite.

3.2.2. Balanço de Materiais

Realizou-se um balanço de materiais, em três subamostras de 13g cada, respectivamente, das amostras usadas no tratamento de deslignificação, visando determinar as variações da composição do resíduo nas diferentes etapas dos tratamentos de deslignificação.

3.2.3. Hidrólises

Após os tratamentos de deslignificação, para cada processo de hidrólise foram escolhidas, aleatoriamente, 45 subamostras sendo: 5 subamostras do resíduo deslignificado com etanol e 5 do tratamento com álcali, e 5 subamostras não submetidas à deslignificação, de cada amostra do resíduo.

a. Hidrólise Enzimática

Realizada segundo técnica de SUDO et alii (44). Foram usados: 1,0g do resíduo triturado e passado em peneira de 0,42mm; misturado com 50 ml de solução tampão de acetato de sódio (pH=5,0), contendo 25 mg de celulase Nº C-1437, de Trichoderma viride, cuja atividade de 0,13 unidades por

mg de sólido, (unidade essa que libera 1µmol de glicose da celulose em uma hora a pH=5,0 e 37°C), fornecida por Sigma Chemical Company - USA. O material assim preparado, foi submetido a agitação constante, a 37°C por 72 horas.

b. Hidrólise Ácida

Realizada conforme a técnica de SITTON et alii (43). Foram usados 1g de resíduo triturado e passado em peneira de 0,42mm; foi tratado com H₂SO₄ diluído a 4,4%, a 100°C por 50 minutos. A mistura foi filtrada, sendo o líquido rico em xilose. O sólido após secagem a temperatura ambiente foi impregnado com solução de H₂SO₄ a 85%. A esta suspensão adicionou-se água para que se tivesse uma concentração de 8% de H₂SO₄; a hidrólise foi conduzida a 110°C por 10 minutos, a seguir filtrado, sendo o líquido rico em glicose.

3.2.4. Preparo do Inóculo

Para a fermentação a alcoólica utilizou-se Saccharomyces cerevisiae NCYC nº 366, mantido em Agar Malte em laboratório. A levedura foi inoculada em tubos, contendo 10 ml de Caldo Extrato Malte estéril e incubados a 28°C por 72 horas. Após este período, foi a levedura inoculada em (Erlenmeyer de 500 ml) Caldo Extrato Malte estéril e incubada, a 28°C, por 72 horas, agitando-se periodicamente. A levedura, assim desenvolvida, foi centrifugada a 7.000 rpm, por 5 minutos; lavada três vezes, diluída a 100 ml com solução de NaCl a 0,95%.

3.2.5. Fermentação

Após a hidrólise, ajustou-se o pH dos extratos a 5,0, adicionando-se os seguintes nutrientes, por litro : 1,0g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 g de KH_2PO_4 e 0,05g de $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (32). Distribuíram-se em Erlenmeyer, volumes de 50 e 100 ml, dos extratos, hidrolisados por enzima e ácido, respectivamente, sendo autoclavados a 120°C , por 15 minutos. Inoculou-se a levedura Saccharomyces cerevisiae, a uma proporção de 10%, em volume e incubou-se a 30°C por dez dias.

Amostras do substrato sem deslignificar foram submetidas às mesmas condições referidas anteriormente para controle.

3.2.6. Características Avaliadas

Nas amostras do resíduo foram determinados os teores de umidade, amido, açúcares redutores e totais, celulose, hemicelulose e lignina; nos extratos hidrolisados, determinaram-se os açúcares redutores e totais, celulose e hemicelulose; nos extratos fermentados foi efetuada a determinação dos açúcares redutores, totais e etanol.

Os açúcares redutores e totais, antes da fermentação do extrato foram determinados após a autoclavagem com os nutrientes.

As determinações referidas foram realizadas de acordo com a seguinte metodologia:

a. Umidade

Conforme técnica preconizada pela AOAC (2).

b. Amido

Extraído segundo método AOAC (2) e identificado pelo método SOMOGY NELSON (36).

c. Açúcares Redutores e Totais

Foram doseados segundo o método de SOMOGY NELSON (36).

d. Celulose, Hemicelulose e Lignina

Determinados de acordo com o método descrito por BAILEY (3).

e. Etanol

Seguindo-se o método analítico de MAXON e JOHNSON (31).

3.2.7. Concentração Alcoólica

Calculado em mg por 100 ml dos extratos, após fermentação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características do Resíduo

Os resultados do Quadro 1, mostram as características físicas e químicas das amostras de resíduos, antes dos tratamentos de deslignificação. Embora tenha havido diferenças entre as amostras, algumas não foram significativas. Considerando que as amostras foram obtidas em épocas diferentes do ano, e segundo citação de CORREA (7), a composição química das raízes de mandioca é variável, de acordo com o cultivar, idade da planta, local e época do ano, justifica-se, assim, as variações, observadas nas análises físicas e químicas do resíduo.

4.2. Tratamento de Deslignificação

No Quadro 2 e nas Figuras 2, 4, 6, 8, 10 e 11, podem-se observar os resultados obtidos, após os tratamentos de deslignificação. Nos Quadros 3, 4, 5, 6 e nas Figuras 3, 5, 7, 9, 12 e 13 encontram-se os resultados obtidos, após o balanço de materiais.

Verifica-se pelo Quadro 2 que, no tratamento de deslignificação com etanol, houve aumento variado, no teor de celulose, em todas as amostras, de acordo com as diferentes épocas de coleta do material, quando comparadas com as amostras controle, (Quadro 1). Neste tratamento a média de acréscimo de celulose foi 8,9%, em relação ao controle, (Figura 2).

Nota-se pelo balanço de materiais, apresentado no

Quadro 3, que houve acréscimo na percentagem de celulose e, conseqüentemente perdas de outros componentes. Verificou-se a créscimo de celulose em todas as etapas do processo, exceto na primeira (Figura 3).

Observa-se que no balanço de materiais do tratamento de deslignificação com etanol, o acréscimo de celulose foi, em média, aproximadamente, 4,5%, ocorrendo perdas de 44,4% dos outros componentes (açúcares, amido, lignina e hemicelulose).

No tratamento com álcali, verifica-se pelos resultados apresentados no Quadro 2, que também ocorreu variação nos teores de celulose, entre as amostras. O acréscimo médio de celulose, neste tratamento, foi de 20,2%, portanto, 11.4% superior ao tratamento com etanol (Figura 2). Tal ocorrência pode ser confirmada através do balanço de materiais apresentado no Quadro 5.

Um maior aumento de celulose ocorreu na segunda etapa do processo (Figura 3) quando o resíduo foi submetido ao peróxido de hidrogênio e ácido acético.

Do mesmo modo que no tratamento com etanol, naquele com álcali, no balanço de materiais, houve aumento na percentagem de celulose (14,7%) e conseqüentemente perda de outros componentes (em média 47,3%); sendo, porém, o acréscimo de celulose superior ao do tratamento de deslignificação com etanol. Em decorrência desse aumento de celulose, ocorreram perdas de outros componentes do resíduo como: hemicelulose, lignina e amido. Neste tratamento, ocorreu menor solubilização dos açúcares que no tratamento anterior. O aumento de celulo-

se pela deslignificação com álcali, concorda com os resultados de MILLET et alii (34), ao afirmarem que, em materiais celulósicos, assim tratados, ocorrem intumescimento da celulose e separação de seus elementos estruturais.

QUADRO 1 - Características físicas e químicas das amostras do resíduo de mandioca, antes de serem submetidas aos tratamentos de deslignificação - Lavras-MG. 1980

AMOSTRAS Nº	Determinações	Umidade	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Amido	Açucares redutores	Açucares totais
1- março		8.40	18.20	27.10	35.80	15.90	0.80	1.30
2- julho		4.80	16.80	21.90	35.40	11.60	0.30	0.60
3- novembro		3.80	17.80	27.10	34.50	9.90	0.80	1.20

Os resultados foram expressos em percentagem base seca.

QUADRO 2 - Características físicas e químicas das amostras do resíduo de mandioca, após tratamentos de deslignificação. Lavras-MG. 1980

Amostras*	Características	Deslignificação	
		Etanol	Álcali
1	Umidade	9.72	8.14
2		3.61	6.41
3		5.22	4.73
1	Celulose	19.28	23.49
2		18.89	20.77
3		19.33	19.23
1	Hemicelulose	22.25	22.08
2		23.46	22.43
3		22.48	21.65
1	Lignina	17.51	16.10
2		17.33	12.97
3		17.85	14.41
1	Amido	4.83	7.58
2		5.91	2.95
3		5.26	5.18
1	Açúcares redutores	0.00	0.17
2		0.00	0.11
3		0.00	0.77
1	Açúcares totais	0.00	0.20
2		0.00	0.17
3		0.00	1.00

* 1- março
2- julho
3- novembro

Os resultados foram expressos em percentagem base seca.

QUADRO 4 - Balanço de materiais para a fração insolúvel no processo de extração com etanol 95% do resíduo celulósico da mandioca (g base seca). Lavras-MG. 1980.

Determinações	Amostras		ETAPAS DE EXTRAÇÃO (*)																	
	1						2						3							
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
Peso total do resíduo (g)	13	11.94	7.67	5.38	4.97	2.40	13	11.93	8.57	6.63	6.44	2.67	13	12.73	9.64	8.64	6.38	3.36		
Celulose	2.37	2.10	1.36	0.96	0.89	0.45	2.18	2.08	1.45	1.12	1.11	0.48	2.31	2.11	1.68	1.57	1.12	0.62		
Hemicelulose	3.52	2.91	2.02	1.39	1.26	0.58	2.85	3.04	2.30	1.84	1.66	0.61	3.52	3.28	2.49	2.20	1.57	0.78		
Lignina	4.65	3.95	2.15	1.36	0.86	0.41	4.60	3.90	1.82	1.23	1.17	0.45	4.48	4.15	2.08	1.75	0.99	0.54		
Açúcares re- dutores	0.10	0.04	-	-	-	-	0.04	-	-	-	-	-	0.10	0.04	-	-	-	-		
Outros açúca- res	0.17	0.04	-	-	-	-	0.08	0.03	-	-	-	-	0.16	0.08	-	-	-	-		
Amido	2.07	1.52	0.74	0.46	0.31	0.06	1.51	1.20	0.65	0.46	0.14	0.05	1.29	1.00	0.65	0.49	0.34	0.07		
Sólidos to- tais	12.88	10.14	6.92	4.17	3.32	1.50	11.26	9.04	6.22	4.65	4.08	1.59	11.87	10.66	6.90	6.01	4.02	2.01		

(*)

- 1- Composição inicial
- 2- Após extração com etanol 95%
- 3- Após extração com água em digestor por 12 horas
- 4- Após extração com água, cloreto de sódio e ácido acético
- 5- Após extração com hidróxido de potássio 1N e 4N
- 6- Após extração com ácido acético 20%

QUADRO 3 - Balanço de materiais para a fração insolúvel do resíduo celulósico de mandioca no processo de deslignificação com etanol. (7 base seca) - Lavras-MG. 1980.

Amostras	1						2						3					
	ETAPAS DE EXTRAÇÃO (*)																	
Determinações	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Umidade	0.90	15.09	9.80	22.50	33.22	37.71	13.40	24.25	27.45	29.88	36.67	40.47	8.70	16.29	28.45	30.45	37.02	40.19
Celulose	18.20	17.58	17.70	17.84	17.90	18.75	16.80	17.43	16.91	16.89	17.23	17.97	17.80	16.57	17.42	18.17	17.55	18.45
Hemicelulose	27.10	24.37	26.33	25.83	25.35	24.16	21.90	25.48	26.83	27.75	25.77	22.84	27.10	25.76	25.82	25.46	24.60	23.21
Lignina	35.80	33.08	28.03	25.27	17.30	17.08	35.40	32.69	21.23	18.55	18.16	16.85	34.50	32.60	21.57	20.25	15.51	16.07
Açúcares redutores	0.80	0.33	-	-	-	-	0.30	0.16	-	-	-	-	0.80	0.31	-	-	-	-
Açúcares totais	1.30	0.33	-	-	-	-	0.60	0.25	-	-	-	-	1.20	0.62	-	-	-	-
Amido	15.90	12.73	9.64	8.55	6.23	2.50	11.60	10.05	7.58	6.93	2.17	1.87	9.90	7.85	6.74	5.67	5.32	2.08

(*)

- 1 - Composição inicial
- 2- Após extração com etanol 95%
- 3- Após extração com água em digestor por 12 horas
- 4- Após extração com água, cloreto de sódio e ácido acético
- 5- Após extração com hidróxido de potássio 1N e 4N
- 6- Após extração com ácido acético 20%

QUADRO 3 - Balanço de materiais para a fração insolúvel do resíduo celulósico de mandioca no processo de deslignificação com etanol. (% base seca) - Lavras-MG, 1980.

Determinações	1						2						3					
	ETAPAS DE EXTRAÇÃO (*)																	
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Umidade	0.90	15.09	9.80	22.50	33.22	37.71	13.40	24.25	27.45	29.88	36.67	40.47	8.70	16.29	28.45	30.45	37.02	40.19
Celulose	18.20	17.58	17.70	17.84	17.90	18.75	16.80	17.43	16.91	16.89	17.23	17.97	17.80	16.57	17.42	18.17	17.55	18.45
Hemicelulose	27.10	24.37	26.33	25.83	25.35	24.16	21.90	25.48	26.83	27.75	25.77	22.84	27.10	25.76	25.82	25.46	24.60	23.21
Lignina	35.80	33.08	28.03	25.27	17.30	17.08	35.40	32.69	21.23	18.55	18.16	16.85	34.50	32.60	21.57	20.25	15.51	16.07
Açúcares redutores	0.80	0.33	-	-	-	-	0.30	0.16	-	-	-	-	0.80	0.31	-	-	-	-
Açúcares totais	1.30	0.33	-	-	-	-	0.60	0.25	-	-	-	-	1.20	0.62	-	-	-	-
Amido	15.90	12.73	9.64	8.55	6.23	2.50	11.60	10.05	7.58	6.93	2.17	1.87	9.90	7.85	6.74	5.67	5.32	2.08

(*)

- 1 - Composição inicial
- 2- Após extração com etanol 95%
- 3- Após extração com água em digestor por 12 horas
- 4- Após extração com água, cloreto de sódio e ácido acético
- 5- Após extração com hidróxido de potássio 1N e 4N
- 6- Após extração com ácido acético 20%

QUADRO 5 - Balanço de materiais para a fração insolúvel do resíduo celulósico de mandioca no processo de deslignificação com Alkali. (% base seca). Lavras-MG. 1980.

Determinações	Amostras	ETAPAS DE EXTRAÇÃO (*)								
		1			2			3		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Umidade	0.90	29.12	38.09	13.40	34.75	36.14	8.70	38.40	42.87	
Celulose	18.20	18.54	20.35	16.80	17.55	20.62	17.80	18.87	19.57	
Hemicelulose	27.10	22.58	21.68	21.90	22.30	22.37	27.10	22.70	20.37	
Lignina	35.80	23.27	14.15	35.40	20.89	17.13	34.50	16.44	14.20	
Açúcares redutores	0.80	0.49	0.43	0.30	0.23	0.22	0.80	0.23	0.02	
Açúcares totais	1.30	0.78	0.44	0.60	0.39	0.38	1.20	0.31	0.03	
Amido	15.90	5.22	4.86	11.60	3.69	3.14	9.90	3.05	2.94	

(*)

1- Composição inicial

2- Após extração com hidróxido de sódio 1%

3- Após extração com peróxido de hidrogênio e ácido acético v/v.

QUADRO 6 - Balanço de Materiais para a fração insolúvel no processo de extração com hidróxido de sódio 1% do resíduo celulósico da mandioca (g base seca). Lavras-MG. 1980.

Amostras	ETAPAS DA EXTRAÇÃO (*)								
	1			2			3		
Determinações	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Peso total do resíduo (g)	13	10.14	2.26	13	12.73	2.86	13	12.77	3.73
Celulose	2.37	1.88	0.46	2.18	2.26	0.59	2.31	2.41	0.73
Hemicelulose	3.52	2.29	0.49	2.85	2.84	0.64	3.52	2.90	0.76
Lignina	4.65	2.36	0.32	4.60	2.66	0.49	4.49	2.10	0.53
Açúcares redutores	0.10	0.05	0.012	0.04	0.03	0.007	0.10	0.03	0.001
Outros açúcares	0.17	0.08	0.019	0.08	0.05	0.011	0.16	0.04	0.001
Amido	2.07	0.53	0.11	0.51	0.47	0.09	1.29	0.39	0.11
Sólidos totais	12.88	7.19	1.41	11.26	8.31	1.74	11.87	7.89	2.14

(*)

- 1- Composição inicial
- 2- Após extração com hidróxido de sódio 1%
- 3- Após extração com peróxido de hidrogênio e ácido acético v/v.

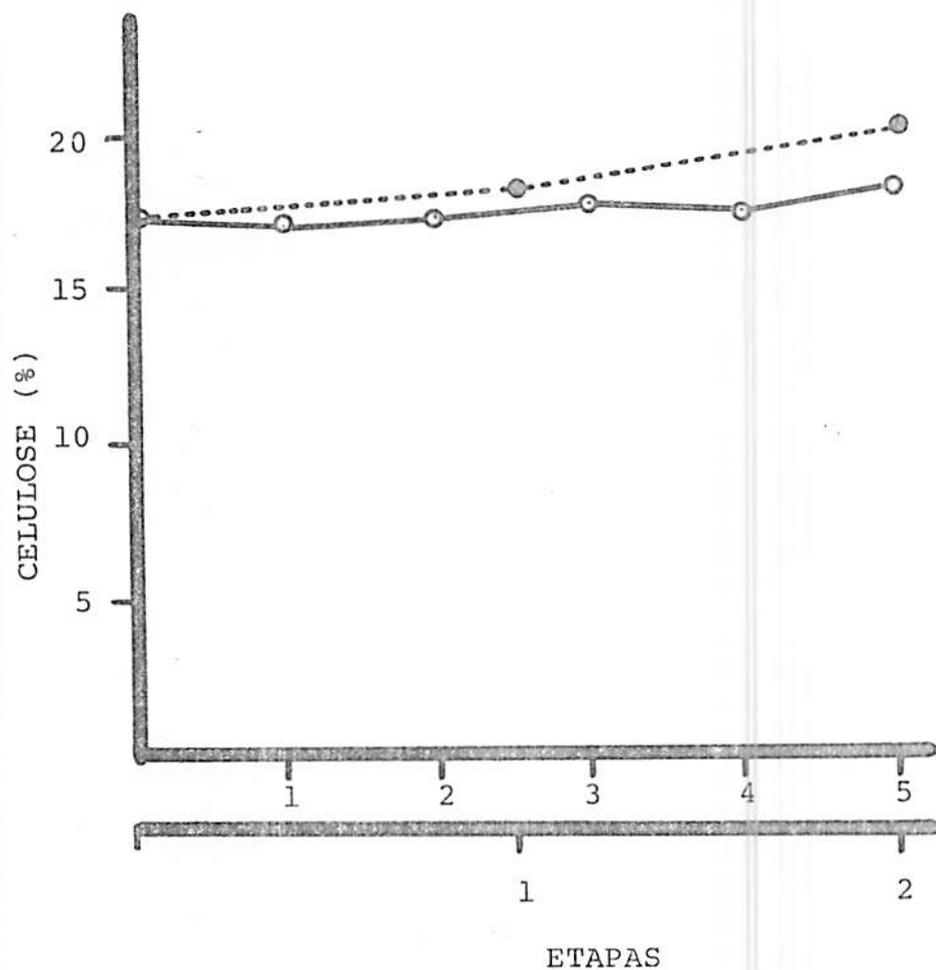


FIGURA 2 - Variações nos teores de celulose, nas diferentes etapas do balanço de materiais, dos tratamentos de deslignificação com etanol (0---0) e com álcali (●---●).

Quanto à hemicelulose, verifica-se pelos resultados do Quadro 2, que no tratamento de deslignificação com etanol, ocorreu redução nos seus teores, nas primeira e terceira amostras. Enquanto, na segunda amostra, ocorreu um ligeiro acréscimo, em relação ao controle (Quadro 1). A média de solubilização da hemicelulose, neste tratamento, foi de 17,5%. (Figura 5).

Pelo balanço de materiais, verifica-se no Quadro 3, que na segunda amostra houve perda total de açúcares e grande percentagem de amido, superior às perdas ocorridas nas amostras tratadas com álcali; verifica-se também que, a percentagem de acréscimo da hemicelulose, neste tratamento foi de 4,3%, duas vezes maior que no tratamento com etanol 2,1%. Pela figura 5, nota-se que maior solubilização de hemicelulose ocorreu na primeira etapa do processo de deslignificação, ou seja, quando tratada com etanol; nas quarta e quinta etapas, ocorreu solubilização, mas, em pequenas proporções.

No tratamento com álcali, (Quadro 2) o decréscimo de hemicelulose, relacionado às amostras controle (Quadro 1), foi aproximadamente o mesmo entre elas; já na segunda amostra houve acréscimo de hemicelulose 2,4%, portanto, inferior ao ocorrido no tratamento com etanol, ou seja, 7,1%. Neste tratamento a solubilização da hemicelulose foi de 19,3% (Figura 4).

Pelo balanço de materiais do tratamento com álcali (Figura 5), verifica-se que, em média, a maior solubilização de hemicelulose ocorreu na primeira etapa do processo, após o tratamento com hidróxido de sódio; na segunda etapa, após tratamento com peróxido de hidrogênio e ácido acético, a solubilização foi menor.

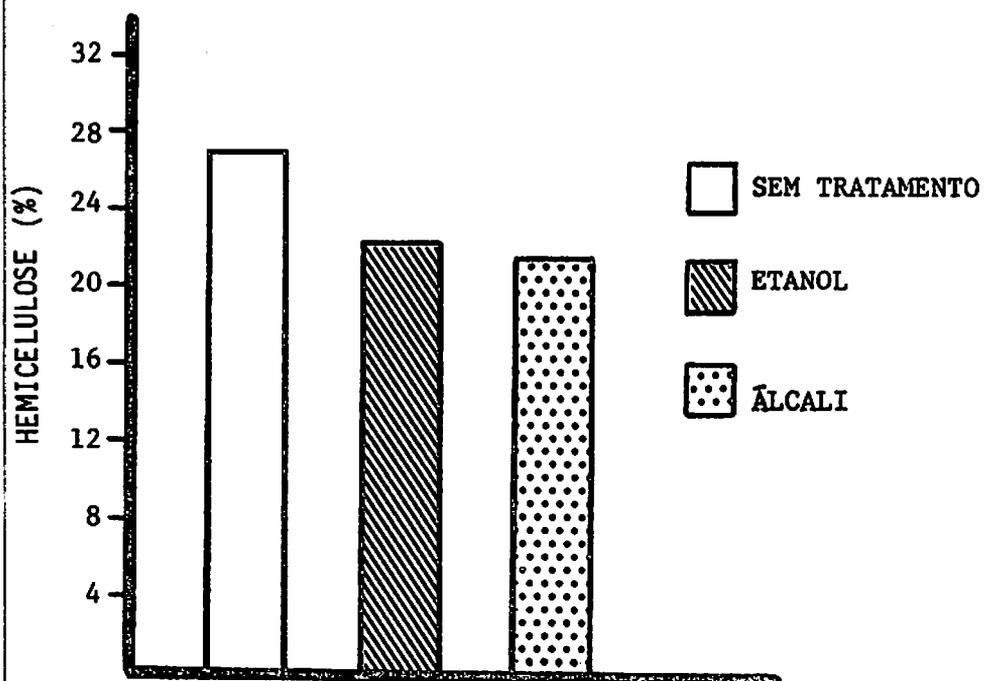


FIGURA 4 - Variações dos teores de hemicelulose, após os tratamentos de deslignificação com etanol e com álcali.

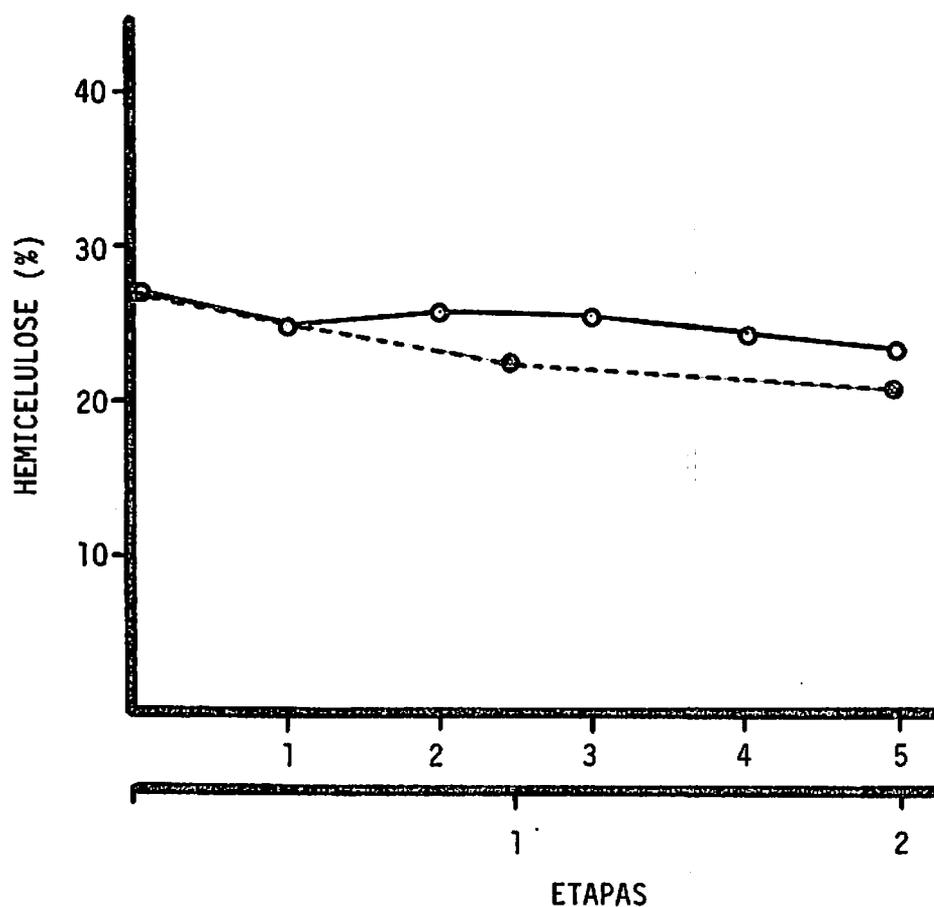


FIGURA 5 - Variações nos teores de hemicelulose, nas diferentes etapas do balanço de materiais, dos tratamentos de deslignificação com etanol (O—O) e com álcali (●--●).

Em relação ao teor de lignina, verifica-se pelo Quadro 2, que no tratamento com etanol, o decréscimo ocorrido, em todas as amostras, foi, aproximadamente, o mesmo quando, comparado ao teor da amostra controle, (Quadro 1), sendo a perda média igual a 50,2%. Resultado este ilustrado na Figura 6).

Pelo balanço de materiais, (Quadro 3) verifica-se que houve, em média, razoável perda de lignina neste tratamento; observa-se decréscimo, mais acentuado, nas primeira e segunda etapas, do processo de deslignificação, (Figura 7); ou seja, nas etapas de tratamento com etanol e água, sendo que nas demais etapas, houve também eliminação de lignina, mas, em menor proporção.

Na deslignificação com álcali verifica-se pelo Quadro 2, uma variação razoável, entre as três amostras. Verifica-se uma perda de 58,9%, como ilustrado na Figura 6.

Pelo balanço de materiais, (Quadro 5) nota-se também que ocorreu eliminação de lignina nas etapas do processo, sendo, em maior proporção, na primeira etapa, com hidróxido de sódio (Figura 7).

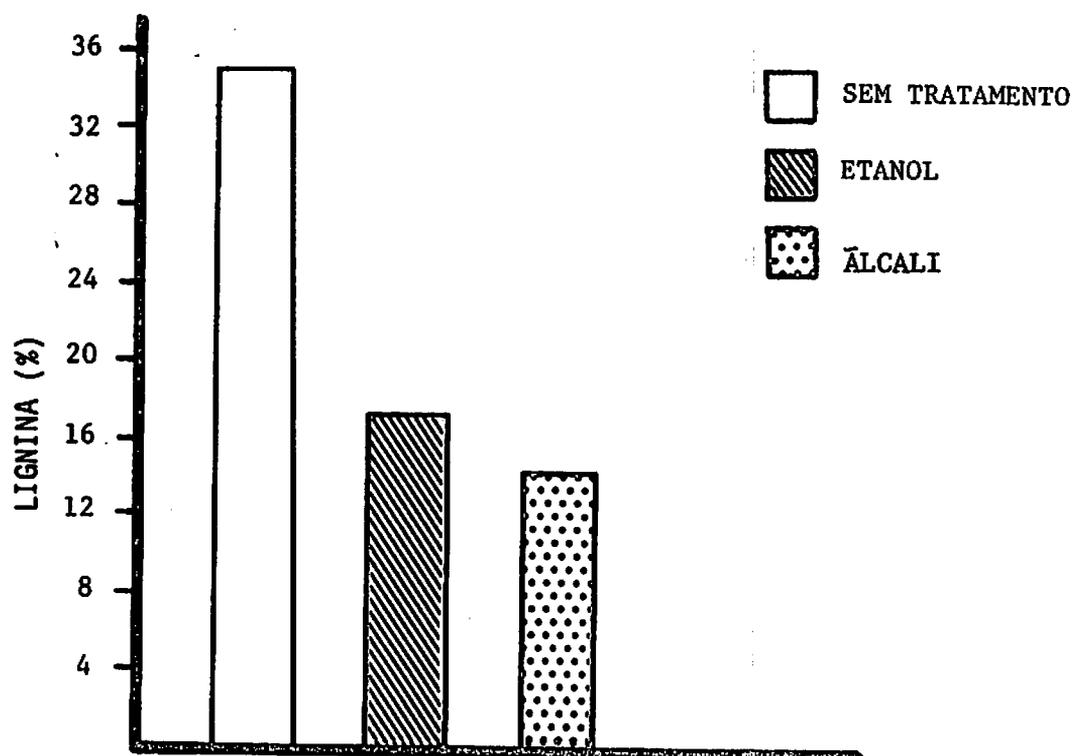


FIGURA 6 - Variações dos teores de lignina, após os tratamentos de deslignificação com etanol e com álcali.

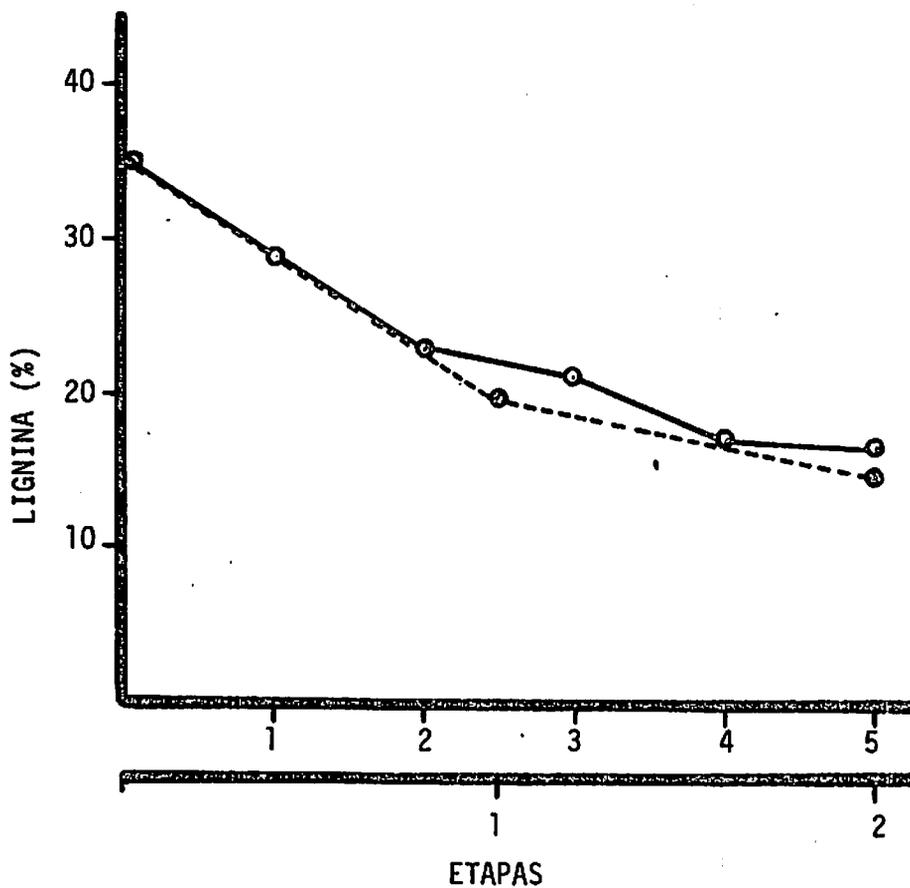


FIGURA 7 - Variações nos teores de lignina, nas diferentes etapas do balanço de materiais, dos tratamentos de deslignificação com etanol (O—O) e com álcali (●--●).

Quanto ao teor de amido, ocorreram diferenças conside
ráveis entre as amostras. No tratamento com etanol (Quadro 2),
observa-se uma grande variação na solubilização deste componentes
entre as amostras analisadas.

Na deslignificação do resíduo com álcali (Quadro 2) ,
a perda de amido foi semelhante à ocorrida no tratamento com
etanol, como se pode observar pela Figura 8, sendo respectiva-
mente, iguais a 58% e 57,2%.

Pelo balanço de materiais do tratamento com etanol
(Quadro 3), verifica-se solubilização de amido em todas as etapas
do processo, (Figura 9) destacando-se, dentre elas , a
quarta e a quinta etapas, ou seja, tratamento do resíduo com
hidróxido de potássio e ácido acético, respectivamente. Obser-
vou-se comportamento inverso ao do teor de celulose, em todas
as amostras.

Nota-se pelo balanço de materiais do tratamento de
deslignificação com álcali, (Quadro 5 e Figura 9) que maior
perda de amido ocorreu na primeira etapa do processo, com hi-
dróxido de sódio; na segunda etapa, com peróxido de hidrogênio,
o amido foi pouco afetado.

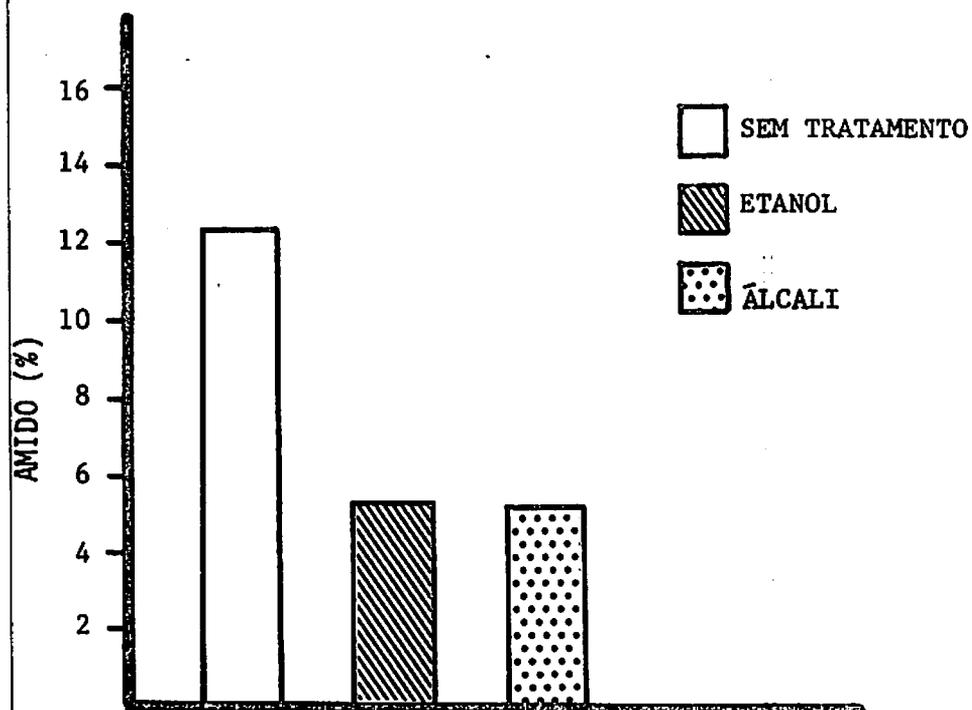


FIGURA 8 - Variações dos teores de amido, após os tratamentos de deslignificação com etanol e com álcali.

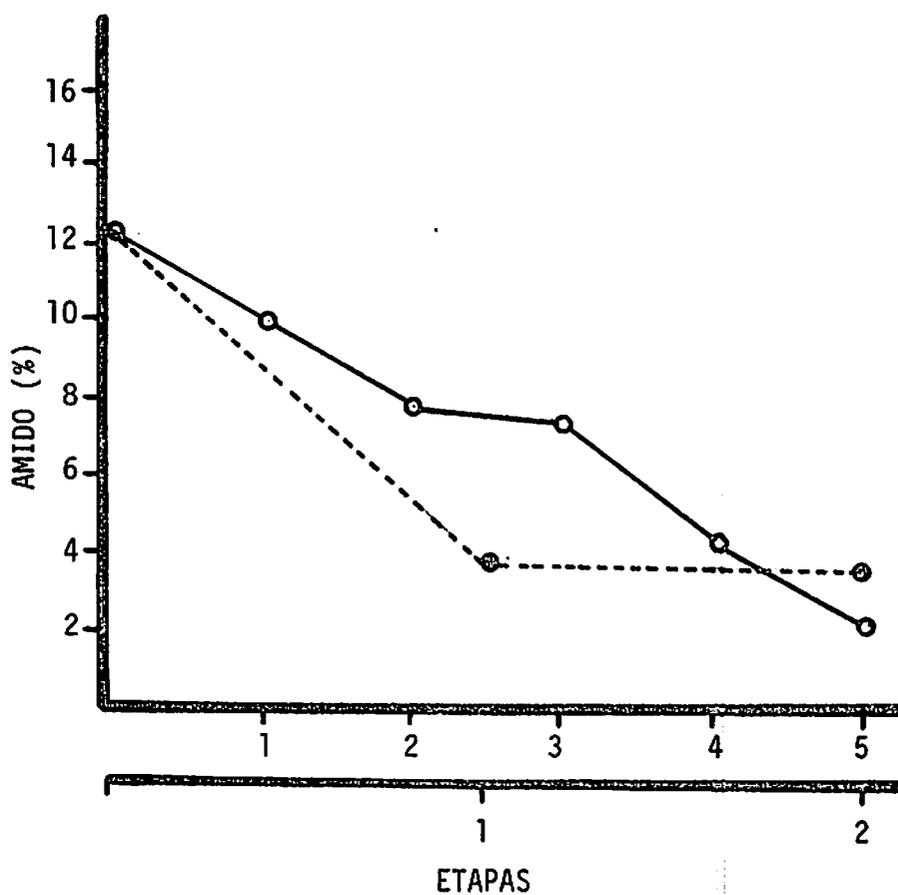


FIGURA 9 - Variações nos teores de amido, nas diferentes etapas do balanço de materiais, dos tratamentos de deslignificação com etanol (O—O) e com álcali (●--●).

Os açúcares redutores e totais foram completamente solubilizados, durante as diferentes etapas, do processo de deslignificação do resíduo com etanol (Quadro 2); o mesmo não ocorreu com o material tratado com álcali, resultado previsto, pois os açúcares são poucos solúveis em álcool, mas, se solubilizam facilmente em água, conforme citado por BRAVERMAN (4).

Na deslignificação do resíduo com álcali (Quadro 2), a solubilização de açúcares foi bem menor que no tratamento com etanol (Figuras 10 e 11).

Observa-se pelo balanço de materiais (Quadro 3), que somente foram detectados açúcares, na primeira etapa do processo de deslignificação com etanol, sendo que, a partir da segunda etapa, estes, foram completamente solubilizados (Figura 12 e 13).

Pelo balanço de materiais do tratamento de deslignificação com álcali (Quadro 5), verifica-se que, tanto para os açúcares redutores, como para os totais, ocorreram maiores perdas na primeira etapa do processo, ou seja, pelo tratamento com hidróxido de sódio; já no tratamento com peróxido de hidrogênio e ácido acético, praticamente, pouca solubilização ocorreu. (Figuras 12 e 13).

No balanço de materiais, verifica-se pelos Quadros 3 e 5, que a perda de componentes do resíduo, durante os processos de deslignificação, foi, em média, no tratamento com álcali, ligeiramente mais elevado, que no tratamento de deslignificação com etanol. Ocorreram portanto, variações entre, os componentes eliminados e também naqueles, retidos durante as diferentes etapas do processo.

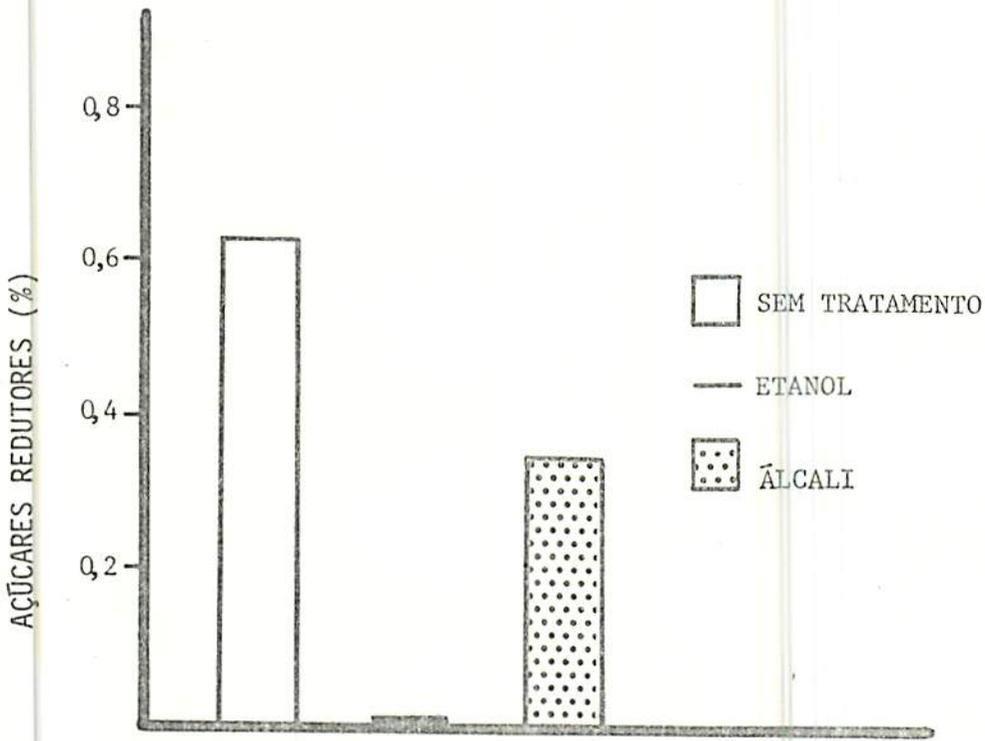


FIGURA 10 - Variações dos teores de açúcares redutores, após os processos de deslignificação com etanol e com álcali.

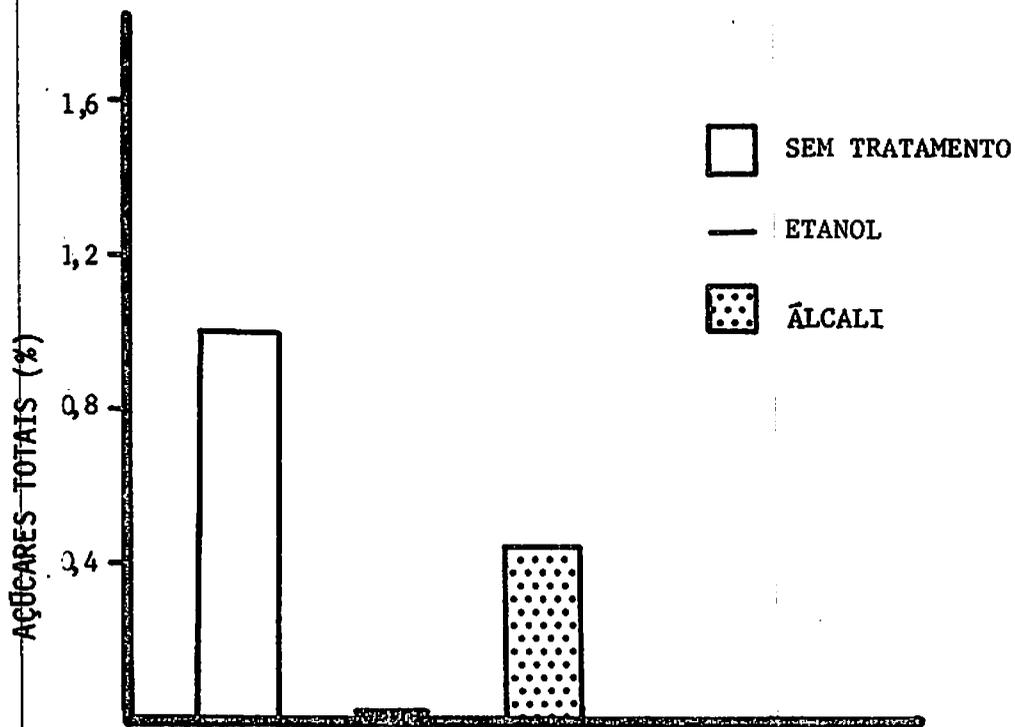


FIGURA II - Variações dos teores de açúcares totais, após os processos de deslignificação com etanol e com álcali.

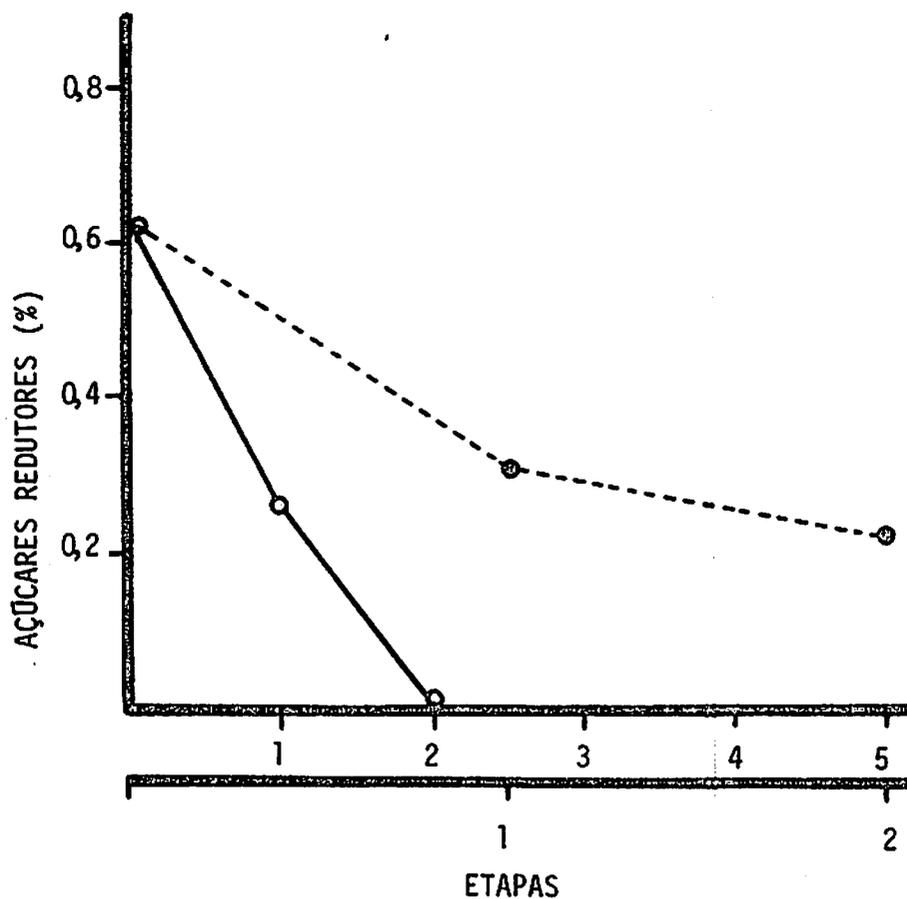


FIGURA 12 - Variações nos teores de açúcares redutores, nas diferentes etapas do balanço de materiais, dos tratamentos de deslignificação com etanol (O—O) e com álcali (●---●).

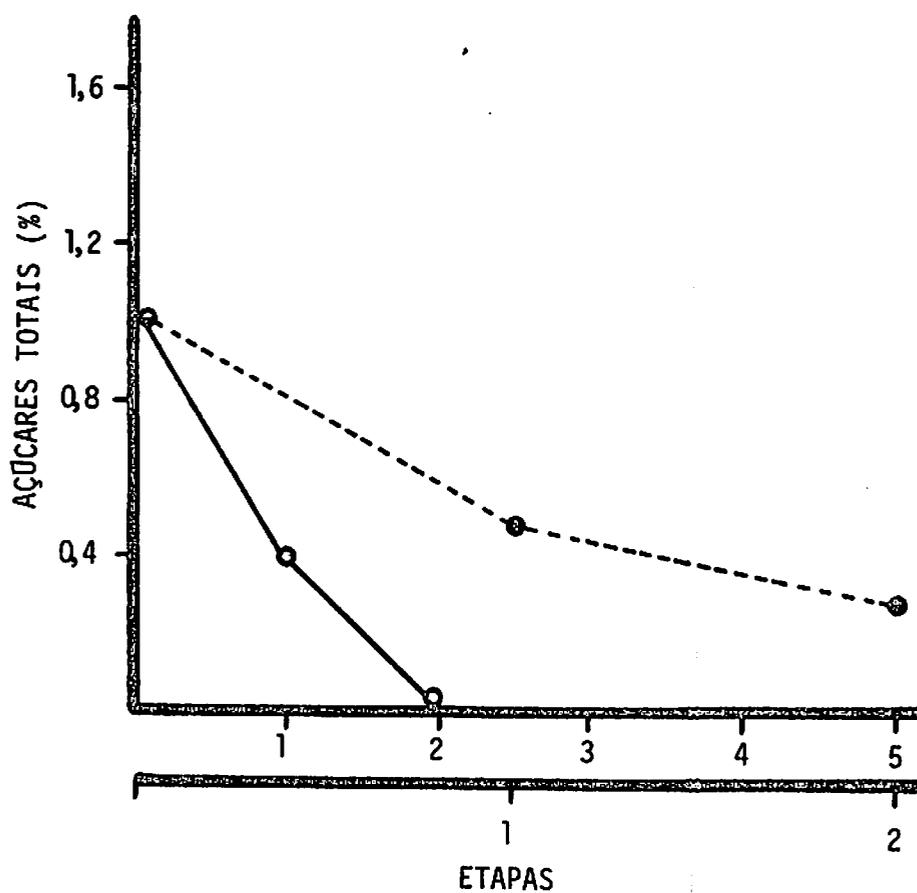


FIGURA 13 - Variações nos teores de açúcares totais, nas diferentes etapas do balanço de materiais, dos tratamentos de deslignificação com etanol (O—O) e com álcali (●--●).

4.3. Hidrólise

No Quadro 7 encontram-se os teores dos componentes dos resíduos, antes de serem utilizados para as hidrólises: enzimática e ácida, bem como do resíduo não deslignificado, utilizado como controle.

Deve-se notar que, com exceção das amostras do resíduo, deslignificado com etanol, destinado à hidrólise ácida, todas as outras amostras de resíduo diferiram entre si e o controle.

Destacaram-se as amostras deslignificadas com álcali, que apresentaram teores de celulose elevados, quando comparadas às demais.

As amostras deslignificadas apresentaram maior uniformidade nos teores médios de hemicelulose; verificou-se, porém, que as primeira e terceira amostras, do controle, apresentaram maiores teores desse componente que as deslignificadas.

As amostras, deslignificadas por etanol, não apresentaram teor de açúcares redutores, visto que estes foram completamente solubilizados, conforme discutido anteriormente. Já nas amostras, deslignificadas com álcali, os teores de açúcares redutores e totais, foram variados, não só entre as amostras, como também em relação ao controle. Neste tratamento, a terceira amostra, destinada à hidrólise enzimática, apresentou teor de açúcares cerca de 2,5 vezes superior ao controle, o

que provavelmente foi devido, segundo o balanço de materiais (Quadro 5), a uma solubilização maior do amido. WEST et alii (49) afirmam que, a hidrólise ácida parcial do amido, produz misturas complexas de dextrinas e glicose.

QUADRO 7 - Teores médios dos componentes químicos do resíduo celulósico de mandioca, destinados às hidrólises enzimática e ácida, e do resíduo controle sem designificar. Lavras-MG. 1980

Amostras	Determinações	Deslignificação					
		Etanol		Álcali		Controle	
		Hidrólises		Hidrólises		Hidrólises	
		Enzima	Ácido	Enzima	Ácido	Enzima	Ácido
1	Celulose %	19.64	18.92	24.42	22.56	18.20	18.20
2		18.62	19.14	22.24	19.30	16.80	16.80
3		18.74	18.90	18.84	19.64	17.80	17.80
1	Hemicelulose %	22.42	22.09	23.06	21.10	27.10	27.10
2		23.22	23.69	22.90	21.95	21.90	21.90
3		22.28	22.68	21.68	21.62	27.10	27.10
1	Açúcares re- dutores (*)	0.00	0.00	2.60	2.04	15.20	7.50
2		0.00	0.00	2.48	0.94	6.80	3.40
3		0.00	0.00	14.80	7.94	5.60	3.80
1	Açúcares totais (*)	0.00	0.00	3.36	2.38	16.20	13.00
2		0.00	0.00	3.20	1.80	11.00	5.50
3		0.00	0.00	16.80	9.14	6.60	5.50

(*)

Os resultados foram expressos em mg/ 100ml do extrato.

No Quadro 8, encontram-se os resultados referentes aos extratos do resíduo obtido após a hidrólise enzimática, ou ácida, das amostras deslignificadas, bem como das amostras controle. Verifica-se que, em todas as amostras hidrolisadas por ácido, houve desdobramento total da celulose e hemicelulose. KNAPPERT et alii (27) consideram que o rendimento, obtido por essa hidrólise, seja devido ao pequeno tamanho do íon hidrodênio, bem como à sua facilidade para penetrar entre as fibras celulósicas.

Relacionando o teor de celulose, antes e após a hidrólise enzimática, nota-se que ocorreu um pequeno desdobramento, quando deslignificada pelo tratamento com etanol. Nas amostras, deslignificadas com álcali, o desdobramento da celulose foi maior que no tratamento anterior e, também, nas amostras do controle. O comportamento geral das amostras apresenta concordância com a citação de GHOSE e KOSTICK (12); de vez que, a menor perda, no grau de polimerização da celulose pela hidrólise enzimática, em relação à hidrólise ácida, é devida à diferença, nos tamanhos relativos, dos dois catalizadores (enzima e ácido), bem como à sua capacidade para penetrar na fina estrutura celulósica). HERR (17) complementa que, na degradação enzimática da celulose, após um período inicial de formação de glicose, a hidrólise quase pára. Este fenômeno é explicado como um desdobramento da parte amorfa da celulose, restando, assim, a região cristalina que a torna mais resistente à hidrólise; ocorrendo também inibição causada pela glicose à glicosidase, enzima esta responsável pelo desdobramento da celobio-

se, e esta quando acumulada é inibidora do sistema $C_1; C_x$, portanto a hidrólise como um todo acaba sendo extremamente inibida.

Do mesmo modo que o ocorrido com a celulose, houve pequeno desdobramento da hemicelulose, pela hidrólise enzimática, em ambos os tratamentos de deslignificação das amostras. Observa-se, entretanto, que no tratamento por álcali ocorreu maior desdobramento, embora não tenha atingido o nível das amostras controle. Estes resultados mostram que, nas amostras deslignificadas, parece não ter sido boa a atividade da celulose, levando assim a deduzir que, possivelmente, os processos deslignificantes aplicados, pouco contribuíram na atividade das enzimas usadas.

Quanto aos açúcares redutores e totais (Quadro 8), vê-se que, no tratamento de deslignificação com etanol, os teores observados foram provenientes do rompimento das moléculas de celulose e hemicelulose, em ambas as hidrólises, de vez que, neste tratamento de deslignificação somente foi detectado açúcares nas primeira e segunda etapas do processo deslignificante, comprovado pelo balanço de materiais (Quadro 3). Há concordância com LEE et alii (29) ao afirmarem que na hidrólise enzimática da biomassa celulolítica, ambas, celulose e hemicelulose, são hidrolisadas, dando seus respectivos produtos como por exemplo os açúcares xilose e glicose, pois a atividade da celulose é comum à celulose e hemicelulose.

Amostras deslignificadas com álcali apresentaram, em média, teores de açúcares redutores e totais, superiores aos

do tratamento anterior e aos controle, em ambas as hidrólises.

Observou-se um melhor rendimento em açúcares, nas amostras hidrolisadas por ácido, concordando com SITTON et alii (43), os quais, trabalhando com a celulose de cana de milho , hidrolisada por ácido, obtiveram bom rendimento, em açúcares , pela conversão em outras hexosanas e glicose.

O índice de sacarificação dos hidrolisados por ácido, proveniente do desdobramento total de celulose e hemicelulose, foi relativamente baixo, ao relacionar-se aos hidrolisados por enzima; pressupõe-se a ocorrência de destruição de açúcares durante o processo hidrolítico.

Como os açúcares não foram totalmente solubilizados no processo de deslignificação com álcali, e o desdobramento de celulose e hemicelulose sendo total, poder-se-ia, assim , justificar o melhor rendimento em açúcares.

QUADRO 8 - Teores médios dos componentes químicos do resíduo celulósico de mandioca, após as hidrólises enzimática e ácida, e do resíduo controle sem deslignificar. Lavras-MG. 1980.

Amostras	Determinações	Deslignificação				Controle	
		Etanol		Alcali		Hidrólise	
		Enzima	Ácido	Enzima	Ácido	Enzima	Ácido
1	Celulose %	19.38	0.00	18.44	0.00	16.78	0.00
2		17.96	0.00	19.40	0.00	16.36	0.00
3		17.88	0.00	17.54	0.00	17.45	0.00
1	Hemicelulose %	22.38	0.00	21.88	0.00	23.16	0.00
2		21.74	0.00	22.00	0.00	20.80	0.00
3		22.16	0.00	21.24	0.00	23.16	0.00
1	Açúcares redutores (*)	154.12	205.90	160.28	263.12	159.80	187.80
2		111.22	227.26	117.40	258.42	109.53	125.66
3		103.98	189.80	128.04	197.16	108.86	127.10
1	Açúcares totais (*)	163.12	265.18	173.00	331.20	162.50	221.70
2		116.54	230.70	119.18	268.28	112.70	150.38
3		108.18	196.82	135.10	216.04	192.04	149.70

(*) resultados expressos em mg/100 ml do extrato.

4.4. FERMENTAÇÃO

Relacionando os resultados obtidos, após a hidrólise enzimática, e antes da fermentação Quadros 8 e 9, observa-se que, tanto naquele, proveniente do tratamento de deslignificação com etanol, como por álcali, houve perda considerável de açúcares, durante a autoclavagem; já no hidrolisado por ácidos, houve acréscimo de açúcares, em ambos os processos. LEONARD E HAINY (30), consideram que, o efeito favorável do aquecimento sobre o hidrolisado neutro, pode originar-se pela mudança na estrutura do açúcar a uma forma facilmente fermentescível; ocorrendo mudança de substâncias tóxicas a formas inativas, e formação de substâncias redutoras.

Pela hidrólise ácida, supõe-se que, a estrutura celulósica, não foi toda desdobrada em glicose, mas que, pela elevação de temperatura, moléculas maiores, podem ter sido rompidas em moléculas de monossacarídeos.

No Quadro 9, encontram-se os resultados referentes à fermentação dos extratos.

Os hidrolisados ácidos de ambos os tratamentos de deslignificação, bem como os do controle, quando submetidos à fermentação, apresentaram consumo de açúcares maior que os hidrolisados enzimáticos. (Quadro 11). Observa-se que, os hidrolisados do tratamento de deslignificação com etanol, apresentaram menor consumo de açúcares que os do tratamento de deslignificação com álcali; isso leva a crer que houve interferência na atividade da levedura, no extrato proveniente do processo de deslignificação com etanol. O maior consumo de açúcares ocorreu no extrato, proveniente do tratamento de deslignificação com álcali, em ambas as hidrólises. Ficou, assim, demonstrado que este foi o tratamento de deslignificação mais atuante, levando a resultados consideráveis no consumo de açúcares.

Os açúcares restantes supõem-se serem celobiose, aquele proveniente da hidrólise enzimática, e pentoses quando do hidrolisado por ácido, pois ambos não são fermentáveis pela S. cerevisiae.

QUADRO 9 - Teores médios de açucares, antes da fermentação do resíduo de mandioca deslignificado e do resíduo controle sem deslignificar . LAVRAS-MG - 1.980

Amostras		Deslignificação					
		Etanol		Álcali		Controle	
		Hidrólise		Hidrólise		Hidrólise	
nº	Determinações	Enzima	Ácido	Enzima	Ácido	Enzima	Ácido
1		92,30	228,70	124,88	415,00	81,06	189,20
2	Açucares redutores	72,56	214,70	128,68	264,02	88,86	192,04
3		68,14	227,14	95,56	224,32	63,82	171,14
1		98,06	298,00	149,59	458,30	118,56	228,86
2	Açucares totais	86,96	394,06	109,18	386,64	90,86	227,68
3		76,98	244,26	116,88	231,56	80,40	221,22

Os resultados foram expressos em mg/100 ml. do extrato

QUADRO 10 - Teores médios de açucares após a fermentação do resíduo de mandioca deslignificado e do resíduo controle sem deslignificar. LAVRAS-MG - 1.980

Amostras		Deslignificação					
		Etanol		Álcali		Controle	
		Hidrólise		Hidrólise		Hidrólise	
nº	Determinações	Enzima	Ácido	Enzima	Ácido	Enzima	Ácido
1		30,32	159,42	61,00	345,60	37,96	125,20
2	Açucares redutores	23,56	164,70	72,72	199,00	43,86	142,42
3		19,78	171,52	32,78	159,32	14,68	126,14
1		77,06	190,48	75,46	360,60	43,96	136,48
2	Açucares totais	54,20	171,20	78,78	225,84	44,58	162,98
3		40,06	181,52	34,56	181,90	38,92	128,72

Os resultados foram expressos em mg/100 ml do extrato

QUADRO 11 - Teores médios do consumo de açúcares durante a fermentação do resíduo de mandioca deslignificado e do resíduo sem deslignificar. LAVRAS-MG - 1.980

Amostras	Deslignificação					
	Etanol		Álcali		Controle	
	Hidrólise		Hidrólise		Hidrólise	
	Enzima	Ácido	Enzima	Ácido	Enzima	Ácido
1	0,62	0,69	0,64	0,69	0,43	0,64
2	0,49	0,50	0,56	0,65	0,45	0,50
3	0,48	0,56	0,63	0,65	0,48	0,45

Os resultados foram expressos em mg/ml do extrato

4.5. Rendimento Alcoólico

Os resultados obtidos, quanto à concentração alcoólica (Quadro 12), foram bastante variados, notando-se uma heterogeneidade muito grande, devido aos tratamentos de deslignificação, às diferentes hidrólises aplicadas, bem como à atividade da levedura.

Nota-se (Quadro 13) que, nos extratos hidrolisados por ácido, em ambos processos de deslignificação, aos quais foram submetidos, se obteve rendimento alcoólico ligeiramente mais elevado, quando comparado com o hidrolisado por enzima, em decorrência do total desdobramento da estrutura celulósica (conforme citação de GHOSE e KOSTICK (12) e KNAPPERT et alii (27), citados anteriormente). Conseqüentemente, foi maior o rendimento em açúcares, e, melhor, o aproveitamento destes, pelas leveduras.

No tratamento de deslignificação com álcali, o rendimento alcoólico foi melhor ao do tratamento com etanol (Quadro 13), e ao do controle, em ambos tipos de hidrolisados. Neste tratamento ocorreu maior liberação de moléculas de celulose, pela perda de lignina e, também, de outros componentes do resíduo; possivelmente houve diminuição de cristalinidade causada pelo álcali (9), tornando assim, maior o rendimento de açúcares e, conseqüentemente, dando um maior consumo pelas leveduras e um melhor rendimento alcoólico. Observando-se porém, que o rendimento alcoólico foi baixo, havendo a possibilidade de ter ocorrido perda de etanol por evaporação, devido ao tempo de fermentação, e também ao consumo pelas próprias leveduras.

QUADRO 12 - Valores médios das concentrações de etanol no extrato final fermentado das amostras do resíduo de mandioca. LAVRAS-MG - 1.980

Amostras nº	Deslignificação					
	Etanol		Álcali		Controle	
	Hidrólise		Hidrólise		Hidrólise	
	Enzima	Ácido	Enzima	Ácido	Enzima	Ácido
1	8,68	11,50	11,00	12,40	3,56	8,38
2	5,46	6,44	8,34	10,80	3,60	5,54
3	5,76	8,42	9,46	10,62	4,40	4,62

Os resultados foram expressos em mg de etanol/100 ml. do extrato

QUADRO 13 - Valores médios do rendimento alcoólico das amostras do resíduo de mandioca deslignificado e do controle sem deslignificar. LAVRAS-MG - 1.980

Amostras nº	Deslignificado					
	Etanol		Álcali		Controle	
	Hidrólise		Hidrólise		Hidrólise	
	Enzima	Ácido	Enzima	Ácido	Enzima	Ácido
1	27	33	33	35	16	25
2	22	25	29	33	16	21
3	23	29	30	32	18	20

Os resultados foram expressos em percentagem

5. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições experimentais , utilizadas no presente trabalho, sugerem algumas considerações conclusivas:

Nos processos deslignificantes, o utilizado com álcali foi o que promoveu maior liberação de celulose, em consequência das perdas de alguns constituintes do resíduo; deixando-o, assim, em condições mais adequadas aos processos hidrolíticos.

Entre as diferentes hidrólises aplicadas, verificou-se melhores resultados nos hidrolisados com ácido, que no hidrolisado por enzimas.

No aspecto fermentativo, observou-se melhor consumo de açúcares nos extratos hidrolisados por ácido, em ambos os processos de deslignificação; embora este consumo não tenha atingido a totalidade de açúcares presente no extrato.

No aspecto de rendimento alcoólico, melhores resultados foram obtidos do resíduo deslignificado com álcali, tanto naquele hidrolisado por ácido, como por enzima, notando-se, porém, que a percentagem alcoólica obtida foi baixa.

6. RESUMO

R E S U M O

Visando a possibilidade do aproveitamento do resíduo celulósico de mandioca, obtido após o processo de fermentação na USAC. Usina de Álcool de Curvelo, Minas Gerais, conduziu-se o presente trabalho nos laboratórios de Análises de Alimentos e de Microbiologia do Departamento de Ciências dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura de Lavras, no período de março de 1980 a março de 1981.

Estudou-se a constituição física e química do resíduo, obtido em diferentes épocas do ano.

Observaram-se os efeitos dos dois tratamentos de deslignificação aplicados; em consequência destes, verificaram-se as variações ocorridas na constituição do resíduo após a aplicação dos processos.

Realizou-se um balanço de materiais durante os tratamentos de deslignificação, a fim de verificar todas as alterações ocorridas no resíduo nas diferentes etapas do processo.

Verificando assim, em decorrência da deslignificação, acréscimo de celulose e perdas dos outros constituintes do resíduo, inclusive percentagem razoável de lignina.

Verificou-se pelas hidrólises aplicadas ser o ácido sulfúrico o melhor agente hidrolítico, através do maior índice de sacarificação do material celulósico.

Observou-se que o melhor consumo de açúcares pela levedura ocorreu com o extrato proveniente do processo de deslignificação com álcali, e hidrolisados por ácido: consequentemente um melhor rendimento alcoólico.

7. SUMMARY

S U M M A R Y

The present research was conducted at the Laboratories of the Food Science Department of the Escola Superior de Agricultura de Lavras, during March 1980 to March 1981. Taking into account the possibilities of using the cellulosic waste of cassava obtained before the fermentation process at USAC. Curvelo - Minas Gerais.

The study included:

A - The physical and chemical constitution of the residue obtained in several periods of the year;

B - The effects of two kinds of deslignification treatments applied and its consequences in the variation of the compositions of the residue.

C - A screening of chemical substance during the deslignification processes as to define possible changes in the composition of the residue in each stage of the process.

It was observed the following points:

a) - as a consequence of the deslignification there were an increase of the cellulose content and losses of the other constituents markedly in the lignine content.

b) - Sulphuric acid showed as the best hydrolytic agent, giving the greatest value for the sugar conversion of

the cellulosic materials.

c) - The best sugar consumption by the yeast was observed in the extract from the process in which deslignification was made with alcali following by acid hidrolisis besides a better alcoholic yielding.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALMEIDA, Hugo. Açúcar: produção cai e a de álcool aumenta. O Globo, Rio de Janeiro, 31 de maio de 1981 p.35 C.5-7.
02. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of official Agricultural chemists. 11 ed, Washington, 1970. 1015.
03. BAILEY, R.W. Quantitative studies of ruminant digestion. II loss of infested plant carbohydrates from the reticulo rumen. Journal of Agricultural Research. New Zealand, 10:15-32, 1967.
04. BRAVERMAN, J.B.S. Carboidratos e oligossacarídeos. In: Introduction à la bioquímica de los alimentos , Barcelona, Omega, 1967 p.90-7.
05. CAMHI, Joseph O. A fermentação alcoólica e sua otimização. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 94 (2) : 34-41, ago.1979.
06. CORRÊA, Hélio. Cultura da Mandioca. Lavras ESAL, Coordenadoria de Extensão, 1977 86p.
07. COWLING, Ellis B. & BROWN, Winford. Structural features of celulosic materials in relation to enzymatic hidrolysis. In: CELLULASES and their applications, Washington, American Chemical Society, 1969, p.152-87. (Advances in Chemistry Series, 95).

08. _____ & KIRK, T. Kent. Properties of cellulose and lignoceluloses material as substrates for enzymatic conversion processes. Biotechnology and Bioengineering Symposium, New York, (6):95-123,1976.
09. DUNLAP, Charles et alii. Treatment processes to increase cellulose microbial digestibility. AIChE Symposium Series, New York, 72 (158):58-63,1976.
10. GADEN, JR. & ELMER, L. Summary statement on the process. Biotechnology and Bioengineering. New York, (5):161-2,1975.
11. GHOSE, Tarunk. Continuous enzymatic saccharification of cellulose with culture filtrates of *Trichoderma viride* QM 6a. Biotechnology and Bioengineering, New York, 11:239-61,1969.
12. _____ & KOSTICK, John A. Enzymatic saccharification of cellulases in semi and continuous agitated system. In: CELLULASE and their application, Washington, American Chemical Society, 1968, p.415-46. (Advances in chemistry Series, 95).
13. GONÇALVES, José Carlos. Aspectos industriais da mandioca. In: EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. I Curso Intensivo Nacional de Mandioca. Cruz das Almas, 1971 13p.
14. GREGOR, Harry P. & JEFFRIES, Thomas W. Ethanollic fuels from renewable resources in the solar age. In: WIETH, W.R.; VENTASUBRAMANION, K. & CONSTANTINIDES A. New York, Academy of Sciences, 1979, p.326.

15. GRETHLEIN, Hans E. Comparison of the economics of acid and enzymatic hidrolysis of new sprint. Biothechnology and Bioengineering, New York, 22: 503-25,1978.
16. HELENE, M.E. Marcondes et alii. Madeira como fonte de energia - etanol a partir da celulose. Ciência e Cultura, São Paulo, 32(7)807-15, jul.1980.
17. HERR, Dieter. Conversion of cellulose to glicose with cellulase of *Trichoderma viride* ITCC - 1433 . Biotechnology and Bioengineering, New York, 22: 1601-12,1980.
18. HEUSER, Emil. The decomposition of cellulose by acids. In: THE CHEMISTRY of cellulose, London, J. Willey, 1943. p.493-540.
19. HOWELL, J.A. & STUCK, J.D. Kineties of solka, floc cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulase. Biotechnology and Bioengineering, New York, 17:873-93, 1975.
20. HUANG, Andrew A. Enzymatic Hidrolysis of cellulose to sugar. Biotechnology and Bioengineering Symposium, New York, (5):245-52, 1975.
21. HUMPHREY, A.E. Fermentation techonology. Chemical Engineering Progress, New York, 73(5):85-93, May 1977.
22. JOLY, Brandão A. Família Euphorbiaceae. In: - Botânica, introdução à taxonomia vegetal, São Paulo, Nacional, 1975, p.398-406.

23. KARUBE, Isao et alii. Hydrolases of cellulose in a cellulase bead fluidized bead reactor. Biotechnology and Bioengineering, New York, 19:1183-91, 1977.
24. KATZ, Moshe & REESE, E.T. Production of glucose by enzymatic hydrolysis of cellulose. Applied Microbiology, Washington, 10(2):419-20, Feb. 1968.
25. KELSEY, Rick G. & SHAFIZADEH. Enhancement of cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis by simultaneous wet milling. Biotechnology and Bioengineering, New York, 22:1025-36, 1980.
26. KIRT, T. Kent & HARKIN, John M. Lignin Biodegradation and the bioconversion of wood; Forest products and the environment symposium. AIChE symposium Series, New York, 69(133):124-6, 1967.
27. KNAPPERT, Diane et alii. Partial acids hydrolysis of cellulosis materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering, New York, 22:1449-63, 1980.
28. KOENINGS, Jerome W. Hydrogen Peroxide and iron: A Microbial cellulolytic System. Biotechnonology and Bioengineering Symposium, New York, (5):151-9, 1975.
29. LEE, Y. et alii. Selective hydrolysis of hardwood hemicellulose by acids. Biotechnology and Bioengineering Symposium, New York, (8):75-88, 1978
30. LEONARD, Reid H. & HAJNY, Georges J. Fermentation of wood sugars to Ethyl Alcohol. Industrial and Engineering Chemistry, New York, 37(4):390-5, Apr. 1945.

31. MAXON, W.O. & JOHNSON, M.J. Destillation of ethyl alcohol. Industrial Engineering Chemistry, New York, 45:2554, 1945.
32. MENEZES, Tobias J.B. Caracterização bioquímica de uma celulase fúngica e sua influência no rendimento de álcool da mandioca. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 9:175-200, 1978.
33. _____ et alii. Produção do complexo celulolítico $C_1 - C_x$ por microorganismo. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 7:91-6, 1976.
34. MILLET, Merrill A. et alii. Pretreatments to enhance chemical, enzymatic of cellulosic materials. Biotechnology and Bioengineering Symposium, New York, (5):193-219, 1975.
35. MONTENECOURT, B.S. et alii. Biochemical nature of celluloses from mutants of *Trichoderma reesei*. Biotechnology and Bioengineering Symposium, New York, (10):15-26, 1980.
36. NELSON, N.A. A photometric adaptation of somogy method for the determination of glucose. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 135:135-75, 1974.
37. PEITERSEIN, Nicolai & ROSS JR. Edward W. Mathematical model for enzymatic hydrolysis and

fermentation of cellulose by *Trichoderma*.

Biotechnology and Engineering, New York, 21:997 - 1017, 1979.

38. PIGDEN, W.J. & HEANEY, D.P. Lignocellulose in ruminant nutritions. In: CELLULASE and their applications, Washington, American Chemical Society, 1969, p.245-61 (Advances in Chemistry , 95).
39. RANBY, Bengt. Recent progress on the structure and morphology of cellulose. In: CELLULASE and their applications, Washington, American Chemical Society, 1969. p.139-51 (Advances in Chemistry Series, 95).
40. ROBERTSON, James A. et alii. An investigation of lignin extraction from dietary fibre using acetyl bromide. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, 30(11):1039-42, Nov. 1979.
41. SACRAMENTO, E. Agora o País tem sede de álcool, a mandioca é uma opção. Diário da Tarde, Belo Horizonte, 30 mar. 1981, 1º caderno, p.5,c-1-4.
42. SANTINI, Gary & VAUX, Walter G. Biochemical conversion of refuse to ethyl alcohol. AIChE Symposium Series, New York, 72(158):99-103,1976.
43. SITTON, O.C. et alii. Ethanolic from agricultural residues. Chemical Engineering Progress. New York, 75(12)52-7, Dec. 1979.

44. SUDO, Ken-ichi et alii. Enzymatic hydrolysis of wood. I. effect of deslignification on hydrolysis of wood by *Trichoderma viride* cellulase. Journal of the Japan Wood Research, Tokio, 22(12):670-6, Dec. 1976.
45. SU, Mun. & PAULAVICIUS, Irene. Single cell protein productions from cellulosic fiber. AIChE Symposium Series, New York, 72(158):72-6, 1979.
46. TANISSARI, Thomaz et alii. Energy requeriments and process design consideration in compression milling pretreatment of cellulosic Wastes for enzymatic hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering, New York, 22:1689-1705, 1980.
47. TOYAMA, Nobuo & OGAWA, Kihachiro. Sugar production from agricultural woody wastes by saccharification with *Trichoderma viride* cellulase. Biotechnology and Bioengineering Symposium, New York (5):225-45, 1973.
48. WALSETH, Curtis S. The influence of the fine structure of cellulose on the action of cellulases, Tappi, Washington, 35(5):233-8, May 1952.
49. WEST, E.S. et alii. Carbohidratos e sacarídeos. In: Bioquímica médica, México, Editorial Interamericano, 1969, p.132-96.

50. YANG, H.T. et alii. Factors influencing fungal degradation of lignin in a representative ligno-cellulosic, thermomechanical pulp. Biotechnology and Bioengineering, New York, 22:65-77, 1980.
51. ZABRISKIE, Dane W. et alii. Production of ethanolic form cellulose using a soluble cellulose derivative as an intermediate. Biotechnology and Bioengineering Symposium, New York, (10):149-62, 1980.