

Avaliação de Diferentes Resíduos Agroindustriais como Substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida



ISSN 1678-0434

Novembro, 2008

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 22

Avaliação de Diferentes Resíduos Agroindustriais como Substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida

Cristiane Sanchez Farinas
Viviane Lemo
Ursula Fabiola Rodríguez-Zúñiga
Victor Bertucci Neto
Sonia Couri

Embrapa Instrumentação Agropecuária
São Carlos, SP
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento de ilustrações: Valentim Monzane
Capa foto montagem: Cristiane Sanches Farinas
Editoração eletrônica: Manoela Campos

1ª edição

1ª impressão (2008): tiragem 300

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

F225a Farinas, Cristiane Sanches

Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulasas por fermentação semi-sólida. / Cristiane Sanchez Farinas, Viviane Lemo, Ursula Fabiola Rodríguez-Zúñiga, Victor Bertucci Neto, Sonia Couri. -- São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2008.

13 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 1678-0434; 22)

1. Celulasas. 2. Fermentação semi-sólida. 3. Enzimas. 4. Resíduos agroindustriais. 5. Engenharia bioquímica. I. Lemo, Viviane. II. Rodríguez-Zuniga, Úrsula Fabiola. III. Bertucci Neto, Victor. IV. Couri, Sonia. V. Título. VI Série.

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
1. Introdução	7
2. Metodologia	9
2.1 Microorganismo	9
2.2 Preparação do Inóculo	9
2.3 Condições de Fermentação	9
2.4 Atividades enzimáticas	10
3. Resultados e Discussões	10
Conclusões	14
Referências	14

Avaliação de Diferentes Resíduos Agroindustriais como Substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida

Cristiane Sanchez Farinas¹

Viviane Lemo²

Ursula Fabiola Rodríguez-Zúñiga³

Victor Bertucci Neto⁴

Sonia Couri⁵

Resumo

Neste trabalho avaliaram-se diferentes resíduos agroindustriais (bagaço de cana, bagaço de laranja, casca de arroz e farelo de soja) como substratos para a produção das enzimas celulases por fermentação semi-sólida (FSS). O processo de produção das enzimas é uma etapa essencial e limitante para a conversão enzimática da biomassa lignocelulósica em etanol, sendo que o requerimento do complexo de celulases para a hidrólise da celulose é bastante elevado. Assim, para uma economia de processo, é importante produzir as enzimas com um custo o mais baixo possível. O bagaço de laranja e o farelo de soja se mostraram como os substratos mais eficientes em termos de produtividade enzimática. No entanto, todos resíduos avaliados apresentaram um potencial para aplicação na produção de enzimas por FSS, requerendo estudos completos para um ajuste dos parâmetros operacionais do processo fermentativo.

Termos de Indexação: celulases, fermentação semi-sólida, enzimas, resíduos agroindustriais, engenharia bioquímica.

¹Eng. Química, Dra., Pesquisadora, Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, cristiane@cnpdia.embrapa.br

²Farmácia, Estagiária da Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, vivilemo@hotmail.com

³Eng. Ambiental, Dra., EESC-USP, Bolsita na Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, ursula@cnpdia.embrapa.br

⁴Eng. Elétrica, Dr., Pesquisador, Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, victor@cnpdia.embrapa.br

⁵Biologia, Dra., Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501 Guaratiba Rio de Janeiro, RJ CEP 23020-470, scoury@ctaa.embrapa.br

Evaluation of different agroindustrial residues as substrates to cellulase production for semi-solid fermentation

Cristiane Sanchez Farinas

Viviane Lemo

Ursula Fabiola Rodríguez-Zúñiga

Victor Bertucci Neto

Sonia Couri

Abstract

In this study we evaluated different agroindustrial residues (sugar cane bagasse, orange bagasse, rice hulls and soybean meal) as substrates for the production of the cellulase enzymes by semi-solid fermentation (SSF). The enzyme production process is an important and limiting step for the conversion of lignocellulosic biomass into ethanol. Besides that, the requirement of the cellulases complex for the hydrolysis of cellulose is very high. Thus, to ensure the process economic viability, it is important to produce the enzymes at a cost as low as possible. Orange bagasse and soybean meal were the most efficient substrates in terms of enzyme productivity. However, all of the evaluated residues showed a potential for application in the production of enzymes by SSF, requiring further studies to adjust the operational parameters of the fermentation process.

Index terms: cellulases, semi-solid fermentation, enzymes, agroindustrial residues, biochemistry engineering.

Introdução

A celulose é o recurso natural renovável mais abundante do planeta e a produção de energia baseada na matriz lignocelulósica é uma importante rota alternativa que vem sendo mundialmente estudada e debatida. Apesar de já existirem tecnologias disponíveis para o processamento da celulose, a maioria esbarra em dificuldades técnicas ou econômicas. A utilização da rota enzimática na etapa de hidrólise da celulose para a produção do etanol celulósico, apesar de ser uma alternativa de menor impacto ambiental, ainda requer o desenvolvimento de tecnologias que possam reduzir os custos de produção das enzimas. 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 e SZAKACS, 2003).

As tecnologias existentes para a produção de enzimas utilizam processos fermentativos que podem ser conduzidos tanto no estado líquido, chamado de fermentação submersa (FS), quanto no estado sólido, a fermentação semi-sólida (FSS). A FSS é definida como o processo de crescimento de microrganismos em um substrato sólido, contendo uma umidade suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo do microrganismo, isto é, isento de água livre (CHAHAL, 1985).

O uso da FSS tem se mostrado particularmente vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos, uma vez que simula o habitat natural destes microrganismos. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produtividade quando comparada ao processo de fermentação submersa. Além disso, as enzimas produzidas pela FSS são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH (HOLKER et al., 2004). Sob o ponto de vista ambiental, a vantagem da FSS está relacionada ao menor volume de efluente produzido e à possibilidade de conduzir o processo em condições semi-estéreis. Outra vantagem de destaque da FSS é a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substrato sólido, servindo estes como fontes de carbono e energia.

Dentro desse contexto, o presente trabalho descreve a avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção das enzimas celulases por FSS. As celulases constituem um grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose em açúcares fermentescíveis. A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, se divide em três grandes grupos: as endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; as exoglucanases, que atuam na região externa da celulose; e as -glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis à glicose (LYND et al., 2002).

Os resíduos agroindustriais avaliados neste trabalho incluem o bagaço de cana-de-açúcar, o bagaço de laranja, a casca de arroz e o farelo de soja. Todos esses materiais se destacam pela abundância em determinadas regiões do país e pelo baixo custo. De acordo com Pereira (2006), cerca de 350 milhões de toneladas de resíduos agrícolas são produzidos anualmente no Brasil, sendo os resíduos provenientes da cana-de-açúcar os que apresentam o maior volume de geração. Na safra de 2007/2008 foram produzidos cerca de 500 milhões de toneladas de cana no Brasil (UNICA, 2008) e segundo Burgi (1995), de cada tonelada de cana moída na indústria obtêm-se 700 litros de caldo de cana e 300 kg de bagaço.

O bagaço de laranja é o principal co-produto da indústria de processamento de citrus, correspondendo a cerca de 50% da massa total da fruta. Esse material possui a agravante de se deteriorar muito rápido durante a estocagem. Diante dessas características e considerando a produção de laranja no estado de São Paulo (maior produtor do país) na safra de 2005/2006 que foi de 14,4 milhões de toneladas (ABECITRUS, 2008), o bagaço de laranja vem a ser um substrato em potencial para a utilização na FSS.

O Brasil também se destaca como o maior produtor de arroz fora do continente Asiático, estando em 9º lugar na produção mundial desta cultura. Em 2005, a produção brasileira foi de 13,1 milhões de toneladas, representando 2,1% do total mundial (MAPA, 2008).

O Farelo de soja é considerado importante matéria-prima para alimentação animal e está sendo utilizado também para o desenvolvimento de produtos não alimentares devido à sua quantidade abundante e baixo custo, sendo o Brasil o segundo maior produtor de soja do mundo (MAPA, 2008). A produção nacional de farelo de soja na safra de 2007/2008 foi de 41,1 milhões de toneladas (ABIOVE, 2008).

A Tabela 1 apresenta a composição dos resíduos agroindustriais avaliados neste trabalho em termos de suas principais frações. Tal composição é de grande importância na avaliação do desempenho desses materiais como substrato para produção de enzimas, pois mesmo presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, a lignina confere uma limitação para a assimilação da fonte de carbono pelo microrganismo agente da fermentação.

Tabela 1. Composição(%) dos resíduos agroindustriais avaliados.

Componente	Bagaço de cana¹	Bagaço de laranja²	Bagaço de soja³	Casca de arroz⁴
Celuloso	36	16	3	36
Hemicelulose	28	14	4	20
Lignina	20	1	3	19
Cinzas	5	2	5	20
Proteínas	4	8	43	3

Fontes: 1. Castro (2006); 2. Mamaa et al. (2008); 3. Maciel (2006); 4. Cen e Xia (1999).

O desenvolvimento de tecnologias que permitam a produção das enzimas a um custo competitivo é de grande importância não só para a área de biocombustíveis, mas para diversas aplicações biotecnológicas e de outros setores, incluindo o de produtos químicos, alimentos, bebidas, rações para animais, têxteis, papel e celulose e agricultura. Estima-se que aproximadamente 20% dos mais de \$1 bilhão de dólares da comercialização mundial de enzimas industriais consista de celulases, hemicelulases e pectinases (BHAT, 2000). De acordo com Demain (2000), 60% do total do abastecimento mundial de enzimas industriais são produzidos na Europa, e os restantes 40% nos Estados Unidos e Japão. O desenvolvimento de processos de produção de enzimas que utilizem como insumo básico resíduos agroindustriais poderá vir a contribuir para a viabilidade econômica da produção de biocombustíveis pela rota enzimática.

2 Metodologia

2.1 Microrganismo

O agente de fermentação foi uma linhagem do fungo filamentososo *Aspergillus niger* da coleção da Embrapa Agroindústria de Alimentos, RJ. Conídios do microrganismo armazenados em solo estéril e sob condições de congelamento (-18°C) foram reativados em gelose inclinada com meio básico e incubados por 7 dias a 32°C (COURI e FARIAS, 1995). Os conídios da etapa de ativação foram utilizados para a inoculação em meio de sabugo de milho, utilizado para produção do inóculo da fermentação.

2.2 Preparação do Inóculo

Utilizou-se 1 mL da suspensão de conídios em Tween 80 para a inoculação do meio de sabugo de milho. Os meios de sabugo de milho inoculados foram incubados por 5 dias a 32°C, segundo COURI e FARIAS (1995). A concentração de conídios necessária para a inoculação foi determinada em câmara de Neubauer após a devida diluição da densa suspensão obtida. O volume de inóculo para fermentação foi calculado visando uma concentração final de 10^7 conídios/g de meio.

2.3 Condições da Fermentação

Cada um dos substratos avaliados (bagaço de cana, bagaço de laranja, casca de arroz e farelo de soja) foi inicialmente moído para a homogeneização do tamanho de partículas, tendo suas granulometrias padronizadas em peneira de Mesh 10. Pesaram-se dez gramas de cada substrato em frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL, utilizando para o controle da umidade o meio Czapek Dox modificado. Os frascos foram esterilizados e então inoculados. Após 72 horas de fermentação a 32°C (Fig. 1), procedeu-se à etapa de extração do complexo enzimático. As amostras foram extraídas com tampão acetato 0,2 mol/L, pH 4,5, incubando os frascos por 1 h em banho termostático a 32°C. Os extratos enzimáticos recuperados foram armazenados a -18 °C para posterior análise da atividade enzimática. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.



Fig. 1. Fermentação semi-sólida em frascos.

2.4 Atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas de FPase, CMCCase, xilanase e α -glicosidase dos extratos obtidos a partir dos diferentes substratos foram quantificadas e os resultados das análises foram expressos como unidades de atividade por massa de substrato inicial seco. A atividade FPásica avalia a ação sinérgica das enzimas celulolíticas endogluconases, exo-glucanases e α -glicosidase sobre um substrato celulósico cristalino (papel de filtro Whatman n° 1), segundo metodologia descrita por Ghose (1987).

2.4 Atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas de FPase, CMCCase, xilanase e α -glicosidase dos extratos obtidos a partir dos diferentes substratos foram quantificadas e os resultados das análises foram expressos como unidades de atividade por massa de substrato inicial seco. A atividade FPásica avalia a ação sinérgica das enzimas celulolíticas endogluconases, exo-glucanases e α -glicosidase sobre um substrato celulósico cristalino (papel de filtro Whatman n° 1), segundo metodologia descrita por Ghose (1987). Uma unidade de atividade FPásica corresponde a 1 μ mol de glicose liberado por minuto de reação em pH 4,2 a 50°C. A atividade endogluconásica CMCCase, tem como substrato a CMC (Sigma, EUA). Uma unidade de atividade CMCCase corresponde a 1 μ mol de grupos redutores liberados por minuto de reação em pH 4,2 a 50°C. A atividade da xilanase foi medida em termos de produção de açúcares redutores a partir de xilana comercial (Sigma, EUA). Uma unidade de atividade xilanase corresponde a 1 μ mol de xilose liberado por minuto em pH 4,2 a 50°C. Finalmente, a atividade α -glicosidásica foi realizada utilizando como substrato a celobiose (Sigma, EUA) e quantificando os açúcares liberados com a utilização de um reagente enzimático para dosagem de glicose (Laborlab, Brasil). A quantificação de grupos redutores foi realizada pelo método DNS (MILLER, 1959).

3 Resultados e Discussões

A utilização de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de celulases por FSS representa uma importante alternativa para redução dos custos dessas enzimas. Nesse sentido, avaliou-se neste trabalho a viabilidade de quatro diferentes resíduos produzidos em abundância no Brasil na produção de celulases (Fig. 2), utilizando como agente da fermentação o fungo filamentososo *A. Niger*.



Fig. 2. Resíduos agroindustriais avaliados como substrato para a produção de celulases por FSS: 1- farelo de soja, 2- bagaço de cana, 3- bagaço de laranja e 4- casca de arroz.

A comparação dos substratos foi realizada em termos das atividades enzimáticas FPAse, CMCase, α -glicosidase e xilanase obtidas ao final de 72 horas de fermentação, sendo que esse período foi selecionado com base em resultados anteriores (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2008).

A produção da enzima FPAse pelo fungo filamentoso *A. niger* é apresentada na Figura 3. A maior produtividade dessa enzima foi obtida quando se utilizou o farelo de soja como substrato sólido, atingindo valores de até 6,65 FPU/g. Esse resultado é bastante interessante quando comparado com dados de Chandra et al. (2007) que obtiveram valores máximos de atividade FPAse de 2,9 FPU/g a partir do farelo de trigo como substrato sólido e tendo como agente da fermentação também um isolado de *Aspergillus niger*.

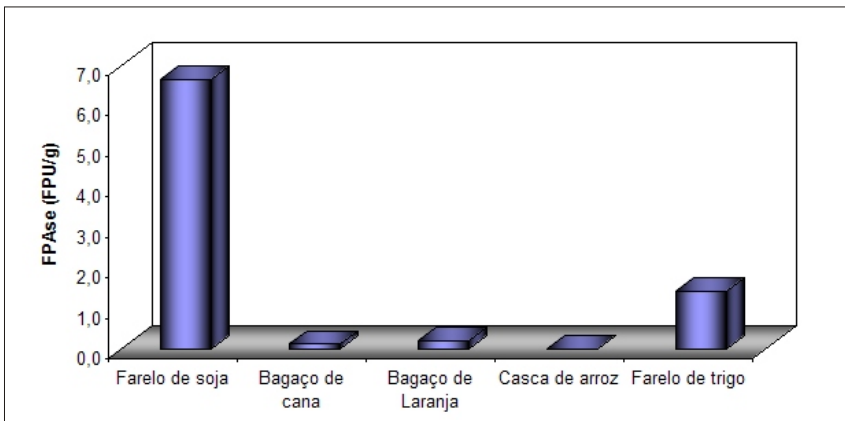


Fig. 3. Atividade da enzima FPAse produzida por *A. niger* após 72 horas de fermentação semi-sólida em diferentes substratos.

Apesar do *A. niger* ser um fungo que geralmente apresenta uma produtividade inferior em termos de FPAse quando comparada aos fungos do gênero *Trichoderma*, os dados aqui apresentados são superiores aos valores máximos de FPAse obtidos por Latifian et al. (2007) utilizando o *Trichoderma reesei* em substrato farelo de arroz (2,3 UI/g).

No entanto, a comparação dos resultados de diferentes estudos é limitada dada às diferenças no tipo de substrato, no microrganismo e nas condições operacionais utilizadas. Chahal (1985), por exemplo, reporta valores de atividade de FPAse superiores a 300 UI/g de celulose utilizando uma linhagem mutante de *T. reesei* após 22 dias de FSS em substrato de palha de trigo pré-tratada em meio alcalino.

Os outros substratos avaliados forneceram valores bastante inferiores de atividade FPAse. Isso se deve, provavelmente, à composição dos diferentes substratos, uma vez que a hemicelulose e a lignina conferem uma limitação para a assimilação da fonte de carbono pelo microrganismo agente da fermentação.

Como pode ser observado na Tabela 1, o teor de lignina no bagaço de cana e na casca de arroz é superior aos demais substratos. Outro fator que pode ter favorecido a produtividade no farelo de soja é o seu elevado teor protéico em relação aos demais substratos, fornecendo uma quantidade de nitrogênio orgânico mais adequada ao crescimento do microrganismo.

Em relação à enzima CMCase, a melhor produtividade foi obtida quando se utilizou o bagaço de laranja como substrato sólido, com uma atividade enzimática de 12,76 UI/g após 72 h de fermentação (Fig. 4). Os resultados obtidos a partir do farelo de soja também foram bastante interessantes, com valores de CMCase em torno de 10 UI/g.

Novamente, para essa enzima específica, os valores obtidos no presente trabalho são superiores aos descritos por Chandra et al. (2007) que relatam valores máximos de CMCase de 3,24 UI/g utilizando o farelo de trigo como substrato.

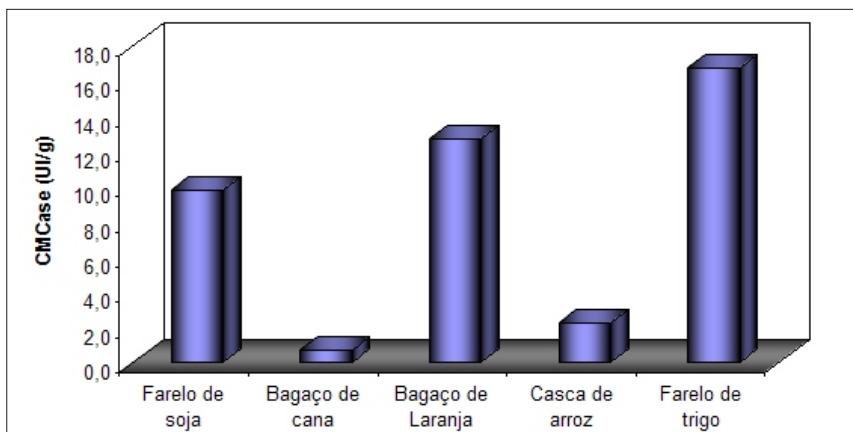


Fig. 4. Atividade da enzima CMCase produzida por *A.niger* após 72 horas de fermentação semi-sólida em diferentes substratos.

O substrato farelo de soja também se destacou em relação à produção da enzima α -glicosidase, com valores de até 5,25 UI/g (Fig. 5). A α -glicosidase atua na hidrólise da celobiose (dímeros de glicose) e oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND et al., 2002). Como as celulases sofrem de inibição pelo produto, a proporção adequada entre as enzimas do complexo celulásico é extremamente importante para uma boa eficiência da hidrólise.

Nesse sentido, o *A. niger* se destaca em relação aos fungos do gênero *Trichoderma*. O fungo *Trichoderma reesei* apesar de ser um dos microrganismos mais estudados em relação à produção de celulases, produz uma quantidade de α -glicosidase relativamente baixa, acarretando uma desvantagem do ponto de vista do processo de sacarificação da biomassa (KIM et al., 1997). Nesse sentido, a utilização do fungo *Aspergillus niger* tem sido apontada como alternativa para superar essa desvantagem, podendo ser avaliada em fermentações com culturas simples ou em co-culturas. Os resultados aqui obtidos em relação à α -glicosidase corroboram essa vantagem do *A. niger*.

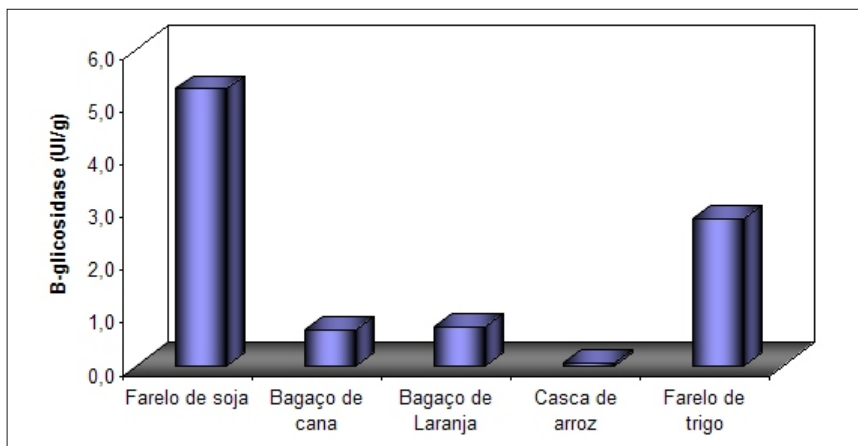


Fig. 5. Atividade da enzima β -glicosidase produzida por *A.niger* após 72 horas de fermentação semi-sólida em diferentes substratos.

Em relação à enzima xilanase, as melhores produtividades também foram obtidas com os substratos farelo de soja (15,84 UI/g) e bagaço de laranja (13,14 UI/g) (Fig. 6). As xilanases são as enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana, que é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses. A presença de xilanases no complexo enzimático é de grande importância para desestruturar o entrelaçamento da hemicelulose presente na parede celular vegetal. Esse grupo de polissacarídeos ramificados se liga firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas, via pontes de hidrogênio, dificultando a ação das celulases durante o processo de sacarificação.

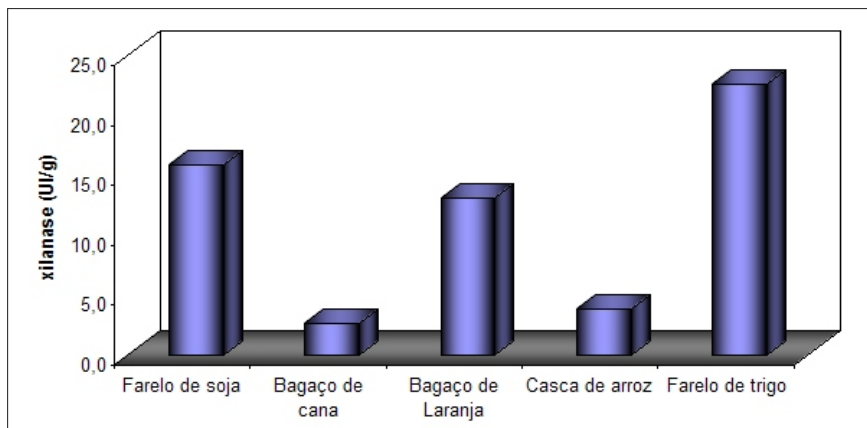


Fig. 6. Atividade da enzima xilanase produzida por *A.niger* após 72 horas de fermentação semi-sólida em diferentes substratos.

De uma forma geral, os resultados obtidos neste trabalho se mostram bastante promissores, dado que parâmetros operacionais relevantes no processo de FSS como a temperatura, umidade, aeração, complementação do meio e o pré-tratamento do substrato poderão ainda ser otimizados. No caso, por exemplo, do bagaço de cana e da casca de arroz que apresentaram produtividades enzimáticas inferiores aos outros substratos, um estudo complementar direcionado à suplementação do meio com uma fonte de nitrogênio e, possivelmente, uma fonte de carbono mais facilmente assimilável poderá vir a viabilizar suas aplicações na FSS.

Além disso, todos os materiais lignocelulósicos avaliados foram utilizados sem qualquer tipo de pré-tratamento para reduzir sua recalcitrância. Desta forma, a inclusão de uma etapa de pré-tratamento também poderá contribuir para aumentar a produtividade enzimática nos substratos.

Apesar deste estudo ter sido realizado em escala de bancada, os resultados obtidos servem como um ponto de partida para o escalonamento do processo. Esse processo em escala industrial poderá vir a gerar um impacto bastante representativo, pois está diretamente relacionado à viabilização de uma rota tecnológica que permite o aproveitamento do material celulósico proveniente de resíduos agroindustriais, tornando possível a diversificação das fontes de matéria-prima para a produção de biocombustíveis.

Conclusões

O processo de produção das enzimas é uma etapa essencial e limitante para a conversão enzimática da biomassa lignocelulósica em etanol, sendo que o requerimento do complexo de celulases para a hidrólise da celulose é bastante elevado. Assim, para uma economia de processo, é importante produzir as enzimas com um custo o mais baixo possível. Neste trabalho avaliaram-se diferentes resíduos agroindustriais (bagaço de cana, bagaço de laranja, casca de arroz e farelo de soja) como substratos para a produção das enzimas celulases. O bagaço de laranja e o farelo de soja se mostraram como os substratos mais eficientes em termos de produtividade enzimática. No entanto, todos resíduos avaliados apresentaram um potencial para aplicação na produção de enzimas por FSS, requerendo estudos completos para um ajuste dos parâmetros operacionais do processo fermentativo.

Referências

ABECITRUS - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CÍTRICOS.

Produção de Laranja: Série Histórica. Disponível em:

<<http://www.abecitrus.com.br>>. Acesso em: nov. 2008.

ABIOVE. **Complexo Soja - Balanço Oferta / Demanda.** Disponível em:

<http://www.abiove.com.br/balanco_br.html>. Acesso em: nov. 2008.

BHAT, M. K. Cellulase and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, p. 355-383, 2000.

BURGI, R. Utilização de resíduos culturais e de beneficiamento de na alimentação de bovinos. **Anais do 6º simpósio sobre nutrição de bovinos da FEALQ**. Piracicaba-SP: FEALQ, 1995. p. 153-169.

CASTRO, M. A. **Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar**. 2006. 212 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CEN, P.; XIA, L. Production of cellulase by solid-state fermentation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 65, p. 70-92. 1999.

CHAHAL, D. S. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, p. 205-210, 1985.

CHANDRA, M. S.; VISWANATH, B.; REDDY, B. R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. **Indian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 47, p. 323-328, 2007.

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 314-317, 1995.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 18, p. 26-31, 2000.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

HOLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 175-186, 2004.

KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, Essex, v. 59, p. 63-67, 1997.

LATIFIAN, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; BARZEGAR, M. *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 3634-3637, 2007.

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, 2002.

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanas por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MAMMAA, D.; KOURTOGLOUA, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 2373-2383, 2008.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Dados Estatísticos. **Mundo**: Principais países produtores, culturas selecionadas. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: nov. 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, p. 426-428, 1959.

PEREIRA, R. E. **Avaliação do Potencial Nacional de Geração de Resíduos Agrícolas para a Produção de Etanol**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; LEMO, V.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Evaluation of agroindustrial residues as substrates for cellulolytic enzymes production under solid state fermentation. In: ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA EM MATERIAIS - SBPMat, 7., 2008, Guarujá; BRAZILIAN MRS MEETING, 7., 2008, Guarujá. **Abstracts...** Rio de Janeiro: SBPMat, 2008. não paginado. 1CD-ROM.

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

UNICA. **Estatísticas da Safra de 2007/08**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acesso em: nov. 2008.



Embrapa Instrumentação Agropecuária

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

