

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum Officinarum*) UTILIZANDO CELULASES PRODUZIDAS PELO FUNGO *Aspergillus niger*

Caroline Mariana de Aguiar, Marcelo Henrique Luzia Margonar, Daisy Catharina Rodrigues, Sérgio Luiz de Lucena (Orientador/UNIOESTE),
e-mail: lucenasergio@yahoo.com.br.

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Engenharias e Ciências Exatas – Mestrado em Engenharia Química – Toledo – PR.

Palavras-chave: Enzimas, Biodegradação, Bioetanol, Celulose, Fermentação, Resíduos Lignocelulósicos.

Resumo:

Os resíduos lignocelulósicos tais como folhas, palhas, cascas e caules de plantas são os mais abundantes no mundo e, atualmente, há uma preocupação mundial em aproveitá-los como matéria-prima na produção de bioetanol, um combustível renovável; isto é possível visto que tais resíduos são ricos em celulose. A celulose é um biopolímero composto por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1-4. A glicose é um açúcar que pode ser transformado em etanol por via fermentativa e pode ser obtido da celulose a partir da hidrólise enzimática utilizando as enzimas celulases. As celulases podem ser produzidas por diversos microrganismos sob condições adequadas. Dentre esses microrganismos destaca-se o fungo *Aspergillus niger*. Em usinas de açúcar e álcool, as fontes de celulose são os resíduos do processamento da cana-de-açúcar: a palha, que fica no campo após a colheita, e o bagaço, resíduo abundante resultante do processo convencional de produção de açúcar e álcool. Os objetivos deste trabalho foram obter as celulases cultivando-se *A. niger* em caldo sintético usando o bagaço de cana pré-tratado como única fonte de carbono, observar a cinética da fermentação e analisar os efeitos das variáveis pH, temperatura, tempo de hidrólise enzimática, concentração do substrato e diluição do caldo enzimático. Utilizou-se bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como substrato da hidrólise. Nas condições estudadas, foi concluído que o tempo ótimo para coleta do caldo enzimático é aproximadamente 14 dias. O pH ótimo para se conduzir a hidrólise do bagaço é pH 5,0 na temperatura de 50°C por 50 minutos. Observou-se uma diminuição da atividade enzimática após 50 minutos de hidrólise. A concentração do bagaço afeta linearmente a atividade enzimática e observou-se que o caldo sem diluição proporciona uma maior concentração de glicose com 50 minutos de hidrólise.

Introdução

Os resíduos lignocelulósicos tais como folhas, cascas e palhas, madeira, etc., são os mais abundantes no mundo e tais biomassas

apresentam um potencial enorme para a produção de produtos de interesse industrial como bioetanol, glicose e biomassa protéica. Esses resíduos são abundantes fontes de carboidratos e sua bioconversão tem recebido grande atenção nos últimos anos. Processos utilizando esse tipo de resíduo como matéria-prima podem minimizar a falta de alimentos, resolver problema de desperdício e diminuir a dependência do homem por combustíveis fósseis através do fornecimento de uma conveniente e renovável fonte de energia (OJUMU, 2003).

Atualmente o Brasil se defronta com um aumento significativo da demanda de álcool combustível. Esse aumento se deve a fatores tais como: o aumento do consumo interno de álcool devido ao aumento das vendas de carros bicomustíveis e a expansão das exportações brasileiras de etanol em função do interesse pela mistura do álcool à gasolina. Para suprir essa demanda, muitos pesquisadores estão estudando o aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar excedente para a produção de etanol, através da hidrólise enzimática.

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto gerado por usinas e destilarias composto basicamente por hemicelulose (aproximadamente 27,5%), lignina (aproximadamente 26%) e em grande quantidade por celulose (aproximadamente 47%) (CANILHA L, 2006). Cerca de 60% do bagaço é consumido pelas usinas, dependendo do número de caldeiras e do tamanho das mesmas, na geração de vapor para a produção de energia elétrica e acionamento de turbinas.

A celulose presente em resíduos lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar é um polímero formado por ligações β (1-4) entre duas moléculas de glicose. É um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas (cerca de 33% do peso da planta), em combinação com a lignina, com hemicelulose e pectina. A presença de pontes de hidrogênio entre as cadeias de glicose e o empacotamento biológico encontrado nas plantas devido, principalmente, à presença da lignina, conferem à celulose alta resistência a processos de degradação. A maior parte da estrutura de celulose é organizada em regiões cristalinas altamente ordenadas, nas quais as cadeias de celulose ou fibrilas são rigidamente empacotadas (insolúvel em água) e de difícil hidrólise e cerca de 15% da estrutura é formada por uma região amorfa (facilmente hidrolisável) (SHULER, 1992).

As hemiceluloses são uma mistura de polímeros como xilose, manose, glicose, arabinose, galactose, ácido galacturônico, ácido glucurônico e ácido metilglucurônico, que podem ser lineares ou ramificados, amorfas, e possuem peso molecular relativamente baixo.

A lignina é um polímero aromático constituído de um sistema irregular e ramificado sem nenhuma unidade repetidora definida. Representa de 20 a 30% da planta, cuja função é de conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais.

A hidrólise enzimática é um processo que busca extrair do material celulósico, a glicose (açúcar formado por cadeia de seis carbonos). A hidrólise é realizada por enzimas chamadas celulasas. O termo celulasas é

utilizado para designar um conjunto de três enzimas que atuam sinergicamente, hidrolisando as moléculas de celulose à glicose: endo-glucanases, exo-glucanases e as β -glicosidases. As endo-glucanases rompem as moléculas de celulose e liberam fragmentos menores que servem de substrato para as exo-glucanases que, por sua vez, hidrolisam os fragmentos de menor massa molecular e, então, as β – glicosidases hidrolisam a celobiose até a glicose (BAILEY & OLLIS, 1986). O esquema está apresentado pela Figura 1.

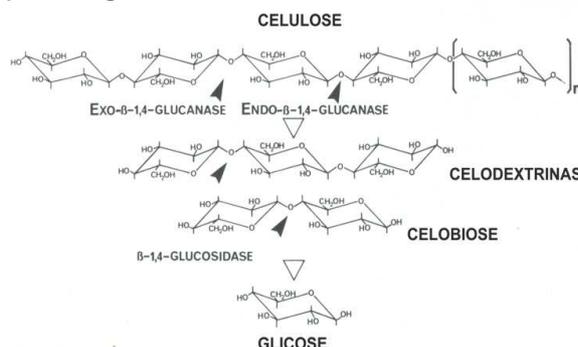


Figura 1 – Mecanismo de biodegradação de celulose
Fonte: (Malburg et al., 1999)

Pesquisadores no mundo todo vêm desenvolvendo esforços substanciais para obter uma eficiente hidrólise enzimática da celulose (BAILEY & OLLIS, 1986). De acordo com SHULER (1992) e RAMOS (2000), os principais fatores que afetam a hidrólise enzimática são:

- Porosidade e área superficial disponível do substrato;
- Grau de polimerização e cristalinidade da celulose;
- Heterogeneidade dos diversos substratos em função das quantidades variadas de lignina e hemicelulose ;
- Ação catalítica das enzimas: efeito inibitório pelo produto final (glicose e celobiose), inativação ou desnaturação pelo efeito do tempo, temperatura e agitação, sinergismo entre as três enzimas envolvidas e efeito da concentração de enzima e de substrato.

O grau de cristalinidade da celulose e o empacotamento provocado pela estrutura complexa da lignina limitam a hidrólise da celulose por qualquer agente hidrolítico. Para minimizar esses problemas, são aplicados pré-tratamentos (físicos, químicos ou biológicos), os quais são capazes de aumentar a suscetibilidade da celulose à hidrólise (solubilização da lignina e da hemicelulose), abrir a estrutura da celulose e remover as interações secundárias (pontes de hidrogênio) entre as cadeias de glicose (OJUMU, 2003).

Os processos alcalinos de pré-tratamento geralmente utilizam condições moderadas de operação, em termos de temperaturas e pressões. O principal efeito desse tipo de pré-tratamento consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade da fibra, pois o hidróxido de sódio tende a causar um “inchamento” da biomassa, fazendo com que a cristalinidade da celulose decresça, enquanto ocorre um incremento da

superfície específica de contato e da porosidade da mesma. A partir disso, evidencia-se uma cisão das ligações lignina-carboidrato, além da fragmentação da estrutura da lignina.

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulasas; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural (ROBSON & CHAMBLISS, 1989). O fungo *Aspergillus niger* é uma das mais comuns espécies do gênero *Aspergillus*. São importantes agentes decompositores de alimentos, e podem ser utilizados na produção de alimentos e na produção comercial de ácido cítrico, glucônico e gálico. Este fungo tem mostrado grande potencial na produção de celulasas e é cultivado para a produção industrial de várias substâncias, como ácido cítrico e ácido glucônico. Muitas enzimas úteis industrialmente são produzidas utilizando a fermentação de *A. niger* em escala industrial, como por exemplo, glicoamilases, pectinases, α -galactosidases e celulasas.

Materiais e Métodos

Preparo do inoculo:

O desenvolvimento do *Aspergillus niger* foi realizado em meio de cultura Sabouraud-cloranfenicol inclinado com incubação por sete dias a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em estufa microbiológica.

Para a obtenção do inóculo, colocou-se 10 mL de água esterilizada no tubo contendo o fungo. Realizou-se a raspagem dos esporos com bastão de vidro e posterior contagem de esporos em câmara de Neubauer. A concentração de esporos foi de 10^6 esporos/mL.

Tratamento do bagaço de cana-de-açúcar:

O tratamento escolhido para o substrato bagaço de cana-de-açúcar foi o tratamento alcalino a vapor, segundo AGUIAR e MENEZES (2000). Realizou-se em autoclave a uma temperatura de 121°C por 30 minutos em solução de hidróxido de sódio a 4% (100 g do bagaço lavado para cada 2000 mL de solução).

O material recuperado foi então lavado com água corrente e neutralizado com ácido fosfórico e posteriormente seco em estufa a 65°C até massa constante.

Cinética da Fermentação:

Para a realização deste teste foram feitas duas bateladas de fermentação em duplicata com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, com concentração de 100 g/L, a 30°C , com inóculo de 7 dias. As análises desse teste foram feitas a cada 24 ou 48 horas do caldo previamente filtrado, sendo que a cada coleta foi verificado o pH das amostras através de potenciômetro devidamente calibrado.

Para se fazer a hidrólise, 300 mg de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foram adicionados em tubos de ensaio e em seguida, adicionados 5,5 mL de tampão acetato 50mM, com pH 5,00. Posteriormente, os tubos de ensaio foram levados a um banho à temperatura de 50°C. Adicionou-se 0,5 mL de caldo fermentado em cada tubo de ensaio, e estes foram deixados no banho por 50 minutos, sendo agitados em intervalos de 10 minutos.

Procedeu-se a análise dos ART em triplicata e calculou-se a atividade enzimática.

Efeito do pH na hidrólise enzimática:

Para a realização deste teste foi realizada uma fermentação com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, com concentração de 100 g/L, a 30°C, com inóculo de 7 dias.

Para se fazer a hidrólise, 300 mg de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foram adicionados em 7 tubos de ensaio e em seguida, foram adicionados 4 mL de tampão com diferentes pHs (pHs 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00). Posteriormente, os tubos de ensaio foram levados a um banho à temperatura de 50°C. Adicionou-se 2 mL de caldo fermentado em cada tubo de ensaio, e estes foram deixados no banho por 50 minutos, sendo agitados em intervalos de 10 minutos.

Procedeu-se a análise dos ART em triplicata e calculou-se a atividade enzimática.

Efeito da temperatura na hidrólise enzimática:

Para se fazer a hidrólise, 300 mg de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foram adicionados em tubos de ensaio e em seguida, foram adicionados 4 mL de tampão acetato 50 mM com pH 5,00. Posteriormente, esses tubos foram levados a um banho onde a temperatura foi variada (20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C e 80°C). Adicionou-se 2ml de caldo fermentado em cada tubo de ensaio e estes foram deixados no banho por 50 minutos, sendo agitados em intervalos de 10 minutos.

Procedeu-se a análise dos ART em triplicata e calculou-se a atividade enzimática.

Efeito do tempo da hidrólise enzimática:

Para a realização deste teste foi utilizado um caldo fermentado com bagaço de cana de açúcar pré-tratado, com concentração de 100 g/L. O tempo de fermentação foi de 14 dias, em estufa microbiológica a 30°C, utilizando um inóculo com 7 dias. O pH inicial do caldo foi de 5,03.

Para se fazer a hidrólise, 300 mg de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foram adicionados em tubos de ensaio e em seguida, foram adicionados 4 mL de tampão acetato 50 mM, com pH 5,00. Posteriormente, os tubos de ensaio foram levados a um banho à temperatura de 50°C. Adicionou-se 2 mL de caldo fermentado em cada tubo e o tempo de hidrólise

foi variado (0, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 minutos), sendo que os tubos foram agitados em intervalos de 10 minutos.

Procedeu-se a análise dos ART em triplicata e calculou-se a atividade enzimática.

Efeito da concentração de substrato na hidrólise enzimática:

Para se fazer a hidrólise, foram pesadas diferentes massas de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg) em tubos de ensaio e em seguida, foram adicionados 4 mL de tampão acetato 50 mM, com pH 5,00. Posteriormente, os tubos de ensaio foram levados a um banho à temperatura de 50°C, e em seguida, foram adicionados 2 mL de caldo fermentado em cada tubo e foram deixados no banho por 50 minutos, sendo agitados em intervalos de 10 minutos. Como o volume final é de 6 mL, as concentrações de bagaço analisadas foram calculadas (16,66; 33,33; 50; 66,66; 83,33 e 100,00 g/L).

Procedeu-se a análise dos ART em triplicata e calculou-se a atividade enzimática.

Antes dos testes referentes ao efeito da concentração de substrato foi realizado o teste de absorção de água do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em triplicata. Este teste consistiu em adicionar 5,00 g de bagaço em béquer, encharcou-se o mesmo com 50 mL de água destilada e deixou-se em repouso durante 30 minutos. Em seguida, a solução (bagaço + água) foi colocada em um funil (devidamente pesado). Assim que a água parou de gotejar, o bagaço juntamente com o funil foi pesado. Feito isso, a massa de água retida ou o poder de retenção do bagaço de cana foi calculado.

Efeito da diluição do caldo na hidrólise enzimática:

Para se fazer a hidrólise, 300 mg de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foram adicionados a tubos de ensaio, sendo que em cada tubo foi adicionado volumes diferentes de tampão acetato, variando de 0 a 6 mL, conforme apresentados pela Tabela 1. A diluição foi definida como a razão entre o volume total (6mL) e o volume do caldo enzimático.

Tabela 1 – Relação entre os volumes de caldo e de tampão nas diluições.

Volume de caldo (mL)	Volume do tampão (mL)	Diluição, x
1	5	6
2	4	3
3	3	2
4	2	1,5
5	1	1,2
6	0	1

Posteriormente, os tubos de ensaio foram levados a um banho à temperatura de 50°C, onde foram adicionados os respectivos volumes de caldo fermentado em cada tubo. O tempo de hidrólise foi de 50 minutos, sendo agitados em intervalos de 10 minutos.

Procedeu-se a análise dos ART em triplicata e calculou-se a atividade enzimática.

Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART):

Os açúcares redutores foram medidos pelo método do Ácido dinitro-salicílico (DNS) adaptado de Miller (1959) padronizados com glicose. Neste método utiliza-se os seguintes reagentes: Ácido 3,5-dinitro-salicílico, hidróxido de sódio, fenol, água destilada e metabissulfito de sódio. Suas finalidades estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Finalidade dos reagentes no método DNS

Reagente	Finalidade
Fenol	Aumentar a quantidade de cor produzida
Metabissulfito de Sódio	Estabilizante da cor obtida na presença do Fenol
Hidróxido de Sódio	Redutor da ação da glicose sobre o ácido dinitro-salicílico

Fonte: Macedo et al., 2003

Unidades de hexose resultantes (α -D-glucose e β -D-frutose), em meio fortemente alcalino e a quente, formam enedióis que cedem elétrons para reduzir o reagente 3,5-dinitrosalicilato (de cor amarelo forte) a 3-amino-5-nitro-salicilato (de cor laranja-marrom forte). Cada mol de açúcar redutor presente na solução formará 1 mol de 3-amino-5-nitrosalicilato, pode-se determinar a concentração de açúcar redutor presente na solução. A sensibilidade da técnica de determinação de açúcar redutor pelo DNS é de 1-20 μ mol de glicose (ZANCAN, 1999).

Foi definido que uma unidade de atividade enzimática (U) libera 1 μ mol de açúcar redutor por mL de caldo por minuto, ou seja, $U = \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$.

Resultados e Discussão

A seguir temos alguns resultados obtidos para a cinética da fermentação (produção das celulasas pelo fungo), efeito do pH, efeito da temperatura, do tempo, da diluição do caldo enzimático e da concentração do bagaço na hidrólise enzimática.

Cinética da Fermentação:

A Figura 2 apresenta o efeito do tempo de fermentação na atividade enzimática do caldo coletado.

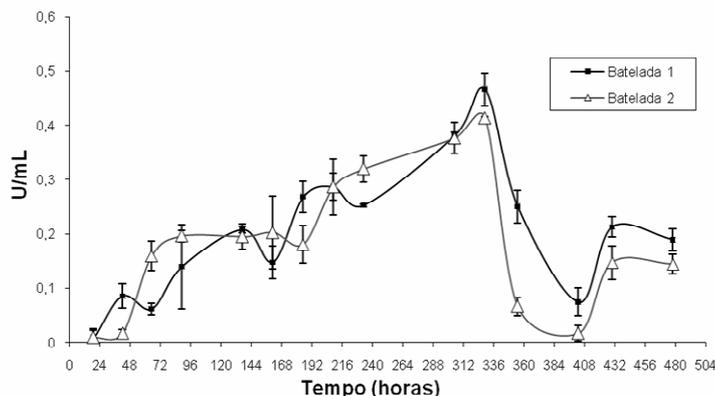


Figura 2 – Efeito do tempo de fermentação na atividade enzimática em duas bateladas simultâneas

Observa-se na figura 2 que a máxima atividade enzimática foi 0,408 U/mL obtida com aproximadamente 330 horas de fermentação, para ambos os sistemas em bateladas, indicando este como o tempo ótimo para a coleta do caldo da fermentação.

Observa-se que após 408 horas ocorreu um aumento na atividade enzimática. Isto pode ter ocorrido devido ao crescimento críptico, no qual uma pequena população se desenvolve devido à disponibilidade de nutrientes oriundos de células que morrem e se decomuseram lentamente.

A Figura 3 apresenta a variação do pH do caldo em função do tempo de fermentação.

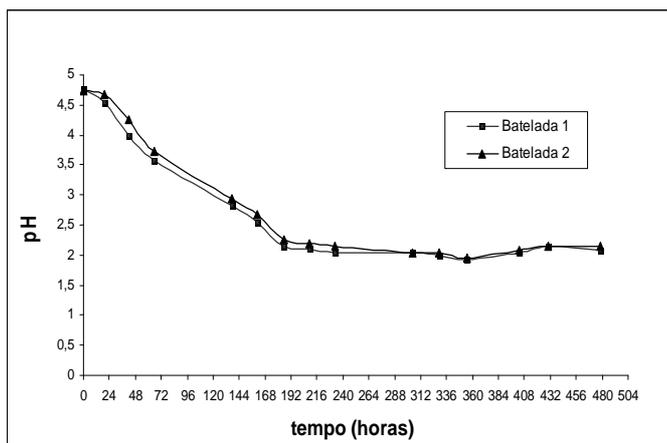


Figura 3 – Variação do pH do caldo em função do tempo de fermentação

Observa-se uma diminuição do pH do caldo de fermentação, inicialmente de 4,75, caindo para aproximadamente 2,0, após 185 horas de

fermentação. Esta diminuição provavelmente ocorreu devido a produção de ácidos orgânicos pelo *A. niger*.

Efeito do pH na Atividade Enzimática:

A Figura 4 apresenta o efeito do pH na atividade enzimática.

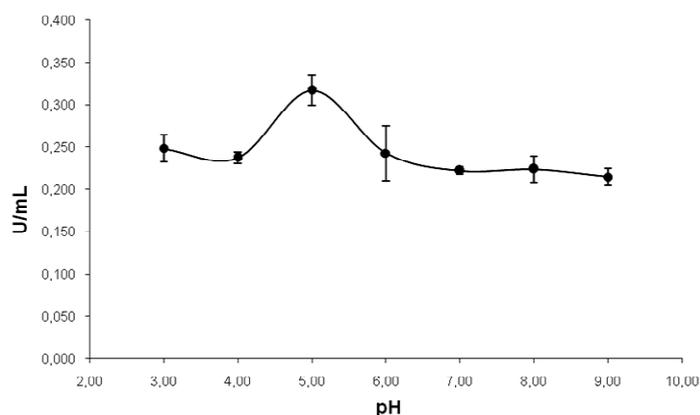


Figura 4 – Efeito do pH na atividade enzimática

Observa-se pela Figura 4 que as celulases apresentaram maior atividade enzimática em pH 5,00 (comportamento típico).

Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática:

A Figura 5 apresenta o efeito da temperatura na atividade enzimática.

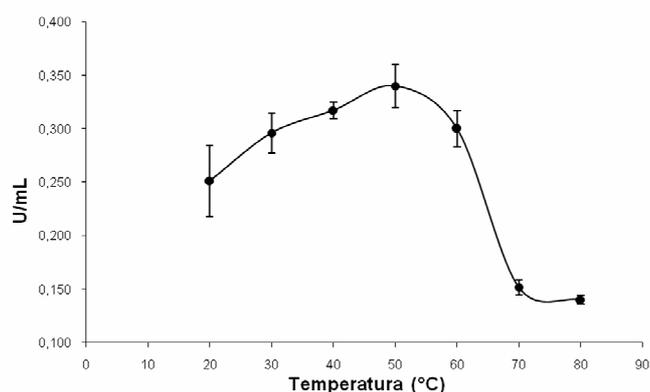


Figura 5 – Efeito da temperatura na atividade enzimática

Observa-se pela Figura 5 que a ativação térmica das enzimas ocorre gradualmente até a temperatura de 50°C, a qual se apresenta como temperatura ótima. Acima desta temperatura ocorre a desativação térmica

das celulasas (desnaturação) com a diminuição da atividade enzimática (comportamento típico).

Efeito do tempo da hidrólise enzimática:

A Figura 6 apresenta o efeito do tempo de hidrólise na atividade enzimática a 50°C em pH 5,0.

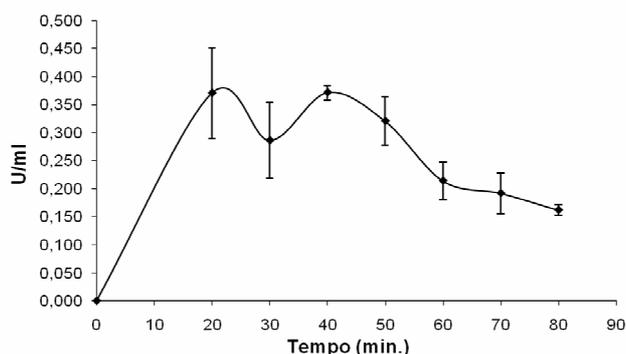


Figura 6 – Efeito do tempo de hidrólise na atividade enzimática

Observa-se na Figura 6 que com o tempo de hidrólise maior que 40 minutos há uma diminuição na atividade enzimática devido a uma desativação térmica (desnaturação) das enzimas celulolíticas submetidas durante um período de tempo prolongado à temperatura de 50°C. Em temperaturas menores que 40°C não há um comportamento padrão. No entanto, deve-se lembrar que as celulasas representam um sistema enzimático que atua sinergicamente.

Efeito da concentração de substrato na hidrólise enzimática:

A Figura 7 apresenta o efeito da concentração do substrato (bagaço de cana-de-açúcar) na atividade enzimática. Foi aplicada regressão linear forçada pela origem para obter a reta ajustada aos pontos experimentais pelos mínimos quadrados dando coeficiente de correlação igual a 0,994.

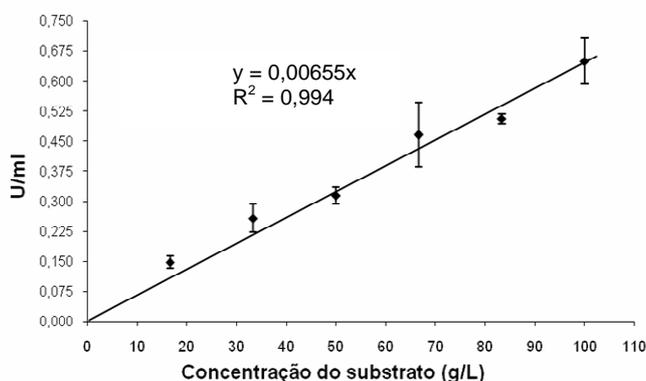


Figura 7 – Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática

Observa-se na Figura 7 uma dependência linear entre a atividade enzimática e a concentração do substrato na região estudada, ou seja, aumentando-se a quantidade de bagaço aumenta-se proporcionalmente a atividade enzimática. No entanto, no teste de absorção de água, observou-se que o bagaço de cana absorveu aproximadamente 45% da água inicial. Sendo assim, há uma limitação na quantidade de bagaço a ser usada na hidrólise. Cabe lembrar que o bagaço é um substrato insolúvel que será submetido à hidrólise enzimática (sistema heterogêneo).

Efeito da diluição do caldo na hidrólise enzimática:

A diluição do caldo afeta a concentração de celulasas, conforme esperado. A Figura 8 apresenta o efeito da diluição do caldo na atividade enzimática.

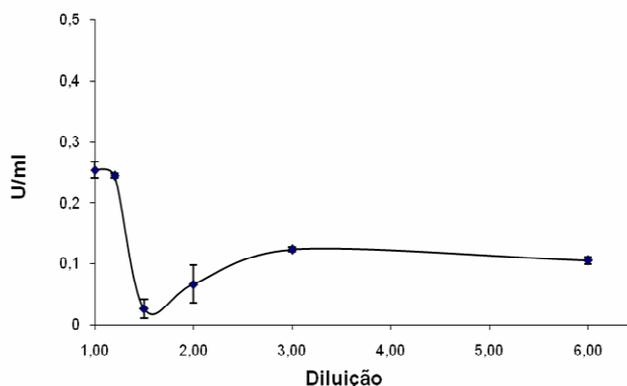


Figura 8– Efeito da diluição do caldo na atividade enzimática

Observa-se na Figura 8 que a maior atividade enzimática ocorre com o caldo sem diluição. Com diluição de 1,2 vezes não houve diminuição significativa da atividade enzimática conforme observado com as diluições maiores.

Conclusões

O fungo *Aspergillus niger* produz celulasas quando cultivado em meio sintético com bagaço de cana-de-açúcar como principal fonte de carbono. O tempo ótimo para coleta do caldo enzimático com atividade máxima foi de 14 dias nas condições estudadas. O sistema reacional celulose-celulasas é complexo, com uma etapa inicial demandando o ataque da enzima sobre um substrato insolúvel.

Foi possível avaliar a influência do pH, da temperatura, do tempo, da concentração do substrato e da diluição do caldo na hidrólise enzimática do bagaço da cana. Nas condições estudadas, foi observado que o tempo ótimo para coleta do caldo enzimático é aproximadamente 14 dias. O pH ótimo para se conduzir a hidrólise do bagaço é pH=5,00 na temperatura de 50°C

por 40 minutos. Observou-se uma diminuição da atividade enzimática após 40 minutos de hidrólise. A concentração do bagaço afeta linearmente a atividade enzimática e observou-se que o caldo sem diluição proporciona uma maior atividade enzimática com 40 minutos de hidrólise.

Referências

- Aguiar, C.L.; Menezes, T.J.B. Produção de celulasas e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. *B. CEPPA*. jan/jun 2000, V.18, n.1, p.57-70.
- Bailey, J.M., Ollis, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. Mc Graw Hill Intl Editions, 2 Ed, 1986.
- Canilha, L. Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena – Brasil, 2006.
- Macedo, G. R., Araújo, M. M. S., Lobato, A. K. C. L. Acompanhamento do crescimento da biomassa e síntese de biosurfactantes por microrganismos isolados de poços de petróleo. In *Anais do 2º Congresso Nacional de P&D em Petróleo e Gás*, Rio de Janeiro, 2003.
- Malburg, L.; Tamaru, Y.C.C.; Liu, A. The *Clostridium cellulovorans* cellulosome and noncellulosomal cellulases, In K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita, and T. Kimuna (ed.), *Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation*. Uni Publishers Co., Ltd., 1999, Tokyo, Japan. p. 488-494.
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959, v. 31, n.3, p. 426-428.
- Ojumu, T.V.; Solomon B.O.; Betiku E.; Layokun S.K.; Amigun B. Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. *African Journal Biotechnology*. 2003, 2:150-152.
- Ramos, L.P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais. *CEPESQ/UFPR*. Ago, 2000.
- Robson, L.M. & Chambliss, G.H. Cellulases of bacterial origin. *Enzyme and Microbial Technology*. 1989, 11: 626-644.
- Shuler, M. L. & Kargi, F. *Bioprocess Engineering – Basic Concepts – Prentice Hall Int. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences*, New Jersey, 1992.
- Zancan, G. T. *Bioquímica: aulas práticas*. Departamento de Bioquímica. 6 ed. Curitiba: Editora da UFPR, 178 p., 1999.