

# Produção de celulases por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulásica

Caroline Mariana de Aguiar<sup>1</sup> e Sérgio Luiz de Lucena<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. <sup>2</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua da Faculdade, 645, Jd. Santa Maria, 85903-000, Toledo, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: lucenasergio@yahoo.com.br

**RESUMO.** O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da cinética de produção de enzimas celulases pelo fungo *Aspergillus niger* e da cinética de desativação das celulases. Foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como fonte de carbono na fermentação para a produção do complexo celulásico e também como substrato da hidrólise enzimática. *A. niger* foi cultivado em três bateladas, cada uma contendo 10, 50 e 100 g L<sup>-1</sup> de bagaço pré-tratado com NaOH 4% (m v<sup>-1</sup>). A cinética da produção das celulases foi obtida determinando-se a atividade enzimática das amostras coletadas ao longo do tempo. As variações do pH também foram determinadas. A deativação enzimática foi avaliada determinando-se periodicamente a atividade das amostras armazenadas nas condições de resfriamento (4°C) e de congelamento (-18°C). Conclui-se que o *A. niger* produz celulases quando cultivado em meio de cultivo contendo bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e que o tempo ideal para coleta do caldo enzimático foi de aproximadamente sete dias, com produtividade máxima de 0,0013 U mL<sup>-1</sup>·h para a batelada com 10 g L<sup>-1</sup> e 0,0018 U mL<sup>-1</sup>·h para as bateladas com 50 e 100 g L<sup>-1</sup>. O complexo celulásico não sofre desativação se armazenado à temperatura de -18°C por 43 dias, mas perde cerca de 40% da sua atividade após 48h se armazenado a 4°C.

**Palavras-chave:** fermentação, enzimas, bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise enzimática, lignocelulose.

**ABSTRACT. Cellulases production by *Aspergillus niger* and cellulase deactivation kinetic.** This work aimed to evaluate the kinetic for the cellulase production by *Aspergillus niger* and the deactivation kinetic of the cellulase enzymes. Cellulase were produced in three different batches using NaOH 4% (w v<sup>-1</sup>) pre-treated sugarcane bagasse as the carbon source in the fermentation broth. The amount of the bagasse in each batch was 10, 50 and 100 g L<sup>-1</sup>. The kinetic of the cellulase production was accomplished by periodically determining the cellulasic activity of the fermentation broth using pre-treated bagasse as the hydrolysis substrate. Changes in the pH also were determined. The cellulase deactivation kinetic was accomplished by periodically determining the cellulasic activity of the fermentation broth samples stored at 4°C and at -18°C. One may conclude that *Aspergillus niger* produces cellulases when grown on medium with pretreated sugarcane bagasse as carbon source. The ideal time to collect the enzymatic broth was about seven days with maximum yield of 0.0013 U mL<sup>-1</sup>·h for the batch with 10 g L<sup>-1</sup>, and 0.0018 U mL<sup>-1</sup>·h for the batches with 50 and 100 g L<sup>-1</sup>. The cellulase complex does not suffer considerable deactivation when stored at -18°C (freezer) for 43 days, however, the activity drops by 40% within 48 hours when stored at 4°C (fridge).

**Keywords:** fermentation, enzymes, sugarcane bagasse, enzymatic hydrolysis, lignocellulose

## Introdução

Lignocelulose é a mais abundante biomassa renovável (ALVIRA et al., 2010) e constitui uma grande fração de resíduos sólidos urbanos, resíduos de culturas, esterco animais, madeiras, resíduos florestais ou de culturas energéticas (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Tal biomassa apresenta um potencial enorme para a obtenção de produtos de interesse industrial como bioetanol, glicose e biomassa proteica, já que são abundantes

fontes de carboidratos (OJUMU et al., 2003). Esforços significativos, muitos dos quais bem sucedidos, têm sido feitos para converter esses resíduos em produtos de valor, como os biocombustíveis, produtos químicos e alimentos para animais (DASHTBAN et al., 2009).

A cana-de-açúcar é uma planta de suma importância para a economia brasileira, tornando-se grande geradora de empregos e de energia via industrialização desta em açúcar e álcool

(MANZANO et al., 2000). O bagaço de cana é um resíduo gerado em grandes quantidades pelas indústrias de açúcar e álcool no Brasil (CARDONA et al., 2010). Após a extração da sacarose, aproximadamente 75% do bagaço excedente é utilizado na geração de calor e energia para a usina e cerca de 25% é estocado ou disposto em aterros (DAWSON; BOOPATHY, 2008). Segundo Castro e Pereira Junior (2010), em 2007, a produção brasileira de bagaço foi de 147 milhões de toneladas. Em virtude da importância do bagaço de cana como resíduo industrial, existe grande interesse no desenvolvimento de métodos para a produção biológica de combustíveis e produtos químicos que oferecem vantagens econômicas, ambientais e estratégicas (CARDONA et al., 2010).

O bagaço de cana é composto basicamente por celulose (41,7 a 45,3%), hemicelulose (31,6 a 34%) e lignina (12,6 a 16,5%) (MANZANO et al., 2000; PIRES et al., 2004). A celulose é um polímero formado por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) entre moléculas de  $\beta$ -D-glicose. A maior parte da estrutura de celulose é organizada em regiões cristalinas altamente ordenadas, nas quais as cadeias de celulose são rigidamente empacotadas e de difícil hidrólise. Cerca de 15% dessa estrutura é formada por uma região denominada de amorfa que pode ser facilmente hidrolisada (BAILEY; OLLIS, 1986). O grau de cristalinidade e o empacotamento provocado pela estrutura complexa da lignina limitam a hidrólise da celulose por qualquer agente hidrolítico (OJUMU et al., 2003). O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma etapa necessária para alterar algumas características estruturais dos materiais lignocelulósicos porque aumentam a acessibilidade das enzimas celulasas ao substrato celulose. Pré-tratamentos alcalinos aumentam a digestibilidade da celulose e são mais eficazes na solubilização de lignina, expondo a celulose e causando menor solubilização da hemicelulose do que pré-tratamentos com ácido ou processos hidrotérmicos. Hidróxido de sódio, potássio, cálcio e amônio são adequados aos pré-tratamentos alcalinos. O NaOH provoca inchaço, aumentando a superfície interna da celulose e causa diminuição do grau de polimerização e cristalinidade, o que provoca a desestruturação da lignina (ALVIRA et al., 2010).

A hidrólise enzimática pode ser utilizada para a produção de açúcares de resíduos lignocelulósicos pelas condições suaves de trabalho relacionadas ao pH, temperatura e ausência de subprodutos (CARRILLO et al., 2005). A hidrólise enzimática da celulose é realizada pelas enzimas celulasas, que são proteínas catalisadoras altamente específicas.

Celulasas é a mistura de várias enzimas que atuam sinergicamente, dentre as quais pelo menos três grandes grupos estão envolvidos no processo de hidrólise da cadeia de celulose: as endoglucanases, que atacam as regiões de baixa cristalinidade da fibra, gerando cadeias livres; as exoglucanases, que removem unidades de celobiose a partir das extremidades livres da cadeia e as glucosidases, que hidrolisam a celobiose à glicose (MUSSATTO et al., 2008). Muitas espécies de fungos possuem a habilidade de degradar a celulose produzindo as celulasas extracelulares (enzimas produzidas no interior da célula e lançada para o meio externo). Os principais gêneros produtores são *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* (DASHTBAN et al., 2009). O fungo *Aspergillus niger* é produtor de celulasas e pode ser considerado, algumas vezes, superior aos outros fungos, reconhecidamente bons produtores dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos, como o *Trichoderma reesei*. (AGUIAR; MENEZES, 2000). As enzimas são biomoléculas frágeis e, uma vez produzidas, estas perdem, gradualmente, a capacidade catalítica sendo desativadas por diversos fatores. Isto constitui uma limitação importante em muitos processos biotecnológicos e torna importante o seu conhecimento. A desativação é definida como um processo em que as estruturas de uma proteína são modificadas sem romper ligações covalentes (NAIDU; PANDA, 2003). A desativação enzimática pode ocorrer pela influência de fatores como temperatura, pH, forças hidrodinâmicas, ausência de substrato, entre outras (BAILEY; OLLIS, 1986).

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da cinética de produção de enzimas celulasas pelo fungo *Aspergillus niger* e avaliação da cinética de desativação do complexo celulolítico. Foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como fonte de carbono na fermentação para a produção do complexo celulolítico e também como substrato da hidrólise enzimática.

## Material e métodos

### Material

*Aspergillus niger* foi cedido pelo Laboratório de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Unioeste – Cascavel, Estado do Paraná, Brasil. A manutenção do fungo foi realizada em meio de cultura ágar sabouraud dextrose (ASD) a 4°C com repicagens periódicas. O bagaço de cana-de-açúcar foi cedido pela Cooperativa Agrícola Regional de Produtores de Cana – Coopcana - Paraíso do Norte, Estado do Paraná, Brasil.

## Métodos

### Preparo do inóculo

O desenvolvimento do *Aspergillus niger* foi realizado em meio de cultura ágar sabouraud dextrose (ASD) com incubação por sete dias a 30°C. Para obter o inóculo foram adicionados 10 mL de água esterilizada no tubo contendo o fungo. Em seguida, realizou-se a raspagem dos esporos assepticamente com um bastão de vidro utilizando-se, assim, esta suspensão de esporos para o ensaio de fermentação (adaptado de AGUIAR; MENEZES, 2000). A determinação de esporos em suspensão na solução foi realizada com o auxílio de câmara de Neubauer.

### Pré-tratamento do substrato

O bagaço de cana previamente moído da usina foi submetido à secagem ao ar livre em local coberto e, após, armazenado em sacos plásticos. O tratamento alcalino foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Aguiar e Menezes (2000) e Muthuvelayudham e Viruthagiri (2006), utilizando solução de NaOH 4% ( $m\ v^{-1}$ ). O material foi levado à autoclave à temperatura de 121°C por 30 min., lavado com água corrente, neutralizado com ácido fosfórico concentrado e seco em estufa a 65°C.

### Cinética da fermentação

Utilizou-se bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH 4% ( $m\ v^{-1}$ ) como fonte de carbono (AGUIAR; MENEZES, 2000) em meio de cultura adaptado de Mandels e Weber (1969) [ $K_2PO_4$  (2,00 g  $L^{-1}$ ),  $(NH_4)_2SO_4$  (1,40 g  $L^{-1}$ ),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,30 g  $L^{-1}$ ),  $CaCl_2$  (0,30 g  $L^{-1}$ ),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (5,00 mg  $L^{-1}$ ),  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (1,56 mg  $L^{-1}$ ),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (1,40 mg  $L^{-1}$ ),  $CoCl_2$  (2,00 mg  $L^{-1}$ ), peptona de carne (1,00 g  $L^{-1}$ )]. Adicionou-se 1 mL de Tween 80 por litro de meio de cultura e 10, 50 e 100 g  $L^{-1}$  de bagaço. As três bateladas foram esterilizadas a 120°C por 20 min. Em seguida, adicionou-se suspensão de esporos com concentração de, aproximadamente,  $10^6$  esporos  $mL^{-1}$  e fez-se a incubação do material a 30°C por 21 dias (504h). Periodicamente, amostras foram coletadas assepticamente e filtradas em papel filtro para a determinação da atividade enzimática. A produtividade foi calculada dividindo-se o valor da atividade enzimática obtida ( $U\ mL^{-1}$ ) pelo número de horas de fermentação (h).

### Cinética de desativação enzimática

Realizaram-se ensaios de fermentação em duas bateladas com bagaço de cana-de-açúcar a 100 g  $L^{-1}$  por sete dias. Após o término da fermentação, porções de 20 mL dos caldos enzimáticos foram

armazenadas a 4°C e a -18°C. Porções dos caldos foram retiradas em diferentes intervalos de tempo para a determinação da atividade enzimática.

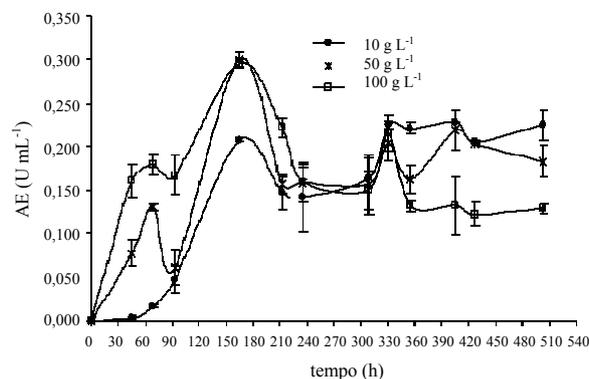
### Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar e determinação da atividade enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada adaptando-se o método proposto por Ghose (1987), utilizando-se bagaço de cana pré-tratado como substrato de hidrólise e tempo de incubação igual a 50 min. As concentrações de açúcares redutores foram determinadas pelo método do DNS descrito por Miller (1959). Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1  $\mu mol$  de açúcar redutor por mL de caldo por min ( $U = \mu mol\ mL^{-1}\ min^{-1}$ ). Os resultados de atividade enzimática foram expressos em  $U\ mL^{-1}$ .

## Resultados e discussão

### Cinética da fermentação

A Figura 1 apresenta os resultados de atividade enzimática ao longo do tempo de fermentação para três diferentes bateladas, cada uma com 10 g, 50 g ou 100 g de bagaço de cana-de-açúcar por litro de caldo.



**Figura 1.** Atividade enzimática em função do tempo de fermentação para três diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar utilizadas como substrato (10, 50 e 100 g  $L^{-1}$ ). Condições de hidrólise enzimática (determinação da atividade): pH 4,8; 50°C e 50 min.

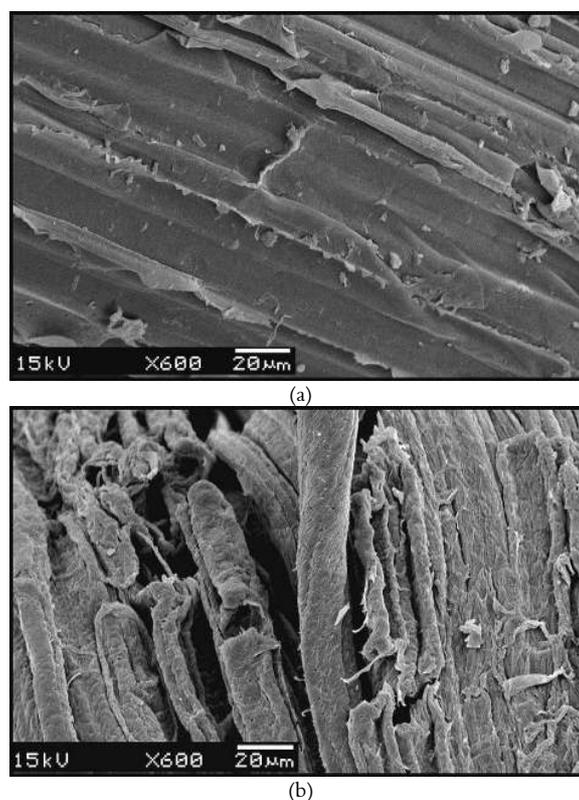
Observa-se (Figura 1) que a produtividade máxima foi de 0,0013  $U\ mL^{-1}\cdot h$  para a batelada com 10 g  $L^{-1}$  e 0,0018  $U\ mL^{-1}\cdot h$  para as bateladas com 50 e 100 g  $L^{-1}$ , com atividades de 0,208  $U\ mL^{-1}$  para a batelada com 10 g  $L^{-1}$ , 0,300  $U\ mL^{-1}$  para a batelada com 50 g  $L^{-1}$  e 0,297  $U\ mL^{-1}$  para a batelada com 100 g  $L^{-1}$ , após 164h de fermentação. Portanto, o tempo ideal para a coleta do caldo da fermentação é de aproximadamente sete dias. Aguiar e Menezes (2000), em estudo de produção de celulases de *Aspergillus niger* com bagaço de cana-de-açúcar (10 g  $L^{-1}$ ) pré-tratado com NaOH 4% ( $m\ v^{-1}$ ) como

fonte de carbono, obtiveram valores de atividade enzimática de aproximadamente  $0,27 \text{ U mL}^{-1}$ . Obtiveram, ainda, com tratamento do substrato utilizando NaOH 4% a vapor, aumento de aproximadamente 44% no teor de celulose e redução de aproximadamente 59% de lignina e observaram maiores resultados de atividade enzimática com o substrato tratado em relação ao não-tratado, provavelmente pela redução do teor de lignina e pela exposição da matriz celulósica às enzimas. Menezes e Hennies (1991) também trabalharam com bagaço de cana pré-tratado com NaOH, obtendo valores próximos a  $0,25 \text{ U mL}^{-1}$  de celulase total.

A atividade enzimática apresentou-se mais elevada para os sistemas em batelada com 50 e  $100 \text{ g L}^{-1}$  pela maior quantidade de suporte (fonte de carbono) no meio para o desenvolvimento do fungo. Maiores quantidades de celulose presente no meio acarretam elevação dos níveis de endoglucanases (OLSSON et al., 2003), as quais são responsáveis pela liberação de glicose, celobiose e celodextrinas direto da cadeia de celulose. O tratamento alcalino a que o bagaço foi submetido promove alterações morfológicas que permitem maior acessibilidade do fungo à estrutura da celulose na fermentação e, também, aumenta a acessibilidade das enzimas celulases durante o processo de hidrólise. A Figura 2 apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do bagaço de cana sem pré-tratamento e após ser submetido ao pré-tratamento alcalino com NaOH.

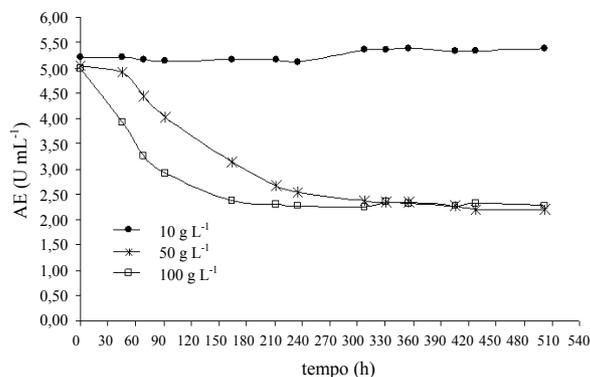
Observa-se na Figura 2a uma estrutura ordenada, uniforme e lisa na cadeia lignocelulósica. Após o tratamento alcalino (Figura 2b), a cadeia lignocelulósica apresenta-se em várias camadas e áspera, indicando que a área superficial da fibra foi modificada e aumentada. Houve também quebra das fibras, indicando a desorganização da estrutura da celulignina e o aumento da porosidade da estrutura (QI et al., 2009). Os pré-tratamentos visam à remoção da lignina e da hemicelulose, à redução da cristalinidade da celulose, ao aumento da porosidade do material (KUMAR et al., 2009) e da área superficial (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010), aumentando a acessibilidade das enzimas à celulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Segundo Talebnia et al. (2010), o tratamento químico é responsável por modificações na estrutura do complexo lignocelulósico, tais como: aumento da área superficial, aumento da porosidade da superfície, redução do grau de polimerização e do índice de cristalinidade da celulose, além da degradação da hemicelulose e da redução da lignina. Alvira et al. (2010) afirmam que os pré-tratamentos

alcalinos aumentam a digestibilidade da celulose e são eficazes na solubilização de lignina, expondo a celulose. O hidróxido de sódio provoca inchaço, aumentando a superfície interna da celulose e causando diminuição do grau de polimerização e cristalinidade, o que provoca a desestruturação da lignina. Assim, pode-se afirmar que a fibra lignocelulósica, após tratamento alcalino, torna-se mais favorável à colonização fúngica e melhora a hidrólise enzimática, fato que justifica os resultados de atividade obtidos. Observa-se ainda na Figura 1 que, após 308h de fermentação, ocorreu aumento na atividade enzimática, provavelmente, pelo crescimento críptico (após a morte celular, acompanhada de lise, ocorre a liberação de nutrientes ou fragmentos celulares para o meio, os quais são utilizados para o crescimento de outras células) (BANKS; BRYERS, 1990; LI et al., 2008; ROSE; WILKINSON, 1967).



**Figura 2.** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do bagaço de cana-de-açúcar: (a) sem pré-tratamento; (b) com pré-tratamento alcalino.

Em paralelo aos resultados de atividade enzimática, obtiveram-se medidas de pH das três bateladas. Os resultados de pH dos caldos em função do tempo de fermentação estão apresentados pela Figura 3.



**Figura 3.** Variação do pH dos caldos em função do tempo de fermentação para três diferentes quantidades de bagaço de cana utilizadas como substrato na fermentação.

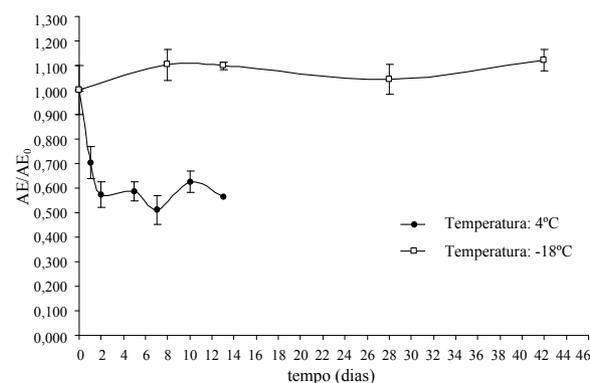
Observa-se (Figura 3) a diminuição do pH do caldo para os sistemas em batelada com 50 e 100 g L<sup>-1</sup>, inicialmente de 5,03 e 5,00, caindo para 2,67 e 2,29, respectivamente, após 212h de fermentação. A redução do pH dos meios de fermentação pode ter ocorrido pela produção de ácidos orgânicos pelo fungo. Para a batelada com 10 g L<sup>-1</sup>, o pH manteve-se constante ao longo da fermentação, o que pode ter ocorrido pela baixa quantidade de fonte de carbono, acarretando em reduzida quantidade de açúcares liberados no meio. Baixas concentrações de açúcares no meio fermentativo provocam baixos rendimentos na produção de ácido cítrico. Para a batelada com 100 g L<sup>-1</sup> a redução do pH foi significativa após, aproximadamente, 70h de fermentação. Isto pode ser justificado pela maior disponibilidade de fonte de carbono ao fungo pela maior concentração de bagaço e acessibilidade das enzimas à estrutura da celulose, proporcionada pelo tratamento alcalino.

#### Cinética de desativação enzimática

A Figura 4 apresenta os resultados da atividade enzimática (AE/AE<sub>0</sub>) em função do tempo de armazenamento. As amostras do caldo foram armazenadas nas temperaturas de 4°C e -18°C. AE<sub>0</sub> é a atividade enzimática determinada logo após a coleta do caldo.

Observa-se que não houve perda da atividade enzimática para as amostras armazenadas na temperatura de congelamento a -18°C, provavelmente pela alta taxa de congelamento, a qual não ocasionou desnaturação enzimática. Ainda, o congelamento parece proporcionar aumento de cerca de 10% na atividade celulásica. O congelamento afeta a estrutura original das proteínas, pois interfere na atividade da água provocando re-estruturação da cadeia polipeptídica. Assim, após o descongelamento, as moléculas de enzimas poderão adquirir nova configuração que

afetará a atividade enzimática (GREIFF; KELLY, 1966). Analisando os resultados obtidos, pode-se afirmar que o complexo celulásico permanece estável e ativo quando armazenado congelado a -18°C por pelo menos 43 dias. No entanto, para as amostras do caldo armazenadas sob resfriamento a 4°C, a atividade enzimática reduziu rapidamente (aproximadamente 30% após 24h e aproximadamente 40% após 48h de armazenamento). O processo de congelamento interrompe reações químicas e atividades biológicas (TATTINI JUNIOR et al., 2006), o que não ocorre quando enzimas são armazenadas em refrigeração. Segundo Bailey e Ollis (1986), a desativação enzimática pode ocorrer pela influência de fatores como temperatura, pH, forças hidrodinâmicas, ausência de substrato, entre outras. Para as amostras refrigeradas, as determinações de atividade foram interrompidas no 13º dia pela degradação microbiológica das amostras. Durante o congelamento, a água livre cristaliza-se sendo indisponibilizada aos microrganismos presentes, os quais não se desenvolvem na temperatura de -18°C (COLLA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2003). Já na temperatura de refrigeração, sabe-se que a água permanecerá disponível para desenvolvimento dos microrganismos, o que justifica a degradação das amostras.



**Figura 4.** Variação da atividade enzimática ao longo do tempo de armazenamento para amostras de caldo enzimático nas temperaturas de 4 e -18°C. AE<sub>0</sub> = 0,263 ± 0,020 U mL<sup>-1</sup> (4°C) e AE<sub>0</sub> = 0,181 ± 0,001 U mL<sup>-1</sup> (-18°C). Condições de hidrólise enzimática (determinação da atividade): pH 4,8; 50°C e 50 min.

#### Conclusão

O *Aspergillus niger* produziu celulases quando cultivado em meio de cultura utilizando o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH 4% (m v<sup>-1</sup>). As curvas cinéticas mostram que o tempo ideal para coleta do caldo enzimático, com atividade máxima, é de aproximadamente sete dias. A utilização de maiores quantidades de bagaço como substrato da

fermentação produziu um caldo com maiores atividades ( $0,208 \text{ U mL}^{-1}$  para a batelada com 10 g de bagaço  $\text{L}^{-1}$  e aproximadamente  $0,300 \text{ U mL}^{-1}$  para as bateladas com 50 e 100 g de bagaço  $\text{L}^{-1}$ , com 164h de fermentação). O complexo celulásico não sofre desativação se armazenado congelado na temperatura de  $-18^\circ\text{C}$  por 43 dias, mas perde cerca de 40% de sua atividade com 48h de armazenamento a  $4^\circ\text{C}$ . Isto indica que o caldo deve ser utilizado logo após a coleta ou então deverá ser congelado para uso posterior.

### Agradecimentos

À Capes, pela concessão da bolsa de Mestrado; à Cooperativa Agrícola Regional de Produtores de Cana, por ter cedido o bagaço da cana-de-açúcar; ao Prof. Dr. Eduardo J. de Arruda, da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD-MS), pela realização das microscopias eletrônicas de varredura (MEV); aos alunos e funcionários da Unioeste que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

### Referências

- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulasas e xilanasas por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-486, 2010.
- BAILEY, J. M.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Nova York: Mc Graw-Hill, 1986.
- BANKS, M. K.; BRYERS, J. D. Cryptic growth within a binary microbial culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 596-601, 1990.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugar cane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.
- CARRILLO, F.; LIS, M. J.; COLOM, X.; LÓPEZ-MESAS, M.; VALLDEPERAS, J. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3360-3364, 2005.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- COLLA, L. M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Congelamento e descongelamento – sua influência sobre os alimentos. **Vetor - Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v. 13, n. 1, p. 53-66, 2003.
- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.
- DAWSON, L.; BOOPATHY, R. Cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse without enzymatic saccharification. **Bioresources**, v. 3, n. 2, p. 452-460, 2008.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- GREIFF, D.; KELLY, R. T. Cryotolerance of enzymes - I. freezing of lactic dehydrogenase. **Cryobiology**, v. 2, n. 6, p. 335-341, 1966.
- KUMAR, P.; BARRET, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.
- LI, W.; ZHANG, G.; ZHANG, P.; LIU, H. Waste activated sludge reduction using sonication and cryptic growth. **International Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 64-72, 2008.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. In: HAJNY, G. J.; REESE, E. T. (Ed.). **Cellulases and their applications**. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1969. v. 95, p. 391-414. (Advances in Chemistry Series).
- MANZANO, R. P.; FUKUSHIMA, R. S.; GOMES, J. D. F.; GARIPPO, G. Digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratado com reagentes químicos e pressão de vapor. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1196-1204, 2000.
- MENEZES, T. J. B.; HENNIES, P. T. Influência do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com peróxido alcalino e hidróxido de sódio no sistema celulolítico de *A. niger*. **Coletânea do ITAL**, v. 21, n. 2, p. 213-219, 1991.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 124-129, 2008.
- MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 20, p. 1873-1881, 2006.
- NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 1, p. 57-67, 2003.
- 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 of Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 150-152, 2003.

- OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; HANSEN, K. P.; PALMQVIST, E. A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 612-619, 2003.
- PIRES, A. J. V.; GARCIA, R.; FILHO, S. C. V.; PEREIRA, O. G.; CECON, P. R.; SILVA, F. F.; SILVA, P. A.; VELOSO, C. M. Novilhas alimentadas com bagaço de cana-de-açúcar tratado com amônia anidra e, ou, sulfeto de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 1078-1085, 2004.
- QI, B.; CHEN, X.; SHEN, F.; SU, Y.; WAN, Y. Optimization of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by alkaline peroxide using response surface methodology. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 15, p. 7346-7353, 2009.
- ROSE, A. H.; WILKINSON, J. F. **Advances in microbial physiology**. New York: Academic Press, 1967.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.
- TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4744-4753, 2010.
- TATTINI JUNIOR, V.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 127-136, 2006.

*Received on May 19, 2010.*

*Accepted on September 23, 2010.*

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.