

ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI

**BIOCONVERSÃO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO
DE *Pinus taeda*, OBTIDO PELO PROCESSO DE EXPLOÇÃO A
VAPOR, NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO *L* (+) LÁTICO PELO
FUNGO *Rizopus oryzae***

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química, do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI

**BIOCONVERSÃO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO
DE *Pinus taeda*, OBTIDO PELO PROCESSO DE EXPLOÇÃO
A VAPOR, NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO L (+) LÁTICO PELO
FUNGO *Rizopus oryzae***

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

1997

**BIOCONVERSÃO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO
DE *Pinus taeda*, OBTIDO PELO PROCESSO DE EXPLOÇÃO
A VAPOR, NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO L (+) LÁTICO PELO
FUNGO *Rizopus oryzae***

Por

ADENISE LORENCI WOICIECHOWSKI

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre
no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química, avaliada pela comissão
formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Departamento de Tecnologia Química – UFPR

Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin
Universidade Estadual de Maringá – PR

Prof. Dr. Urivald Pawlowsky
Departamento de Tecnologia Química – UFPR

Curitiba, 1997

Aos meus pais Alfredo e Maria,
Pelo esforço e carinho dado aos filhos durante a nossa vida acadêmica.
Ao meu esposo Marcio,
Pelo apoio e compreensão nesta jornada.
Aos meus filhos Felipe e Gustavo,
Pela companhia e compreensão nos momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo constante incentivo e apoio nos momentos de dificuldade e esmorecimento.

Ao Professor Carlos Ricardo Soccol, pelo estímulo e acompanhamento durante a orientação desta dissertação.

Ao Professor Luis Pereira Ramos, pelo apoio, incentivo e pela co-orientação desta dissertação.

Aos professores Urivald Pawlowsky e Gisella Maria Zanin, por terem aceitado julgar este trabalho.

Ao Professor Renato João Sossela de Freitas, pelo auxílio e imparcialidade demonstrado de maneira geral com todos os colegas de mestrado.

Aos professores do Laboratório de Estatística, pelo acompanhamento e pronto atendimento.

À Professora Rumiko Hara e ao Professor Ubajara Indio do Brasil von Linsinger, pelo exemplo de profissionalismo.

À amiga Sônia Cachoeira Stertz, pelo apoio, constante incentivo e sugestões dadas durante esta etapa.

Aos colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos, pelo apoio, carinho, incentivo, sugestões e amizade oferecida durante todos os momentos gastos para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Processamento de Fito-biomassa pelo apoio e auxílio na realização deste trabalho

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro, que possibilitou a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
SUMÁRIO.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. O Processo de Explosão a Vapor.....	4
2.2. A Fermentação Submersa.....	8
2.3. <i>Rhizopus spp.</i>.....	11
2.3.1 O metabolismo dos fungos.....	14
2.3.2 Necessidades nutricionais	14
2.3.2.1 Fonte de carbono.....	15
2.3.2.2 Fonte de nitrogênio.....	15
2.3.2.3 Relação C/N.....	16
2.3.2.4 Água.....	16
2.3.2.5 Íons inorgânicos essenciais.....	17
2.3.3 Condições de Cultivo.....	17
2.3.3.1 Temperatura.....	17
2.3.3.2 Aeração.....	18
2.3.3.3 pH.....	18
2.4 Produção de Ácidos Orgânicos por Fungos.....	19
2.5 O Ácido Lático.....	20
2.5.1. Histórico.....	21
2.5.2. Produção.....	21

2.6	Substratos Utilizados.....	25
2.6.1	<i>Pinus taeda</i>	30
2.6.2	<i>Eucalyptus viminalis</i>	31
2.6.3	<i>Mimosa scabrella</i>	33
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1	Microrganismos.....	34
3.2	Conservação das Cepas.....	34
3.3	Preparação das Suspensões de Esporos.....	35
3.4	Substrato.....	36
3.5	O reator de Pré-tratamento por Explosão a Vapor.....	37
3.6	Determinação da Composição dos Hidrolisados.....	39
3.6.1.	Análises físico-químicas dos hidrolisados.....	39
3.6.1.1	pH.....	39
3.6.1.2	Nitrogênio.....	40
3.6.1.3	Açúcares redutores.....	40
3.6.1.4	Açúcares totais.....	40
3.6.2	Composição do hidrolisado de <i>P. taeda</i>	40
3.6.3	Teor de açúcares redutores nos hidrolisados de <i>E. viminalis</i> e de <i>M. scabrella</i>	41
3.7	Seleção de Cepas em Meio Simples.....	41
3.7.1.	Crescimento radial.....	41
3.8	As Fermentações.....	42
3.9	Análises no Fermentado.....	43
3.9.1	Açúcares redutores residuais.....	43
3.9.2	Metabólitos e biomassa produzidos.....	44
3.9.2.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	44
3.9.2.2	Determinação da biomassa fúngica.....	46
3.9.2	pH.....	46
3.10	Fermentação com os Três Substratos.....	46
3.11	Estudo Fisiológico da Cepa de <i>Rhizopus oryzae</i> 395	48
3.11.1	Planificação experimental 1: Otimização dos parâmetros de cultura para a produção de ácido L-lático pela cepa <i>R. oryzae</i>	48
3.11.2	Planificação experimental 2: Otimização da relação C/N e da concentração de substrato, utilizando a planificação experimental.....	49

3.11.3	Planificação experimental 3: Otimização da reação C/N e da quantidade de carbonato de cálcio adicionada por frasco, utilizando a planificação experimental	49
3.12	Avaliação das Eficiências de Conversão Substrato-Produto ($Y_{P/S}$).....	50
3.13	Avaliação das Eficiências de Conversão Substrato-Biomassa ($Y_{X/S}$).....	51
3.14	Estudo Cinético das Fermentações.....	51
3.14.1	Velocidade volumétrica de formação de biomassa (r_x).....	51
3.14.2	Velocidade volumétrica de formação de produto (r_p).....	51
3.14.3	Velocidade Volumétrica de consumo do substrato (r_s).....	52
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1	Seleção de Cepas.....	53
4.2	Seleção do Substrato.....	56
4.3	Seleção do Metabólito.....	62
4.4	Plano Fatorial de Otimização.....	62
4.4.1	Planificação Experimental 1: 2^{5-1}	62
4.4.2	Planificação Experimental 2: 3^2	74
4.5	Cinética de Crescimento e Produção de Metabólitos.....	80
4.5.1	Fatores de conversão de substrato em biomassa e em produto.....	84
4.5.2	Parâmetros cinéticos do processo.....	86
4.5.3	Decaimento da DQO no caldo de fermentação.....	87
5.	CONCLUSÕES.....	89
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	91
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Representação esquemática do sistema de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos por explosão a vapor instalado na Universidade Federal do Paraná.....	6
FIGURA 2:	<i>Rhizopus</i>	13
FIGURA 3:	Fórmula estrutural da celulose. Unidades de celobiose.....	27
FIGURA 4:	Açúcares presentes na hemicelulose.....	28
FIGURA 5:	Estruturas presentes na lignina de madeiras duras e moles.....	29
FIGURA 6:	Modelo da estrutura da parede celular de traquéias de madeiras moles.....	29
FIGURA 7:	Conservação das cepas, preparo das suspensões de esporos e inoculação.....	35
FIGURA 8:	Madeiras usadas na preparação dos substratos de fermentação.....	36
FIGURA 9:	Preparação de substratos celulósicos, utilizando o método de explosão a vapor	37
FIGURA 10:	Reator de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos por explosão a vapor.....	38
FIGURA 11:	Ciclone de descarga do material após tratamento com vapor.....	38
FIGURA 12:	Agitador de movimento orbital usado nas fermentações.....	42
FIGURA 13:	Cromatógrafo líquido Shimadzu.....	43
FIGURA 14:	Processamento do material fermentado para análise.....	44
FIGURA 15:	Aspecto da madeira e do hidrolisado de <i>Pinus taeda</i>	47
FIGURA 16:	Crescimento radial dos <i>Rhizopus</i> em meio ágar-hidrolisado de <i>P. taeda</i>	53
FIGURA 17:	Evolução do crescimento radial das cepas R. 25 975 e R. 28 422	55
FIGURA 18:	Evolução do crescimento radial das cepas R. 28 168, R. 1475 e R. 16 179.....	55
FIGURA 19:	Evolução do crescimento radial das cepas R. 3267, R. 28 425 e R. 2582.....	55
FIGURA 20:	Evolução do crescimento radial das cepas R. 34 612 e R. 28 627.....	55

FIGURA 21:	Metabólitos produzidos na fermentação do hidrolisado de <i>P. taeda</i> com <i>Rhizopus</i> . Concentração de açúcar redutor no hidrolisado = 56,55 g/L.....	59
FIGURA 22:	Concentração de açúcar redutor residual e biomassa produzida na fermentação de hidrolisado de <i>P. taeda</i> , com <i>Rhizopus</i>	59
FIGURA 23:	Metabólitos produzidos na fermentação do hidrolisado de <i>E. viminalis</i> com <i>Rhizopus</i> . Concentração de açúcar redutor no hidrolisado = 56,5 g/L.....	60
FIGURA 24:	Concentração de açúcar redutor residual e biomassa produzida na fermentação de hidrolisado de <i>E. viminalis</i> , com <i>Rhizopus</i>	60
FIGURA 25:	Metabólitos produzidos na fermentação do hidrolisado de <i>M. scabrella</i> com <i>Rhizopus</i> . Concentração de açúcar redutor no hidrolisado = 57,5 g/L	61
FIGURA 26:	Concentração de açúcar redutor residual e biomassa produzida na fermentação de hidrolisado de <i>M. scabrella</i> , com <i>Rhizopus</i>	61
FIGURA 27:	Gráfico PARETO para a produção de ácido láctico na planificação experimental 1, na fermentação de hidrolisado de <i>P. taeda</i> com <i>R. oryzae</i> 395.....	64
FIGURA 28:	Gráfico PARETO para a produção de biomassa na planificação experimental 1, na fermentação de hidrolisado de <i>P. taeda</i> com <i>R. oryzae</i> 395.....	64
FIGURA 29:	Gráfico PARETO para a produção de etanol na planificação experimental 1, na fermentação de hidrolisado de <i>P. taeda</i> com <i>R. oryzae</i> 395.....	65
FIGURA 30:	Superfície de resposta e gráfico de contorno para a produção de ácido láctico, em função da concentração de substrato e do nível de agitação, na planificação experimental 1: 2^{5-1}	67
FIGURA 31:	Superfície de resposta e gráfico de contorno para a produção de ácido láctico, em função da concentração de substrato e da quantidade de CaCO_3 adicionado por frasco, na planificação experimental 1: 2^{5-1}	68
FIGURA 32:	Superfície de resposta e gráfico de contorno para a produção de ácido láctico, em função da concentração de substrato e da relação C/N, na planificação experimental 1: 2^{5-1}	69

FIGURA 33:	Superfície de resposta e gráfico de contorno para a produção de ácido láctico, em função da concentração de substrato e da relação C/P na planificação experimental 1: 2^{5-1}	70
FIGURA 34:	Superfície de resposta para a produção de biomassa, em função da concentração do substrato e da relação C/N, na planificação experimental 1: 2^{5-1}	71
FIGURA 35:	Superfície de resposta para a produção de biomassa, em função da concentração do substrato e do nível de agitação, na planificação experimental 1: 2^{5-1}	71
FIGURA 36:	Superfície de resposta para a produção de etanol, em função da concentração do substrato e da quantidade de CaCO_3 adicionada por frasco de fermentação, na planificação experimental 1: 2^{5-1}	72
FIGURA 37:	Superfície de resposta para a produção de etanol, em função da concentração do substrato e do nível de agitação, na planificação experimental 1: 2^{5-1}	72
FIGURA 38:	Gráfico PARETO para a produção de ácido láctico na planificação experimental 2.....	75
FIGURA 39:	Gráfico de superfície de resposta para a produção de ácido láctico na planificação experimental 2.....	77
FIGURA 40:	Gráfico de superfície de resposta para a produção de biomassa na planificação experimental 2.....	78
FIGURA 41:	Gráfico de superfície de resposta para a produção de etanol na planificação experimental 2.....	78
FIGURA 42:	Cinética da fermentação do hidrolisado de <i>P. taeda</i> , obtido submetendo-se os cavacos de madeira a 210° C por 5 minutos.....	81
FIGURA 43:	Cinética da fermentação do hidrolisado de <i>P. taeda</i> , obtido submetendo-se os cavacos de madeira a 205° C por 5 minutos.....	83
FIGURA 44:	Decaimento da DQO, no processo de fermentação do hidrolisado de <i>P. taeda</i> obtido submetendo-se cavaco da madeira a 210° C, por 5 minutos.....	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Produtos químicos industriais produzidos por fermentação.....	9
TABELA 2:	Produção microbiológica de enzimas por fermentação.....	10
TABELA 3:	Produção microbiológica de antibióticos por fermentação.....	10
TABELA 4:	Produção de aminoácidos por fermentação microbiológica.....	11
TABELA 5:	Composição química média do lenho, em %.....	31
TABELA 6:	Condições físicas usadas no processo de explosão a vapor, para obtenção dos hidrolisados de madeira usados nas fermentações.....	39
TABELA 7:	Composição aproximada do hidrolisado hemicelulósico de <i>Pinus taeda</i> obtido em dois testes de processamento.....	40
TABELA 8:	Parâmetros de processamento no processo de explosão a vapor para a obtenção do hidrolisado de <i>P. taeda</i>	41
TABELA 9:	Teor de açúcares redutores nos hidrolisados de <i>E. viminalis</i> e de <i>M. scabrella</i>	41
TABELA 10:	Tempos de retenção de alguns metabólitos (padrões), monitorados em coluna cromatográfica.....	45
TABELA 11:	Características dos hidrolisados de madeira usados nos estudos iniciais.....	47
TABELA 12:	Valores (real e codificado) das variáveis experimentais usadas no plano fatorial 1.....	48
TABELA 13:	Valores (real e codificado) das variáveis experimentais usadas no plano fatorial 2.....	49
TABELA 14:	Valores (real e codificado) das variáveis experimentais usadas no plano fatorial 3.....	50
TABELA 15:	Medidas do crescimento radial de variedades de <i>Rhizopus</i> em meio agar-hidrolisado hemicelulósico de <i>P. taeda</i>	54
TABELA 16:	Resultados da fermentação líquida de hidrolisado hemicelulósico de <i>P. Taeda</i> , com <i>Rhizopus</i> . Teor de açúcar redutor no substrato = 56,55 g/L.....	56

TABELA 17: Resultados da fermentação líquida de hidrolisado hemicelulósico de <i>E. viminalis</i> , com <i>Rhizopus</i> . Teor de açúcar redutor no substrato = 56,5 g/L.....	57
TABELA 18: Resultado da fermentação líquida de hidrolisado hemicelulósico de <i>M. scabrella</i> com <i>Rhizopus</i> . Teor de açúcar redutor no substrato = 57,5 g/L.....	58
TABELA 19: Planificação experimental usada para otimizar a produção de ácido láctico a partir de hidrolisado hemicelulósico de <i>P. taeda</i> , com <i>R. oryzae</i> 395.....	63
TABELA 20: ANOVA para o ácido láctico produzido no planejamento experimental 1.....	66
TABELA 21: Planejamento experimental para incrementar a produção de ácido láctico a partir de hidrolisado hemicelulósico de <i>P. taeda</i> com fungo <i>R. oryzae</i> 395.....	75
TABELA 22: ANOVA para a produção de ácido láctico na planificação experimental 2.....	76
TABELA 23: Parâmetros inicial e final, com os fatores de conversão de substrato em biomassa e em ácido láctico calculados a partir dos dados finais da cinética da fermentação com os hidrolisados obtidos a 205 e a 210° C.....	85
TABELA 24: Parâmetros cinéticos das fermentações realizadas com os hidrolisados obtidos a 205 e a 210° C.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS

Ac.	ácido
Ac. Red.	açúcar redutor
ANOVA	análise de variância
C/N	relação carbono/nitrogênio
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
Cresc.	crescimento
DQO	demanda química de oxigênio
g	grama
g/L	grama por litro
g/L h	grama por litro por hora
kg/cm ²	quilogramas por centímetro quadrado
°C	graus Celsius
L	litro
HPLC	high performance liquid chromatography
μL	microlitros
mg/L	miligrama por litro
mL/min	mililitros por minuto
mM	milimolar
M	concentração molar
min.	minuto
mm	milímetro
PDA	agar-dextrose-batata
%	porcentagem
<i>R.</i>	<i>Rhizopus</i>
rpm	rotações por minuto

RESUMO

Materiais lignocelulósicos, tais como madeira e resíduos de agricultura constituem-se em um substrato perfeito para conversões biológicas, já que são virtualmente inesgotáveis, pois são produzidos por processos fotossintéticos. Ocorre que os açúcares fermentescíveis não estão acessíveis à maioria dos microrganismos, e sim polimerizados, na celulose e hemicelulose, além de protegidos por uma barreira de lignina. O processo de explosão a vapor é uma alternativa para separar as frações, celulose, hemicelulose e lignina que formam a estrutura dos materiais lignocelulósicos e deixá-los viáveis ao ataque microbiológico. Neste trabalho, investigou-se a fermentação de hidrolisados hemicelulósicos de *Pinus taeda*, *Eucalyptus viminalis* e *Mimosa scabrella* (bracatinga), que é a fração líquida proveniente do tratamento de cavacos de madeira pelo processo de explosão a vapor. Várias cepas de *Rhizopus* foram testadas com os três hidrolisados com concentrações de açúcar redutor de 56,55 g/L, 56,50 g/L e 57,50 g/L, respectivamente e avaliados os metabólitos produzidos em fermentação submersa. A cepa *Rhizopus oryzae* 395, mostrou-se boa produtora de ácido láctico, fermentando o hidrolisado de *P. taeda*, produzindo 12 g/L neste estudo. Na sequência, através de planificações experimentais, foram testados outros níveis de concentração de substrato, níveis de agitação, relação C/N, relação C/P e quantidade de agente neutralizante adicionado ao frasco de fermentação. Concentrações de substrato altas, em torno de 90 g/L inibiram o crescimento do fungo, sendo que a melhor produtividade de ácido láctico foi conseguida com concentração de 86 g/L e relação C/N de 40 g atom/g atom. A relação C/P não mostrou influencia nos teores de ácido láctico produzido. As melhores produtividades foram encontradas com nível de agitação de 230 rpm, e adição de 2 g de CaCO₃/ frasco de fermentação. A cinética do processo foi realizada com concentração de substrato de 75 g/L, e feita para o hidrolisado obtido em 205 e 210 °C, com a finalidade de comparação. O hidrolisado obtido à temperatura mais alta mostrou-se mais tóxico ao crescimento microbiano e menos propício à produção do ácido láctico, confirmando os dados da literatura, que relatam a produção de compostos tóxicos provenientes da degradação da hemicelulose e da lignina, proporcional à drasticidade das condições de pré-tratamento.

ABSTRACT

Lignocellulosic materials, such as wood and agricultural wastes are a perfect substrate for biological conversions, because they are virtually inexhaustible, produced by photosynthetic process. The fermentable sugars are not available to the great part of the microorganisms. They are polymerized as cellulose, hemicellulose, and protected by lignin. The steam explosion process is an alternative to separate these fractions: cellulose, hemicellulose and lignin, that are the base of the lignocellulosic materials. The steam explosion process makes them available for the microorganisms action. In this study, the fermentation was done with the lignocellulosic hidrolisates of *Pinus taeda*, *Eucalyptus viminalis* and *Mimosa scabrella* (bracatinga), which are the liquid fraction from the treatment of wood chips at the steam explosion process. Some *Rhizopus* strains were tested for the three hidrolisates, with a content of 56.55 g/L, 56,50 g/L and 57,5 g/L in reducing sugar, respectively and evaluated the metabolites produced at the submerged fermentation. The strain *Rhizopus oryzae* 395, appeared to be a good producer of lactic acid, converting the *P. taeda* hidrolisate, which produced 12 g/L, of this acid. After this, using the experimental design other levels of substrate content, agitation, C/N ratio, C/P ratio and amount of calcium carbonate added per fermentation flask were tested. High contents of substrate, around 90 g/L inhibited the mold growth, and the best productivity of lactic acid was reached with the following conditions: substrate content of 86 g/L, C/N ratio of 40 g atom/g atom, agitation level of 230 rpm and the amount of calcium carbonate added to the fermentation flasks of 2 g/flask. The C/P ratio did not affect the lactic acid production. In order to compare, the process kinetic study was done with the substrate content of 75 g/L, for the hidrolisates obtained at 205 and 210 °C. The hidrolisate obtained at 210 °C was more toxic to the mold growth, confirming the review data, which says that, the more drastic conditions used at the steam explosion process, the more toxic is the hidrolisate.

1. INTRODUÇÃO

Esta dissertação faz parte do projeto *Aproveitamento Químico e Tecnológico de Resíduos Agrícolas e Agro-industriais*, coordenados pelo Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos e pelo Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, financiado pelo PADCT-II e CNPq, através do processo aprovado N. 62 0194/95-2.

O projeto envolve basicamente três linhas de pesquisa a saber: reciclagem de resíduos celulósicos agrícolas e agro-industriais, pelo processo de explosão a vapor, biotransformação dessa matéria prima em produtos de maior valor agregado e conversão termoquímica da lignina em materiais de maior interesse comercial. Assim, tem como objetivo avaliar condições de pré-tratamento de resíduos agrícolas e agro-industriais pelo processo de explosão a vapor, com a finalidade de separar as três frações constituintes da estrutura destes materiais lignocelulósicos, celulose, hemicelulose e lignina, bem como estudar a bioconversão, a conversão enzimática e a conversão química de cada uma destas frações em produtos de interesse comercial.

A utilização de substratos complexos, normalmente resíduos de processos industriais, para produzir biomoléculas de valor comercial, tem sido um desafio para pesquisadores de vários laboratórios.

Como substratos passíveis de utilização em processos fermentativos citam-se os hidrolisados hemicelulósicos de madeira, os resíduos agro-industriais, como palha de trigo, de arroz, no estado natural ou os seus hidrolisados, além de bagaço de cana-de-açúcar, de mandioca, de soja, etc.

Como exemplo de processos pesquisados nos quais obteve-se alta produtividade, pode-se citar o uso de caldo de cana como substrato para a *Phaffia Rodozima*, em substituição à sacarose pura, na produção de pigmentos carotenóides como a astaxantina (FONTANA *et alii*, 1996), o uso de bagaço de mandioca em fermentação no estado sólido,

para a produção de ácido cítrico pelo *Aspergillus Oryzae* (KOLICHESKI, 1995), o enriquecimento protéico de farinha de mandioca pelo *Rhizopus formosa* (STERTZ, 1997), a produção de ácido láctico por fermentação no estado sólido por *Rhizopus oryzae*, sobre farinha de milho (HANG, 1989) e sobre farinhas de arroz, cevada, milho, mandioca e aveia (YU & HANG, 1989).

Outros processos utilizando substratos menos viáveis, não obtiveram bons rendimentos em produto. Entre estes pode-se citar a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto (MORITA *et alii*, 1996 e GUARAGNA *et alii*, 1996), a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (MAYERHOFF *et alii*, 1996) e de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (ALVES *et alii*, 1996).

A busca de alternativas para a separação dos principais constituintes da madeira (celulose, hemicelulose e lignina), por processos que gerem resíduos menos agressivos ao meio ambiente e que possibilitem a recuperação destas três frações, tem levado vários grupos de pesquisadores a estudar processos alternativos aos já tecnicamente consagrados e que são empregados atualmente para a obtenção da celulose industrial. Dentre os processos far-se-á referência à técnica de explosão a vapor utilizada neste trabalho.

Esta técnica consiste em submeter cavacos de madeira a um pré-tratamento com solução diluída de H_2SO_4 , (impregnação ácida), seguida de um processamento desta madeira à alta pressão e temperatura, durante tempos definidos, e posterior descompressão súbita. Como produtos deste processo, obtém-se duas frações: uma solúvel e uma insolúvel. A fração insolúvel é formada por lignina, celulose e resíduos de hemicelulose e a fração solúvel representa os açúcares redutores solúveis derivados da hemicelulose.

Os microrganismos apresentam uma certa habilidade de crescer em substratos os mais variados possíveis, ocorrendo a fermentação dos mesmos a produtos vários de interesse industrial, tais como etanol e ácidos orgânicos. Assim, a habilidade de algumas espécies de fungos filamentosos para fermentar a xilose tanto quanto a glucose à etanol e outras biomoléculas, constitui-se numa importante alternativa para a valorização de hidrolisados de madeira.

Após a recuperação da celulose e da lignina, o hidrolisado hemicelulósico é o resíduo líquido obtido no tratamento por explosão a vapor de cavacos de madeira, previamente submetidos à impregnação ácida. Além de açúcares fermentescíveis, este resíduo líquido contém compostos fenólicos e extrativos da madeira, e também compostos de degradação da hemicelulose e da lignina, o que lhe confere certo grau de toxicidade, e características inibitórias ao processo fermentativo (NIELSEN & AHRING, 1997).

O objetivo deste trabalho foi o de testar a viabilidade fermentativa dos hidrolisados hemicelulósicos, fração líquida proveniente do tratamento por explosão a vapor de cavacos de *Pinus taeda*, *Mimosa scabrella* (bracatinga), e *Eucalyptus viminalis*, utilizando diferentes espécies de fungos do gênero *Rhizopus*.

Para este trabalho foram utilizados cavacos de madeira de espécies abundantes no Paraná e no Brasil. O *Pinus taeda* e o *Eucalyptus viminalis*, são matérias-primas para as indústrias de papel e celulose e objeto de extensas áreas de reflorestamento, e a *Mimosa scabrella*, é um tipo de madeira largamente usada na construção civil e cuja utilização das sementes para a extração de gomas naturais, vêm sendo amplamente estudadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Processo de Explosão a Vapor

A estrutura da madeira, formada por celulose, hemicelulose e lignina, está organizada em uma matriz extremamente rígida. Portanto, celulose e hemicelulose não estão diretamente disponíveis para utilização já que a lignina atua como uma potente barreira física. Para se hidrolisar a celulose e a hemicelulose, é preciso despolimerizar, solubilizar e remover a lignina. Com os três componentes separados é possível a utilização da fração hemicelulósica formada por açúcares fermentescíveis, a conversão da celulose enzimaticamente em açúcares solúveis e da lignina para sínteses de insumos químicos como a vanilina por exemplo (SCHMIDT & BJERRE, 1997).

Vários métodos químicos têm sido propostos para hidrolisar a madeira, tais como tratamentos químicos em meio básico, que tendem a solubilizar as hemiceluloses e tratamentos em meio ácido, que hidrolisam e solubilizam os polissacarídeos da planta. O sucesso de cada método de pré-tratamento está relacionado com a quantidade de material recuperado após a etapa de pré-tratamento e o grau no qual a hidrólise enzimática da celulose é aumentada (GRETHLEIN, 1984; WOOD & SADDLER, 1988; PARISI, 1989).

Conforme amplamente demonstrado na literatura, os pré-tratamentos que combinam métodos físicos e químicos têm sido os mais eficientes. Dentre as várias alternativas até hoje estudadas, o uso de pré-tratamento a vapor tem sido proposto como o mais promissor (RAMOS, 1992; SILVA, 1995).

O pré-tratamento a vapor baseia-se no aquecimento de materiais lignocelulósicos a altas temperaturas e pressão, seguido de ruptura mecânica dos materiais pré-tratados, através de um processo de descarga violenta (explosão) em um tanque de coleta do tipo ciclone. A descompressão do reator pode ser lenta até a pressão atmosférica (sem explosão) (CARPES, 1997).

O processo de explosão a vapor é portanto um processo onde a biomassa é tratada com vapor a alta pressão sob condições otimizadas e na sequência o conteúdo do reator é liberado instantaneamente à pressão atmosférica através de uma expansão adiabática. Este processo fraciona seletivamente cada um dos três polímeros do material lignocelulósico. Condições ótimas são definidas como aquelas na qual o melhor substrato para hidrólise é produzido, com menor perda de material em reações de decomposição (RAMOS & EMMEL, 1997). O pré-tratamento com explosão a vapor combina elementos químicos e físicos que causam a ruptura da estrutura da parede celular e a exposição de suas camadas internas ao ataque microbiano ou enzimático (CARPES, 1997). A figura 1, mostra esquematicamente o sistema de pré-tratamento para materiais lignocelulósicos por explosão a vapor instalado na UFPr.

As variáveis de processamento tais como temperatura dentro do reator, tempo de reação e concentração do catalisador ácido, devem ser detalhadamente estudadas para que o processamento produza um melhor substrato para a hidrólise enzimática da celulose e uma maior recuperação de açúcares fermentescíveis no hidrolisado hemicelulósico aquoso. A otimização das condições de processamento dos materiais lignocelulósicos deve portanto ser feita levando-se em conta o rendimento da acessibilidade do substrato às enzimas celulásicas, ou seja da hidrólise enzimática da celulose, e o rendimento de recuperação da lignina e dos açúcares da hemicelulose, ou seja com degradação mínima dos açúcares liberados da hemicelulose (RAMOS, 1992).

Assim a eficiência do pré-tratamento a vapor é medida não somente pelo aumento da eficiência do tratamento do substrato pelas enzimas, permitindo maior eficiência na hidrólise ou sacarificação da celulose, mas também pela facilidade e pelo rendimento com que os três componentes principais da madeira, celulose, hemicelulose e lignina, são separados. A literatura mostra que a acessibilidade das enzimas ao substrato é diretamente proporcional ao aumento da drasticidade das condições de pré-tratamento, porém, condições excessivamente drásticas causam uma decomposição da lignina e dos açúcares constituintes da hemicelulose (RAMOS *et alii*, 1992b).

De acordo com RAMOS (1992) e CARPES (1997), a estrutura da parede celular da planta é radicalmente modificada pelo vapor a alta pressão. As hemiceluloses

parcialmente hidrolisadas são removidas por extração aquosa, restando uma fração insolúvel em água composta de celulose e lignina parcialmente condensada. A maior parte da lignina pode então ser extraída com alcali, etanol ou dioxana.

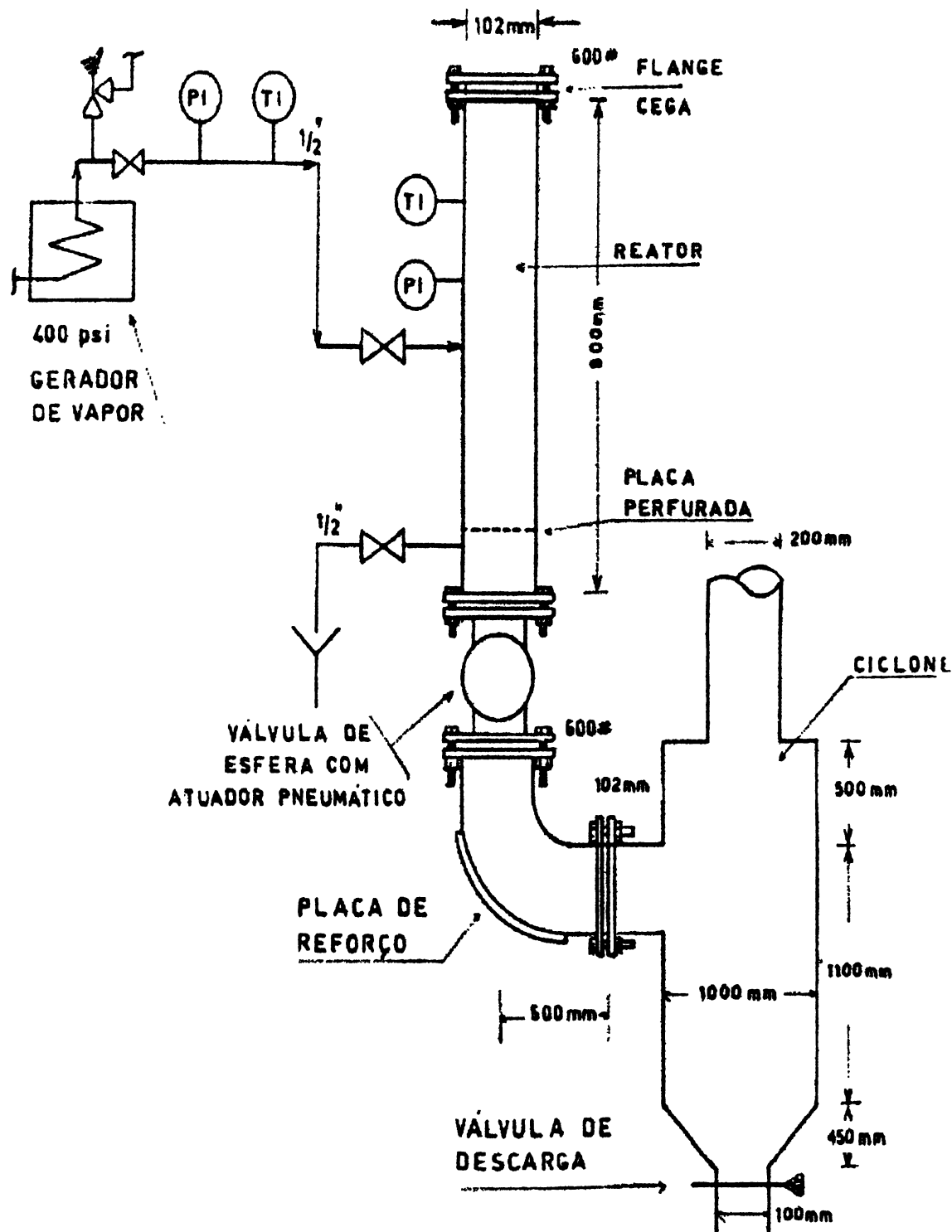


FIGURA 1: Representação esquemática do sistema de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos por explosão a vapor instalado na Universidade Federal do Paraná.

O pré-tratamento a vapor tem sido estudado e otimizado para vários tipos de materiais lignocelulósicos, incluindo madeiras duras e moles (RAMOS, 1992; RAMOS *et alii*, 1992b; CARPES, 1997), resíduos de agricultura como palha de trigo (AHRING *et alii*, 1997; SCHMIDT & BJERRE, 1997), bagaço de cana-de-açúcar (SILVA, 1995), serragem (CARRASCO, 1992), etc.

O uso de catálise ácida durante o pré-tratamento a vapor tem vantagens tais como, o alto rendimento na recuperação de pentoses na fração solúvel em água e o melhor rendimento da hidrólise enzimática na fração sólida (RAMOS, 1992), fato este atribuído à maior estabilidade das pentoses em soluções ácidas, com pH na faixa de 2,5 a 3,5 (SPRINGER & HARRIS, 1992). Além disso o uso de catalisador ácido leva a um decréscimo considerável no grau de despolimerização da celulose (RAMOS, 1992; SILVA, 1995).

O pré-tratamento por explosão a vapor tem sobre a oxidação a úmido, a desvantagem de produzir compostos tóxicos como 2-furfural e 5-hidroximetil-2-furfural a partir dos carboidratos, o que pode ser um problema para as etapas de fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos pelas suas características inibitórias ao crescimento microbiano (NIELSEN & AHRING, 1997; SCHMIDT & BJERRE, 1997).

A geração de substâncias tóxicas ao metabolismo microbiano foram também relatadas por MORITA *et alii*, (1996), estudando a fermentação de hidrolisados hemicelulósicos de *Eucalyptus grandis* com a levedura *Candida guilliermondii*, para a produção de xilitol. Neste estudo foram testados alguns agentes químicos para a detoxificação do hidrolisado, que foram posteriormente submetidos ao processo fermentativo. O melhor rendimento de xilitol (27,2 g/L) foi conseguido, quando o hidrolisado foi tratado com cálcio, isto devido ao fato deste se ligar aos compostos inibidores presentes no hidrolisado precipitando-os.

2.2 A Fermentação Submersa

Mesmo sem ter consciência do fato, o homem tem usado microrganismos, há milhares de anos, na fabricação de pães, vinho, cerveja, etc., fatos estes cronologicamente colocados muito anteriores à era cristã. A fermentação industrial é a utilização racional, controlada e otimizada de microrganismos, com a finalidade de gerar um produto de valor comercial (LIMA *et alii*, 1992).

O meio de fermentação é preparado convenientemente para fornecer ao microrganismo utilizado no processo fermentativo, os nutrientes de que necessita no seu metabolismo. Normalmente o meio deve ser esterilizado com o objetivo de eliminar organismos contaminantes indesejáveis. No fermentador, o meio recebe o inóculo ou seja, a suspensão do microrganismo desejado, ou de seus esporos capaz de garantir a fermentação do meio com eficiência. O processo fermentativo é então controlado com base nos vários parâmetros fermentativos, tais como temperatura, pH, agitação, concentração de nutrientes, aeração, de maneira a manter no reator as condições ideais ao trabalho do microrganismo (BORZANI *et alii*, 1988).

A fermentação submersa é aquela onde o substrato está dissolvido em fase líquida, e o desenvolvimento do microrganismo se dá em presença de água livre (THIEMANN, 1985). Na fermentação submersa, o meio de cultura está qualitativa e quantitativamente mais equilibrado e homogêneo quando comparado com a fermentação em meio sólido. Por isso, permite uma regulação mais uniforme do metabolismo miceliano, um melhor controle das trocas gasosas no meio, e metabólitos microbianos, quando excretados no meio, permanecem em solução de maneira mais homogênea do que quando produzidos em fermentação no estado sólido, onde a difusão do metabólito no meio é mais difícil (LITCHFIELD, 1967).

Alguns produtos, mesmo sendo produzidos eficientemente por fermentação, são freqüentemente manufaturados por meios químicos, ou extraídos de animais e plantas. Processos microbiológicos estão entretanto se apresentando como uma alternativa eficiente para processos de síntese, tornando o processo produtivo mais simples e produzindo substâncias com elevado grau de pureza. Dentre os produtos biossintetizados pode-se citar

os químicos orgânicos como ácidos, álcoois, enzimas, antibióticos, aminoácidos, proteínas e outros polímeros microbianos (ATKINSON & MAVITUNA, 1991).

Em cultura submersa, o caldo de fermentação tem sua viscosidade fortemente alterada no decorrer do processo fermentativo, qualquer que seja o microrganismo empregado, o que pode alterar as condições ambientais no reator. Seja com bactérias, leveduras ou fungos filamentosos, a viscosidade aparente do caldo fermentativo sempre aumenta. Durante a fermentação com fungos filamentosos em fermentadores tipo torre, a morfologia dos microrganismos varia também consideravelmente com o decorrer da fermentação de um micélio filamentoso até “pellets” redondos e macios. Estas mudanças na morfologia podem alterar a viscosidade aparente (ATKINSON & MAVITUNA, 1991).

As tabelas de 1 a 4 a seguir listam alguns produtos sintetizados por processos biotecnológicos, em fermentação submersa, industrialmente consagrados, com os seus microrganismos produtores.

TABELA 1: Produtos químicos industriais produzidos por fermentação

Produto sintetizado	Microrganismo	Usos industriais
Etanol	<i>Saccharomyces</i>	Solvente industrial, preparo de bebidas Intermediário para vinagre, ésteres e éter
Ácido fórmico	<i>Aspergillus</i>	Corantes têxteis, manufatura de borracha Tratamento de couro
Ácido acético	<i>Acetobacter</i>	Acidulante de alimentos, solvente industrial Intermediário para outros compostos orgânicos
Ácido glicólico	<i>Aspergillus</i>	Processamentos têxteis, controle de pH Adesivos, produtos de limpeza
Ácido fumárico	<i>Rhizopus</i>	Intermediário para a síntese de resinas Preparo de corantes, antioxidantes, acidulantes
Ácido succínico	<i>Rhizopus</i>	Manufatura de lacas, corantes manufatura de ésteres para perfumes
Ácido cítrico	<i>Aspergillus</i>	Acidulante para bebidas e alimentos Conservante e antioxidante para alimentos
Ácido málico	<i>Aspergillus</i>	Acidulante para bebidas e alimentos Intermediário para sínteses de outros produtos químicos
Ácido itacônico	<i>Aspergillus</i>	Manufatura de tecidos Indústria de papel

FONTE: ATKINSON & MAVITUNA, 1991.

TABELA 2: Produção microbiológica de enzimas por fermentação

Enzima	Microrganismo	Substrato
Alfa-amilase	<i>Bacillus licheniformes</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Amido
Beta-amilase	<i>Bacillus polymyxa</i>	Amido
Amiloglucosidase (glucoamilase)	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus niveus</i>	Dextrinas
Celulases	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Trichoderma reesei</i>	Celulose
Alfa-glucosidase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Maltose
Gluco-1-oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Glucose
Pectinesterase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Pectina
Lipases	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus arrhizus</i>	Lípídeos
Proteinase ácida (como pepsina)	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus saitoi</i>	Proteína
Proteinase ácida (como renina)	<i>Endothia parasitica</i> <i>Mucor pusillus</i>	Proteína

FONTE: ATKINSON & MAVITUNA, 1991.

TABELA 3: Produção microbiológica de antibióticos por fermentação

Antibiótico	Classe Química	Microrganismo
Anfotericina B	Tetraeno	<i>Streptomyces nodosus</i>
Cefalosporina C	Beta-lactana	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Cloranfenicol	Nitroaromático	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Clortetraciclina	Tetraceno	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Eritromicina	Macrolide	<i>Streptomyces erythreus</i>
Penicilina	Beta-lactana	<i>Penicillium chrisogenum</i>
Estreptomicina	Aminoglicosídeo	<i>Streptomyces griseus</i>
Tetraciclina	Tetraceno	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Gentamicina C	Aminoglicosídeo	<i>Micromonospora purpurea</i>
Neomicina	Aminoglicosídeo	<i>Streptomyces fradiae</i>
Nistatina	Heptaeno	<i>Streptomyces noursei</i>

FONTE: ATKINSON & MAVITUNA, 1991.

TABELA 4: Produção de aminoácidos por fermentação microbiológica

Aminoácido	Microorganismo
L – Arginina	<i>Brevibacterium flavum</i>
Ácido L-glutâmico	<i>Brevibacterium flavum</i>
L – Histidina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L – Isoleucina	<i>Brevibacterium flavum</i>
L – Leucina	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>
L – Lisina	<i>Brevibacterium flavum</i>
L – Fenilalanina	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>
L – Prolina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L – Serina	<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>
L – Triptofano	<i>Brevibacterium flavum</i>
L – Tirosina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
L – Valina	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>

FONTE: ATKINSON & MAVITUNA, 1991.

2.3 *Rhizopus spp*

Rhizopus são fungos filamentosos comestíveis usados há milhares de anos, sobretudo nos países orientais, na preparação de diferentes alimentos fermentados. Alguns autores têm demonstrado que estes fungos podem melhorar o grau de digestibilidade de alguns alimentos através da desagregação de fibras e aumentar o valor protéico dos alimentos através do crescimento micelial (BEUCHART, 1978; DAUBRESSE *et alii*, 1987; STERTZ, 1997). Também foi estudada a sua capacidade de impedir a formação de produtos tóxicos como a aflatoxina B₁ (ZHU *et alii*, 1989), produzir substâncias anticarcinogênicas (KO, 1974), controlar o crescimento de bactérias GRAM + através da síntese de substâncias que impedem o seu desenvolvimento (WANG *et alii*, 1969) e detoxificar os compostos cianogênicos da mandioca (PADMAJA & BALAGOPAL, 1985).

Os fungos são microrganismos multicelulares, filamentosos, de aspecto algodonooso e se apresentam em várias cores (branco, esverdeados, róseos, escuros); as células são eucarióticas e a reprodução é por meio de esporos, com poucas exceções. A maioria das

Revisão Bibliográfica

partes de um fungo é potencialmente capaz de crescimento. Os bolores são formados por filamentos ramificados chamados de hifas; o conjunto dessas hifas é denominado micélio. Como exemplo cita-se os bolores comuns do pão que causam decomposição de alimentos; crescem em pães, frutas, vegetais e outros produtos comestíveis (PELCZAR *et alii*, 1981). Há basicamente, dois tipos de hifas: as vegetativas, que penetram no meio para daí retirar o alimento, e as aéreas, onde se formam as estruturas reprodutoras. As hifas dos fungos imperfeitos são multinucleadas, não há separação entre células e apresentam o citoplasma contínuo (LIMA *et alii*, 1992).

As características mais típicas de *Rhizopus* são: não septados; possuem estolões e rizóides, que se escurecem freqüentemente ao envelhecer; os esporângios se originam em nódulos nos quais se formam os rizóides. Possuem esporângios grandes e geralmente negros, micélio abundante e algodinoso que pode tomar todo o recipiente que o contém. A parte do micélio na qual se prende o esporângio chamada de cumela é hemisférica e em forma de copa (FRAZIER, 1976).

Os fungos pertencem à divisão do reino vegetal chamada *Thallophita*. Não possuem clorofila, nem apresentam suas estruturas diferenciadas em folhas, caules ou raízes. Estão amplamente distribuídos na natureza, principalmente no solo. Seu papel na natureza é de grande importância para o homem. Quando patogênicos causam enfermidades para animais e vegetais. As espécie patógenas estão relacionadas com a decomposição e destruição de madeira, tecidos, alimentos e outros produtos. E quando úteis, estão relacionados com processos industriais como a maturação de queijos, produção de ácidos orgânicos de valor comercial, preparados de enzimas e outros produtos (PRESCOTT & DUNN, 1962). Ainda segundo PRESCOTT & DUNN (1962), o fungo filamentoso *R. oryzae*, tem a seguinte classificação:

Phylum	<i>Eumycetes</i> (fungos verdadeiros)
Classe	<i>Phycomycetes</i>
Sub-classe	<i>Zygomycetes</i>
Ordem	<i>Mucorales</i>
Família	<i>Mucoraceae</i>
Gênero	<i>Rhizopus</i>
Espécie	<i>oryzae</i>

Seus esporos são de natureza assexual formados dentro de uma estrutura fechada chamada esporângio, suportada por um esporangióforo, conforme mostrado na figura 2.

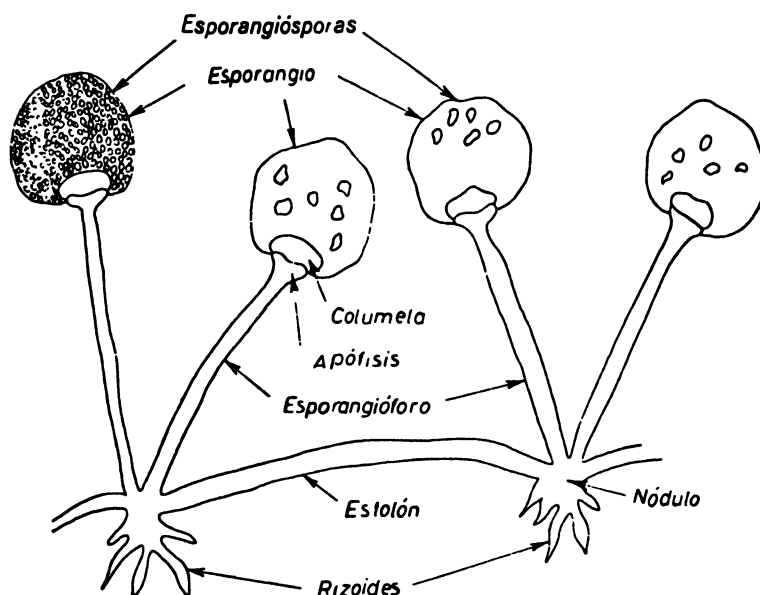


FIGURA 2: *Rhizopus*.

O *Rhizopus oryzae* é um microrganismo comestível largamente utilizado no oriente na produção de alimentos fermentados como tempeh. Algumas cepas tem um grande potencial como produtor de ácido láctico, metabólito amplamente utilizado na indústria alimentícia como acidulante e composto que está sendo bastante estudado devido ao potencial uso médico e em outras aplicações industriais importantes, como um componente ecológico, que está sendo utilizado na síntese de plásticos biodegradáveis não derivados do petróleo. A amplificação do fragmento genético LDH do *Rhizopus oryzae*, codificado para a síntese de Lactato desidrogenase, enzima que converte piruvato em lactato, em condições de privação de oxigênio foi estudada por HAKKI *et alii* (1997).

2.3.1 O metabolismo dos fungos

Conforme BORZANI *et alli* (1988), os microrganismos são capazes de efetuar uma grande diversidade de reações bioquímicas que se traduzem pela produção de biomassa, degradação, transformação e produção de substâncias orgânicas. As condições de crescimento dos microrganismos dependem de três fatores: necessidades nutritivas, condições físicas e acesso ao substrato. As necessidades nutricionais são muito variadas em função das diferentes espécies de microrganismos. As condições físico-químicas são o pH, a temperatura, a aeração e a pressão osmótica. E quanto ao acesso ao substrato, a membrana citoplasmática forma uma barreira seletiva; a penetração dos substratos se efetua através de diversos mecanismos tais como a fagocitose, difusão pela água, gases ou pequenas moléculas (uréia, glicerol, etanol, ácidos orgânicos, pentoses, hexoses) ou o transporte ativo ou passivo fazendo intervir proteínas de transporte para a maior parte das moléculas orgânicas e minerais.

A energia necessária aos microrganismos para o seu metabolismo, pode ser fornecida pela luz (fototróficos), ou pela oxidação de substâncias químicas (quimiotróficos). A maior parte das bactérias, leveduras e fungos são incapazes de efetuar fotossíntese; eles utilizam a energia liberada no decorrer das reações químicas de oxidação e de redução. A fermentação propriamente dita, corresponde a decomposições químicas produzidas em substratos orgânicos mediante a atividade de microrganismos vivos. Do ponto de vista bioquímico, a fermentação é um processo no qual, uma substância orgânica endógena e proveniente da degradação do substrato, serve como aceptor de elétrons e de prótons. Os substratos são substâncias de valor energético nas quais os microrganismos atuam utilizando-as de duas formas: primeiro como alimento; segundo, como materiais que se transformam pela ação de enzimas produzidas em excesso em relação aos nutrientes. Em geral, o valor energético de uma substância depende do grau de oxidabilidade da mesma (PRESCOTT & DUNN, 1962).

2.3.2 Necessidades nutricionais

Os fungos são seres heterótrofos, ou seja não são capazes de sintetizar seus alimentos a partir de compostos minerais, necessitando de compostos orgânicos já

elaborados, na forma de um substrato que lhe forneça todos os nutrientes necessários ao seu crescimento (SMITH, 1972; PELCZAR, 1981). De acordo com WAINWRIGHT (1995), os fungos são considerados seres quimioheterotróficos estritos, incapazes de fotossintetizar, assim necessitam de alimentos elaborados ricos em energia para a produção de novas células e para provê-las de energia.

2.3.2.1 Fonte de carbono

Os fungos produzem uma grande variedade de enzimas extracelulares, capazes de degradar grande quantidade de polímeros existentes na natureza, sendo para eles possível utilizar a maior parte dos substratos orgânicos que existem naturalmente, inclusive celulose, quitina, amido, hemicelulose e lignina. Os carboidratos são as fontes de carbono mais facilmente assimiláveis pelos fungos. No metabolismo é gerada energia para manutenção celular e também os carboidratos atuam como precursores para a síntese de material celular. Outras fontes de carbono utilizadas pelos fungos incluem álcoois, hidrocarbonetos, glicerol e amido (WAINWRIGHT, 1995).

2.3.2.2 Fonte de nitrogênio

Os fungos necessitam de fonte de nitrogênio, utilizando-o principalmente na forma de amônio e em alguns casos pode utilizar também na forma de nitrato. O nitrito é geralmente tóxico para os fungos, apesar de ser utilizado por fungos que metabolizam o nitrato. Entre outras fontes comuns de nitrogênio para o metabolismo fúngico, destacam-se uréia, L-aminoácidos e peptídios. Os D-aminoácidos são fontes pobres de nitrogênio e por vezes podem ser tóxicos. A digestão de proteínas por fungos sobre substrato sólido é muito utilizada no oriente para a produção de alimentos fermentados. Pela ação de enzimas extracelulares fúngicas, as ligações peptídicas são hidrolisadas, para a produção de polipeptídio, oligopeptídios e aminoácidos. Estes são hidrolisados facilmente a amônio, que é assimilado. Em alguns processos industriais, o nitrogênio pode ser incorporado ao meio na forma de gás amônia (WAINWRIGHT, 1995).

2.3.2.3. Relação C/N

O nitrogênio, assim como o carbono, são vitais para o crescimento de microrganismos em geral, pois são constituintes básicos da matéria celular dos seres vivos. O efeito da relação C/N é um fator fundamental a ser estudado com o objetivo de definir a quantidade ideal de nitrogênio no meio de cultura, para que se forneça ao fungo as condições ótimas de crescimento para a finalidade fermentativa desejada.

Para a produção de biomassa microbiana, baixas relações C/N, entre 4,7 e 42 foram estudadas por SOCCOL (1994); o objetivo do estudo era o enriquecimento protéico de bagaço de mandioca por fermentação em meio sólido, com *Rhizopus oryzae*. Neste estudo a maior produção de biomassa foi conseguida com relação C/N de 4,7; relações C/N maiores limitavam o crescimento do fungo, levando a valores menores de proteína no produto fermentado.

MORESI *et alii* (1991), estudando a produção de ácido fumárico por *Rhizopus arrhizus*, a partir de farinha de batata, mostraram que a produção de biomassa decresce, e a produção de ácido fumárico aumenta com o aumento da relação C/N, para valores de C/N testados entre 120 e 20 g atom/g atom, mostrando que controlando-se a quantidade de nitrogênio no meio de cultura, controla-se a produção de biomassa.

Da mesma forma, SOCCOL (1994), estudando a produção de ácido fumárico em fermentação no estado sólido, utilizando meios de cultura otimizados em fermentação submersa impregnados em suporte lignocelulósico (bagaço de cana-de-açúcar), mostrou que valores de C/N de 200 g atom/g atom., foram mais eficientes na obtenção de ácido fumárico. Valores superiores levam a uma diminuição da produtividade em ácido fumárico, com redução no consumo de glucose e na produção de biomassa.

2.3.2.4. Água

A água não é exatamente um nutriente, mas é absolutamente indispensável para o crescimento dos microrganismos. Tem um papel múltiplo. A menos dos protozoários que se nutrem por fagocitose, todos os outros microrganismos se nutrem pela passagem através

da membrana citoplasmática das substâncias em solução. A água sendo um solvente universal, exerce uma função primordial na regulação da pressão osmótica e na regulação térmica. A dessecação provoca a morte da maioria dos organismos, a não ser quando precedida de um congelamento rápido, em técnicas de liofilização (LIMA *et alii*, 1992)

2.3.2.5. Íons inorgânicos essenciais

Além do carbono e do nitrogênio, os microrganismos exigem para o seu metabolismo, macronutrientes, pois são necessários em quantidades relativamente grandes, e micronutrientes. Entre os macronutrientes pode-se relacionar: o fósforo, que é importante para o metabolismo energético e para a síntese de ácidos nucleicos; o enxofre, necessário para a síntese de aminoácidos sulfurados como a cistina e a cisteína, e na síntese de vitaminas como a biotina; o potássio, regulador da pressão osmótica; o magnésio, ativador de uma série de enzimas; o cálcio, fator importante na esporulação; o ferro necessário para a síntese de citocromos para a cadeia respiratória e de certos pigmentos. Entre os micronutrientes, citam-se cobre, cobalto, zinco, boro e outros necessários para alguns microrganismos, e que não tem função bem conhecida (LIMA *et alii*, 1992).

2.3.3. Condições de cultivo

Os fatores mais importantes que promovem o monitoramento e o controle da fermentação são: a temperatura, o pH, a aeração e a agitação contínua do meio reacional.

2.3.3.1. Temperatura

Para todos os microrganismos existem três temperaturas limites: uma temperatura mínima, abaixo da qual não há crescimento; uma temperatura máxima acima da qual não há crescimento, e uma temperatura ideal, onde o crescimento é ótimo (LIMA *et alii*, 1992). Nas fermentações líquidas, devido a agitação ininterrupta dos reatores, o calor produzido pelos microrganismos durante a respiração (calor metabólico) é rapidamente dissipado (PAREDES-LOPEZ & HARRY, 1988; SOCCOL, 1994).

2.3.3.2. Aeração

Como a água, o oxigênio atmosférico não é um nutriente, sendo necessário nos processos de respiração aeróbia como receptor final de hidrogênio. Os fungos são todos aeróbios ou facultativos, nunca anaeróbios (LIMA *et alii*, 1992).

SOCCOL *et alii*, (1994c) avaliaram a produção de ácido L-lático por várias espécies de *Rhizopus*, definindo as cepas melhores produtoras, e testaram o metabolismo do fungo *Rhizopus oryzae* NRRL 395 em aerobiose, anaerobiose, com e sem a presença de carbonato de cálcio, e concluíram que estes fatores afetam grandemente a produção de ácido L-lático. O melhor rendimento de produção de ácido láctico foi conseguido em aerobiose e na presença de carbonato de cálcio, atingindo concentração superior a 60 g/L de ácido, com consumo total das 100 g/L de glucose iniciais. Em condição de anaerobiose verificou-se a produção de grande quantidade de etanol.

Um suprimento adequado de oxigênio é indispensável para microrganismos aeróbios e o efeito se reflete no maior ou menor rendimento da cultura. Para certos microrganismos facultativos, que podem desenvolver-se na ausência de oxigênio, o fornecimento deficiente de oxigênio, além de influenciar no rendimento, provoca diferenças na velocidade do crescimento e nos produtos sintetizados a partir da atividade do microrganismo. SOCCOL *et alii* (1994b), avaliaram o efeito da concentração de gás carbônico sobre o crescimento do micélio de espécies de *Rhizopus* e concluíram que a maioria das cepas destes fungos toleram concentrações de 5 a 10% de gás carbônico.

2.3.3.3. pH

Tal como a temperatura, o pH também pode ser máximo, mínimo e ótimo. A maioria dos microrganismos têm seu desenvolvimento máximo em pH próximo da neutralidade (SOCCOL, 1994). Conforme SCRIBAN, 1984, a maioria das leveduras e os mofos, ou fungos filamentosos preferem meios relativamente ácidos de pH entre 3 e 6.

2.4 Produção de Ácidos Orgânicos por Fungos

A obtenção de ácidos orgânicos, especialmente o cítrico e o acético, é uma importante aplicação das atividades microbianas. Do ponto de vista industrial, pode-se dizer que entre as espécies mais importantes de fungos estão os do gênero *Aspergillus*, *Penicilium*, *Rhizopus* e *Mucor*. Pode-se constatar por exemplo que *Aspergillus niger* é de especial interesse pois se empregam diferentes espécies deste fungo em três fermentações industriais diferentes e importantes: as do ácido cítrico, glucônico e gálico. Entre os *Penicilium*, várias espécies atuam na maturação de queijos, e são também empregados na produção de ácido glucônico e cítrico. Algumas espécies do gênero *Rhizopus* e *Mucor*, se empregam na sacarificação de materiais feculentos. Sabe-se ainda que certas espécies de *Rhizopus* podem ser utilizadas para a produção industrial de ácido D-lático (PRESCOTT & DUNN, 1962; LIMA *et alii*, 1992).

O ácido cítrico é um ácido hidroxitricarboxílico, presente em todas as células vivas que necessitam de compostos de carbono como fonte de energia, sendo na célula quase que totalmente metabolizado, e constitui um metabólito normal no organismo humano (ABOU-ZEID & ASHY *et alii*, 1984; BENDER, 1982). Ocorre amplamente em frutas e representa 5 % da massa, e 9 % do suco. As frutas nas quais é encontrado em maiores concentrações são: abacaxi, pêra, pêssego, figo e tomate (GARY & ZIENTY, 1979). É usado largamente como aditivo alimentar, sendo muito versátil e inócuo. É o acidulante mais consumido na indústria alimentícia, onde responde por 60 % do total, realçando o sabor e o aroma, empregado no controle de pH, como agente sequestrante de compostos indesejáveis, anti-microbiano e dispersante. Usado no preparo de sorvetes, bebidas, geleias e conservas de frutas e vegetais, queijos, balas e gomas de mascar (ANTUNES & CANHOS, s/d).

O ácido oxálico é o mais simples dos ácidos dicarboxílicos de fórmula molecular $C_2H_2O_4$, e é produzido como um subproduto da fermentação cítrica, resultando da decomposição do ácido oxalacético em ácido acético e ácido oxálico pela ação da enzima oxalacetato hidrolase, produzida por diversas linhagens fúngicas, principalmente por *Aspergillus* (SCRIBAN, 1984; BOCQUET, 1985).

A fermentação de açúcares por fungos do gênero *Rhizopus*, com vistas à produção de ácido fumárico, já é bem conhecida (RHODES *et alii*, 1959) e já foi uma fonte importante de produção do ácido na década de 40, nos EUA (KAUOLA & LINKO, 1989), mas estudos sobre substratos alternativos de fermentação aplicados à produção desse ácido são bastante recentes.

O ácido fumárico é um diácido insaturado com 4 carbonos. Possui baixa solubilidade, e é aplicado nas indústrias químicas e de alimentos. É usado como acidulante em bebidas e alimentos, sendo praticamente atóxico e apresentando em relação ao ácido cítrico a vantagem de não ser higroscópico. Essencialmente todo o ácido fumárico comercializado é derivado do ácido maléico por isomerização catalítica e o anidrido maléico é a principal fonte do ácido maléico. Aproximadamente 83% do anidrido maléico nos Estados Unidos é produzido por oxidação do benzeno. Sendo este um hidrocarboneto derivado de fontes não renováveis (petróleo e carvão mineral), diversas tentativas têm sido feitas no sentido de produzir economicamente o ácido fumárico por fermentação, utilizando fontes renováveis (KIRK - OTHMER, 1981). O ácido fumárico é produzido por várias espécies de fungos, em particular do gênero *Rhizopus*, através da fermentação aeróbica da glucose em presença de carbonato de cálcio. Algumas cepas produzem o ácido fumárico com rendimentos elevados, outras produzem uma mistura de ácido láctico e fumárico em função da composição do meio e de condições de cultura (SOCCOL, 1992).

O ácido glucônico, utilizado largamente na medicina como suplemento alimentar na forma de sais de cálcio, potássio ou zinco, é produzido principalmente por fermentação submersa com *Aspergillus niger* ou com *Penicillium chrysogenum*, sendo a glucose, a fonte de carbono. A biossíntese do ácido glucônico sugere uma fermentação direta da glucose, e o pH do caldo de fermentação se mantém entre 6 e 7 (WAINWRIGHT, 1995).

2.5 O Ácido Láctico

O ácido láctico, (ácido 2-hidroxi-propanóico), é o hidroxiácido mais simples que contém um carbono assimétrico, e existe em duas formas opticamente ativas e em mistura racêmica. É um líquido claro solúvel em água. É o constituinte primário do soro de leite, e

um constituinte normal do sangue, músculos e tecidos animais. É um dos principais acidulantes usados em bebidas e produtos alimentícios. O principal uso do ácido láctico sintético grau alimentício é a produção de estearoil-2-lactato de cálcio ou sódio para a indústria de panificação. Além disso é também usado na indústria farmacêutica, onde na forma de lactato de cálcio, é usado para as terapias de cálcio (KIRK & OTHMER, 1978).

2.5.1. Histórico

Em 1894, Eijkmann suspeitou que o ácido formado por *Mucor rouxii* era o ácido láctico, suspeita confirmada em 1901 por Chrzascz. Em 1899, foi concedido a Boullanger uma patente para a produção de ácido láctico por um fungo descrito como *Lactomyces*, e que parecia ser uma espécie de *Rhizopus*. Saito em 1911, registrou a produção de pequenas quantidades de ácido D(-)láctico, a partir de soluções de glucose por *R. chinensis*. Em 1925, Takahashi e colaboradores descreveram a conversão em ácido láctico de até 38% da glucose fermentada, observada em alguns de seus experimentos. Ao mesmo tempo produziam também certas quantidades de ácido acético, fórmico, fumárico, D(-)málico, succínico e etanol. Em 1934, Kanel publicou trabalhos, onde empregava uma espécie de *Rhizopus*, obtendo rendimento de até 40% de ácido láctico, a partir de açúcar invertido e amido. O meio de cultivo continha 10% de açúcar e 4% de carbonato de cálcio. Ward e colaboradores em 1936, estudando atividades bioquímicas de *Rhizopus*, encontraram várias espécies que convertiam glucose em ácido L(+) láctico em presença de carbonato de cálcio, com rendimentos de até 62% (PRESCOTT & DUNN, 1962).

2.5.2. Produção

De maneira geral, o ácido L(+)láctico pode ser produzido por variedades selecionadas de fungos filamentosos em cultivos de superfície ou submersa, sendo este de acordo com Ward, Lockwood, Tabenkin e Wells o de melhor rendimento. O ácido láctico tem sido produzido atualmente por ação de muitos fungos filamentosos como: *R. arrhizus*, *R. chinensis*, *R. oryzae*, *R. stolonifer* e certos tipos de *Mucor*. O fungo *Rhizopus oryzae* é também capaz de produzir ácido láctico a partir de meios contendo glucose (ATKINSON & MAVITUNA, 1991; PRESCOTT & DUNN, 1962).

Industrialmente o ácido láctico é produzido com rendimento prático de 90 a 95%, por fermentação submersa ou no estado sólido, sendo o período de fermentação de 3 a 4 dias. O volume de microrganismos inoculados é da ordem de 0,5 a 2,5 %, sendo usados principalmente bactérias homoláticas, ou seja, que produzem somente células e ácido láctico em quantidades significativas. São utilizados principalmente *Lactobacillus delbrueckii*, *L. leichmannii* e *L. bulgaricus*, isolados ou associados, fermentando produtos como amido de milho, batata ou arroz; trigo, cana-de-açúcar, açúcar de beterraba, etc. A fermentação é feita na presença de carbonato de cálcio, cuja função é neutralizar continuamente o ácido produzido. Para fermentar leite ou soro de leite, são usadas as espécies *L. casei* e *L. bulgaricus*, além do *Streptococcus lactis*. O ácido láctico é o produto final da glicólise, formando dois moles do ácido por mol de glucose fermentada pela via glicolítica. Na fermentação heterolática um mol de ácido láctico, de etanol e de gás carbônico são os produtos finais da fermentação (ATKINSON & MAVITUNA, 1991; KIRK & OTHMER, 1978).

Um substrato possível para a síntese de ácido láctico por processos fermentativos é o licor de sulfito. Entretanto para melhores resultados, o resíduo antes da fermentação deve passar por um processo de lavagem com vapor para remoção do dióxido de enxôfre, e tratado com álcali para remover lignina (ATKINSON & MAVITUNA, 1991).

A fermentação de substratos açucarados por *Rhizopus oryzae* é um caso particular. Em condições aeróbias produz ácido láctico e gás carbônico, pela via glicolítica, enquanto que em condições anaeróbias produz ácido láctico, etanol e gás carbônico, a partir do piruvato. Estes produtos são obtidos também na fermentação heterolática com *Leuconostoc* (SCRIBAN, 1984).

Hang (1989), estudou a produção de ácido L(+)láctico por *Rhizopus oryzae* NRRL 395, a partir da sacarificação e fermentação simultâneas e direta de milho. Os resultados mostraram uma produção de até 390 g de ácido L (+) láctico por quilo de milho fermentado, com um conteúdo inicial de 818g de glucose por quilo de milho. O fator de conversão substrato produto foi maior que 44 %, com um residual de açúcar médio de 17 g por quilo de milho.

YU & HANG (1989), estudaram a cinética de fermentação de cevada, mandioca, milho, aveia e arroz, com vistas à produção de ácido L(+)lático por *Rhizopus oryzae*, e concluíram que a produção do ácido é fortemente influenciada pelo tipo de substrato usado, sua concentração, pela temperatura de fermentação e pela presença de agente neutralizante. Os maiores rendimentos de produção de ácido L(+)lático, cerca de 400 g por quilo de substrato, foram conseguidos com arroz e milho. Rendimentos médios, cerca de 250 g por quilo de substrato, foram conseguidos por fermentação de cevada e mandioca, e a fermentação com aveia forneceu o menor rendimento de ácido L(+)lático, cerca de 100 g por quilo de substrato. A temperatura ideal de fermentação foi de 30° C.

Os trabalhos de HANG & YU (1989) mostraram as vantagens da sacarificação e fermentação simultâneas de resíduos de agricultura, pelo fungo *Rhizopus oryzae* NRRL 395. Assim, estes resíduos não necessitam de pré-tratamento com ácido ou com enzimas par hidrolisar o amido a glucose, etapa esta necessária para processos como a produção de etanol por levedura e a produção de ácido lático racêmico por bactérias lácticas.

KITPREECHAVANICH *et alii* (1997), estudaram o enriquecimento protéico e o aumento do teor de vitamina B12 de farinha de milho por fermentação no estado sólido, utilizando uma co-cultura de *Rhizopus oryzae* e de *Propionibacterium shermanii*. Neste processo, o *Rhizopus oryzae* produz ácido L-lático, a partir do amido de milho enquanto a *Propionibacterium shermanii*, utiliza o ácido L-lático produzindo a vitamina B12; assim o substrato proteicamente enriquecido pelo micélio do fungo, tem também aumentado o seu teor vitamínico. Depois de 7 dias de fermentação o teor de vitamina B12 aumentou de 3,69 mg/100g para 64,5 mg/100 g, e o teor de proteínas passou de 9,03 g/100 g para 19,64 g/100 g. Neste estudo foi também confirmada a importância da adição do CaCO₃ ao meio de fermentação para a produção da vitamina B12. A produção de ácido lático também foi menor em meio sem a adição de CaCO₃.

Ácido lático foi também produzido a partir de batatas por um processo em dois estágios, envolvendo também uma co-cultura de *Rhizopus nigricans* e de *Lactobacillus delbrueckii*. O processo envolve a hidrólise enzimática do amido de batata pela amiloglicosidase do *Rhizopus*, e a fermentação láctica usando o *Lactobacillus*. A máxima conversão de amido de batata em glucose foi de 55 %, e o maior rendimento de produção

de ácido láctico foi de 42 %, com base no peso de glucose após a sacarificação do amido de batata (KHAN *et alii*, 1995).

O uso alternativo de resíduos do processamento de cenouras, foi também estudado como fonte de carboidrato para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, e de ácido L (+) láctico por *Rhizopus oryzae*. Com base no açúcar fermentescível consumido a partir dos resíduos de processamento de cenoura, o rendimento de ácido cítrico foi de 36 %, e o de ácido L (+) láctico foi de 55 % (GANG & HANG, 1995).

A produção de ácido L (+) láctico por *Rhizopus oryzae* NRRL 395, foi também estudada por fermentação submersa usando-se xilose como fonte de carbono (YANG *et alii*, 1995). Neste estudo o fungo esteve auto-imobilizado em “pellets” com um tamanho aproximado de 1 mm. Estes “pellets” foram repetidamente usados para inoculação de um meio novo cada vez que se chegava à exaustão do meio por um período de 22 dias.

SUNTORNUSUK & HANG (1994), realizaram um melhoramento genético da variedade de *Rhizopus oryzae* NRRL 395, com vistas à produção de ácido L (+) láctico e de glucoamilase. 38 mutantes foram produzidos por exposição à radiação UV e/ou por exposição à N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Após, selecionaram 3 mutantes, por seu rendimento significativamente maior de L (+) láctico em meio à base de arroz, mas apenas um mutante produziu mais glucoamilase quando comparado com a cepa inicial.

Por fermentação em meio sólido dezenove cepas de *Rhizopus* foram testadas pela sua capacidade de crescer em amido de mandioca crua e por sua habilidade de produzir amilase. Somente três cepas cresceram significativamente neste substrato natural, aumentando o teor protéico do substrato de 1,75 % para 11,3 %. Nesta fermentação foram detectados também o ácido fumárico, o ácido láctico e o etanol, produzidos como metabólitos alternativos (SOCCOL *et alii*, 1994c).

Utilizando a cepa de *Rhizopus oryzae* NRRL 395, SOCCOL *et alii* (1994a) estudaram a fermentação em meio sólido de bagaço de cana impregnado com uma solução nutritiva à base de glucose e CaCO₃, fazendo também um estudo comparativo entre a fermentação submersa e a cultura em meio sólido. A concentração ótima de glucose em

meio líquido foi de 120 g/L, produzindo 93,8 g/L de ácido L (+) láctico, e em meio sólido a concentração ótima de glucose foi de 180 g/L com uma produção correspondente a 137,0 g/L de ácido láctico.

HAMAMCI & RYU (1994) imobilizaram células de *Rhizopus oryzae* em alginato de cálcio para a produção de ácido L (+) láctico em reator batelada de leito fluidizado. Iniciando com uma concentração inicial de glucose de 150 g/L, foi possível produzir 73 g/L de ácido L (+) láctico em fermentação de 44,5 horas. O rendimento foi de 64,8 % com base no peso de glucose consumida.

HANG *et alii* (1989), estudaram a produção de ácido L (+) láctico por células de *Rhizopus oryzae* em cultura submersa imobilizadas em gel de alginato de cálcio, chegando a uma produção de 62 g/L de ácido L (+) láctico em frascos erlemmeyer de 500 mL, preenchidos com 100 mL de meio de cultura com 13 % de glucose, fonte de nitrogênio, fósforo, magnésio e 5 % de CaCO₃. O tempo de reação em batelada foi de 24 horas, e o rendimento foi maior que 72 % com base na glucose consumida.

Quitosana foi produzida com sucesso como produto de valor secundário por micélio de *Rhizopus oryzae* que foi previamente usado para fazer ácido L (+) láctico. Os maiores valores de quitosana produzidas foram da ordem de 700 mg/L (HANG, 1990).

2.5.3. Síntese

O ácido láctico é sintetizado a partir do lactonitrilo (CH₃CHOHCN), subproduto na síntese do acrilonitrilo. O lactonitrilo é sintetizado a partir da reação do acetaldeído com cianeto de hidrogênio e após é hidrolisado a ácido láctico em presença de ácido clorídrico. O ácido sintético tem excelente estabilidade térmica (KIRK & OTHMER, 1978).

2.6. Substratos Utilizados

Materiais lignocelulósicos, como madeira, resíduos agrícolas e de processamento de alimentos, devido à sua composição básica, podem ser utilizados em processos de

produção de energia e na biossíntese de insumos químicos (SILVA, 1995; SOCCOL, 1992). Entretanto devido às suas características morfológicas, existe uma dificuldade em converter estes materiais lignocelulósicos em insumos químicos

Madeira e produtos secundários da agricultura, são os substratos ideais para a produção de energia e de insumos químicos pois sendo formados por processos fotossintéticos são virtualmente inesgotáveis. Estes produtos são formados por três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina, todas em estruturas poliméricas. A celulose e a hemicelulose são encontradas nas paredes das células vegetais. Na estrutura da madeira, a celulose está associada com uma matriz amorfa de hemicelulose e lignina, as quais são heteropolissacarídeos amplamente variados tanto em composição quanto em estrutura. Em suma, microfibrilas de celulose cristalina são cercadas por hemicelulose amorfa, e este todo é embebido numa matriz de lignina. Esta matriz age como uma barreira natural ao ataque de microrganismos ou suas enzimas, e torna este material estruturalmente rígido e pouco reativo (MISHRA & SINGH, 1993; FENGEL & WEGENER, 1989).

Fibras de algodão são praticamente celulose pura, mas de modo geral na natureza, a celulose é encontrada formando as células vegetais de plantas superiores, em associação com hemicelulose e lignina. Independente da fonte, a celulose é sempre quimicamente a mesma, mesmo que a natureza e o arranjo das microfibrilas sejam diferentes (KOLMANN & CÔTÉ, 1984).

A celulose é um polissacarídeo amplamente encontrado na natureza pois está presente como constituinte da parede celular de plantas superiores e de seres inferiores como algas e bactérias. É um polímero linear de moléculas de β -D-glucose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1-4), formando o (1-4) β -D-glucoglicano, consistindo de resíduos de β -D-glucopiranoose ligadas em cadeia produzidas por condensação, ou seja eliminação de uma molécula de água, proveniente das hidroxilas dos carbonos 1 e 4 de duas unidades de D-glucose. A unidade estrutural da celulose é portanto a celobiose, como mostrada na figura 3. (KOLLMANN & CÔTÉ, 1984; FENGEL & WEGENER, 1989).

A massa molecular da celulose varia entre 5×10^4 e $2,5 \times 10^6$ g/mol, dependendo do seu grau de polimerização, ou seja, número médio de unidades de glucose presentes na

Revisão Bibliográfica

molécula e da sua origem. Devido a sua linearidade, as moléculas justapostas, se estruturam em microfibrilas com diâmetro médio de 1 a 30 nm, que formam uma rede de agregados com comprimento e largura variados, insolúveis em água. Ligações do tipo pontes de hidrogênio formadas entre e inter moléculas são responsáveis pela estabilidade das regiões cristalinas, e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise por ácidos, álcali ou enzimas (SILVA, 1995).

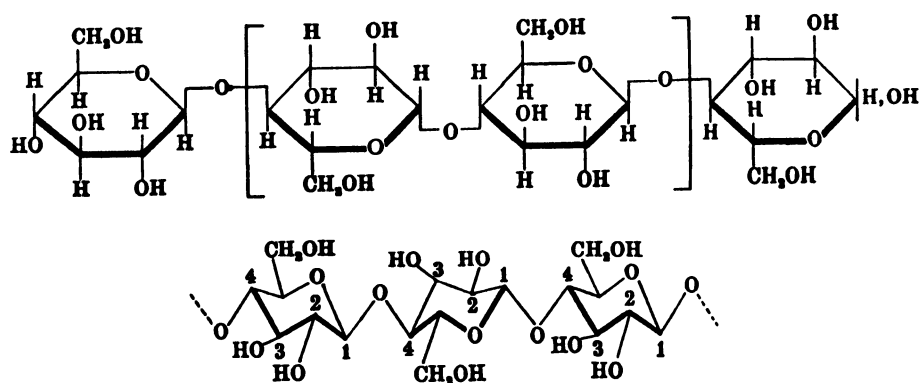


FIGURA 3: Fórmula estrutural da celulose. Unidades de celobiose

FONTE: KOLLMANN & CÔTÉ, 1984.

A hemicelulose é um polímero não celulósico, e mostra de acordo com a procedência, uma variedade tanto estrutural como de composição. A sua natureza química varia com a planta, com o tecido, com a espécie, caracterizando o tipo de madeira. São polioses, de peso molecular relativamente baixo, compostas basicamente por açúcares neutros polimerizados (pentoses, hexoses, desoxi-hexoses), D-xylose, D-manose, D-glucose, D-galactose, L-arabinose, ácido 4-O-metil-D-glucurônico. Em menores proporções encontra-se ácido D-glucurônico, ácido urônico, L-ramnose, L-fucose, vários açúcares neutros metilados, além de grupos acetílicos, todos presentes como seus respectivos polímeros de condensação, tais como, xilanas, arabanos, glucanas, galactanas e mananas. Estas estruturas mostradas na figura 4, formam uma cadeia principal que pode ser um homopolímero, como no caso das xilanas, ou um heteropolímero, como no caso das glucomananas, com algumas unidades em ramificações laterais como arabinose, galactose ou grupos acetil (KOLLMANN & CÔTÉ, 1984; FENGEL & WEGENER, 1989).

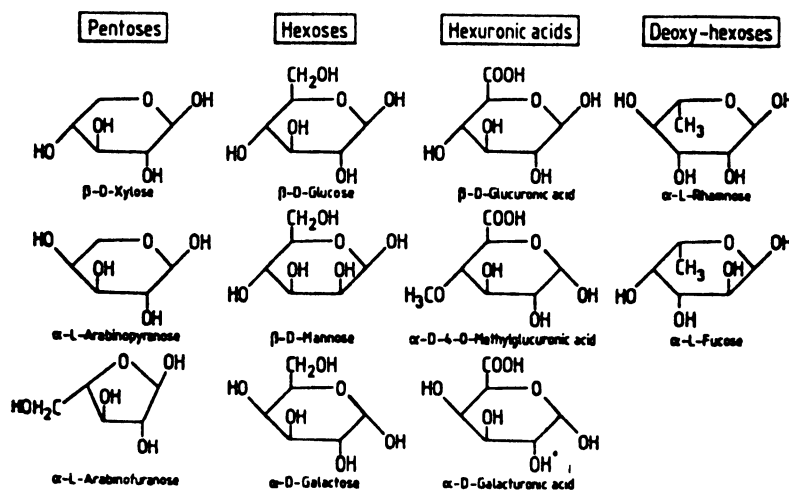


FIGURA 4: Açúcares presentes nas hemicelulosas

FONTE: FENGEL & WEGENER, 1989.

As polioses são denominadas de acordo com os açúcares predominantes na cadeia principal do polímero. Assim tem-se as xilanas, mananas, glucanas, galactanas, etc. As xilanas são homopolímeros formados por moléculas de xilose, unidas através de ligações β -(1-4). Nas madeiras duras as xilanas contém em intervalos regulares o ácido 4-O-metilglucurônico unido à cadeia de xilose por uma ligação α -(1-2), enquanto as xilanas de madeiras moles são caracterizadas pela presença de arabinofuranoses, ligadas à cadeia principal por ligações α -(1-3) (SILVA, 1995).

Assim, após a hidrólise de madeiras, por processos químicos ou termo-químicos, os açúcares mais comuns presentes nos hidrolisados hemicelulosicos são D-xilose, D-glucose, D-manose, L-arabinose, D-galactose, e ocasionalmente outros açúcares, dependendo do tipo de madeira usada.

O terceiro componente da estrutura da madeira é a lignina, responsável pela resistência mecânica das plantas. É o polímero mais abundante na natureza. É típica de tecidos de plantas superiores, e está presente na estrutura celular da madeira em quantidades que variam de 20 a 40 %. A estrutura química da lignina é bastante complexa e ainda não totalmente conhecida. A lignificação da parede celular das plantas é um processo controlado individualmente para cada célula, sendo a lignina, o último polímero a ser depositado na parede celular. As interações entre a lignina, a celulose e as polioses,

determinam a estrutura da parede celular dos materiais lignocelulósicos (FENGEL & WEGENER, 1989).

A lignina é um polímero tri-dimensional, composto por unidades de fenil-propano unidas por ligações C-O-C e C-C. Em madeiras moles, cada unidade tem um oxigênio fenólico e um grupo metoxílico (II), enquanto em madeiras duras cerca de metade das unidades contém um grupo metoxílico adicional (III), conforme mostrado na figura 5.

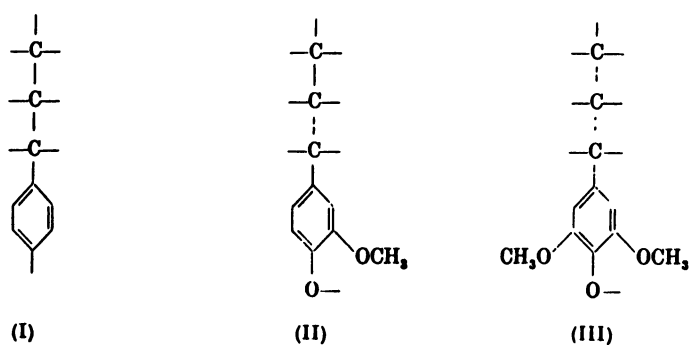


FIGURA 5: Estruturas presentes na lignina de madeiras duras e moles.

FONTE: KOLLMANN & CÔTÉ, 1984.

Estes componentes, associados em proporções altamente diferenciadas, formam as várias lamelas da parede da célula vegetal, que são subdivididas em primária, secundária e terciária (Figura 6). Entre as células existe ainda uma camada fina, a lamela média; nas madeiras maduras, a lamela média está quase que totalmente lignificada, e é responsável pela integridade estrutural do tecido vegetal (FENGEL & WEGENER, 1989).

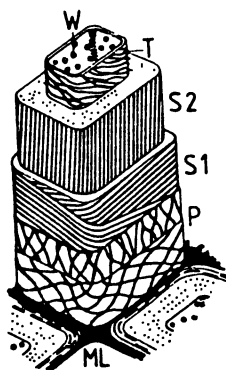


FIGURA 6: Modelo da estrutura da parede celular de traquéias de madeiras moles.

ML: lamela média, P: parede primária, S1 e S2: parede secundária, T: parede terciária e W: camada de verrugas. (FENGEL & WEGENER, 1989).

Revisão Bibliográfica

2.6.1 *Pinus taeda*

O *P. taeda* é uma gimnosperma da classe das coníferas, que se reproduz por meio de células sexuais formadas em estruturas especiais em forma de cone. Em geral são árvores altas e sua madeira é de grande importância econômica, tanto na indústria de construção, quanto na de móveis e na papelreira. Imensas florestas naturais de coníferas se estendem nas regiões mais frias do planeta, e quase não existem nas regiões mais quentes, sendo portanto características de climas frios (LORENZI, 1992).

O *P. taeda* é uma das principais espécies plantadas no sul do país, sendo objetivo de extensas áreas de reflorestamento, visando um aproveitamento industrial principalmente para a produção de papel e celulose. A política brasileira de incentivos fiscais para o reflorestamento, entre os anos de 1966 e 1987, permitiu a implantação de cerca de 1,8 milhões de hectares com espécies de *Pinus*, principalmente nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, cuja finalidade principal era de abastecer o setor papelreiro; entretanto, como as reservas florestais nativas foram se esgotando, ou incluídas em áreas de reservas florestais, aumentou a demanda de *Pinus* também para a produção de madeira serrada e de lâminas, para uso na construção civil e na indústria de móveis (OLIVEIRA, 1995).

BARRICHELO & BRITO (1978), estudando reflorestamentos de coníferas na região sul, observaram que como função das técnicas de plantio e manejo utilizados, o desbaste era necessário entre idades de povoamentos que variavam de 7 a 9 anos de idade, e a madeira, de modo geral, apresentava baixa densidade, fibras curtas, baixo teor de celulose, altos teores de lignina e de extrativos. A composição química média da madeira foi verificada e os resultados estão expressos na tabela 5.

TABELA 5: Composição química média do lenho, em %.

<i>Pinus taeda</i>	
Teores de holocelulose	71,9
Lignina	29,6
Pentosanas	10,8
Cinzas	0,3
Solubilidade em: água quente	4,2
Álcool-benzeno	2,0

FONTE: BARRICHELO & BRITO, 1978.

As hemiceluloses de madeiras moles são na sua maioria formadas por xilanas e glucomananas (FENGEL & WEGENER, 1989). Em geral xilanas de madeiras moles, como é o caso do *Pinus*, diferem das xilanas de madeiras duras pela ausência de grupos acetílicos e pela presença de unidades de arabinofuranose ligadas à cadeia principal de xilose por ligações glicosídicas do tipo α/β -(1-3). Na maioria das xilanas de madeira mole estudadas, a razão xilose:ácido metil glucurônico é de 5 a 6:1. A razão xilose:arabinose varia na faixa de 6 a 10:1. Assim estes polímeros são denominados de arabino-4-O-metilglucuronoxilanas (FENGEL & WEGENER, 1989).

As madeiras moles contêm ainda aproximadamente 20 a 25 % de mananas consistindo de uma cadeia de glucomananas na qual estão ligados grupos acetílicos e unidades de galactose. Assim estes polímeros são denominados de O-acetilgalactoglucomananas (FENGEL & WEGENER, 1989).

2.6.2 *Eucalyptus viminalis*

O eucalipto é uma folhosa que abrange um grande número de espécies e variedades originárias da Austrália, onde constitui a maior parte da riqueza florestal do continente (FERREIRA, 1982). Atingem proporções gigantescas, mas algumas espécies são de porte médio. Os eucaliptos toleram uma grande variedade de climas. O *E. viminalis* é susceptível à deficiência hídrica e apresenta boa capacidade de brotamento a partir de touças e é tolerante a geadas, sendo portanto uma das espécies vegetais mais importantes

para o planalto sul dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, cujas altitudes são superiores a 600 m, onde predominam climas frios (HIGA & CARVALHO, 1990). Ainda segundo estudos de HIGA & CARVALHO (1990), fica evidente o crescente interesse por espécies de eucalipto na região sul do Brasil, provavelmente devido a falta de madeira para lenha e até mesmo para fábricas de papel e celulose, e concluíram que o *E. viminalis* é uma espécie altamente adequada para plantio na região.

O *E. viminalis* é uma árvore que apresenta grande poder calorífico por unidade de volume, é propícia para lenha, e a madeira tem alta densidade, desejável para obtenção de polpa com alto rendimento destinada à produção de papel não branqueado (MATHESON *et alii*, 1986; STURION, 1993; CARPES, 1997).

STURION (1993), estudando as características de crescimento e qualidade da madeira de *E. viminalis*, determinou que o seu teor de holocelulose (celulose + hemicelulose), extrativos e lignina em espécimes com 3,5 anos de idade são de 74,43 %, 3,13 % e 25,42 % respectivamente. RAMOS (1992), estudando o pré-tratamento a vapor de cavacos de *E. viminalis*, determinou que os teores de celulose, xilana, lignina total e extrativos nesta espécie, aos 6 anos de idade, correspondem aos valores de 41,7 %, 14,1 %, 31 % e 2,1 % respectivamente.

Os extrativos presentes na madeira, devido à sua natureza química e física, distribuição e concentração podem afetar acentuadamente suas propriedades e, por conseguinte o seu uso final. Estes extrativos incluem sais de cálcio, sílica, gomas, resinas, gorduras, ceras, óleos, taninos, amidos, alcalóides e materiais de coloração, que aumentam o consumo de reagentes químicos, diminuem o rendimento e dificultam o processo de branqueamento da celulose (DAVIDSON, 1972; FOELKEL & BARRICHELO, 1975).

Devido ao alto poder de regeneração, crescimento rápido e facilidade ao pré-tratamento a vapor, o eucalipto tem despertado grande interesse para usos industriais. Este aumento é verificado na utilização de *Eucalyptus ssp* na indústria de papel e celulose para a produção de polpa e papel, leva à geração de resíduos passíveis de serem aplicados em processos de bioconversão, principalmente no hemisfério sul (RAMOS, *et alii*, 1992a).

2.6.3 *Mimosa scabrella*

A *M. scabrella* é uma angiosperma da classe das Dicotiledôneas, família das Leguminosae, sub-família das Mimosoídea, popularmente conhecida como bracatinga. Esta árvore possui um rápido crescimento, ótima capacidade de regeneração natural, apresentando flores a partir dos 8 meses de idade, em árvores de 3 m de altura (LORENZI, 1992; INOUE *et alii*, 1984).

A *M. scabrella* ocorre em abundância no Brasil, principalmente nos planaltos do Paraná e Santa Catarina, e é uma das espécies mais promissoras para a implantação de florestas energéticas, devido ao alto poder calorífico de sua madeira e ao seu rápido crescimento (SOARES & HOSOKAWA, 1984).

Várias pesquisas têm sido feitas com o objetivo de determinar os polissacarídeos do caule da bracatinga. Estudos de REICHER (1984) com o caule e GANTER *et alii* (1991) com as sementes, concluíram que a xilana da *M. scabrella* contém grupos O-acetil como substituintes nos carbonos 2, carbonos 3 e em carbonos 2-3, das unidades de D-xilopiranoses, em proporções de 14, 16 e 5 % respectivamente. Estes grupos encontram-se distribuídos ao longo da cadeia polimérica da xilana em blocos de duas ou três unidades substituídas, ao lado de uma ou duas não substituídas na madeira do caule, enquanto nas sementes a composição química e estrutural dos polissacarídeos predominam galactomananas.

As galactomananas de semente de bracatinga apresentam como estrutura genérica uma cadeia principal de unidades de β -D-manopirranose unidas por ligações glicosídicas do tipo (1-4), com uma relação manose-galactose de 1,1-1 (GANTER, 1991).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

O estudo foi feito, empregando-se as seguintes cepas de *Rhizopus* disponíveis no laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná. Estas cepas são provenientes de bancos de cultura internacionais, tais como: NRRL (Northern Regional Research Laboratory), U.S. Department of Agriculture, Illinois, USA.; MUCL (Mycothèque de Université Catholique de Louvain) Bélgica; ATCC (American Type Culture Collection), Maryland, USA.

Rhizopus circicans NRRL 1475

Rhizopus arrhizus MUCL 16179

Rhizopus arrhizus MUCL 28425

Rhizopus arrhizus NRRL 2582

Rhizopus delemar ATCC 34612

Rhizopus formosa MUCL 28422

Rhizopus oligosporos NRRL 3267

Rhizopus sp NRRL 25975

Rhizopus oryzae MUCL 28627

Rhizopus oryzae MUCL 28268

Rhizopus oryzae NRRL 395

3.2. Conservação das Cepas

As cepas de *Rhizopus* utilizadas neste estudo foram conservadas em tubos inclinados com potato dextrose agar (PDA) DIFCO. Após a diluição do meio em água destilada, o pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1 N. O meio foi distribuído em tubos à razão de 10 mL por tubo, fechados com algodão e autoclavados a 121°C, durante 15 minutos. Após a esterilização os tubos contendo PDA foram colocados em posição inclinada para solidificação do meio. Os tubos após a inoculação foram incubados por 10 dias em estufa a 32°C e posteriormente conservados em geladeira.

3.3 Preparação das Suspensões de Esporos

Para o preparo das suspensões de esporos, cada cepa testada foi inoculada em placas de petry contendo meio agar-mandioca, ou seja meio geleificado à base de farinha de mandioca. Após inoculadas, as placas de petry foram incubadas em estufa a 32°C. Neste meio ocorre a germinação dos esporos repicados, a formação do micélio, e a seguir a produção de novos esporos.

As suspensões de esporos utilizadas foram obtidas por coleta dos esporos depois de 10 dias de incubação após a repicagem de cada cepa em placas de petry com meio agar-mandioca. Os esporos foram coletados com alça de platina em câmara de fluxo laminar, depositados em balão com água destilada estéril e gotas de tween 80, também estéril, e após conservados em geladeira. As suspensões obtidas continham cerca de 10^8 esporos por ml. As suspensões de esporos com mais de 30 dias eram esterilizadas e descartadas. Os procedimentos de conservação de cepas e preparo das suspensões de esporos estão mostrados esquematicamente na figura 7.

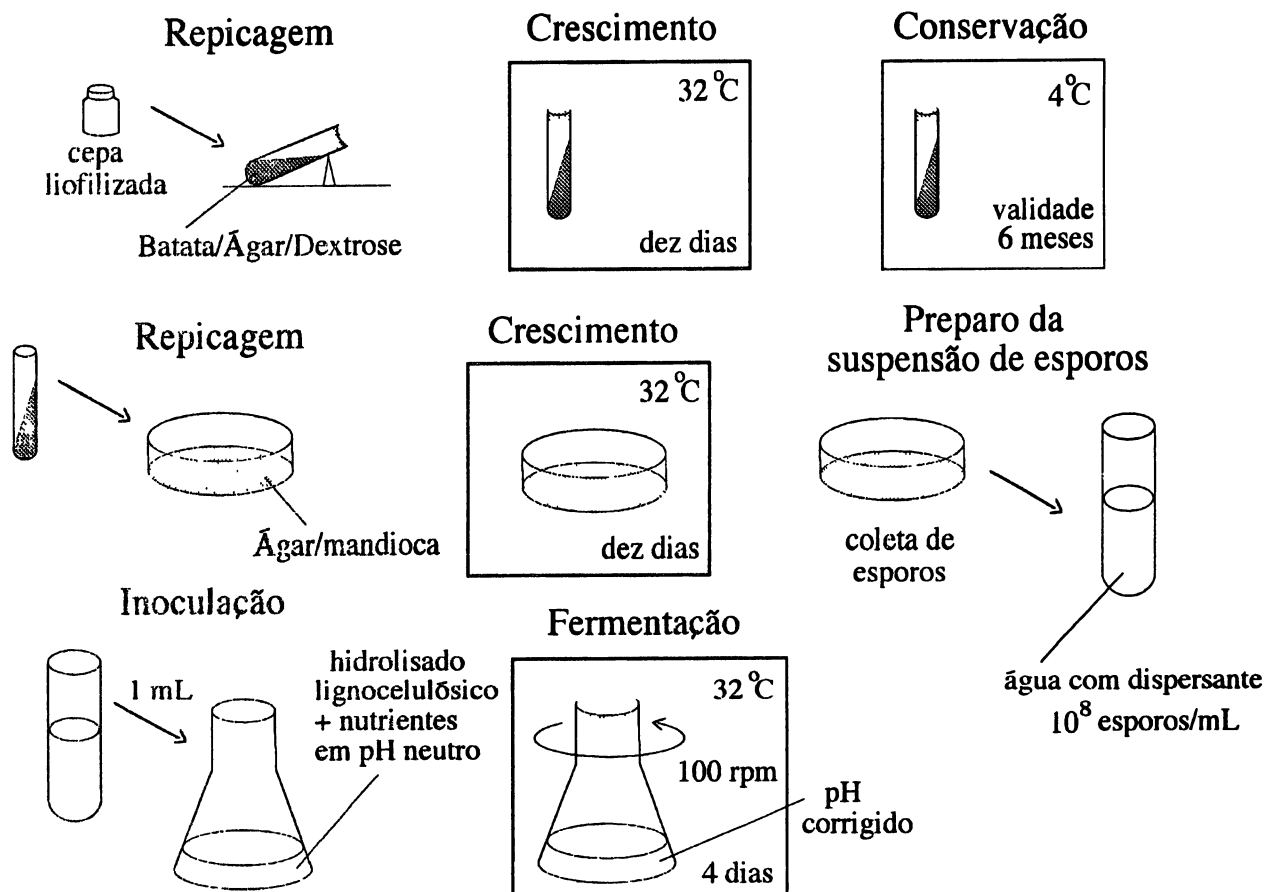


FIGURA 7: Conservação das cepas, preparo das suspensões de esporos e inoculação.

3.4. Substrato

Os substratos utilizados para a fermentação foram os hidrolisados hemicelulósicos de três tipos de madeira: *Pinus taeda*, *Eucalyptus viminalis* e *Mimosa scabrella* (figura 8), obtidos no processo de explosão a vapor.



FIGURA 8: Madeiras usadas na preparação dos substratos de fermentação

Para a preparação do substrato (figura 9), cavacos dos três tipos de madeira, previamente impregnados em solução diluída de ácido sulfúrico (0,05 M) por 2 horas, foram submetidos ao tratamento com vapor a alta pressão e temperatura de 205°C, por 5 minutos, em reator especialmente construído para o estudo do processo. (figura 10). Depois de submetido à este tratamento, o material foi liberado à pressão atmosférica, e direcionado para um ciclone, (figura 11) através de uma válvula de abertura rápida. A fase líquida condensada no processo, mais a água proveniente da lavagem da fração sólida, foram recolhidas, constituindo o substrato usado.

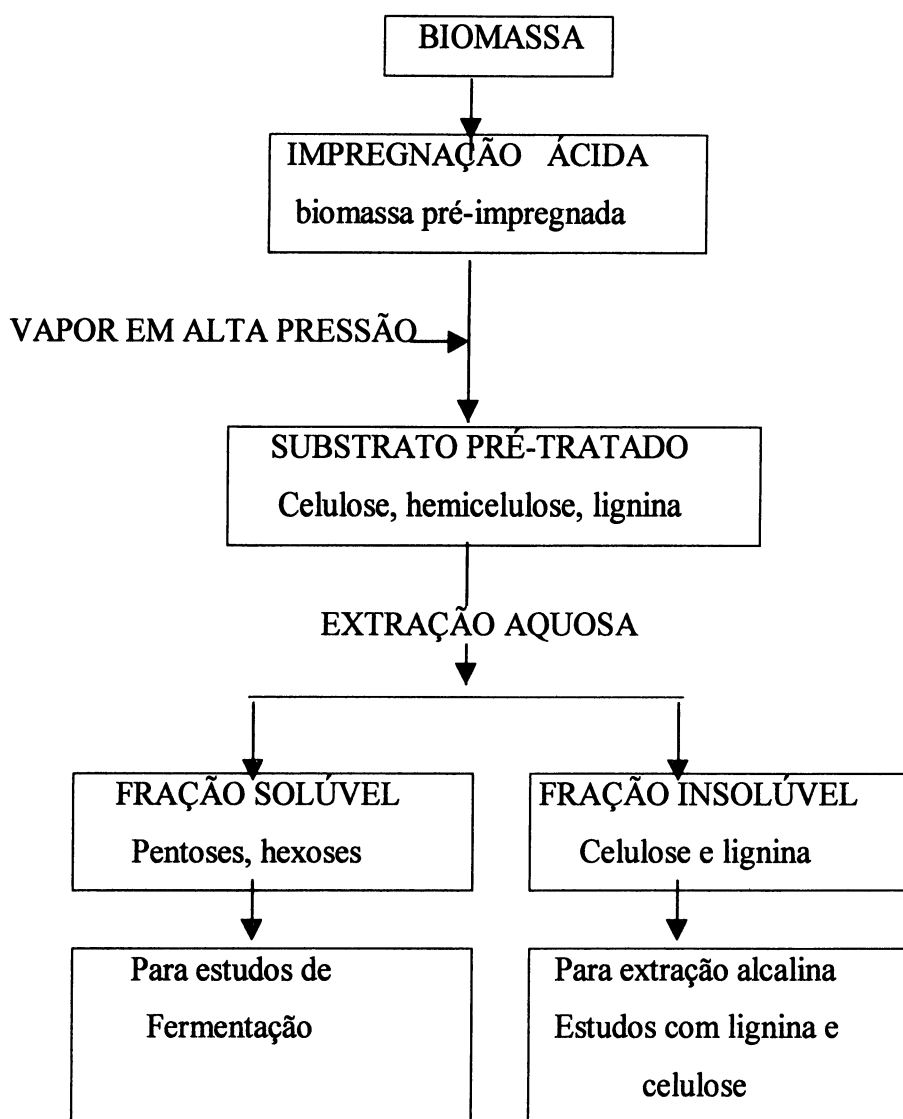


FIGURA 9: Preparação de substratos celulósicos, utilizando o método de explosão a vapor.

3.5 O Reator de Pré-tratamento por Explosão a Vapor

O reator (figura 10) tem corpo em aço inox 316, com capacidade de 5 L, dimensionado para altas pressões e opera por batelada. A carga é feita por uma tampa superior, que permanece hermeticamente fechada durante o processo. A injeção do vapor no vaso, pode ser feita lateralmente na base ou no topo do reator através de manobra de registro. A descarga é feita por intermédio de uma válvula de esfera de abertura rápida, com acionamento pneumático localizada na base do reator. Após a explosão, o material é

descarregado em ciclone de aço carbono (figura 11), acoplado à tubulação de descarga do reator.



FIGURA 10: Reator de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos por explosão a vapor.

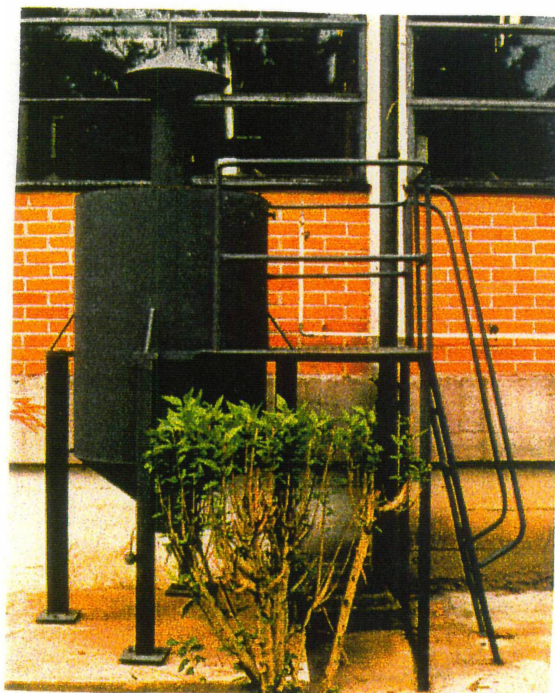


FIGURA 11: Ciclone de descarga do material após tratamento com vapor.

Resumindo-se, as várias madeiras foram submetidas às diversas condições de tratamento para produção dos hidrolisados conforme esquema mostrado na tabela 6.

TABELA 6: Condições físicas usadas no processo de explosão a vapor, para obtenção dos hidrolisados de madeira usados nas fermentações.

Madeira	Pré-Tratamento	Temperatura	Tempo
Pinus (<i>Pinus taeda</i>)	Impregnação ácida com H ₂ SO ₄ 0,05M	205°C	5 minutos
Bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i>)			
Eucalipto (<i>Eucalyptus viminalis</i>)			

3.6 Determinação da Composição dos Hidrolisados

3.6.1. Análises físico-químicas dos hidrolisados

As análises físico-químicas efetuadas no hidrolisado de *P. taeda* foram: pH, sólidos suspensos, cinzas, sólidos totais, açúcares totais e redutores, nitrogênio e fósforo. No hidrolisado de *E. viminalis* e de *M. scabrella* foram realizadas apenas análise de açúcares redutores.

3.6.1.1 pH

O pH foi medido com o auxílio de um potenciômetro (PROCYON - PHN - 4) devidamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

3.6.1.2 Nitrogênio

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método Kjeldhal (SÃO PAULO, 1985).

3.6.13 Açúcares redutores

Os açúcares redutores presentes no substrato foram determinados pelo método Somogyi-Nelson (NELSON, 1944 & SOMOGYI, 1945), fundamentado na ação da glucose reduzindo o reativo alcalino de óxido cuproso. Este em presença do reativo arseno-molibdato de sódio (reagente de Nelson), forma um complexo azul estável de óxido de molibdênio, o qual é medido por fotolorimetria em comprimento de onda de 535 nm

3.6.1.4 Açúcares totais

Os açúcares totais presentes no substrato foram determinados pelo método fenol-sulfúrico descrito na norma AOAC 920.44 (AOAC, 1990).

3.6.2 Composição do hidrolisado de *P. taeda*

Na tabela 7 estão os resultados obtidos nas análises realizadas com o hidrolisado de *P. taeda*, e na tabela 8 as condições de processamento usadas na sua obtenção.

TABELA 7: Composição aproximada do hidrolisado hemicelulósico de *Pinus taeda*, obtido em dois testes de processamento

Característica	Unidade	Teste 1	Teste 2
PH		2,5	2,6
Sólidos Suspensos	g/L	1,84	-
Cinzas	%	0,06	-
Sólidos Totais	g/L	2,04	-
Açúcares Redutores	g/L	13,89	25,14
Açúcares Totais	g/L	41,06	-

Não foi detectado nitrogênio ou fósforo nos hidrolisados.

TABELA 8: Parâmetros de processamento no processo de explosão a vapor para obtenção do hidrolisado de *P. taeda*.

Característica	Unidade	Experimento 1	Experimento 2
Peso de cavacos usado	g	3.997,8	4.534,3
Volume de água de lavagem	L	7,67	10,40
Temperatura do reator	°C	205	210

3.6.3 Teor de açúcares redutores nos hidrolisados de *E. viminalis* e de *M. scabrella*

Nos hidrolisados de *E. viminalis* e de *M. scabrella* foram realizadas análises de teor de açúcares redutores cujos resultados estão relacionados na tabela 9.

TABELA 9: Teor de açúcares redutores nos hidrolisados de *E. viminalis* e de *M. scabrella*.

Hidrolisado de	Unidade	Açúcar Redutor
<i>E. viminalis</i>	g/L	10,87
<i>M. scabrella</i>	g/L	6,18

3.7 Seleção de Cepas em Meio Simples

As cepas de *Rhizopus* disponíveis no laboratório foram inoculadas em meio geleificado à base de hidrolisado de *P. taeda*. O comportamento das cepas foi avaliado pelo crescimento radial nos meios testados.

3.7.1 Crescimento radial

As diferentes cepas de *Rhizopus* foram avaliadas através do crescimento radial utilizando-se o meio de cultura à base de hidrolisado de *P. taeda*. A preparação do meio foi feita com o hidrolisado obtido conforme item 3.4.

Ao hidrolisado contendo 13,9 g/L de açúcar redutor, foram adicionados 2,03 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o que corresponde à uma relação C/N de 14, 0,8 g/L de KH_2PO_4 e 15 g/L de agar. O pH do meio foi corrigido até 7,2 com uma solução 6 N de NaOH, e esterilizado em autoclave à 121°C por 15 minutos.

O meio foi distribuído em placas de petry estéreis de 85 mm de diâmetro à razão de 20 ml por placa. Após a geleificação do meio, no centro de cada placa foi colocada uma gota de suspensão de esporos de cada cepa de *Rhizopus*. As placas foram incubadas a 32°C e o diâmetro de cada colônia formada foi medido a cada 2 horas com o auxílio de um paquímetro, até que um dos raios do micélio formado por cada cepa atingisse a borda da placa de Petry. O experimento foi feito em duplicata, e os resultados expressam a media das duas medições para cada cepa avaliada.

3.8 As Fermentações

As fermentações foram feitas em agitador orbital marca Tecnal, modelo TE – 420, de fabricação nacional, com temperatura e agitação ajustáveis (figura 12).

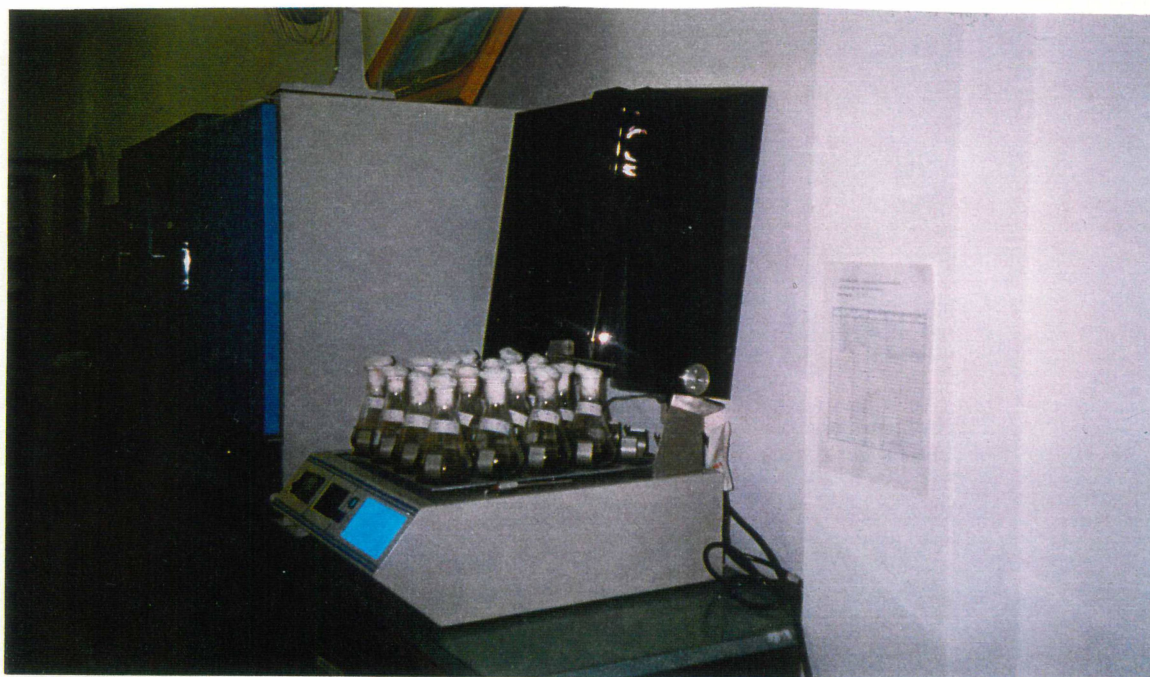


FIGURA 12: Agitador de movimento orbital usado nas fermentações

Os frascos de erlenmeyer com os substratos a serem testados, após inoculados, foram colocados em incubador-agitador de movimento orbital na temperatura e agitação ideais ao crescimento de fungo usado. A fermentação foi conduzida em duas fases:

Na primeira fase, de 48 horas, ocorrem a germinação dos esporos e a formação do micélio. As condições físicas desta etapa foram: temperatura 32°C e agitação de 100 rpm. Na segunda fase da fermentação, ocorre a formação de metabólitos, que são acumulados no interior da célula, ou secretados no meio de fermentação pelos microrganismos. Nesta fase, ou seja, após as primeiras 48 horas de fermentação, adicionou-se a cada erlenmeyer, 2 g de carbonato de cálcio previamente esterilizado à 121°C por 15 minutos, e ajustou-se a agitação do incubador-agitador para 200 rpm, na mesma temperatura por mais 72 horas, totalizando 96 horas de fermentação.

3.9 Análises no Fermentado

3.9.1 Açúcares redutores residuais

O perfil de açúcares redutores no substrato e os açúcares redutores residuais no fermentado foram também determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (figura 13).

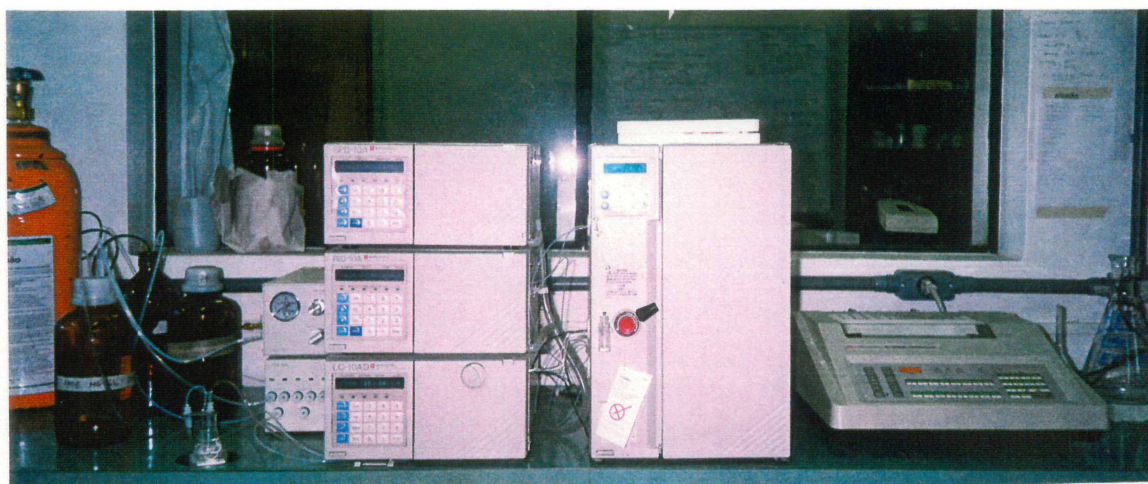


FIGURA 13: Cromatógrafo líquido Shimadzu

3.9.2 Metabólitos e biomassa produzidos

As amostras após as várias fermentações sofreram o seguinte tratamento para avaliação dos metabólitos produzidos, por cromatografia líquida de alta eficiência, bem como avaliação do crescimento do fungo no meio testado através da determinação da biomassa:

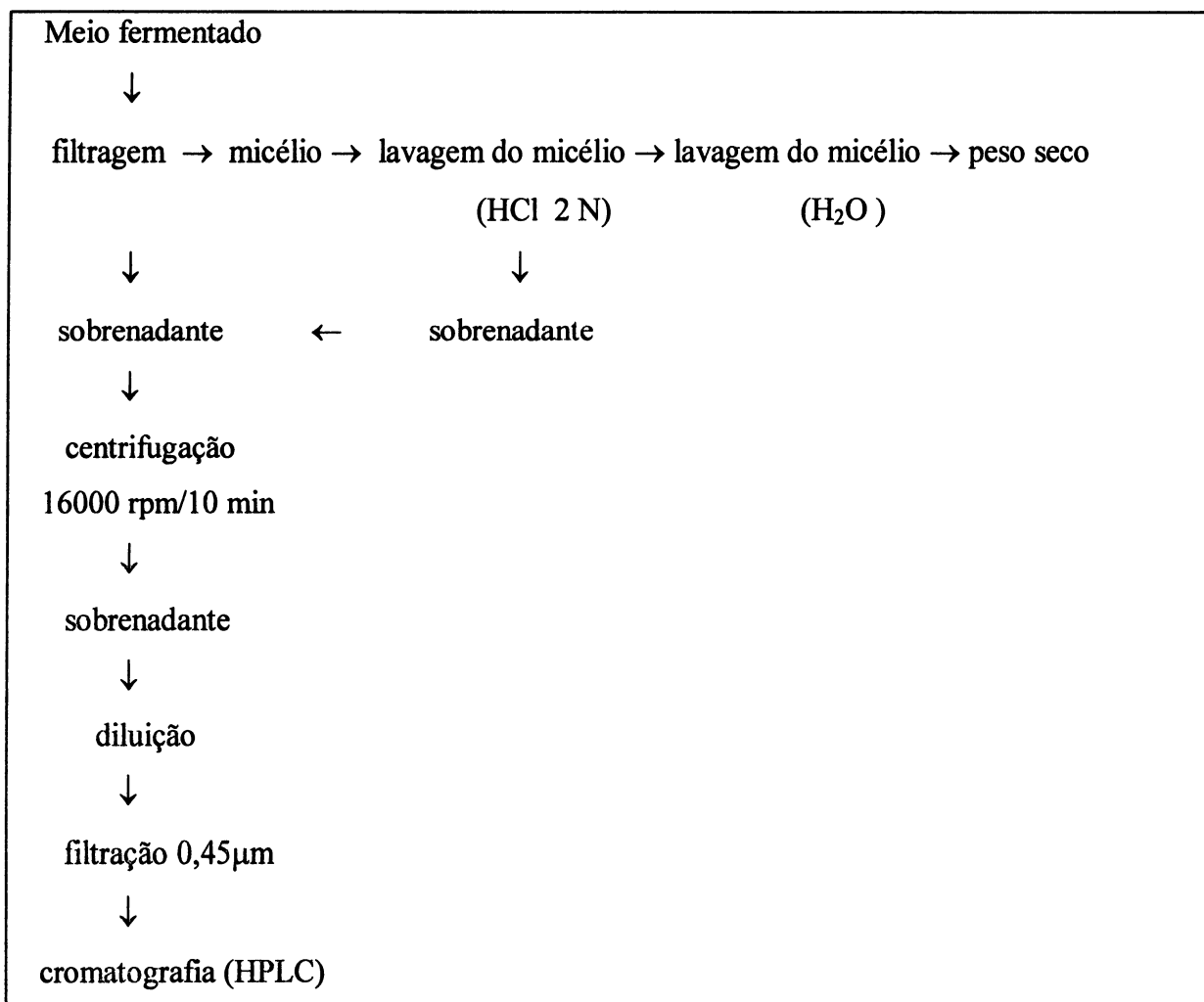


FIGURA 14: Processamento do material fermentado para análise.

3.9.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise foi realizada em cromatógrafo marca Shimadzu (figura 13), composto por uma bomba modelo LC-10AD de duplo pistão, um forno modelo CTO-10A, onde está alojada uma coluna cromatográfica Aminex IIPX 87 H, que separa os solutos por ação

combinada de uma interação hidrofóbica entre os radicais amina da fase estacionária da coluna com os radicais OH do soluto, e de um trocador de íons catiônico (H^+) com base em copolímero sulfonado de estireno e de divinil benzeno (TAN *et alii*, 1944). Na saída da coluna está instalado um detetor de índice de refração RID-10A, capaz de detectar açúcares, ácidos orgânicos e solventes como o etanol. Os sinais provenientes do detetor são registrados em registrador CR 6 A Chromatopac.

O cromatógrafo líquido de alta eficiência operou nas seguintes condições:

Temperatura da coluna:	60°C
Fase Move - Eluente:	H ₂ SO ₄
Concentração:	5 mM
Vazão da fase móvel:	0,6 mL/min
Pressão da bomba:	45 kg/cm ²
Volume injetado	20 µL

Nestas condições os tempos de retenção de cada componente pode ser expresso como mostrado na tabela 10.

TABELA 10: Tempos de Retenção de alguns metabólitos (padrões), monitorados em coluna cromatográfica, nas condições acima:

Componente	Tempo de Retenção (min)
Glucose	8,94
Xilose	9,58
Arabinose	10,43
Ácido Cítrico	7,89
Ácido Málico	9,55
Ácido Lático	12,54
Ácido Fumárico	13,38
Ácido Acético	14,77
Etanol	21,67

3.9.2.2 Determinação da biomassa fúngica

O crescimento do fungo foi estimado pelo peso seco da biomassa produzida após o término da fermentação. O micélio foi separado por filtração em funil de Büchner com papel de filtro qualitativo (WHATMAN) previamente seco e pesado. O micélio foi lavado com HCl 2N para eliminação do excesso de carbonato de cálcio e com água para eliminação do excesso de ácido. Na sequência o papel de filtro foi transferido para uma estufa para secagem por 24 horas a 105°C. O material foi esfriado em dessecador com sílica gel e pesado. A biomassa foi calculada por diferença de peso e expressa em g/L.

3.9.3 pH

O pH do hidrolisado de madeira, do substrato e do fermentado foram determinados logo após o término da fermentação, conforme item 3.6.1.1.

3.10 Fermentação com os Três Substratos

Nesta etapa do trabalho foram testados os hidrolisados preparados conforme o item 3.4, com os três tipos de madeira: *Pinus taeda*, *Eucalyptus viminalis* e de *Mimosa scabrella*, obtidos no processo de explosão a vapor. Como os hidrolisados obtidos diretamente no processo apresentavam concentração de açúcar redutor muito baixas, antes das fermentações, cada substrato obtido conforme descrito anteriormente foi concentrado em roto evaporador a vácuo, até atingir a concentração desejada para cada experimento, fixada inicialmente em 55 g/L.

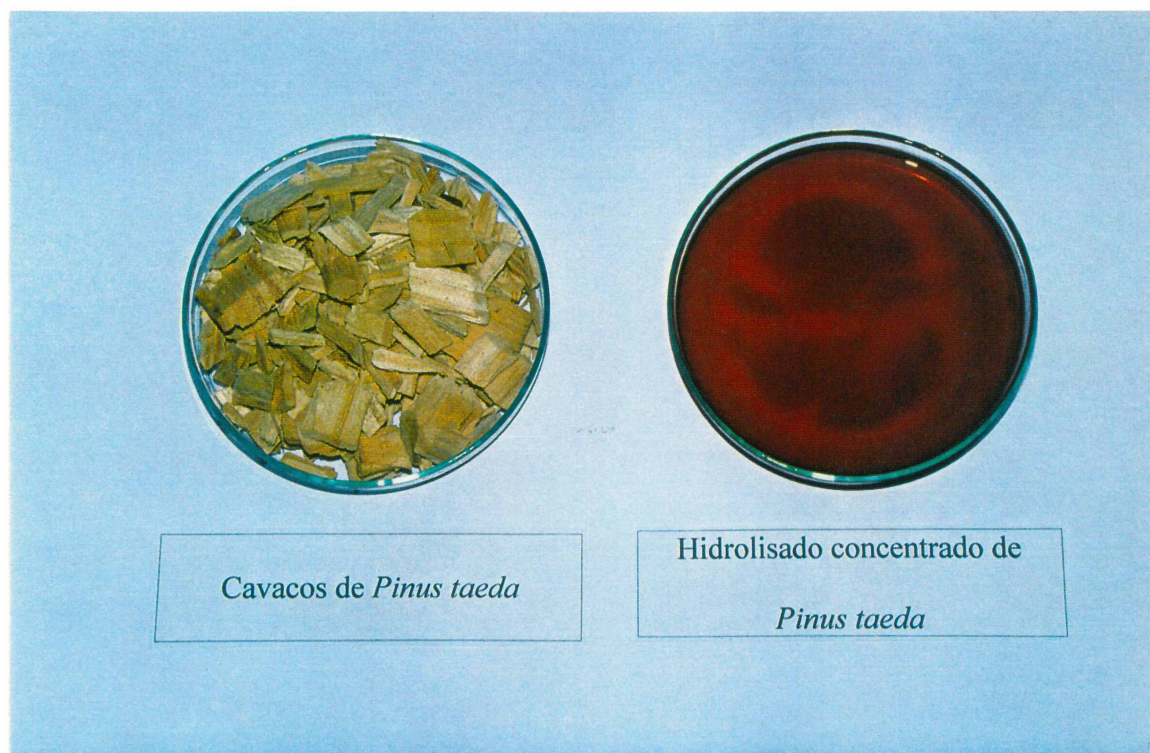
Ao meio de fermentação foram adicionados alguns sais para suprir nutrientes. A fonte de nitrogênio utilizada foi o sulfato de amônio, calculado para uma relação C/N de 14. A fonte de fósforo utilizada foi o fosfato diácido de potássio, além de microelementos (potássio, magnésio, zinco e ferro) necessários ao metabolismo microbiano.

Nas três primeiras fermentações realizadas, com os hidrolisados de *P. taeda*, *M. scabrella* e *E. viminalis*, o pH foi ajustado a 7,2 com solução 6 N de hidróxido de sódio. As características dos substratos usados estão na tabela 11.

TABELA 11: Características dos hidrolisados de madeira usados nos estudos iniciais.

	Hidrolisado de <i>Pinus taeda</i>	Hidrolisado de <i>Eucalyptus viminalis</i>	Hidrolisado de <i>Mimosa scabrella</i>
Açúcar Redutor (g/L)	56,55	56,50	57,50
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	7,37	7,44	7,60
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0,80	0,80	0,80
Mg SO ₄ (g/L)	0,30	0,30	0,30
ZnSO ₄ (g/L)	0,06	0,06	0,06
Fe ₂ (SO ₄) ₄ (g/L)	0,01	0,01	0,01

Distribuíu-se 50 ml dos vários substratos em erlenmeyers de 250 ml, que foram tampados com algodão. O material foi esterilizado a 121°C por 15 minutos, e inoculado com as suspensões de esporos das várias cepas de *Rhizopus* à uma taxa de 10⁷ esporos/ml do meio.

**FIGURA 15: Aspecto da madeira e do hidrolisado de *Pinus taeda*.**

3.11 Estudo Fisiológico da Cepa de *Rhizopus oryzae* 395

Foi realizada otimização das condições de cultura pelo planejamento experimental estatístico com análise de dados pelo programa “statistica”, com o objetivo de determinar as melhores condições físicas para a produção do metabólito escolhido, o ácido L(+)-lático.

A neutralização do hidrolisado de *P. taeda* (figura 15), foi feita com carbonato de cálcio, até pH 7,0. O meio foi então filtrado para remoção do precipitado formado. Após, o meio de fermentação com a composição a ser testada foi distribuído em erlenmeyers à proporção de 50 mL por frasco, esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e inoculado com a suspensão de esporos na proporção de 10^7 esporos por frasco.

3.11.1 Planificação experimental 1: Otimização dos parâmetros de cultura para a produção de ácido L-lático pela cepa *R. oryzae* 395.

Para otimizar a produção em meio líquido do ácido L(+)-lático, foi empregado um plano fatorial experimental fracionado 2^{5-1} , baseado na análise por superfície de resposta com 5 fatores experimentais. Os fatores avaliados foram: concentração de substrato, relação C/N, relação C/P, quantidade de carbonato de cálcio adicionado ao meio na segunda etapa de fermentação e nível de agitação, distribuídos em 2 níveis e um ponto central. O experimento foi feito em duplicata, totalizando 32 ensaios. Os valores reais e codificados dos fatores estão mostrados na tabela 12.

TABELA 12: Valores (real e codificado) das variáveis experimentais usadas no plano fatorial 1.

Termos codificados	-1	0	+1	
Fatores				Unidade
Concentr. Subst. (A)	82	97	112	g/L
Agitação (B)	180	205	230	rpm
CaCO ₃ adicionado (C)	1	2	3	g/frasco
Razão C/N (D)	38	47,5	57	g atom/g atom
Razão C/P (E)	135	407,5	680	g atom/g atom

As letras entre parêntesis referem-se à representação usada para indicar cada fator experimental na equação de regressão da superfície de resposta do experimento.

3.11.2 Planificação experimental 2: Otimização da relação C/N e da concentração de substrato utilizando a planificação experimental

No segundo estudo, foi utilizado um plano fatorial completo 3^2 para otimizar as condições de cultura para a melhor produção de ácido L-lático em meio líquido, testando-se dois fatores experimentais, distribuídos em três níveis. Os fatores experimentais testados foram: concentração de substrato e relação C/N, e a análise baseada em superfície de resposta. Os valores reais e codificados das variáveis experimentais estão mostradas na tabela 13. O experimento foi replicado.

TABELA 13: Valores (real e codificado) das variáveis experimentais usadas no plano fatorial 2.

Termos codificados	-1	0	+1	
Fatores				Unidade
Concentr. Substr. (A)	66	76	86	g/L
Razão C/N (B)	40	55	70	g atom/g atom

3.11.3 Planificação experimental 3: Otimização da relação C/N e da quantidade de carbonato de cálcio adicionada por frasco, utilizando a planificação experimental

No terceiro estudo foi utilizado um plano fatorial completo 3^2 para otimizar as condições de cultura para a maior produção de ácido láctico em meio líquido, no qual foram testados dois fatores experimentais: relação C/N e quantidade de carbonato de cálcio adicionado por frasco, distribuídos em três níveis. A análise foi feita por superfície de resposta, e permitiu testar a previsão estatística estabelecida na planificação experimental 2, que mostra, a tendência da variável resposta. A concentração do substrato foi mantida constante em 90 g/L, e a agitação em 230 rpm. Os valores reais e codificados das variáveis experimentais estão mostradas na tabela 14. O experimento foi replicado.

TABELA 14: Valores (real e codificado) das variáveis experimentais usadas no plano fatorial 3.

Termos codificados	-1	0	+1	
Fatores				Unidade
Relação C/N (A)	30	55	70	G atom/g atom
CaCO ₃ adicionado (B)	1	2	3	g/frasco

Os resultados experimentais das planificações foram analisados de acordo com a equação:

$$Y_i = \beta_0 + \sum_i \beta_i x_i + \sum_i \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

Onde : Y_i = Resposta do experimento (ácido láctico, em g/L)

β_0 = Coeficiente de resposta no centro do domínio experimental

β_i = Coeficiente de resposta do fator i

x_i = Fator experimental i (unidades codificadas)

ε = Erro experimental

3.12 Avaliação das Eficiências de Conversão Substrato-produto ($Y_{P/S}$)

As eficiências de conversão de açúcar redutor (substrato) em ácido láctico (produto) foram avaliadas de acordo com a equação 2:

$$Y_{P/S} = (P_f) / (S_i - S_f) \quad (2)$$

Onde : P_f = quantidade de ácido láctico no fermentado em g/L

S_i e S_f = quantidade inicial e final de açúcar redutor no fermentado em g/L

3.13 Avaliação das Eficiências de Conversão Substrato-biomassa ($Y_{X/S}$)

As eficiências de conversão de açúcar redutor (substrato) em biomassa foram avaliadas de acordo com a equação 3:

$$Y_{X/S} = (X_f) / (S_i - S_f) \quad (3)$$

Onde : X_f = quantidade final de biomassa no fermentado

3.14 Estudo Cinético da Fermentação

Foram realizadas duas cinéticas: Uma com o hidrolisado obtido a 205° C e outra com o hidrolisado obtido a 210 ° C. As amostras foram coletadas, retirando-se do agitador de movimento orbital dois frascos a cada intervalo de tempo definido, e conservados em geladeira para posterior análise de açúcar redutor residual e metabólitos produzidos por CLAE e de biomassa formada por gravimetria.

A partir destes dados pode-se calcular os parâmetros cinéticos dos processos através das equações 4 a 6:

3.14.1 Velocidade volumétrica de formação de biomassa (r_x)

$$r_x = (X_2 - X_1) / (t_2 - t_1) \quad (4)$$

onde X_2 = Biomassa medida no tempo t_2 , em g/L.

X_1 = Biomassa medida no tempo t_1 , em g/L.

3.14.2 Velocidade volumétrica de formação de produto (r_p)

$$r_p = (P_2 - P_1) / (t_2 - t_1) \quad (5)$$

onde : P_2 = Concentração de produto medido no tempo t_2 , em g/L.

P_1 = Concentração de produto medido no tempo t_1 , em g/L.

3.14.3 Velocidade volumétrica de consumo do substrato (r_s)

$$r_s = - (S_2 - S_1) / (t_2 - t_1) \quad (6)$$

onde : S_2 = Concentração do substrato medido no tempo t_2 , em g/L.

S_1 = Concentração do substrato medido no tempo t_1 , em g/L.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de Cepas

Dez diferentes cepas de *Rhizopus* foram testadas em meio sólido preparado com ágar e o hidrolisado hemicelulósico de *Pinus taeda*. O crescimento radial foi medido e os resultados estão na tabela 15. Com estes dados de crescimento radial, não foi possível excluir nenhuma das cepas testadas, pois todas apresentaram crescimento similar no substrato em questão. Assim todas as cepas testadas foram capazes de assimilar e metabolizar o substrato, produzindo biomassa, caracterizado pelo crescimento radial nas placas de petry, com velocidades similares. Como as velocidades de crescimento radial foram semelhantes para todas as cepas, o estudo continuou com todas elas. Isto mostra que existe uma boa afinidade do fungo para o substrato, pois nenhuma cepa apresentou dificuldade de crescer, produzindo biomassa a partir deste substrato. A figura 16 apresenta o aspecto da evolução do crescimento radial das várias cepas de *Rhizopus* sobre o hidrolisado de *Pinus taeda*.

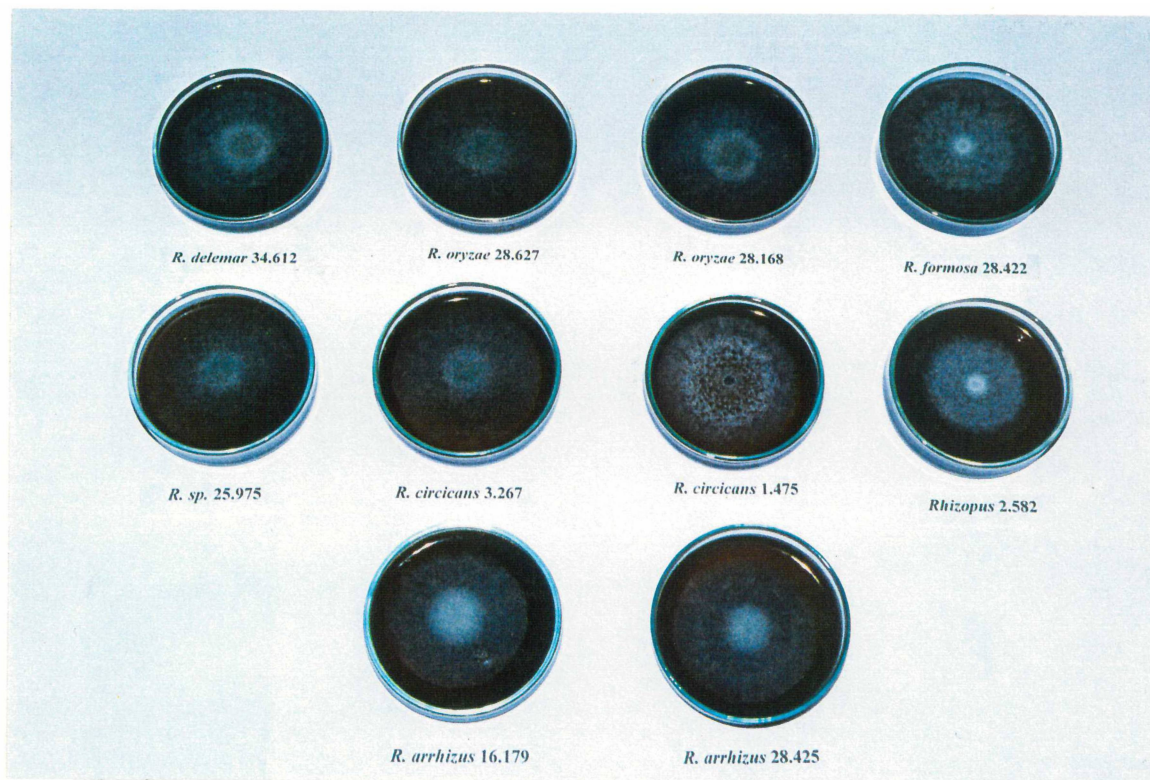


FIGURA 16: Crescimento radial dos *Rhizopus* em meio ágar-hidrolisado de *Pinus taeda*.

TABELA 15: Medidas do crescimento radial de variedades de *Rhizopus* em meio agar-hidrolisado hemicelulósico de *Pinus taeda*. O diâmetro das colônias é dado em mm.

	Cepas									
Tempo (h)	34 612	28 425	16 179	28 627	28 168	28 422	25 975	3267	2582	1475
2	3.87	3.1	2.76	4.8	4.09	3.35	4.45	4.35	4.15	4.22
4	3.87	3.1	2.76	4.8	4.09	3.35	4.45	4.65	4.15	4.22
6	3.94	3.15	2.76	5.06	4.09	3.37	4.55	4.4	4.15	4.22
8	4.05	3.18	2.76	5.1	4.13	3.56	4.56	4.46	4.15	4.22
10	4.27	3.42	3.94	5.44	4.75	3.93	4.81	5.06	4.13	4.39
12	4.3	3.52	4.00	5.89	4.85	4.22	4.97	5.26	4.15	4.73
14	4.3	3.55	4.46	6.05	4.85	4.28	5.12	5.47	4.23	4.95
16	11.0	8.85	8.43	10.78	9.98	8.26	9.3	10.05	5.63	6.61
18	12.72	10.46	11.05	13.34	12.75	10.45	10.72	12.52	7.36	8.28
20	16.80	14.38	15.03	15.79	17.34	14.84	14.67	16.21	10.65	12.27
22	19.85	17.52	18.14	20.75	18.67	17.1	17.96	18.46	12.75	14.29
24	24.01	21.5	22.29	24.8	22.73	21.4	21.75	20.38	16.15	18.7
26	24.17	25.62	26.45	28.91	26.8	25.72	25.56	22.32	19.63	23.31
28	32.96	30.41	30.18	33.31	31.7	30.05	30.42	31.36	23.95	27.95
30	36.48	34.37	33.93	37.97	35.64	35.74	34.46	35.95	28.37	32.54
32	40.86	39.74	38.00	42.46	40.54	39.27	38.94	40.34	32.64	37.45
34	45.9	42.26	41.42	47.37	45.14	45.24	44.17	44.72	36.71	41.72
36	49.61	47.05	45.66	51.22	49.28	50.25	47.81	49.31	41.0	45.87
38	54.42	54.45	49.77	56.21	54.5	55.52	53.38	54.42	45.74	51.42
40	60.93	57.31	54.84	62.32	60.38	61.35	59.33	60.07	50.25	57.2
42	65.63	61.87	59.12	67.31	65.08	66.23	64.61	64.52	54.28	62.05
44	70.44	66.47	63.5	72.71	70.01	73.73	70.22	69.35	60.72	67.23
46	73.95	69.56	67.12	76.18	73.84	77.98	73.84	73.52	63.37	71.93

Plotando-se os valores de crescimento radial das várias cepas de *Rhizopus*, foram obtidos os gráficos mostrados nas figuras de 17 a 20 a seguir:

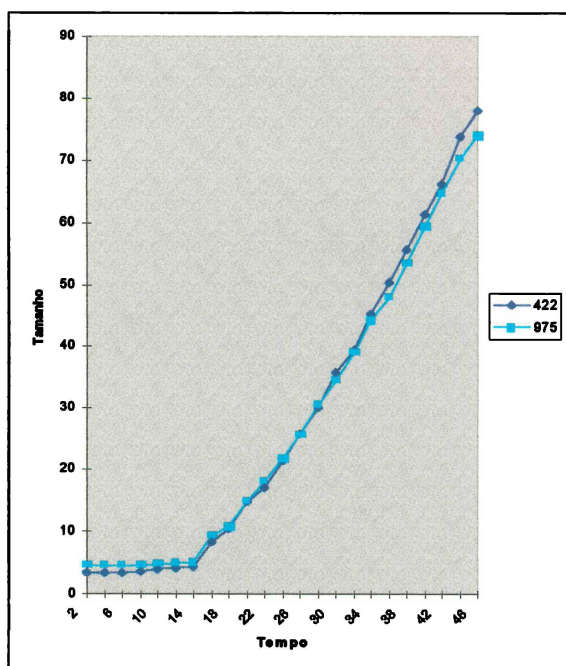


FIGURA.17. Evolução do crescimento radial das cepas de R. 25.975 e R. 28.422.

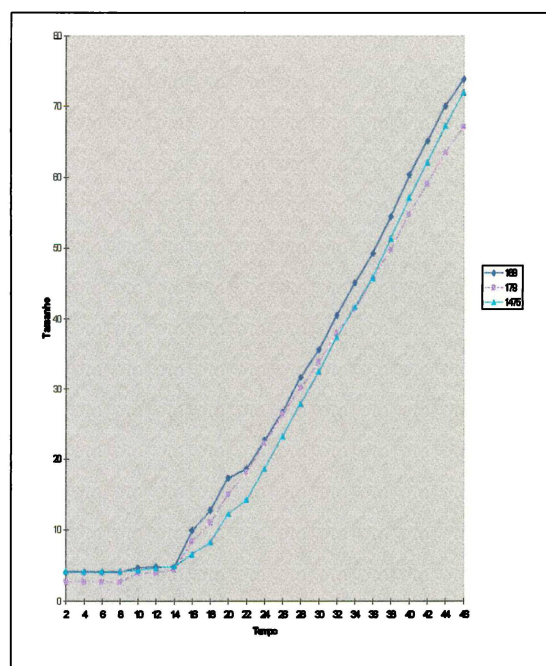


FIGURA.18. Evolução do crescimento radial das cepas de R. 28.168, R. 1475 e R. 16.179.

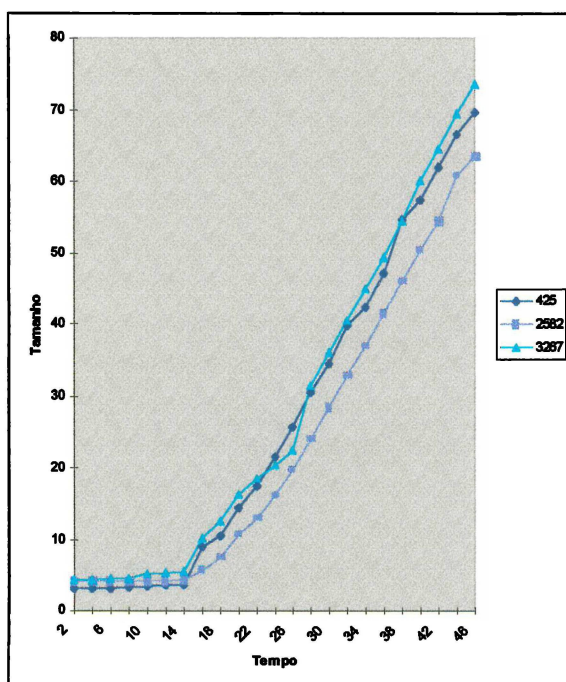


FIGURA 19: Evolução do crescimento radial das cepas de R. 3267, R. 28.425 e R. 2582

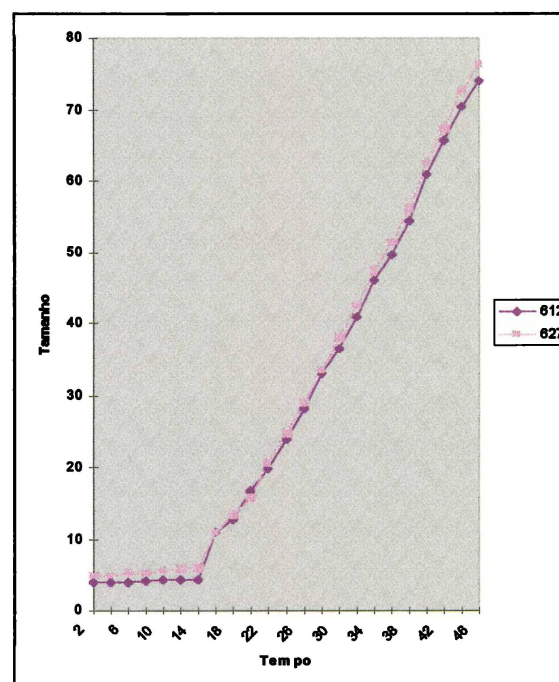


FIGURA 20: Evolução do crescimento radial das cepas de R. 34.612 e R. 28.627

4.2 Seleção do Substrato

Hidrolisados dos três tipos de madeira testados: *P. taeda*, *E. viminalis* e *M. scabrella* foram inoculados com onze diferentes tipos de cepas de *Rhizopus*, e cada fermentação foi monitorada com respeito às mudanças em biomassa, pH, açúcar redutor residual e metabólitos produzidos, especialmente ácidos orgânicos. Os resultados estão mostrados nas tabelas 16, a 18 e nas figuras 21 a 26.

TABELA 16: Resultados da fermentação líquida de hidrolisado hemicelulósico de *P. taeda* com *Rhizopus*. Teor de açúcar redutor no substrato = 56,55 g/L

Cepa	PH Final	Açúcar Red. Residual (g/L)	Metabólitos Produzidos (g/L)	Fator de Conversão Substrato/Produto $Y_{s/p}$
<i>R. circicans</i> 1475	7,4	7,59	Ácido Málico = 1,33 Acido Lático = 9,55 Etanol = 3,45	0,027 0,195 0,070
<i>R. arrhizus</i> 16 179	6,1	9,64	Acido Succínico = 4,0 Acido Fumárico = 5,08 Acido Acético = 2,04 Etanol = 11,61	0,085 0,108 0,152 0,248
<i>R. delemar</i> 34 612	6,3	10,80	Acido Málico = 1,75 Acido Succínico = 3,45 Acido Lático = 4,89 Acido Acético = 2,6	0,038 0,075 0,107 0,057
<i>R. arrhizus</i> 28 425	6,4	18,91	Acido Málico = 2,0 Acido Succínico = 5,78 Acido Fumárico = 4,53 Acido Acético = 2,73 Etanol = 9,63	0,053 0,154 0,120 0,073 0,256
<i>R. arrhizus</i> 2582	6,0	11,01	Acido Succínico = 3,2 Ac. Fumárico = traços Acido Lático = 4,05 Acido Acético = 2,24	0,070 - 0,077 0,049
<i>R. oryzae</i> 28 168	7,5	6,03	Acido Succínico = 1,64 Acido Fumárico = 3,22	0,032 0,064
<i>R. oryzae</i> 395	7,5	8,98	Acido Málico = 2,93 Acido Succínico = 2,7 Acido Lático = 12,0 Etanol = 5,61	0,062 0,056 0,252 0,118

Altas concentrações de inibidores produzidos pelo processo de explosão a vapor com os cavacos de *P. taeda*, nas condições usadas, restringiram o crescimento das cepas

R. formosa 28 422, *R. oligosporos* 3267, *R. sp* 25 975 e *R. oryzae* 28 627, que não produziram biomassa, ou seja tiveram o seu crescimento inibido em tais condições. Todas as outras cepas além de biomassa, caracterizando o crescimento, assimilação e o consumo do substrato, produziram também pequenas quantidades de vários ácidos orgânicos e etanol. Somente as cepas *R. arrhizus* 16 179 e *R. arrhizus* 28 425, produziram quantidades importantes de ácido fumárico, mas em associação com ácido succínico e ácido acético (tabela 16, figuras 21 e 22). No caso do *R. arrhizus* 28 425, foi também observada a produção de ácido málico. As cepas *R. arrhizus* 16 179 e *R. arrhizus* 28 425 produziram também quantidades significativas de etanol, enquanto as cepas *R. oryzae* 395 e *R. circicans* 1475, produziram quantidades expressivas de ácido láctico. A partir deste estudo foi possível identificar a cepa *R. oryzae* 395, como sendo a melhor produtora de um metabólito de interesse, o ácido láctico.

TABELA 17: Resultados da fermentação líquida de hidrolisado hemicelulósico de *E. viminalis*, com *Rhizopus*. Teor de açúcar redutor no substrato = 56,5 g/L

Cepas	PH Final	Açúcar Redutor Residual (g/L)	Metabólitos Produzidos (g/L)	Fator de Conversão Subst. / Produto Y_{SP}
<i>R. delemar</i> 34 612	6,3	22,84	Acido Málico = 3,42 Acido Succínico = 1,3 Acido Acético = 4,9 Etanol = 6,3	0,102 0,039 0,146 0,187
<i>R. arrhizus</i> 28 425	6,4	31,38	Acido Málico = 2,05 Ac. Succínico= traços Acido Acético = 4,6 Etanol = 3,37	0,082 - 0,183 0,134
<i>R. arrhizus</i> 2582	6,0	14,74	Acido Málico = 3,22 Acido Succínico = 1,7 Acido Acético = 5,5 Etanol = 0,98	0,077 0,041 0,132 0,023
<i>R. oryzae</i> 395	7,5	13,23	Acido Málico = 12,24 Acido Fumárico = 3,54 Acido Acético = 4,25 Etanol = 2,98	0,283 0,082 0,098 0,069

Quando o hidrolisado hemicelulósico derivado de cavacos de *E. viminalis* foi usado como substrato para a fermentação com as cepas de *Rhizopus*, observou-se que somente 4 cepas apresentaram crescimento em termos de biomassa (tabela 17). Em todos os casos, uma boa produção de ácido acético foi observada. A cepa *R. delemar* 34 612 produziu uma

quantidade considerável de etanol. O hidrolisado hemicelulósico de *E. viminalis*, mostrou ser um excelente e promissor substrato para a produção de ácido málico pela cepa *R. oryzae* 395. As cepas *R. circicans* 1475, *R. arrhizus* 16 179, *R. formosa* 28 422, *R. oligosporos* 3267, *R. sp* 25 975, *R. oryzae* 28 627 e *R. oryzae* 28 168 não apresentaram crescimento (figuras 23 e 24), indicando que foram inibidas por substâncias tóxicas presentes no hidrolisado e geradas pelo processo de explosão a vapor.

TABELA 18: Resultado da fermentação líquida de hidrolisado hemicelulósico de *M. scabrella* com *Rhizopus*. Teor de Açúcar redutor no substrato = 57,5 g/L.

Cepa	PH Final	Açúcar Redutor Residual (g/L)	Metabólitos Produzidos (g/L)	Fator de Conversão Substrato / Produto $Y_{S/P}$
<i>R. circicans</i> 1475	7,4	25,13	Acido Succínico = 2,85	0,088
			Acido Láctico = 7,31	0,226
			Acido Acético = 5,21	0,161
			Etanol = 4,52	0,139
<i>R. arrhizus</i> 16 179	6,1	27,46	Acido Succínico = 3,2	0,107
			Acido Láctico = 1,46	0,049
			Acido Fumárico = 0,7	0,023
			Acido Acético = 5,2	0,173
			Etanol = 2,04	0,068
<i>R. delemar</i> 34 612	6,3	22,4	Acido Succínico = 0,9	0,025
			Acido Acético = 4,07	0,116
			Etanol = 2,1	0,060
<i>R. arrhizus</i> 28 425	6,4	7,86	Acido Succínico = 1,63	0,033
			Acido Fumárico = 1,73	0,035
			Acido Acético = 5,3	0,107
			Etanol = 2,3	0,046
<i>R. formosa</i> 28 422	5,8	19,76	Acido Succínico = 1,76	0,047
			Acido Fumárico = 1,93	0,051
			Acido Acético = 2,9	0,077
			Etanol = 1,8	0,048
<i>R. arrhizus</i> 2582	6,0	15,15	Acido Succínico = 3,66	0,086
			Acido Acético = 4,19	0,099
			Etanol = 2,7	0,064
<i>R. oryzae</i> 395	7,5	22,11	Acido Acético = 5,3	0,149
			Etanol = 4,8	0,136

Compostos tóxicos aos microrganismos, gerados no processo de explosão a vapor presentes no hidrolisado hemicelulósico de *M. scabrella*, impediram o crescimento de 4 das cepas testadas (Tabela 18). Assim as cepas *R. oligosporos* 3267, *R. sp* 25 975, *R. oryzae* 28 627 e *R. oryzae* 28 168, não apresentaram formação de biomassa na fermentação do

hidrolisado hemicelulósico de *M. scabrella*, não sendo capazes de assimilar o substrato (figuras 25 e 26). As cepas *R. circicans* 1475, *R. arrhizus* 16 179, *R. arrhizus* 28 425 e *R. oryzae* 395, produziram também ácido acético. Em todas as fermentações, etanol foi produzido em pequenas quantidades e somente a cepa *R. circicans* 1475, produziu uma pequena quantidade de ácido láctico, considerada não atrativa para uma futura otimização.

O gráfico, para os dados das fermentações com o hidrolisado de *Pinus taeda* tem-se:

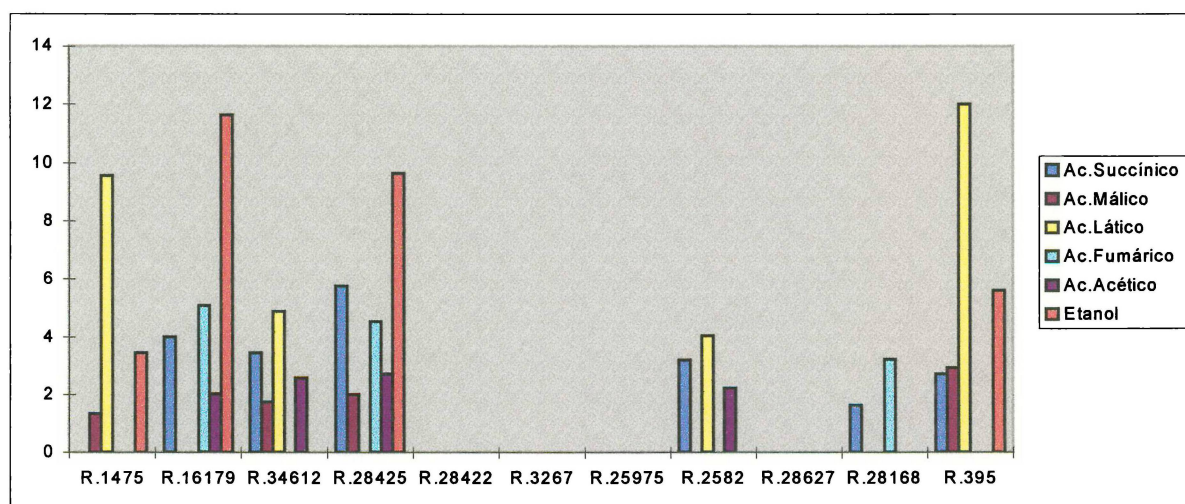


FIGURA 21: Metabólitos produzidos na fermentação do hidrolisado de *Pinus taeda* com *Rhizopus*. Concentração de açúcar redutor no hidrolisado = 56,55 g/L.

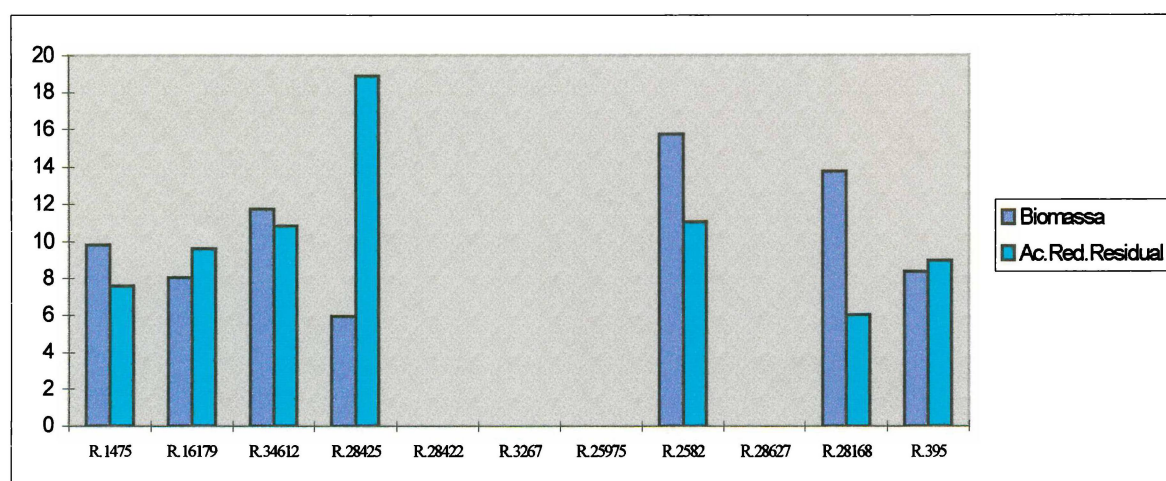


FIGURA 22: Concentração de açúcar redutor residual e biomassa produzida na fermentação de hidrolisado de *Pinus taeda* com *Rhizopus*.

Para os dados referentes às fermentações com o hidrolisado de *Eucalyptus viminalis* tem-se:

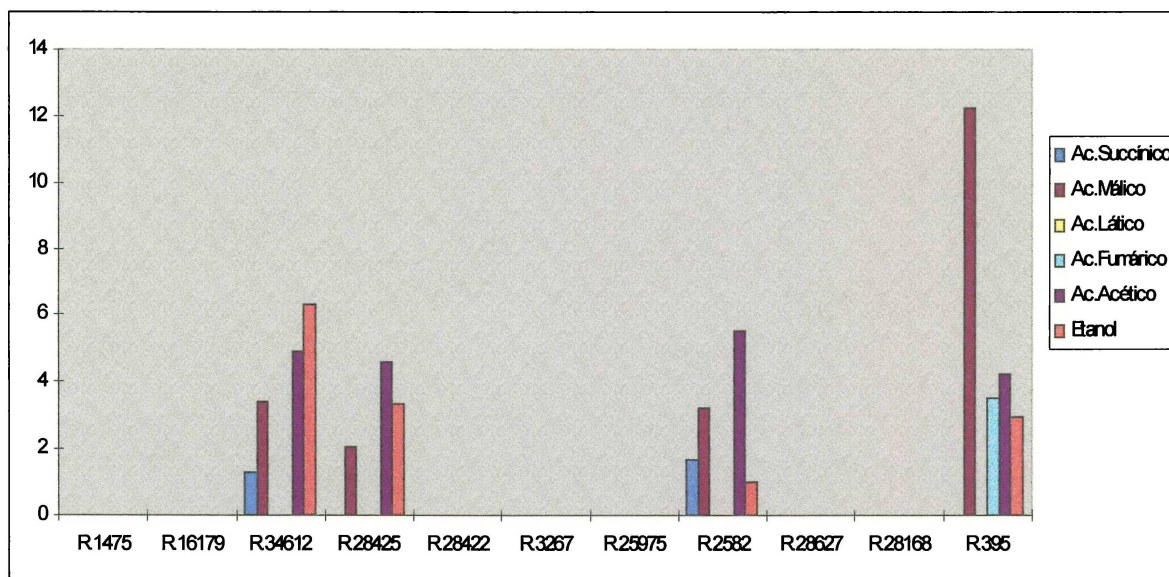


FIGURA 23: Metabólitos produzidos na fermentação do hidrolisado de *Eucalyptus viminalis* com *Rhizopus*. Concentração de açúcar redutor no substrato = 56,5 g/L.

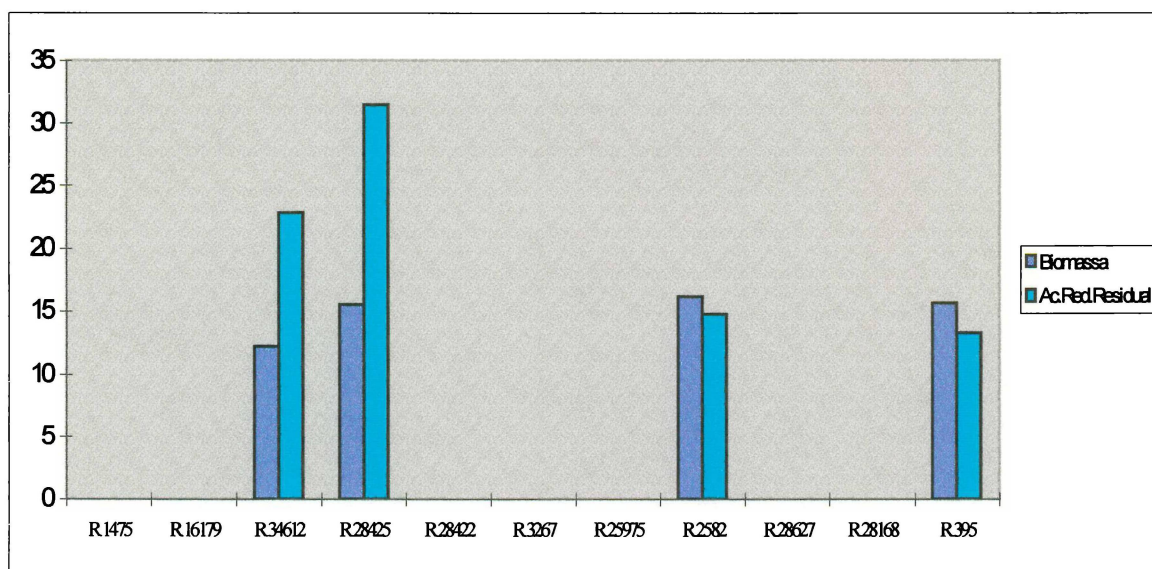


FIGURA 24: Concentração de açúcar redutor residual e biomassa produzida na fermentação de hidrolisado de *Eucalyptus viminalis* com *Rhizopus*.

Para os dados referentes às fermentações com o hidrolisado de cavacos de *Mimosa scabrella* tem-se:

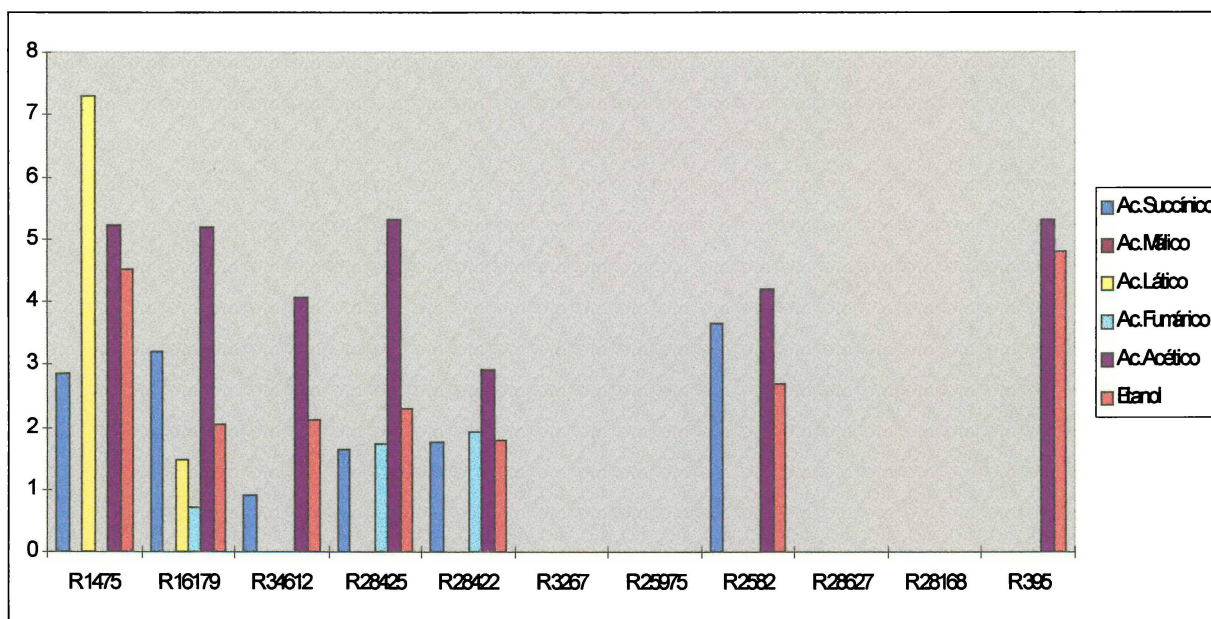


FIGURA 25: Metabólitos produzidos na fermentação do hidrolisado de *Mimosa scabrella* com *Rhizopus*. Concentração de açúcar redutor no hidrolisado = 57,5 g/L.

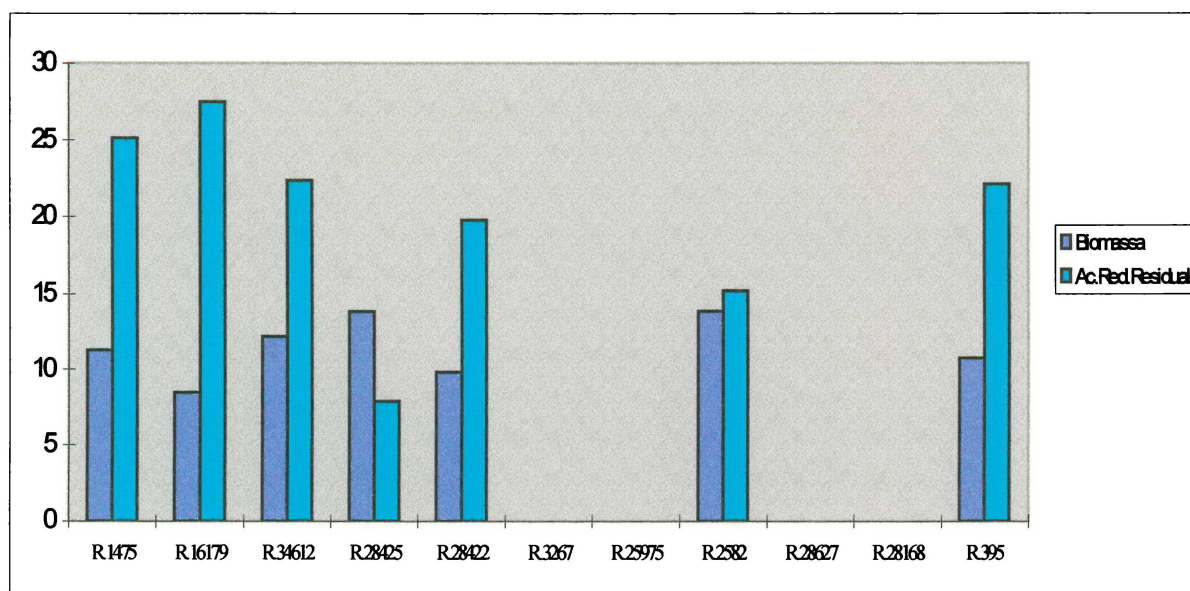


FIGURA 26: Concentração de açúcar redutor residual e biomassa produzida na fermentação de hidrolisado de *Mimosa scabrella*, com *Rhizopus*.

4.3 Seleção do Metabólito

A partir dos resultados obtidos anteriormente, referente aos experimentos realizados, foi possível selecionar o melhor substrato: o hidrolisado de cavacos de *Pinus taeda*, e o fungo *Rhizopus oryzae* 395, para estudos posteriores de otimização de condições de cultura, com vistas à produção de ácido láctico. Verificou-se que o hidrolisado de *Pinus taeda* proporcionou ao fungo *Rhizopus oryzae* 395, as condições básicas de substrato para uma boa produção do ácido láctico. Os açúcares redutores presentes em solução são basicamente xilose e glucose, perfeitamente assimiláveis por este fungo, conforme já verificado por SOCCOL, 1992. Além disso, este metabólito, apresenta grande importância comercial.

4.4. Plano Fatorial de Otimização

Para incrementar a produtividade de ácido láctico, ou seja, aumentar a concentração de ácido láctico no caldo de fermentação e obter menores valores de biomassa e etanol, as condições de cultura foram otimizadas usando a planificação experimental. De estudos anteriores, concluí-se que tempos de fermentação após a adição do carbonato de cálcio maiores que 72 horas não eram eficientes (SOCCOL, 1994). Portanto o tempo de fermentação foi definido com base nestes estudos.

4.4.1 Planificação Experimental 1: 2^{5-1}

Nesta primeira planificação experimental, cinco fatores foram escolhidos para serem testados: concentração do substrato, agitação, quantidade de agente neutralizante (carbonato de cálcio) adicionado ao frasco de fermentação, relação carbono/nitrogênio e relação carbono/fósforo, distribuídos em dois níveis com ponto central. O experimento foi fracionado com cinco repetições do ponto central. Os fatores com seus valores reais e codificados foram mostrados na tabela 12.

As respostas medidas foram concentração de ácido láctico, biomassa produzida e concentração de etanol, e os resultados estão apresentados na tabela 19.

TABELA 19: Planificação experimental usada para otimizar a produção de ácido láctico a partir de hidrolisado hemicelulósico de *P. taeda*, com *R. oryzae* 395.

Teste	Fatores Experimentais					Variável Resposta		
	Concent. Substrato (g/L)	Agitação (rpm)	CaCO ₃ Adicion. (g/frasco)	Relação C/N	Relação C/P	Acido Láctico (g/L)	Biomassa (g/L)	Etanol (g/L)
1	97	205	2	47,5	407,5	7,85	7,99	11,68
2	82	180	1	38,0	680,0	5,33	10,61	6,62
3	112	180	1	38,0	135,0	0,00	6,08	1,13
4	82	230	1	38,0	135,0	15,39	10,44	9,62
5	112	230	1	38,0	680,0	0,00	0,00	0,00
6	97	205	2	47,5	407,5	3,93	8,31	13,51
7	82	180	3	38,0	135,0	6,29	11,30	5,54
8	112	180	3	38,0	680,0	0,00	6,22	4,33
9	82	230	3	38,0	680,0	7,01	13,18	2,76
10	112	230	3	38,0	135,0	0,00	0,00	0,00
11	97	205	2	47,5	407,5	7,60	9,76	7,94
12	82	180	1	57,0	135,0	0,00	8,09	11,61
13	112	180	1	57,0	680,0	0,00	0,00	0,00
14	82	230	1	57,0	680,0	7,88	9,58	11,50
15	112	230	1	57,0	135,0	0,00	0,00	0,00
16	97	205	2	47,5	407,5	7,20	10,14	5,91
17	82	180	3	57,0	680,0	0,00	8,30	7,60
18	112	180	3	57,0	135,0	0,00	0,00	0,00
19	82	230	3	57,0	135,0	0,00	0,00	0,00
20	112	230	3	57,0	680,0	0,00	0,00	0,00
21	97	205	2	47,5	407,5	8,48	8,53	4,56

Os resultados obtidos para a concentração de ácido láctico, de biomassa e de etanol produzidos foram submetidos à análise por superfície de resposta, e à análise estatística, para se verificar quais os fatores mais importantes em cada variável resposta.

As análises através do gráfico PARETO, mostradas nas figuras 27, 28 e 29, forneceram os seguintes resultados com relação aos fatores significativos para cada variável resposta:

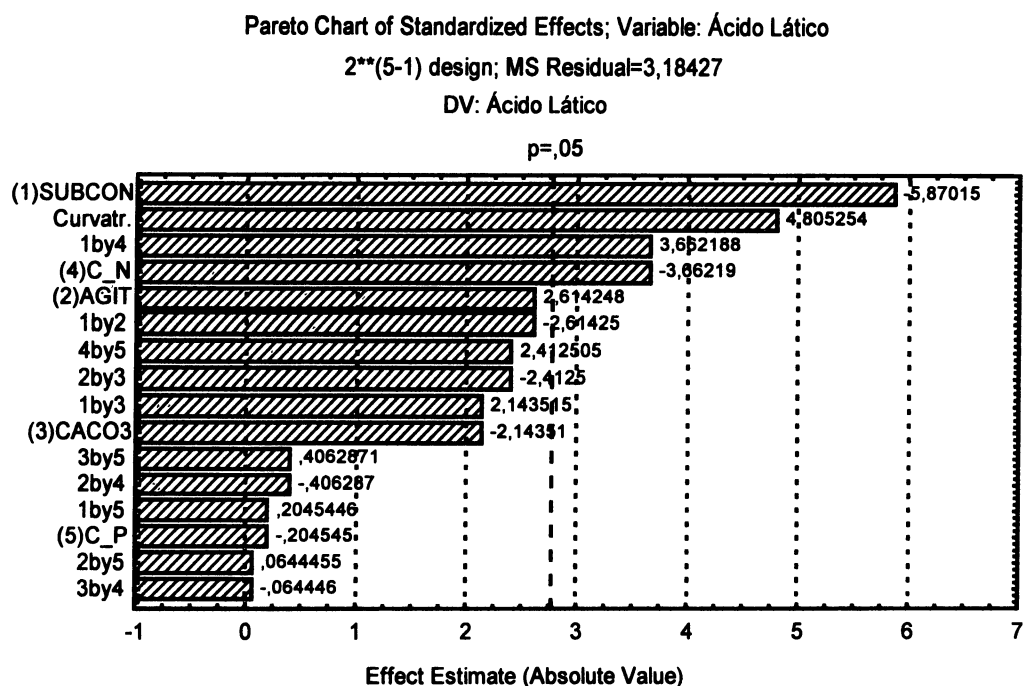


FIGURA 27: Gráfico PARETO para a produção de ácido láctico na planificação experimental 1, na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de *P. taeda* com *R. oryzae* 395.

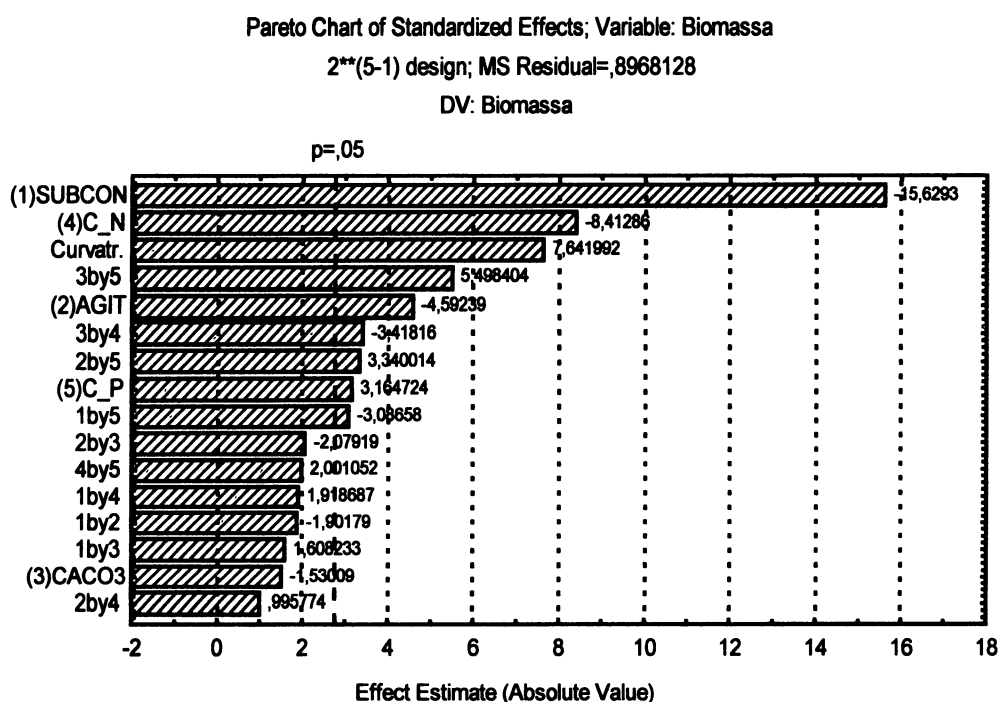


FIGURA 28: Gráfico PARETO para a produção de biomassa na planificação experimental 1, na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de *P. taeda* com *R. oryzae* 395.

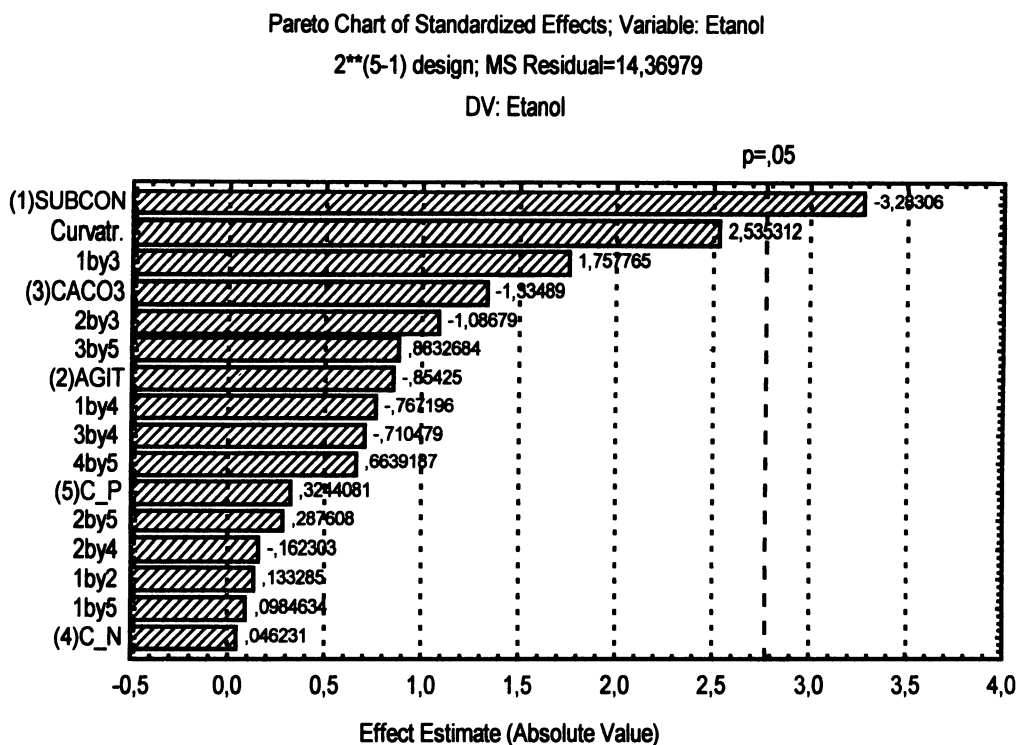


FIGURA 29: Gráfico PARETO para a produção de etanol na planificação experimental 1, na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de *P. taeda* com *R. oryzae* 395.

A partir do gráfico PARETO para o ácido láctico (figura 27), que analisa a proporção de influência de cada fator na variável resposta, pode-se concluir que a concentração do substrato (fator A) e a relação C/N (fator D) são os dois fatores mais importantes na definição das melhores condições para a produção de ácido láctico, assim como a interação dos mesmos (fator AD). O nível de agitação (B), a quantidade de carbonato de cálcio adicionada aos frascos de fermentação (C), bem como as interações de primeira ordem entre as variáveis estudadas, ou seja AB, DE, BC e AC, mesmo sendo não significativas ao nível de 5 %, foram consideradas para na análise de variância (ANOVA) a seguir.

Eliminando os efeitos não significativos, a saber CE, BD, AE, BE, CD, bem como a variável testada relação C/P (E), e submetendo-se os valores de ácido láctico produzido à análise de variância, obtém-se a tabela ANOVA (tabela 20).

TABELA 20: ANOVA para o ácido láctico produzido no planejamento experimental 1.

Fator	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Médias Quadradas	razão F	valor P
A : conc subs.	109,726	1	109,726	34,46	0,0042 ^s
B: agitação	21,762	1	21,762	6,83	0,0592 ^{ns}
C: CaCO ₃ adic	14,631	1	14,631	4,59	0,0987 ^{ns}
D: razão C/N	42,706	1	42,706	13,41	0,0215 ^s
AB	21,762	1	21,762	6,83	0,0591 ^{ns}
AC	14,631	1	14,631	4,59	0,0987 ^{ns}
AD	42,706	1	42,706	13,41	0,0215 ^s
BC	18,533	1	18,533	5,82	0,0734 ^{ns}
DE	18,533	1	18,533	5,82	0,0734 ^{ns}
Teste da curvat	74,870	7	10,696	23,09	0,0086 ^s
Erro Puro	12,712	4	3178		
Total (corr.)	392,557	20			
R ²	0,96756				

Onde:

F = razão entre a variabilidade entre amostras e a variabilidade dentro da amostra.

P = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5 %).

R² = fator de correlação para o ajuste da equação calculada à superfície de resposta

^{ns} = fator não significativo.

^s = fator significativo.

O coeficiente de correlação para esta análise ($R^2 = 0,96756$) foi considerado satisfatório para este tipo de experimento. Confirmando os resultados obtidos na análise por PARETO, os fatores significativos ao nível de 5 % de significância foram, a concentração de substrato, a razão C/N e a interação entre os mesmos. Entretanto os outros efeitos considerados para a análise da ANOVA, foram também considerados para a análise de regressão. Assim, a equação de regressão que melhor se ajusta aos dados do experimento definidos na tabela 20, com relação à produção de ácido láctico em função dos fatores significativos definidos na tabela ANOVA é:

$$\text{Ac. Láctico Prod. (g/L)} = 12,4913 - 0,2182 A + 0,4689 B + 1,5579 C - 1,2909 D$$

$$- 0,0031 AB + 0,0637 AC + 0,0115 AD - 0,0431 BC + 0,0004 DE$$

Onde: A, B, C, D e E são os valores codificados para os fatores.

As superfícies de resposta em função dos vários fatores experimentais testados são:

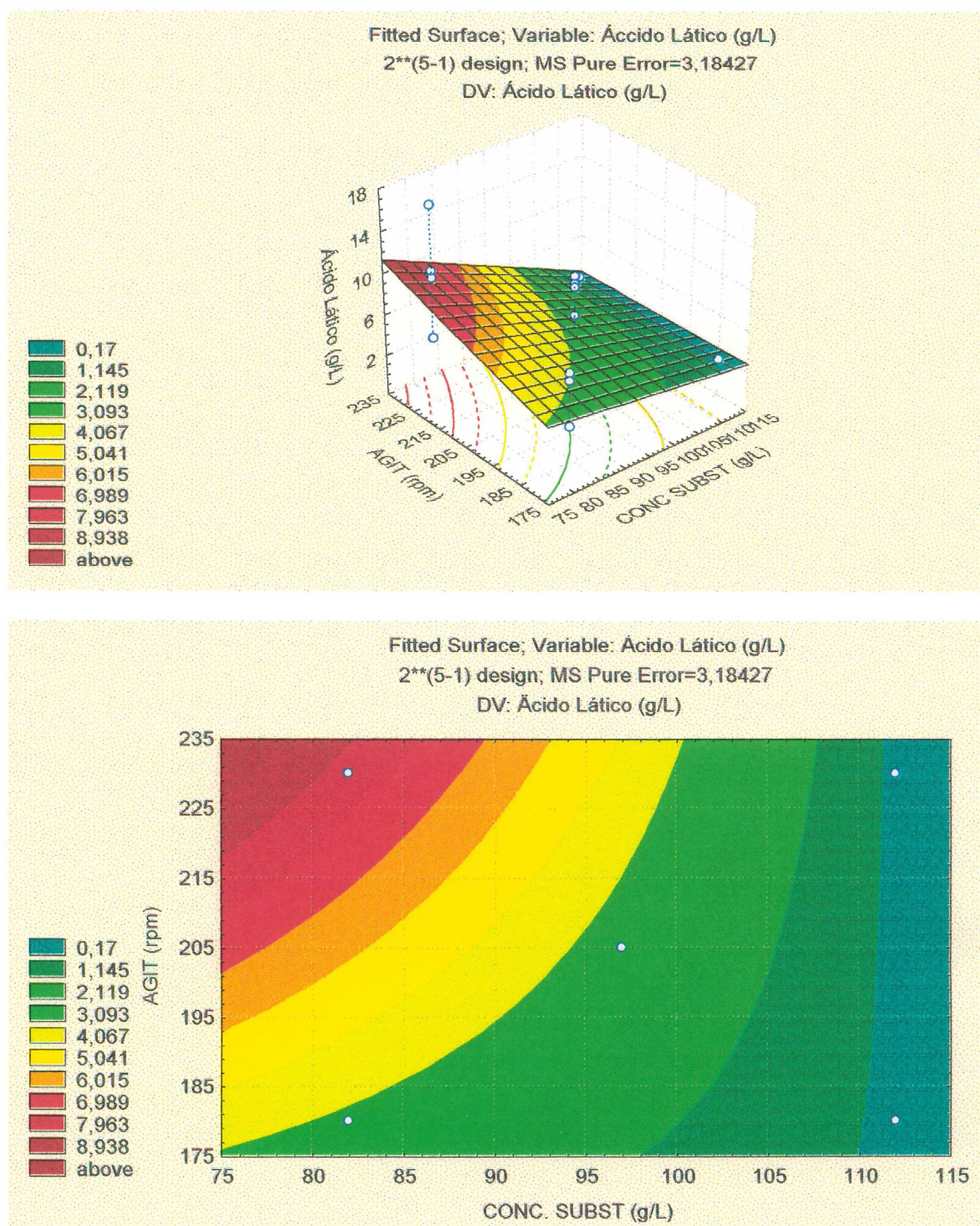


FIGURA 30: Superfície de resposta e gráfico de contorno para a produção de ácido láctico em função da concentração de substrato e do nível de agitação, na planificação experimental 1: 2⁵⁻¹

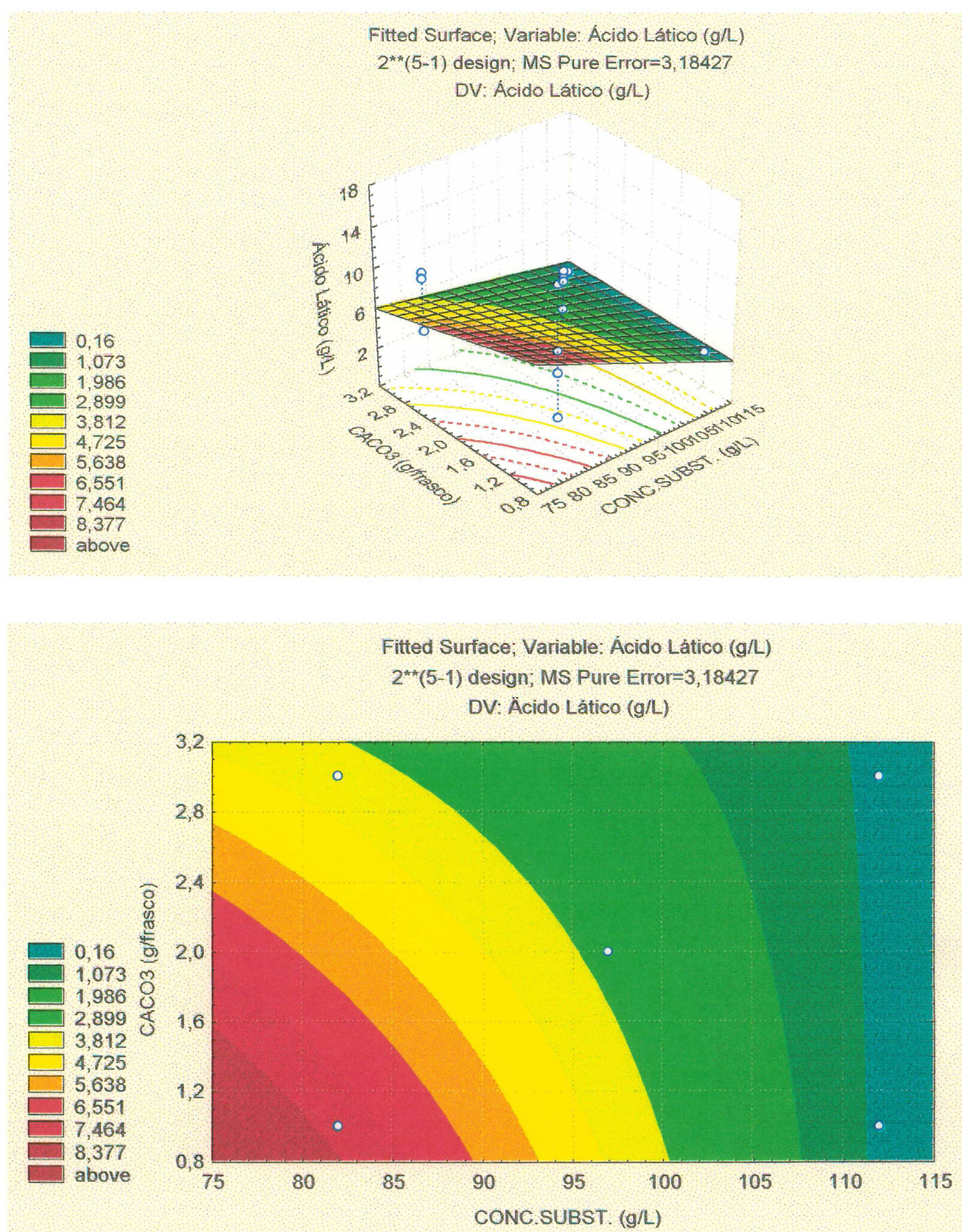


FIGURA 31: Superfície de resposta e gráfico de contorno para a produção de ácido láctico, em função da concentração de substrato e da quantidade de CaCO_3 adicionado por frasco, na planificação experimental 1: 2^{5-1} .

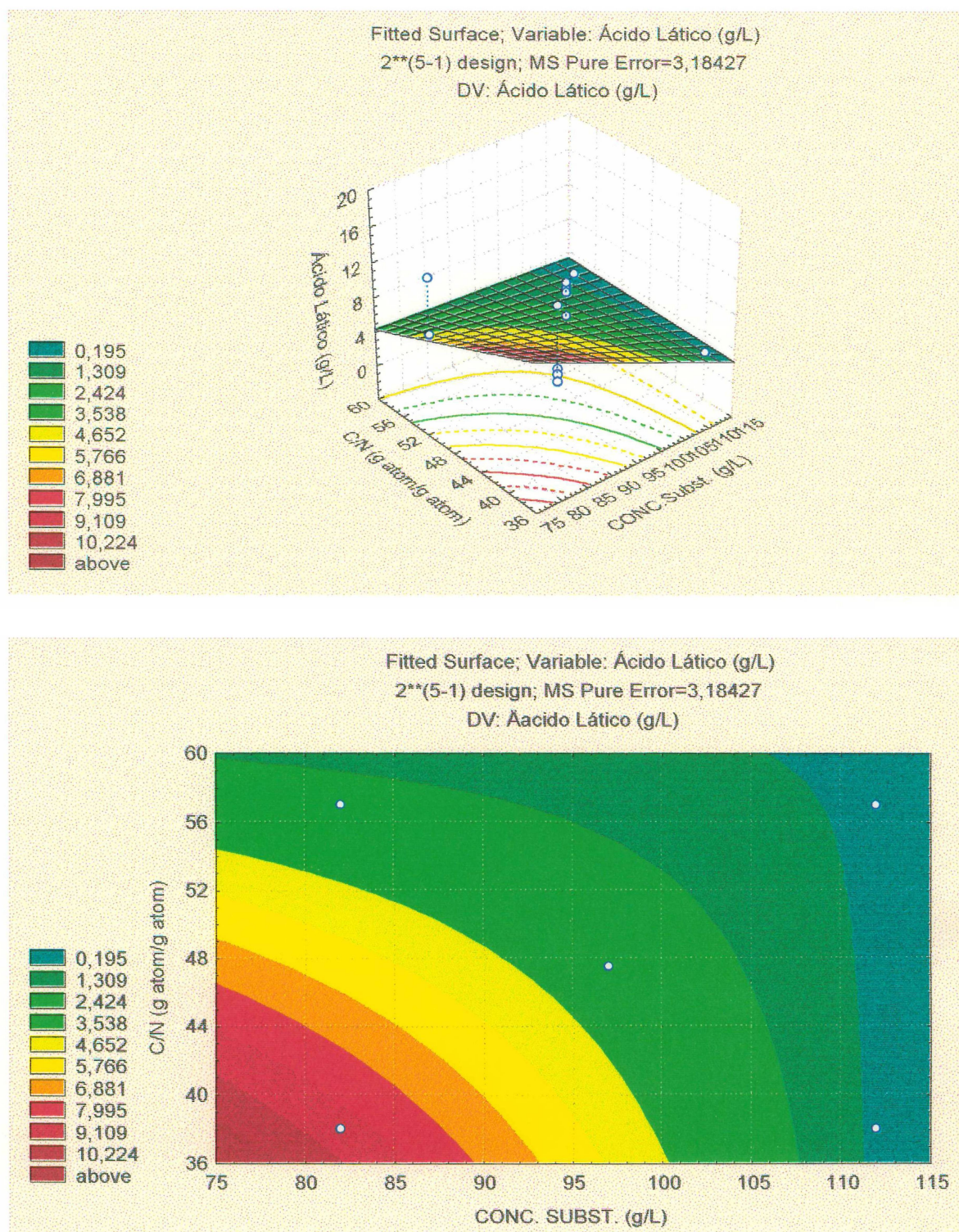


FIGURA 32: Superfície de resposta e gráfico de contorno para a produção de ácido lático, em função da concentração do substrato e da relação C/N, na planificação experimental 1: 2^{5-1} .

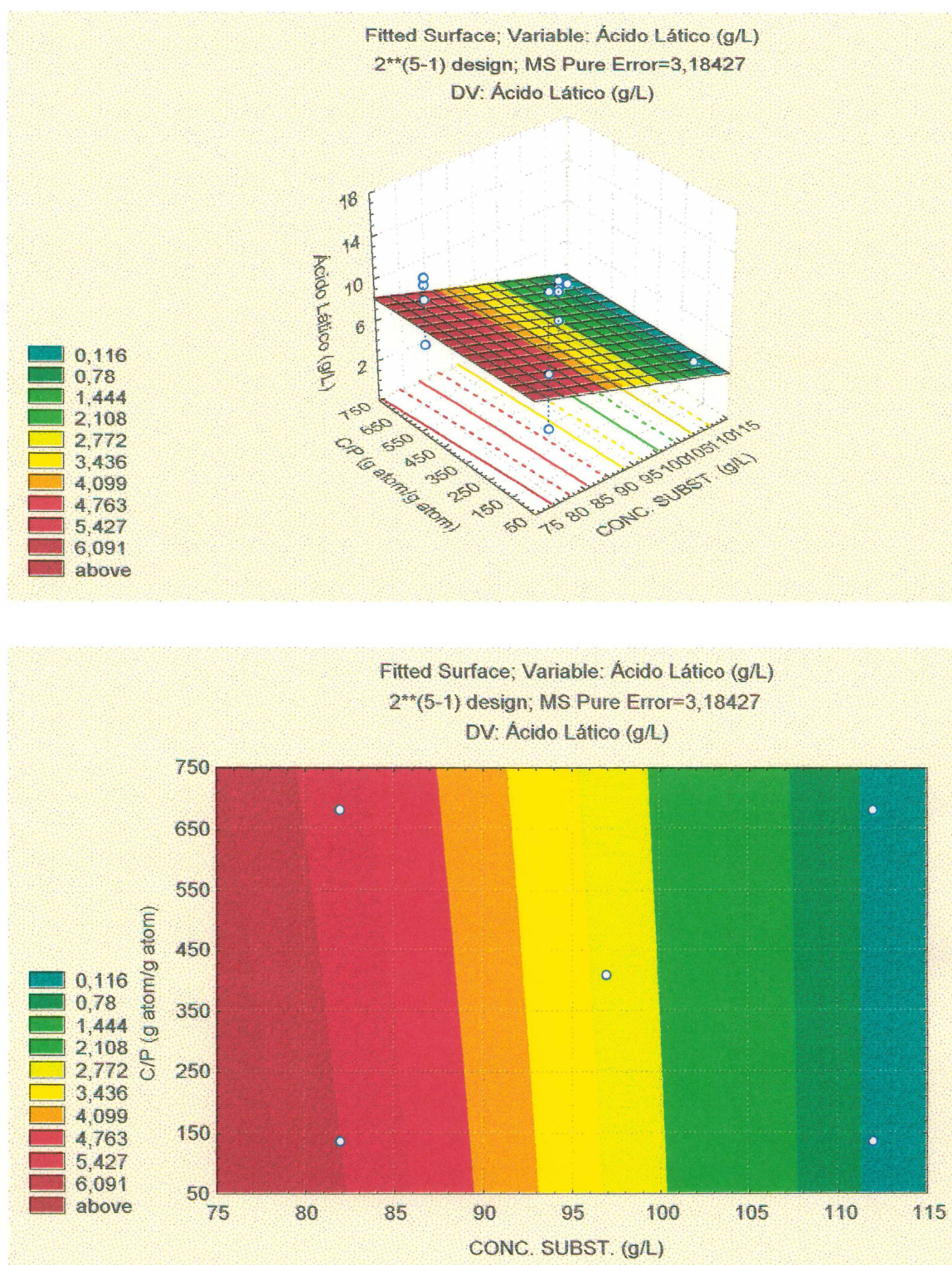


FIGURA 33: Superfície de resposta e gráfico de contorno para a produção de ácido láctico, em função da concentração do substrato e da relação C/P, na planificação experimental 1: 2^{5-1} .

Para a produção de biomassa e de etanol, foram consideradas apenas as superfícies de resposta para os fatores mais significativos (figuras 34 a 37).

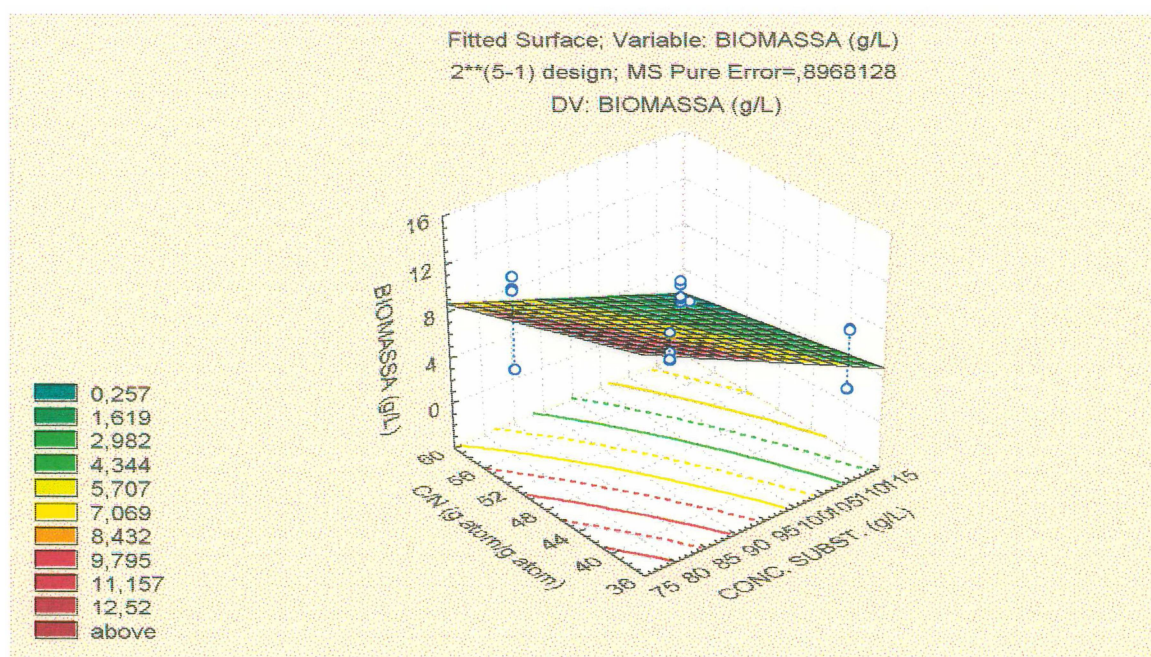


FIGURA 34: Superfície de resposta para a produção de biomassa, em função da concentração do substrato e da relação C/N, na planificação experimental 1: 2⁵⁻¹.

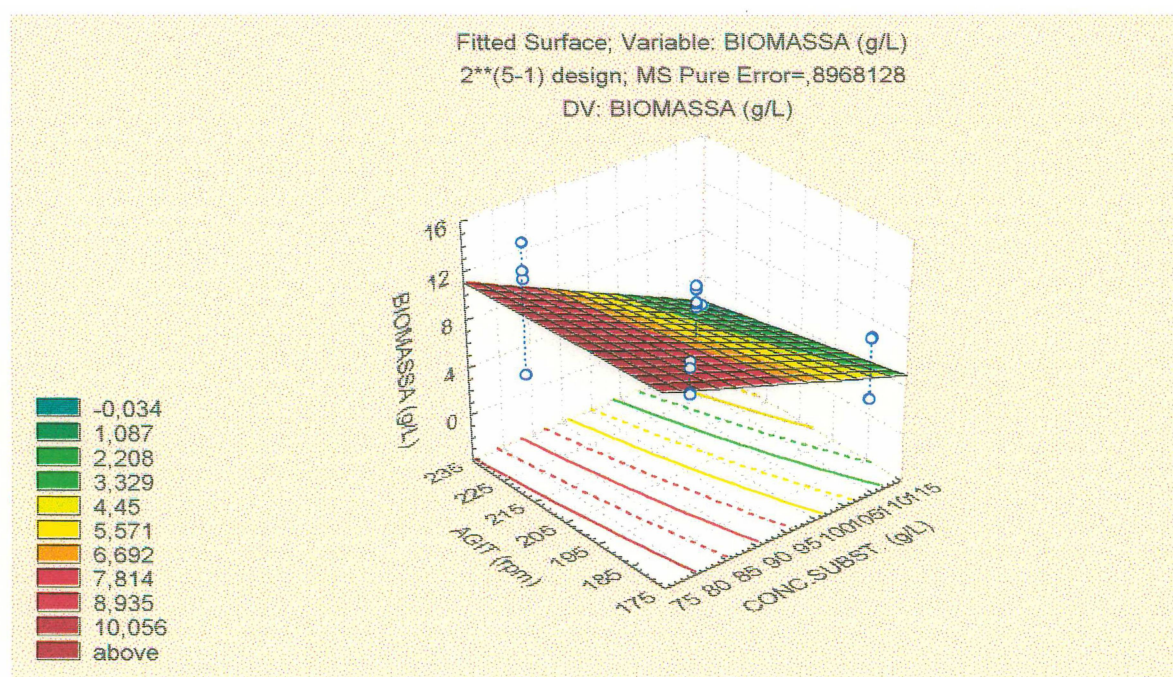


FIGURA 35: Superfície de resposta para a produção de biomassa, em função da concentração do substrato e do nível de agitação, na planificação experimental 1:2⁵⁻¹.

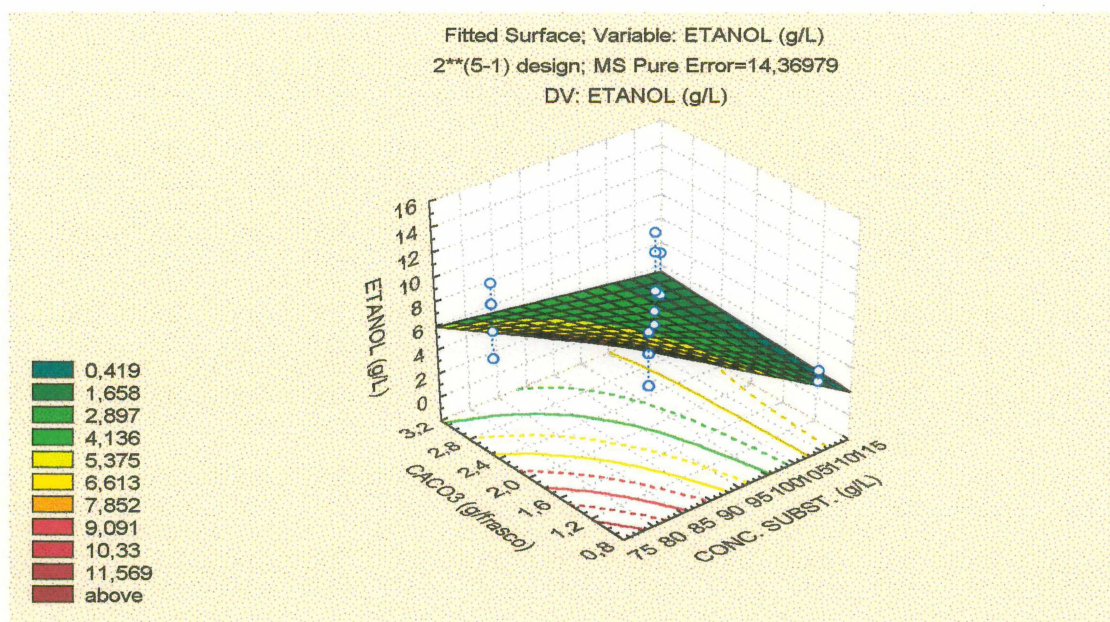


FIGURA 36: Superfície de resposta para a produção de etanol, em função da concentração do substrato e da quantidade de CaCO_3 adicionada por frasco, na planificação experimental 1: 2⁵⁻¹.

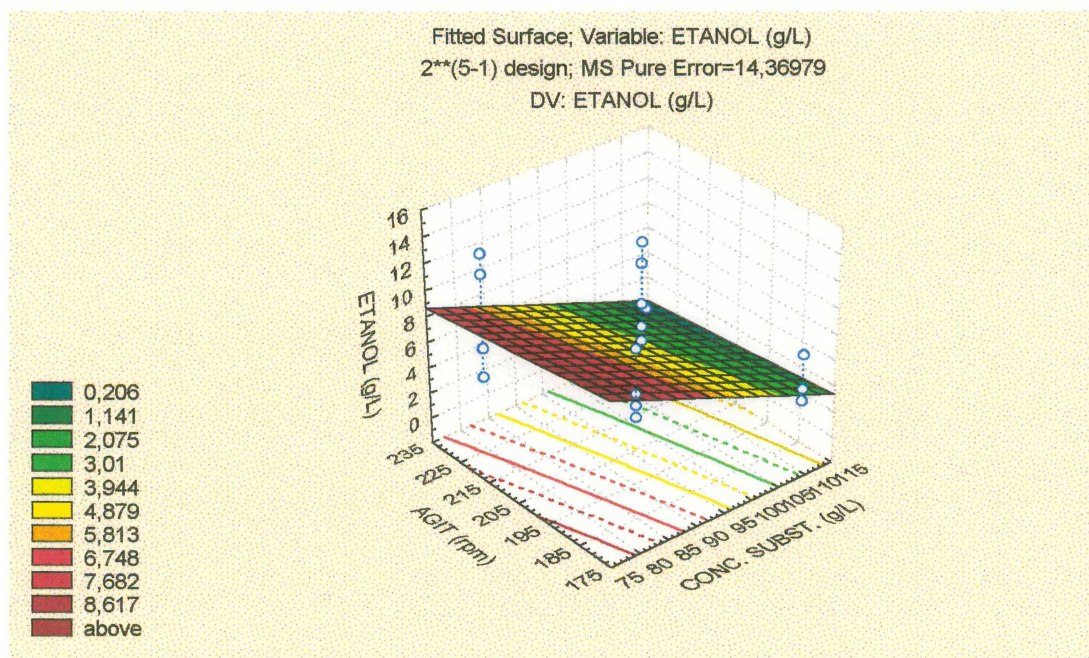


FIGURA 37: Superfície de resposta para a produção de etanol, em função da concentração do substrato e do nível de agitação, na planificação experimental 1:2⁵⁻¹.

Nos gráficos mostrados nas figuras 30, 31, e 32, observa-se a maior produção de ácido láctico no nível baixo de concentração de substrato adotado na planificação experimental (82 g/L), tendendo a aumentar em 75 g/L conforme projeção estatística do programa “statistica”. Observa-se na figura 30 que existe um aumento na produção de ácido láctico, com o aumento do nível de agitação. A figura 31 mostra que ocorre um pequeno aumento da variável resposta com a diminuição da quantidade de carbonato de cálcio adicionado aos frascos de fermentação. Da mesma forma, observa-se na figura 32 que existe um aumento na produção de ácido láctico quando foram usados valores menores de relação C/N, mostrando que nesta região de trabalho, existe uma proporcionalidade entre a biomassa formada e a quantidade de ácido láctico produzido. A figura 33 confirma que a relação C/P não é significativa na produção de ácido láctico, pois para todos os valores testados de relação C/P a resposta de ácido láctico produzido não variou. No gráfico mostrado na figura 33 a produção de ácido láctico foi função somente da concentração de substrato.

Não se conseguiu uma produção maior de ácido láctico nos níveis altos de concentração de substrato provavelmente devido aos altos teores de inibidores (furfural e hidroxi-metil furfural) presentes no caldo de fermentação, a ponto de não permitir o crescimento do fungo quando o hidrolisado é concentrado a valores de açúcar redutor maior que 100 g/L. Observa-se nas figuras 34 e 35 que a produção de biomassa, significando crescimento microbiano, tem resposta estatística negativa quando a concentração de substrato atinge valores acima de 110 g/L. De fato os valores medidos relacionados na tabela 19 mostram esta tendência.

A variação da quantidade de biomassa em função da concentração do substrato e da relação C/N mostrada na figura 34, é idêntica à variação da produção de ácido láctico, em relação a estes mesmos parâmetros, como mostra a figura 32, evidenciando uma variação diretamente proporcional entre a produção de biomassa e a produção de ácido láctico. Entretanto sabe-se que quando se utiliza valores da relação C/N baixos, menores que 14, por exemplo, a formação de biomassa é favorecida, o substrato é utilizado preferencialmente neste processo, e a produção de metabólitos fica prejudicada.

Neste experimento verificou-se também que a produção de biomassa aumenta com a diminuição da relação C/N, ou seja, com concentrações maiores de nitrogênio no meio, o que teoricamente favorece a produção de biomassa; entretanto a diferença observada neste experimento mostrada na figura 34, atribui-se ao fato de que a concentração do meio afeta de modo intenso o crescimento microbiano, e é o fator limitante do processo.

A produção de etanol, metabólito indesejável no processo de produção de ácido láctico, pois consome substrato, foi maior com valores menores de concentração de substrato conforme mostrado nas figuras 36 e 37. Os demais fatores estudados foram não significativos na produção deste metabólito. Com níveis de agitação maiores, esperava-se uma diminuição na produção de etanol, já que este é um produto do metabolismo anaeróbio do fungo, e agitações maiores significam maiores índices de transferência de oxigênio. Entretanto, na fermentação em frascos tipo erlenmeyer, devido à falta de turbulência verificou-se a formação de grandes massas compactas com o micélio fúngico, o que impede a eficiente difusão do oxigênio até as suas regiões interiores, onde certamente ocorre a predominância de reações anaeróbias com a produção de etanol.

Como a resposta ótima de produção de ácido láctico mostrou uma tendência de estar localizada nos arredores da região testada, uma nova planificação experimental foi feita. Como níveis maiores de agitação estavam limitados pelo equipamento, e a relação C/P bem como a quantidade de carbonato de cálcio adicionada aos frascos de fermentação, foram fatores não significativos na variável resposta, estes fatores experimentais foram mantidos constantes, (agitação = 230 rpm, C/P = 680 g atom/g atom e 2 g de CaCO_3 /frasco) e apenas a concentração de substrato e a relação C/N foram testadas.

4.4.2 Planificação Experimental 2: 3^2

Utilizou-se uma planificação experimental 3^2 , com dois fatores (concentração do substrato e relação C/N) em três níveis, para continuar a otimização da produção de ácido láctico, a variável resposta principal do experimento. Foram também avaliadas a produção de biomassa e de etanol como variáveis resposta secundárias. Os valores reais e codificados das variáveis experimentais estão mostrados na tabela 13.

O experimento foi feito em duplicata. Os valores das variáveis experimentais bem como das variáveis resposta estão na tabela 21.

TABELA 21: Planejamento experimental para incrementar a produção de ácido láctico a partir de hidrolisado hemicelulósico de *P. taeda* com fungo *R. oryzae* 395.

	Fatores Experimentais		Variável Resposta					
	Concentração do Substrato (g/L)	Relação C/N	Acido Láctico (g/L)		Biomassa (g/L)		Etanol (g/L)	
1	65	40	15,082	8,763	3,902	4,288	0,54	0,00
2	65	55	14,896	13,694	3,002	4,020	2,91	0,67
3	65	70	8,990	8,120	3,650	3,288	0,00	0,00
4	76	40	13,190	14,874	4,344	3,780	4,66	2,50
5	76	55	16,570	13,290	3,036	2,804	3,36	5,06
6	76	70	10,313	19,099	2,420	2,316	5,69	7,76
7	86	40	19,784	16,555	3,590	3,830	6,75	1,15
8	86	55	0	0	0	0	0	0
9	86	70	0	0	0	0	0	0

Os valores obtidos foram submetidos à análise estatística com avaliação por superfície de resposta. A análise do gráfico PARETO, mostra os fatores mais significativos para a produção de ácido láctico (figura 38).

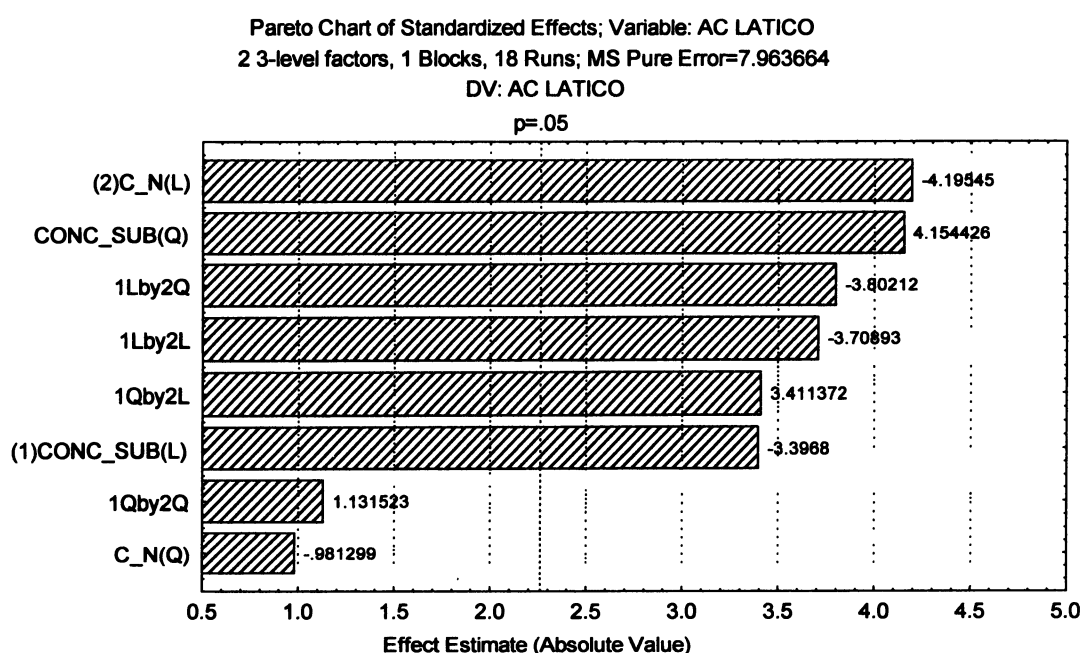


FIGURA 38: Gráfico Pareto para a produção de ácido láctico na planificação experimental 2

Os resultados obtidos para a produção de ácido láctico na planificação experimental 2, foram também submetidos à análise de variância (ANOVA), cujos resultados estão apresentados na tabela 22.

TABELA 22: ANOVA para a produção de ácido láctico na planificação experimental 2

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Media dos Quadrados	Razão -F	Valor P	
A:conc.subs L	91.8865	1	91.8865	11.5382	0.00791	^s
A: Q	131.4386	1	131.4386	16.5048	0.00283	^s
B: rel. C/N L	145.0883	1	145.0883	18.2188	0.00209	^s
B: Q	8.8705	1	8.8705	1.1139	0.31875	^{ns}
AB	320.3671	4	80.0918	10.0572	0.00223	^s
Erro Puro	71.6730	9	7.9637			
Total (corr.)	769.3239	17				
R ²	0.90684					

Onde:

F = razão entre a variabilidade entre amostras e a variabilidade dentro da amostra.

P = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5 %).

R² = fator de correlação para o ajuste da equação calculada à superfície de resposta

^{ns} = fator não significativo.

^s = fator significativo.

Da análise estatística dos dados obtidos para a produção de ácido láctico, pode-se concluir que a concentração de substrato e a relação C/N são de fato os dois fatores que definem a fermentação e que estes fatores atuam sinergisticamente, ou seja estão inter-relacionados pois a interação entre estes dois fatores é significativa.

O fator de correlação obtido na análise estatística ANOVA, (R² = 0,90864) pode ser considerado satisfatório para este tipo de experimento. Os fatores significativos ao nível de 5 % foram a concentração do substrato, a relação C/N e a interação sinérgica dos mesmos. Somente o efeito quadrático do fator B: Relação C/N foi não significativo.

Assim, a equação de regressão para a produção de ácido láctico que melhor se ajusta aos dados do experimento é a equação 8:

$$\begin{aligned} \text{Ac. Lático Prod. (g/L)} = & 23,8029 - 7,2039 A + 0,537 A^2 + 8,0873 B - 0,566 B^2 + \\ & + 0,0248 AB \quad (8) \end{aligned}$$

Onde: A e B são os valores codificados para os fatores.

Os gráficos de superfície de resposta para as variáveis resposta avaliadas, produção de ácido lático, produção de biomassa e produção de etanol em função dos fatores experimentais avaliados, concentração de substrato e relação C/N, na planificação experimental 2 são mostrados nas figuras 39 a 41:

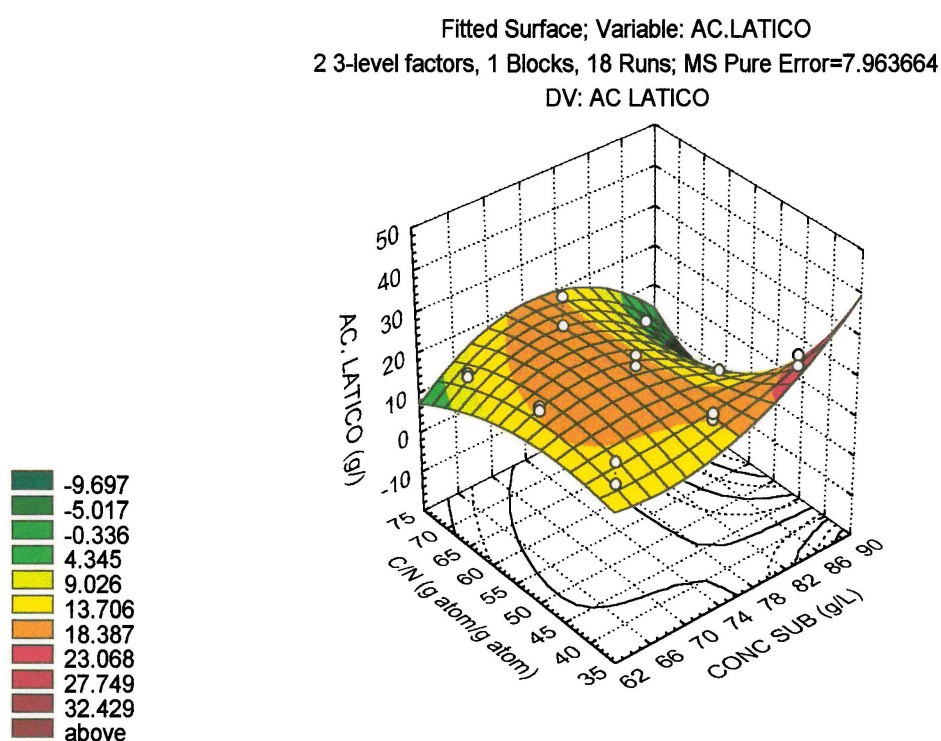


FIGURA 39: Gráfico de Superfície de Resposta para a produção de ácido lático na planificação experimental 2

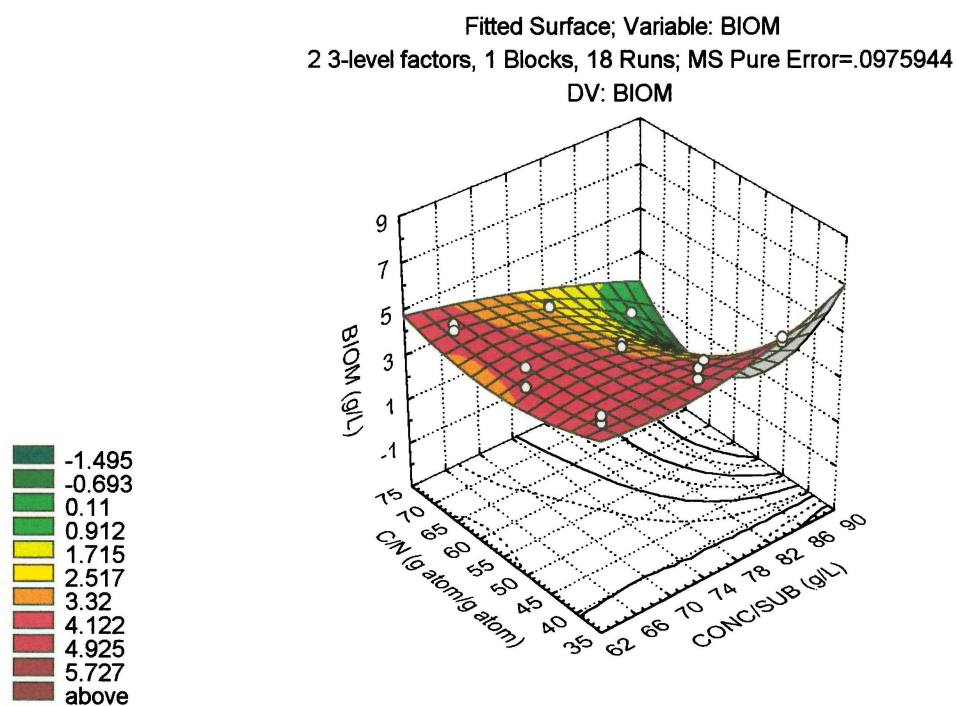


FIGURA 40: Gráfico de Superfície de Resposta para a produção de biomassa na planificação experimental 2

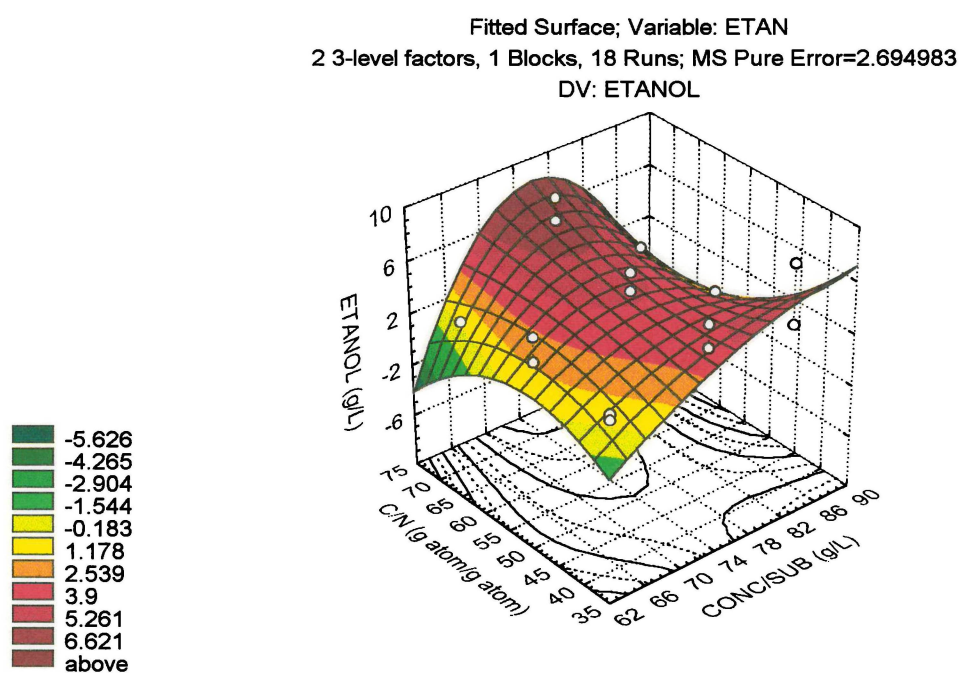


FIGURA 41: Gráfico de Superfície de Resposta para a produção de etanol na planificação experimental 2

Da análise da figura 40, verificou-se que a mínima produção de biomassa está localizada na direção de maiores relações C/N (70), e de máxima concentração de substrato (86 g/L). Mas esta é também uma região onde ocorre a mínima produção de ácido láctico (figura 39), por ser uma região muito instável quanto ao crescimento microbiano, fato atribuído à alta concentração de substâncias inibidoras no substrato. Estes dados também confirmam a tendência de proporcionalidade entre a produção de biomassa e de ácido láctico verificada anteriormente. Assim, conclui-se que, as produções de ácido láctico tendem a ser maiores para relações C/N menores (50 - 55), havendo assim suficiente biomassa produzida, e com concentração de substrato em torno de 74 g/L (figura 39). Nesta região ocorre uma baixa produção de etanol (figura 41).

SOCCOL *et alii*, (1994a), trabalhando com fermentação no estado sólido, utilizaram como substrato bagaço de cana impregnado com solução nutritiva à base de glucose na presença de carbonato de cálcio. Neste estudo conseguiram produzir 137 g/L de ácido L(+)-láctico partindo de 180 g/L de glucose, com a cepa *R. oryzae* NRRL 395. Em fermentação submersa, utilizando o mesmo microrganismo, produziram 93,8 g/L de ácido L(+)-láctico partindo de 120 g/L de glucose.

HAMMAMCI *et alii*, (1994) utilizando células de *R. oryzae* imobilizadas em alginato de cálcio produziram 73 g/L de ácido L(+) láctico partindo de uma concentração de glucose de 150 g/L, em fermentação de 44,5 horas.

MAYERHOFF *et alii* (1996), testando várias cepas de leveduras, produziram com a *Candida guilliermondii* 25,4 g/L de xilitol a partir de 75,8 g/L de açúcar redutor (glucose e xilose) de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.

Foi realizada uma nova planificação experimental 3^2 com dois fatores distribuídos em três níveis, a saber: Relação C/N 30, 55 e 70 g atom/g atom, e carbonato de cálcio adicionado por frasco 1, 2 e 3 g/frasco. A finalidade foi de avaliar a previsão estatística evidenciada na Figura 39, que mostra a tendência de maior produção de ácido láctico para concentração de substrato de 90 g/L e relação C/N de 35 g atom /g atom.

Entretanto neste experimento, não se verificou crescimento em nenhum dos tratamentos testados, mostrando que o crescimento microbiano é fortemente dependente da concentração do meio. Ou seja, a concentração de açúcares redutores de 90 g/L, leva a uma concentração de inibidores grande no caldo de fermentação a ponto de não permitir o crescimento microbiano.

Na planificação experimental 2, dos três experimentos testados com concentração de substrato de 86 g/L, apenas em um deles houve crescimento fúngico (tabela 21), mostrando que esta é de fato uma região de trabalho onde a concentração de substrato torna as condições de fermentação bastante instáveis. O fato é atribuído à presença no meio de substâncias tóxicas ao metabolismo microbiano, geradas no processo de preparo do substrato por explosão a vapor e que são concentradas juntamente com os açúcares redutores do hidrolisado de madeira, conforme relatado por NIELSEN *et alii* (1997).

Na planificação experimental 1, conforme mostrado na tabela 19, houve um bom crescimento microbiano e uma boa produção de ácido láctico para concentração de substrato de 97 g/L. Apenas com concentração de açúcares redutores de 112 g/L o crescimento microbiano ficou prejudicado. Pode-se concluir que havia uma concentração de inibidores maior no hidrolisado utilizado na planificação experimental 2. Isto é atribuído ao fato de que o hidrolisado usado na planificação experimental 1 foi produzido tratando-se a madeira a 205° C por 5 minutos, e no preparo do hidrolisado usado na planificação experimental 2, a temperatura do reator atingiu 210° C. Isto conforma o fato descrito por RAMOS *et alii* (1992b), onde a concentração de substância inibidoras geradas no processo de explosão a vapor, devido à decomposição da lignina e dos açúcares da hemicelulose, aumenta com o aumento da drasticidade das condições usadas no processo de preparo do hidrolisado.

4.5 Cinética de Crescimento e Produção de Metabólito

Foi realizado um estudo cinético, com a finalidade de melhor caracterizar o processo fermentativo nas condições definidas como ótimas para a produção do ácido láctico, de forma a acompanhar a evolução dos parâmetros importantes da fermentação: consumo do substrato, formação de biomassa e produção do ácido láctico. Devido à diferença de comportamento na fermentação do hidrolisado obtido a 205° C e a 210°C, com a finalidade

de comparação, a cinética foi realizada com os substratos produzidos nas duas temperaturas, sendo que a fermentação foi processada nas mesmas condições.

As condições utilizadas foram: concentração de substrato de 75 g/L, relação C/N 50, quantidade de carbonato de cálcio adicionado 2 g/frasco e 230 rpm e mantidas constantes nas duas fermentações.

A figura 42 apresenta a cinética do hidrolisado obtido a 210°C, com as curvas de crescimento microbiano, consumo de substrato e produção de ácido láctico, em função do tempo de fermentação.

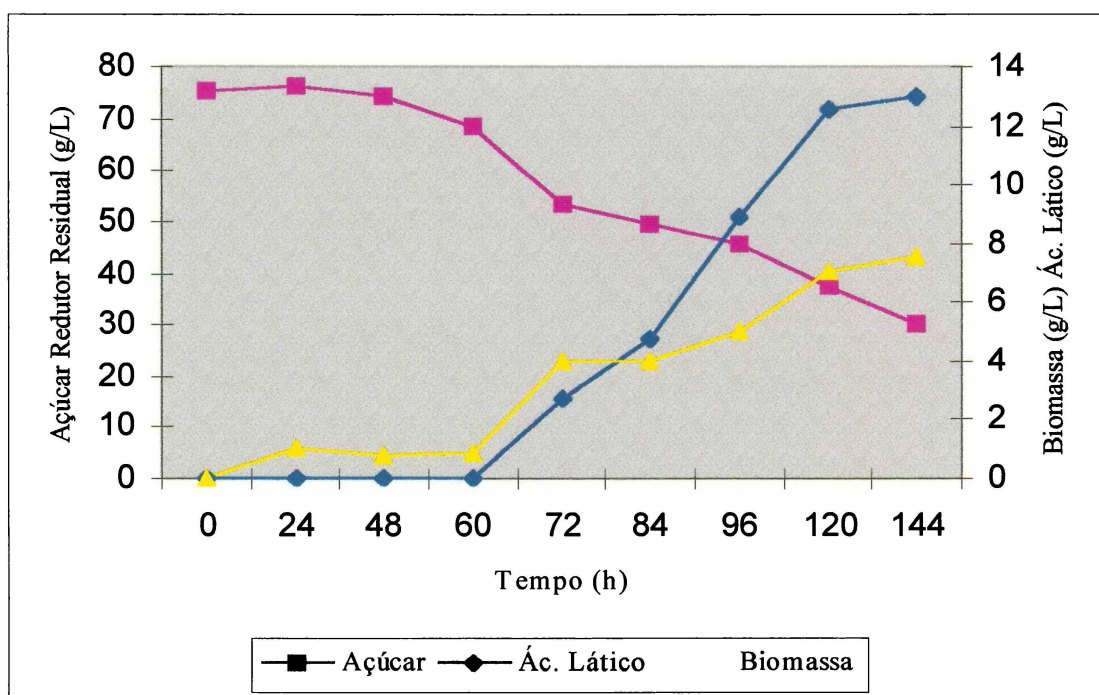


FIGURA 42: Cinética da fermentação do hidrolisado de *P. taeda*, obtido submetendo-se os cavacos de madeira a 210° C por 5 minutos.

A adição do carbonato de cálcio foi feita 48 horas (tempo = 2 dias) após a inoculação, tempo necessário para a adaptação ao meio e germinação dos esporos para a formação de biomassa. Neste tempo ainda não era observado crescimento do fungo. O

crescimento (formação de biomassa) começou a ser observado lentamente no decorrer das primeiras 12 horas após a adição do carbonato de cálcio.

Observou-se que o crescimento do fungo *R. oryzae* 395 foi bastante lento, com uma fase lag de 2,5 dias. Após este período, verificou-se um crescimento constante até o sexto dia de acompanhamento da fermentação, quando atingiu uma concentração final média de biomassa de 7,59 g/L .

Isto confirma o tempo de fermentação ótimo adotado considerando-se um período de 48 horas de adaptação do microrganismo ao substrato e mais 72 horas de crescimento e produção de metabólitos, pois nas 24 horas seguintes tanto crescimento como produção de ácido láctico foram inferiores comparados ao início da fermentação.

A produção do ácido láctico tem início 12 horas após a adição do agente neutralizante, o carbonato de cálcio. Entre 60 e 120 horas observou-se um incremento importante na concentração de ácido láctico no meio de fermentação que passou de 0 a 12,95 g/L. Entre 120 e 144 horas de fermentação observou-se uma queda de produtividade do ácido láctico, mostrando uma limitação no metabolismo do fungo, provavelmente devido a uma diminuição da concentração do substrato utilizável, embora o teor de açúcar redutor residual possa ser considerado ainda alto.

O teor de açúcar redutor residual diminuiu constantemente ao longo da fermentação, sendo que quando a mesma foi interrompida, havia ainda muito açúcar não utilizado no meio (30,2 g/L), mostrando que este estava bastante tóxico e adverso ao microrganismo.

A figura 43 apresenta a cinética do hidrolisado obtido a 205°C, com as curvas de crescimento microbiano, consumo de substrato e produção de ácido láctico, em função do tempo de fermentação.

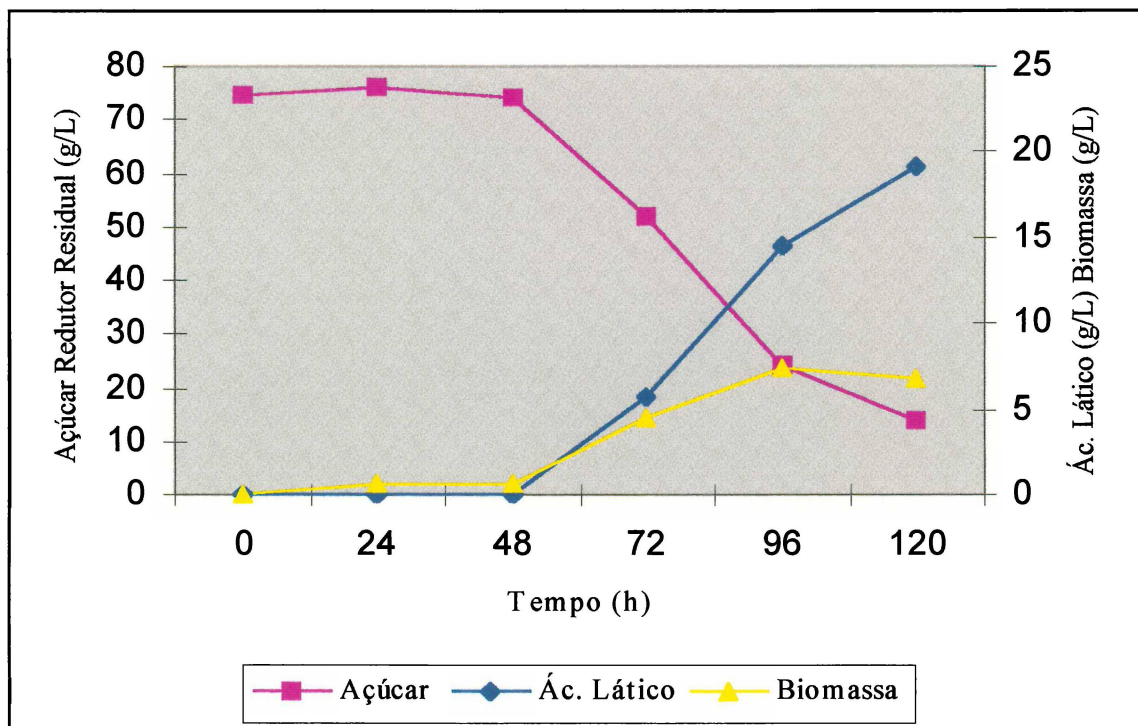


FIGURA 43: Cinética da fermentação do hidrolisado de *P. taeda*, obtido submetendo-se os cavacos de madeira a 205° C por 5 minutos.

Observou-se também neste caso uma fase lag de 48 horas, e, a partir da adição do carbonato de cálcio, um crescimento constante da biomassa até o quarto dia de fermentação, permanecendo praticamente constante até o quinto dia. O ácido láctico foi produzido ao longo de toda a fermentação, atingindo uma concentração de 19,13 g/L após 120 horas. O açúcar redutor residual no caldo de fermentação diminuiu no decorrer do processo fermentativo, até a concentração de 13,7 g/L, no último ponto acompanhado da fermentação.

Comparando-se as duas cinéticas, observou-se que na fermentação do hidrolisado produzido a 210° C, o teor de açúcar redutor residual foi de 30,2 g/L, maior do que o teor de açúcar redutor residual no final da fermentação do hidrolisado produzido a 205° C, que foi de 13,7 g/L, mesmo considerando-se o fato de que no primeiro caso a fermentação foi acompanhada por 6 dias e no segundo caso por 5 dias.

No caso da produção de biomassa, verificou-se que este parâmetro atingiu o valor de 7,58 g/L no caso do hidrolisado produzido a 210° C, ligeiramente maior do que a biomassa final produzida na fermentação do hidrolisado produzido a 205° C, que foi de 6,77 g/L. Considerou-se que a diferença não foi significativa.

Analisando-se a produção do ácido láctico, para o hidrolisado produzido a 210° C, verificou-se uma produção de 12,95 g/L até o sexto dia de fermentação, contra 19,13 g/L de produção de ácido láctico até o quinto dia de fermentação do hidrolisado produzido a 205° C, mostrando que a produção deste metabólito é fortemente afetada pela quantidade de inibidores que provavelmente estão presentes no hidrolisado produzido em condições de processamento mais drásticas, ou seja, de temperatura maior, mesmo considerando-se os dados da fermentação por mais 24 horas.

4.5.1 Fatores de conversão de substrato em biomassa e em produto

Calculando-se os fatores de conversão de substrato em biomassa e em ácido láctico para os dois casos, que estão resumidos na tabela 23, foi possível ter uma melhor avaliação do processo fermentativo nas situações estudadas.

Da mesma forma o cálculo dos parâmetros cinéticos de produtividade de biomassa e de produto, bem como de consumo do substrato, para as duas cinéticas, resumidos na tabela 24, fornecem uma melhor visualização das fermentações realizadas com os dois substratos.

Mesmo apresentando fatores de conversão de substrato em produto próximos, a fermentação do hidrolisado obtido a 205° C apresentou um melhor rendimento global, devido ao melhor aproveitamento do substrato, comparado com o aproveitamento do substrato da fermentação do hidrolisado obtido a 210° C, que apresentou um teor de açúcar redutor final relativamente alto.

TABELA 23: Parâmetros inicial e final, com os fatores de conversão de substrato em biomassa e em ácido lático calculados a partir dos dados finais da cinética da fermentação com os hidrolisados obtidos a 205 e a 210° C.

	Hidrolisado obtido a 205° C	Hidrolisado obtido a 210° C
Açúcar Redutor inicial (g/L)	74,58	75,23
Açúcar Redutor final (g/L)	13,71	30,21
Açúcar Redutor Consumido na fermentação (g/L)	60,87	45,02
Biomassa final produzida (g/L)	6,77	7,58
Fator de conversão do substrato em biomassa ($Y_{X/S}$)	0,1112	0,1684
Ácido lático produzido (g/L)	19,12	12,95
Fator de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$)	0,3141	0,2876

A não utilização completa do substrato, nos dois casos mostra que a fermentação ocorre em condições difíceis e instáveis, provavelmente devido à presença no meio de substâncias inibidoras e tóxicas, geradas no processo de produção do hidrolisado a partir da explosão a vapor de cavacos de madeira.

4.5.2 Parâmetros cinéticos do processo

As velocidades volumétricas de consumo de substrato, de formação de produto e de produção de biomassa para as duas cinéticas realizadas estão resumidos na tabela 24.

TABELA 24: Parâmetros cinéticos das fermentações realizadas com os hidrolisados obtidos a 205 e a 210°C

Parâmetro	Hidrolisado obtido a 205°C		Hidrolisado obtido a 210°C	
	Global	Após adição de CaCO ₃	Global	Após adição de CaCO ₃
Velocidade Volumétrica de Formação de Produto (r_p) (g/L h)	0,1593	0,2656	0,0899	0,1349
Velocidade Volumétrica de Produção de Biomassa (r_x) (g/L h)	0,0564	0,0940	0,0526	0,0789
Velocidade Volumétrica de Consumo de Substrato (r_s) (g/L h)	0,5073	0,8454	0,3126	0,4689

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos globais, considerou-se o tempo total de fermentação, 144 horas para o hidrolisado obtido a 210° C e 120 horas para o hidrolisado obtido a 205° C. Os mesmos parâmetros foram calculados considerando-se o tempo total de fermentação menos 48 horas, tempo em que foi adicionado carbonato de cálcio ao caldo de fermentação. Observa-se que, quando a fase lag foi considerada no cálculo dos parâmetros cinéticos, as produtividades são sempre menores.

Observa-se também que as velocidades de formação do produto foram muito maiores na cinética realizada para o hidrolisado obtido a 205° C, (global = 0,159 g/L.h e após adição do agente neutralizante = 0,2656 g/L.h) do que na cinética realizada com o hidrolisado obtido a 210° C, (global = 0,0899 g/L.h e após adição do agente neutralizante = 0,1348 g/L.h). Esta diferença também ocorre quando são analisados os dados referentes à velocidade volumétrica de formação de biomassa, porém as diferenças não são muito significativas.

Analisando-se as velocidades volumétricas de consumo do substrato, observa-se novamente grandes diferenças. Para o hidrolisado obtido a 205° C a velocidade volumétrica global de consumo do substrato foi de 0,507 g/L.h, contra 0,3127 g/L.h para o hidrolisado obtido a 210° C. A diferença se torna ainda maior quando são comparados os valores da velocidade volumétrica de consumo do substrato calculada após a adição do agente neutralizante, 0,837 g/L.h para o hidrolisado obtido a 205° C e 0,459 g/L.h para o hidrolisado obtido a 210° C.

Da análise destes parâmetros conclui-se que a fermentação do hidrolisado obtido a 210° C ocorre com muito mais dificuldade, ou seja, a assimilação do substrato pelo fungo é mais difícil. Esta dificuldade de utilização do substrato é atribuída ao fato de provavelmente haver no hidrolisado obtido a 210° C, uma concentração maior de compostos inibidores e tóxicos ao metabolismo microbiano do que no hidrolisado obtido a 205° C. A formação de compostos tóxicos em maior quantidade nos hidrolisados obtidos em condições mais drásticas, (maior temperatura) foi relatada por RAMOS (1992). Da mesma forma a presença de compostos tais como furfural, hidroxi-metil-furfural e ácido acético provenientes da degradação da hemicelulose em altas temperaturas é amplamente relatado na literatura (NIELSEN *et alii*, 1997; AHRING *et alii*, 1997; SCHMIDT & BJERRE, 1997).

4.5.3 Decaimento da DQO no caldo de fermentação

Com a finalidade de acompanhar a remoção da DQO no hidrolisado durante o processo fermentativo realizaram-se análises deste parâmetro nas amostras coletadas no

ensaio de cinética realizado com o hidrolisado obtido a 210° C, cujos resultados estão mostrados no gráfico da figura 44.

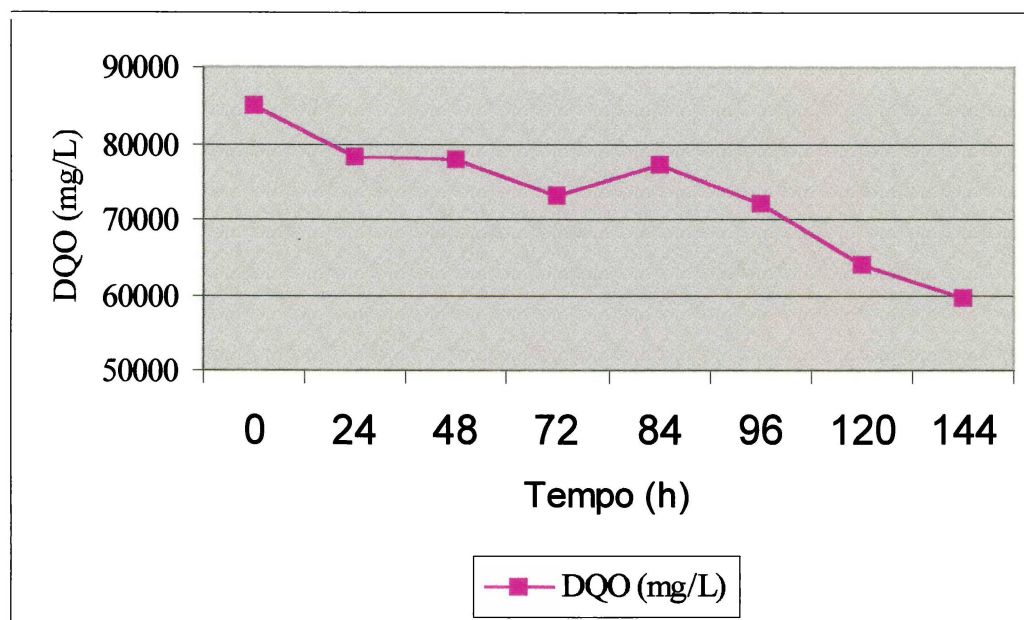


FIGURA 44: Decaimento da DQO, no processo de fermentação do hidrolisado de *P. taeda* obtido submetendo-se cavaco da madeira a 210° C por 5 min.

Observou-se que durante o processo fermentativo existe uma redução no teor de matéria orgânica no meio, traduzido na redução da DQO analisada. Conforme esperado, a redução não foi muito alta, passando de 85.000 no tempo zero, hidrolisado antes do início da fermentação, para 59.450 após as 144 horas de fermentação, apenas 30 %. Isto ocorre porque, a fermentação transforma açúcares em metabólitos também orgânicos, ácido lático, no caso analisado, com isso a redução da DQO é devida somente à fração de substrato consumido para a produção de células e à fração do substrato consumido para a manutenção de suas necessidades energéticas. Como a produção de células está limitada pela pequena quantidade de nitrogênio adicionada ao meio, por imposição do estudo, que tem o objetivo de controlar a produção de biomassa, economizando substrato para a produção de metabólitos, a redução da DQO também está limitada.

5. CONCLUSÕES

A partir da fermentação com os três substratos testados, hidrolisado de *P. taeda*, *E. viminalis* e *M. scabrella*, obtidos submetendo-se cavacos dos três tipos de madeira ao processo de explosão a vapor em condições de tratamento semelhantes, 205 °C por 5 minutos, observou-se que cada substrato forneceu uma resposta diferente em termos de metabólitos produzidos e de crescimento com relação às várias cepas de *Rhizopus* testadas. Enquanto algumas cepas não apresentaram habilidade de crescimento, outras cepas se mostraram eficientes produtoras de biomassa.

Testando-se os hidrolisados hemicelulósicos de *P. taeda*, *E. viminalis* e *M. scabrella*, com teor de açúcar redutor em torno de 56 g/L, pode-se concluir que:

- As cepas *R. arrhizus* 2582, *R. oryzae* 395, e *R. arrhizus* 28 425, se mostraram as melhores produtoras de biomassa quando o hidrolisado de *E. viminalis* foi usado, enquanto a cepa *R. arrhizus* 2582, cresceu melhor no hidrolisado de *P. taeda*.
- As cepas *R. oryzae* 395 e *R. circicans* 1475, foram as melhores produtoras de ácido láctico quando foi usado o hidrolisado de *P. taeda*, e a cepa *R. oryzae* foi a melhor produtora de ácido málico quando foi usado o hidrolisado de *E. viminalis*.
- Altas produções de etanol foram alcançadas pelas cepas *R. arrhizus* 16 179 e *R. arrhizus* 28 425, convertendo o hidrolisado hemicelulósico de *P. taeda*.

A partir dos estudos de otimização realizados utilizando a planificação experimental com análise por superfície de resposta e avaliação estatística do programa “statistica”, pode-se concluir:

- Embora o hidrolisado hemicelulósico de *P. taeda*, produzido por explosão a vapor a 205 °C mostrou ser biodegradável e um bom substrato para fermentação, o hidrolisado produzido por explosão a vapor a 210 °C, mesmo sendo biodegradável, mostrou ser um substrato de menor qualidade.
- O teor de compostos tóxicos provavelmente presentes no meio, não impediram o crescimento de algumas cepas testadas, nas concentrações avaliadas. Entretanto, concentrações maiores, em torno de 110 g/L foram limitantes ao crescimento fúngico para o hidrolisado obtido a 205 °C, e concentrações em torno de 90 g/L foram limitantes ao crescimento fúngico para o hidrolisado obtido a 210 °C.
- A maior produção de ácido láctico por *R. oryzae* 395, em hidrolisado hemicelulósico de *P. taeda*, foi obtida na planificação experimental 2, com concentração de açúcar redutor no substrato de 86 g/L e relação C/N de 40, chegando ao valor de 19,784 g/L. Entretanto, estatisticamente a produção de ácido láctico tende a ser melhor para relação C/N de 50 e concentração de açúcar redutor no substrato de 75 g/L.
- Das cinéticas realizadas com os hidrolisados hemicelulósicos de *P. taeda* obtidos a 205 e a 210 °C, concluiu-se que, o hidrolisado obtido na temperatura maior, apresentou condições qualitativas de composição química que afetaram de maneira importante o processo fermentativo, levando a uma menor produção de ácido láctico.
- A remoção de DQO no processo fermentativo foi pequena devido à limitação das condições de cultivo, que limitou o crescimento microbiano, entretanto uma redução de DQO em torno de 30% foi observada no processo.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos e as observações feitas neste trabalho permitem esclarecer muitas questões referentes à utilização de hidrolisados de madeira como substrato para processos fermentativos, e referentes às condições de pré-tratamento para obtenção destes hidrolisados. Entretanto algumas questões ainda permanecem por esclarecer e podem servir como base para futuros trabalhos de pesquisa, como por exemplo:

- O estudo cromatográfico dos hidrolisados para determinação qualitativa e quantitativa dos compostos tóxicos presentes no mesmos e comparação com o caldo fermentado, para verificar-se eventual consumo destes compostos na fermentação o que caracterizaria a detoxificação biológica destes hidrolisados.
- O estudo cinético da fermentação em fermentador de bancada para que se proceda a efetiva melhora na oxigenação do meio, garantindo processo aeróbio, que inibe a produção de etanol, metabólito não desejado no processo.
- Testar agentes químicos como carvão ativado, carbonato de cálcio e outros, em várias proporções para tentar a detoxificação química dos hidrolisados, com vistas à fermentação, para melhorar a produção do metabólito, o ácido lático.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ZEID, A.; ASHY, M. A. Production of citric acid: A review. **Agricultural Wastes**, v. 9, p. 51-76, 1984.

AHRING, B. K.; BJERRE, A. B.; NIELSEN, P.; SCHMIDT, A. S. Conversion of wheat to ethanol: A new concept. **Proceedings of the Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components**. Curitiba, p. 422-429, 1997.

ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA e SILVA, J. B.; PRATA, A. M. R. Utilização de planejamento experimental para determinação de parâmetros da hidrólise ácida de eucalipto visando a fermentação de xilose a xilitol. **XI SINAFERM**. V. 2. Universidade de São Carlos. São Paulo, p. 544 – 549, 1996.

ANTUNES, A. J.; CANHOS, V. P. **Aditivos em alimentos**. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. Coordenadoria da Indústria e Comércio : São Paulo, 178 p., S/d.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Tópicos de microbiologia industrial**. Série Biotecnologia. V. 2. São Paulo : Edgard Blücher, 2. Reimpressão, 1986. 231 p.

ATKINSON, B.; MAVITUNA, F. **Biochemical engineering and biotechnology handbook**. México : Macmillan Publishers. 2. ed., 1991. 1271 p.

BARRICHELO, L. E. G.; BRITO, J. O. A Madeira de *Pinus taeda* como matéria prima para celulose kraft. **Silvicultura - Anais do 3º. Congresso Florestal Brasileiro - V. II**, Manaus, Amazonas, p. 13-16, 1978.

- BARRICHELO, L. E. G.; BRITO, J. O.; COUTO, H. T. Z.; CAMPINHOS Jr, E. Densidade básica, teor de holocelulose e rendimento em celulose de madeira de *Eucalyptus grandis*. In: **Anais do Simpósio em Melhoramento Genético e Produtividade de Espécies Florestais de Rápido Crescimento**. Águas de São Pedro. São Paulo, p. 802-808, 1983.
- BEUCHART, L. R. Traditional fermented food products. **Food and beverage mycology**. Westport, Connecticut : Avi. Publishing Co. 1978, p. 224-253.
- BENDER, A. E. **Dicionário de Nutrição e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo : Ed. Roca. 1982.
- BOCQUET, J. Generalidades Sobre os Microrganismos. In: **SCRIBAN, R. Biotecnologia**. São Paulo : Manole Ltda., 1985. p.11-46.
- BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A.. **Engenharia bioquímica**. Série Biotecnologia. V. 3. São Paulo : Edgard Blücher. 3. Reimpressão, 1988. 300 p.
- CARPES, S. T. Pré-tratamento de *Mimosa scabrella* (bracatinga) visando a bioconversão dos hidrolisados hemicelulósicos. **Dissertação em Tecnologia Química**. Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1997.
- CARRASCO, F. Thermo-mechano-chemical pretreatment of wood in a process development unit. **Wood Science Technology**, v. 26, p. 413-428, 1992.
- DAVIDSON, J. Variation association and inheritance of morphological and wood caracteres in an improvement programme for *Eucalyptus deglupta* Blume. **Tese**. Australian National University. 1972.
- DAUBRESSE, P.; NTIBASHIRWA, S.; GHEYSEN, A.; MEYER, J. A. A process for protein enrichment of cassava by solid substrate fermentation in rural condicions. **Biotechnology & Bioengineering**, n. 29, p. 962-968, 1987.

- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood :Chemistry, Ultrastructure, Reactions.** Walter de Gruyter : New York, 1989. 613 p.
- FERREIRA, M. **Terminologia de Melhoramento Genético Florestal.** Embrapa-URPFCS, 1982. 91 p.
- FOELKEL, C. E. B.; BARRICHELO, L. E. G. **Tecnologia de Celulose e Papel.** ESALQ. Piracicaba. São Paulo, 1975. 207 p.
- FONTANA, J. D. *et alii.* Culture of the astaxanthinogenic yeast *Phaffia Rhodozima* in low- cost media . **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 57/58, p. 413 – 422, 1996.
- FRAZIER, W. C. **Microbiologia de los alimentos.** 2. ed. Zaragoza : Editora Acribia, 1976. 512 p.
- GANG, N.; HANG, Y. D., Microbial production of organic acids from carrot processing waste. **Journal of Food Science and Technology**, v. 32. n. 2, p. 119 – 121, 1995.
- GANTER, J. L. M. S. Estudo dos carboidratos de semente de *Mimosa scabrella* (bracatinga): Análise estrutural dos oligossacarídeos e propriedades reológicas da galactomanana. **Tese em Bioquímica.** Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1991.
- GANTER, J. L. M. S.; CORRÊA, J.; REICHER, F.; HEYRAUD, A.; RINALDO, M. Low molecular weigh carbohydrates from *Mimosa scabrella* seeds. **Plant. Physiol. Biochem.**, n. 29, v.2, p. 139-146, 1991.
- GARY, T.; ZIENTY, M. F. **Citric Acid: Properties and Reaction.** Miles Laboratories : USA. 1979. 84 p.

GRETHLEIN, H. E. Pretreatment for enhanced hydrolysis of cellulosic biomass. **Biotechnology Advances**, v. 2, p. 43-62, 1984.

GUARAGNA, F. G.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA, J. B.; SILVA, S. S. Avaliação de tratamentos do hidrolisado hemicelulósico de cavaco de eucalipto visando a bioconversão de xilose a xilitol. **XI SINAFERM**. Universidade de São Carlos. São Paulo, v. 2, p. 556 – 561, 1996.

HAKKI, E. E.; AKKAYA, M. S.; BAKIR, U. Amplification of a gene fragment of *Rhizopus oryzae* via RT-PCR. **Book of Abstracts. 8th European Congress on Biotechnology**. Budapest, p. 182, 1997.

HAMAMCI, H.; RYU, D. D. Y., Production of L(+) Lactic acid using immobilized *Rhizopus oryzae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 44, n. 2., p. 125-133, 1994.

HANG, Y. D. Direct fermentation of corn to L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae*. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 4, p. 299-300, 1989.

HANG, Y. D. Chitosan production from *Rhizopus oryzae* mycelia. **Biotechnology Letters**, v.12, n.12, p. 911-912, 1990.

HANG, Y. D.; HAMAMCI, H.; WOODAMS, E. E. Production of L(+) lactic acid by *Rhizopus oryzae* immobilized in calcium alginate gels. **Biotechnology Letters**, v.11, n. 2, p. 110-120, 1989.

HIGA, A. R.; CARVALHO, P. E. R. Sobrevivência e crescimento de doze espécies de eucalipto em Dois Vizinhos, Paraná. In: **Anais do Congresso Florestal Brasileiro**. Sociedade Brasileira de Silvicultura, Campos do Jordão – SP, v. 3, (42), p. 459-462, 1990.

INOUE, M. T.; RODERJAN, C. V.; KUNIYOSHI, Y.S. Projeto Madeira do Paraná. **Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná**. Curitiba, p. 38-44, 1984.

Referências Bibliográficas

- KAUOLA, H.; LINKO, Y. Y. Fumaric acid production from xylose by immobilized biocatalyses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24/25, p. 161-170, 1989.
- KHAN, J.; BAIG, M. A.; EHTEHSAMUDDIN, A. F. M. Production of lactic acid from potato by *Lactobacillus delbrueckii*. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 11, n. 1, p. 13-18, 1995.
- KIRK - OTHMER. **Encyclopedia of Chemical Technology**, 3. Ed. v. 13, 1978, p.84 - 87.
- KIRK - OTHMER. **Encyclopedia of Chemical Technology**, 3. Ed. v. 14, 1981, p.783 -785.
- KITPREECHAVANICH, V.; RATANATAGOOLDECHA, S.; YONGSMITH, B. Vitamin B12 and protein enrichment of corn meal by solid state fermentation. **Book of Abstracts. 8th European Congress on Biotechnology**. Budapest, p. 179, 1997.
- KO, S. D. Self protection of fermented foods against aflatoxin. **Proceedings of the IV International Congress of Food Science and Technology III**, p. 244-253, 1974.
- KOLICHESKI, M. B. Produção de ácido cítrico pôr fermentação no estado sólido utilizando como substrato bagaço de mandioca. **Dissertação em Tecnologia Química. Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba**, 1995.
- KOLLMANN, F. F. P.; CÔTÉ, W. A. **Principles of Wood Science and Technology** V. 1. Soli Wood. Springer-Verlag : Munique, 1984.
- LIMA, U. A. AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações. Série Biotecnologia** V. 1. São Paulo : Edgard Blücher, 5. reimpressão, 1992. 285 p.
- LITCHFIELD, J. H. Submerged culture of mushroom mycelium. In: PEPPLER, H. J. **Microbial Technology**, v. 107, 1967.

- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil.** Nova Odessa : Ed. Plantarum Ltda, 1992.
- MATHESON, A. C.; TURNER, C. H.; DEAN, G. H. Genetic variation in the pulp qualities of *Eucalyptus obliqua* L'Herit. **APPITA**, v. 39, n. 3, p. 205-212, 1986.
- MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. Seleção de leveduras para a produção de xilitol, em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. **XI SINAFERM.** Universidade de São Carlos. São Paulo, v.2, p. 550 – 555, 1996.
- MISHRA, P.; SINGH, A. Microbial pentose utilization. In: **NEIDLEMAN, S. & LASKIN, A. I. Advances in Applied Microbiology.** San Diego : Academic Press Inc, v. 39, p. 91-212, 1993.
- MORESI, M.; PARENTE, E.; PETRUCCIOLI, M.; FEDERICI, F. Optimizatiom of fumaric acid production from potato flour by *Rhizopus arrhizus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 35-39, 1991.
- MORITA, T. A.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R.; RAMOS, R. M. Fermentação de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto para a produção de xilitol. **XI SINAFERM.** Universidade de São Carlos. São Paulo, v.2, p. 562 – 567, 1996.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.
- NIELSEN, P.; LICH, D; AHRING, B. K. Fermentation of D-xylose, xylan and pretreated hemicellulose by the extreme thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacter mathranii*. **Proceedings of the Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components.** Curitiba, p. 470-477, 1997.

- OLIVEIRA, E. B. Um sistema computadorizado de prognose do crescimento e produção de *Pinus taeda* L., com critérios quantitativos para a avaliação técnica e econômica de regimes de manejo. **Tese em Engenharia Florestal**. Setor de Ciências Agrárias e Florestais. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1995.
- PADMAJA, G.; BALAGOPAL, C. Cyanide degradation by *Rhizopus oryzae*. **Journal of Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 663-669, 1985.
- PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolysates. In: **Fiechter, A. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, V. 38. Berlin : Ed. Springer-Verlag, 1989. p. 53-87.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. V. 1. Traduzido do original Microbiology, por M. A. M. Pereira. São Paulo : McGraw-Hill do Brasil, 1981. 577 p.
- PRESCOTT, S. C.; DUNN, C. G. **Industrial Microbiology**. New York : Mc Graw-Hill. 3. ed., 1959. 950 p.
- PRESCOTT, S. C.; DUNN, C. G. **Microbiologia Industrial**. Versão espanhola por Garcia, J. O.; Palasi, V.V. Valencia - Espanha : Aguilar S. A. de Ediciones , 1962. 965 p.
- RAMOS, L. P. Steam pretreatment and enzymatic hidrolisis of *Eucalyptus viminalis* chips. **Tese**. University of Ottawa. Ottawa, Ontario, Canadá, 1992.
- RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; KUSHNER, D. N.; SADDLER, J. N. Steam pre-treatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptus viminalis* wood chips. **Holzforschung**, v. 46, p. 149-154, 1992a.
- RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, L. N. Comparisom of steam pre-treatment of eucalyptus, aspen and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34/35, p. 37-48, 1992b.

- RAMOS, L. P.; EMMEL, A. Fractionation of *Eucalyptus grandis* wood chips by steam explosion. I. Process optimization. **Proceedings of the Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components**. Curitiba, p. 146-155, 1997.
- REICHER, F. Estudos sobre a localização de grupos O-acetilicos e de complexos lignina-xylana em hemicelulose nativa de *Mimosa scabrella* (bracatinga). **Dissertação em Bioquímica**. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 1984.
- RHODES, R. A.; MOYER, A.J.; SMITH, M.L.; KELLEY, S. E. Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus*. **Applied Microbiology**, v. 7, p. 74-80, 1959.
- SCHMIDT, A. S.; BJERRE, A. B. Efficiency of wet oxidation pretreatment for hemicellulose solubilization. **Proceedings of the Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components**. Curitiba, p. 117-124, 1997.
- SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. São Paulo : Editora Manole Ltda, 1984. 489 p.
- SILVA, F. T. Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana. **Tese**. Universidade Estadual de Campinas - S P. 1995.
- SMITH, J. Commercial mushroom production. **Process Biochemistry**, v. 7, p. 24-26, 1972.
- SOARES, R. V.; HOSOKAWA, R. T. Estimativa da biomassa energética de árvores de bracatinga (*Mimosa scabrella Benth*). **Boletim Técnico do IBDF**, v. 8, p. 38-47, 1984.
- SOCCOL, C. R. Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e basidiomacromicetos do gênero *Pleurotus*. **Tese apresentada para o Concurso Público de Professor Titular em Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1994. 228 p.

- SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M; LEBEAULT, J. M. Potencial of fermentation for production of L(+)lactic acid by *Rhizopus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 286-290, 1994a.
- SOCCOL, C. R.; RAIMBAULT, M.; PINHEIRO, L. I. Effect of CO₂ concentration on the micelium growth of *Rhizopus* species. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 37 n. 1, p. 203 – 210, 1994b,
- SOCCOL, C. R.; STONOGA, V. I.; RAIMBAULT, M. Production of L-lactic acid by *Rhizopus* species. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 10, p. 433- 435, 1994c.
- SOCCOL, C. R. Physiologie et metabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergee en relation avec degradation d'amidon cru et la production d'acide L (+) latique. **Tese**. Universite de Technologie de Compiègne. Compiègne. 1992.
- SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.
- SPRINGER, E. L.; HARRIS, J. F. Prehydrolysis of aspenwood with water and with dilute aqueous sulfuric acid. **Svensk. Papperstidn.**, v. 85, p. 152-154, 1982.
- STERTZ, S. C. Bioconversão da farinha de mandioca crua (*Manihot esculenta Crantz*) por fungo do gênero *Rhizopus* em fermentação no estado sólido. **Dissertação em Tecnologia Química**. Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1997. 108 p.
- STURION, J. A. Variação genética de características de crescimento e de qualidade de madeira em progênies de *Eucalyptus viminalis* LABILL. **Tese**. Setor de Ciências Agrárias e Florestais. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1993.

- SUNTORNUSUK, W.; HANG, Y. D. Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for production of L(+) lactic acid and glucoamilase. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 249-252, 1994.
- THIEMANN, J. E. Produção de enzimas por fermentação em substrato semi-sólido com especial referência as celulasas. **IV Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas. Anais V. 2. Maringá : Fundação Universidade Estadual de Maringá, 1996.**
- WAINWRIGHT, M., **Introducción a la biotecnología de los hongos.** Traduzido do original: An Introduction to Fungal Biotechnology, por Liras, S. M. Zaragoza – Espanha : Acríbia S. A., 1995. 228 p.
- WANG, H. L.; RUTTLE, D. I.; HESSELTINE, C. W. Antibacterial compound from a soybean product fermented by *Rhizopus oligosporus*. **Proc. Soc. Exper. Biol. Med.** v. 131, p. 579-583, 1969.
- WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. SO₂ prehydrolysis for hygh yield ethanol production from biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 33-34, 1988.
- YANG, C. W.; LU, Z.J.; TSAO, G. T. Lactic acid production by pellets from *Rhizopus oryzae* in a submerged system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51-52, p. 57-71, 1995.
- YU, R.; HANG, Y. D. Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+)lactic by *Rhizopus oryzae*. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 8, p. 597-600, 1989.
- ZHU, C. R.; DU, M. J.; LEI, D. N.; WANG, L. Q. A study on the inhibition of aflatoxin B-1 induced hepatocarcinogenesis by *Rhizopus delemar*. **Mater. Med. Pol.**, v. 21, n.2, p. 87-91, 1989.