**UTILIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA COMO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE  
CELULASES PELO MICRORGANISMO TERMIFÍLICO BACILLUS SP SMIA-2**

Andréia Boechat Delatorre (\*), Sílvia Alves Ladeira, Marcela Vicente Vieira Andrade Gonçalves, Beatriz Rohden Becker, Meire Lelis Leal Martins

\* Universidade Estácio de Sá – Campus Macaé

**RESUMO**

A fabricação de açúcar e álcool gera o resíduo bagaço de cana, que é constituído principalmente de materiais lignocelulósicos, que possui como principais componentes a celulose, hemicelulose e lignina. A abundância de materiais lignocelulósicos, que podem ser utilizados como matéria prima, faz aumentar o interesse na produção de celulases. O *Bacillus* sp SMIA-2, usada neste trabalho, foi isolado de solos da região Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro e sua habilidade para secretar proteases, amilases e pectinases foi verificada recentemente. Este trabalho, visando pesquisar novas cepas produtoras de celulases investigou a produção de carboximetilcelulase, avicelase e  $\beta$ -glicosidase por *Bacillus* sp SMIA-2 em culturas submersas contendo como substrato bagaço de cana de açúcar. Além disso, avaliou a influência de diferentes tratamentos químicos alcalinos (NaOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e NaOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) sobre a alteração na estrutura física do bagaço e na atividade das celulases. Os resultados mostraram que a ação dos tratamentos químicos em especial aquele em que foi utilizada as bases conjuntamente, promoveu uma perda da estrutura das fibras do bagaço. Em relação a atividade das celulases foi observado que a síntese destas enzimas está associada ao crescimento do microrganismo e que a mesma foi produzida, xii quando a cultura estava metabolicamente ativa. A utilização do bagaço de cana tratado com soluções alcalinas mostrou-se mais eficiente na síntese das enzimas do que o bagaço sem tratamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** bagaço de cana, celulases, tratamento químico, *Bacillus* sp

**ABSTRACT**

The sugarcane and alcohol production process generate bagasse as a residue, which is mainly composed by lignocellulosic material, containing as main component cellulose, hemicelluloses and lignin. The amount of lignocellulosic wastes that can be used as raw material has increased the interest on cellulases production. *Bacillus* sp. strain SMIA-2, used in this work, was isolated from Brazilian soils of Fluminense North Region of Rio de Janeiro State and its ability to produce proteases, amylases and pectinases have been previously verified. This work, in order to search for new strains producers of cellulases, investigated the carboxymethylcellulase, avicelase and  $\beta$ -glucosidase production by *Bacillus* sp. strain SMIA-2 in submerged cultures containing sugarcane bagasse. In addition, evaluated the effect of different alkaline chemical (NaOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e NaOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) treatments on the physical structure of the sugarcane bagasse fiber. The results showed that the action of the chemical treatments, in special of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  and NaOH combined, promoted a loss of structure of fibers. In respect to the cellulases activity was observed that the enzymes synthesis was growth associated and that the enzymes were produced when the culture was metabolic active. The use of the sugarcane chemically treated with alkaline solutions showed more efficient than the sugarcane bagasse without treatments.

**KEYWORDS:** sugarcane bagasse, cellulases, chemical treatments, *Bacillus* sp

**INTRODUÇÃO**

O Brasil ocupa um lugar de destaque tanto no setor produtivo quanto no aproveitamento dos resíduos de cana-de-açúcar. Este aproveitamento constitui-se em uma prática bastante generalizada, tanto para os efluentes, principalmente a vinhaça, como também para os descartes sólidos, como as tortas de filtro e o bagaço de cana. Esses resíduos se destacam pela abundância em determinadas regiões do país e pelo baixo custo. Anualmente no Brasil são produzidos milhões de toneladas de resíduos agrícolas, sendo os resíduos provenientes da cana-de-açúcar os que apresentam o maior volume de geração.

A utilização do resíduo de bagaço de cana como substratos para a produção de enzimas é uma alternativa racional, considerando o elevado teor de carboidratos presente nessa biomassa (Cunha et al., 2005; Pandey et al., 2000). O bagaço de cana contém cerca de 25 a 40% de celulose e o restante de hemicelulose (20 a 35%) e lignina (15 a 35%).



A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo e pode ser hidrolisada pela enzima denominada celulase, a qual se encontra como um complexo multienzimático (Bayer e Lamed 1992). As celulases são enzimas que possuem capacidade de romper as ligações glicosídicas de microfibrilas da celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (Dillon, 2004). A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, se divide em três grandes grupos: as endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; as exoglucanases, que atuam na região externa da celulose; e as  $\beta$ -glicosídates, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis à glicose (Lynd *et al.*, 2002).

As celulases são amplamente utilizadas em diversos ramos da indústria, como por exemplo: na indústria têxtil e de detergentes, na preparação do malte da cerveja, em processo de extração de sucos, óleos vegetais, pigmentos, alcalóides e amido. Na área de alimentação animal, é comercializada como componentes indutores de silagem e em ração para aves e suínos com a finalidade de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibras de celulose. Na área energética, essas enzimas vêm sendo empregadas em plantas piloto para obtenção de hidrolisado de celulose, que são utilizados na fermentação visando à fabricação de produtos de interesse, tal como etanol (Kubicek *et al.*, 1993).

A maior parte das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. apresenta uma variedade de sistemas de enzimas hidrolíticas e são capazes de utilizar substâncias orgânicas consistindo de misturas complexas típicas de resíduos. Estas bactérias são capazes de crescer sob condições extremas de temperatura e pH e originar produtos estáveis em uma ampla faixa de ambientes adversos (Wang *et al.*, 2007).

## OBJETIVOS

Este trabalho, na busca por novas cepas produtoras de celulases, investigou a produção destas enzimas pelo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2, quando cultivado em culturas submersas contendo como substrato o bagaço de cana de açúcar.

## METODOLOGIA

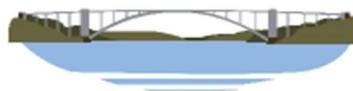
Para realização deste estudo, foi utilizado uma cultura bacteriana termofílica, *Bacillus* sp SMIA-2, isolada por Nunes e Martins (2001) a partir de amostras do solo do município de Campos dos Goytacazes, no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual do norte Fluminense (UENF). Segundo os mesmos autores, a comparação das sequências de 16S rRNA indicaram que o isolado possui 94% de similaridade com *B. caldoxylyticus* e *Bacillus* sp. espécie AK1.

Para a produção do complexo enzimático (carboximetilcelulase, avicelase e  $\beta$ -glicosídate), foi utilizado o meio de cultura contendo os seguintes nutrientes (g/L - 1 de água destilada): peptona, 1,0; KCl, 0,3;  $K_2HPO_4$ , 0,87;  $CaCl_2$ , 0,29;  $MgSO_4$ , 0,5; e traços de metais ( $CaCl_2$ ,  $2,2 \times 10^{-3}$ ; ZnO,  $2,5 \times 10^{-3}$ ;  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ,  $2,7 \times 10^{-2}$ ;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ,  $1,0 \times 10^{-2}$ ;  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $8,5 \times 10^{-4}$ ;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $2,4 \times 10^{-3}$ ;  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $2,5 \times 10^{-4}$ ;  $H_3BO_3$ ,  $3,0 \times 10^{-4}$ ;  $Na_2MoO_4$ ,  $1,0 \times 10^{-3}$ ). A este meio basal foi adicionado 0,5% da fonte de carbono (avicel, carboximetilcelulose, bagaço de cana de açúcar e bagaço de cana de açúcar submetido a diferentes tratamentos). O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,5 com NaOH 1,0M e logo após foi esterilizado por autoclavagem a 121 °C por 15 minutos.

### Pré-tratamento do bagaço

O bagaço de cana foi lavado com água destilada, seco a aproximadamente 70°C por 48 horas e triturado em moinho de facas tipo Wily, peneira 30 mesh e posteriormente peneirado em peneira de 60 mesh. Em seguida foi triturado em moinho de facas tipo Wily, peneira 30 mesh, e peneirado em peneira de 60 mesh e estocado em saco plástico, sob refrigeração, até o uso. Para facilitar o acesso das enzimas celulolíticas nas frações de celulose e hemicelulose, o bagaço foi submetido aos seguintes pré-tratamentos: i) bagaço sem tratamento nenhum (controle); ii) bagaço tratado com solução de hidróxido de sódio (NaOH - 4%); iii) bagaço tratado com solução de hidróxido de cálcio ( $Ca(OH)_2$  - 4%); iv) bagaço tratado com uma mistura das soluções de hidróxido de sódio (NaOH - 4%) e hidróxido de cálcio ( $Ca(OH)_2$  - 4%). Após cada tratamento, o bagaço foi autoclavado a 121°C por 30 minutos e após 12 horas de incubação a temperatura ambiente, o bagaço foi filtrado e lavado com água destilada previamente sua esterilização até pH neutro. Com o intuito de verificar a eficiência da hidrólise dos materiais pré-tratados quimicamente, foram determinados os teores de lignina, celulose e hemicelulose presentes nas amostras submetidas aos tratamentos, sendo o controle o bagaço in natura. As análises foram realizadas de acordo com as metodologias propostas por Van Soest (1965 e 1967), por meio da Determinação de fibra em detergente neutro (FDN) e Determinação de fibra em detergente ácido (FDA).

### Microscopia eletrônica de varredura



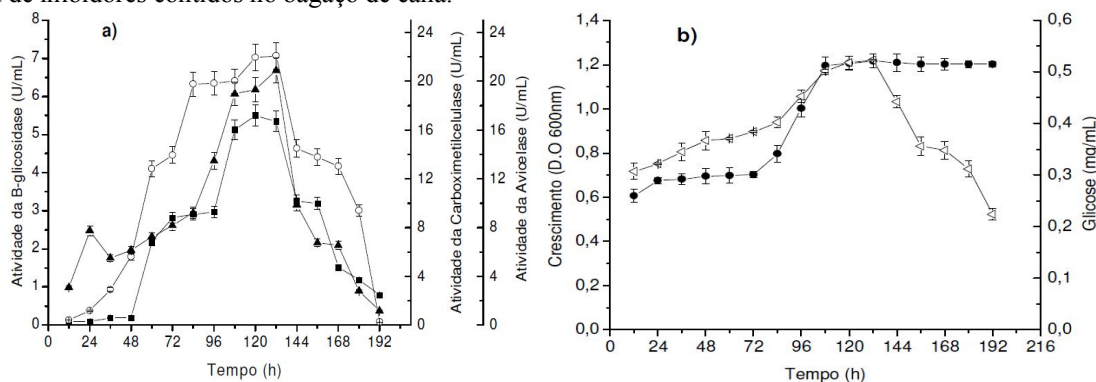
A análise da morfologia do bagaço foi realizada em microscópio eletrônico de varredura 1450 V operando a 20 kW. As amostras foram metalizadas com ouro e as imagens geradas a partir de elétrons secundários a vácuo. As amostras foram dispostas de forma que possibilitasse observar as modificações superficiais das fibras do bagaço depois do pré-tratamento.

#### Determinação da produção de celulases através de ensaio enzimático

A produção das celulases foi determinada indiretamente através da avaliação da atividade celulásica de extratos brutos do caldo de fermentação. Quando concluídas as fermentações, os meios de cultura foram centrifugados a 4500 x g por 15 min a 4 °C, e o sobrenadante livre de células foi utilizado para dosagem da atividade das enzimas. As atividades da carboximetilcelulase (CMCase) e da avicelase foram determinadas baseando-se na técnica descrita por TANAKA et al. (1981) que consistiu em conduzir a hidrólise de uma solução de carboximetilcelulose 1,0% (p/v) em tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) para a atividade da fração CMCase e de uma suspensão a 1,0% (p/v) no mesmo tampão, de celulose microcristalina (avicel) para a avicelase. A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS. A curva padrão foi feita a partir de glicose, nas concentrações de 0,2 a 1,0 g/L. Já a atividade da  $\beta$ -glicosidase foi determinada em tubo de ensaio contendo uma mistura de 0,5 mL da enzima e 2,0 mL de uma solução de p-nitro-phenol- $\beta$ -D-glicosideo (PNPG) 0,026% (p/v) em tampão Tris-HCl (0,05M e pH 8,0) foi incubada em banho-maria à 70°C durante 60 minutos. Uma unidade de  $\beta$ -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 mmol de p-nitrofenol por minuto por mL da enzima. A curva padrão foi feita a partir p-nitrofenol (PNPG) 200  $\mu$ g/mL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fontes de carbono, carboximetilcelulose (0,5%) e a avicel (0,5%), do meio de cultura foram substituídas pelo bagaço de cana (0,5%) e a atividade das celulases foram determinadas (Figura 1). *Bacillus* sp SMIA-2 demonstrou capacidade para produzir o complexo celulolítico a partir de bagaço de cana, fonte de carbono abundante e barata no Brasil. O crescimento do microrganismo foi lento até 72h de incubação da cultura. Porém a secreção das enzimas avicelase e CMCase iniciaram logo após a incubação da cultura, alcançando o valor máximo na fase estacionária de crescimento, com níveis de 20,12 U/mL e 21,65 U/mL. Estes valores de atividade foram inferiores aos encontrados quando o microrganismo foi cultivado no meio de cultura contendo a avicel e a carboximetilcelulose, possivelmente, devido à presença de inibidores contidos no bagaço de cana.

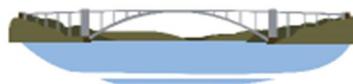


**Figura 1. Gráfico (a): atividade do complexo enzimático, carboximetilcelulose (O), avicelase (▲) e  $\beta$ -glicosidase (■), secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2. Gráfico (b): crescimento (●) e teores de glicose ( $\Delta$ ), quando cultivado no meio mineral contendo 0,5% de substrato por 192 horas a 50° C. As barras representam o desvio padrão. A ausência de barras indica que o erro foi menor do que o símbolo.**

A atividade da avicelase e da CMCase utilizando o bagaço de cana alcançou 59,09% e 16,89% do valor obtido com a avicel e a carboximetilcelulose, respectivamente, possivelmente, devido ao maior teor de lignina presente no a) b) 34 bagaço. Os valores dos teores de açúcares redutores presentes no meio de cultura também foram inferiores. Em relação à atividade da  $\beta$ -glicosidase foi observada que a secreção desta enzima ocorreu somente após 60 h de crescimento do microrganismo. A secreção mais tardia desta enzima se justifica pelo fato de a mesma atuar sobre a celobiose produzindo a glicose. A máxima atividade desta enzima foi alcançada em torno de 120 h com níveis de 5,5 U/mL, quando o microrganismo se encontrava na fase estacionária de crescimento.

#### Influência de diferentes tratamentos sobre a composição química e estrutura física do bagaço de cana.

Os teores de hemicelulose, lignina e celulose do bagaço de cana submetido aos diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 1. Com respeito aos teores de celulose, os bagaços tratados apresentaram valores menores do que o bagaço de

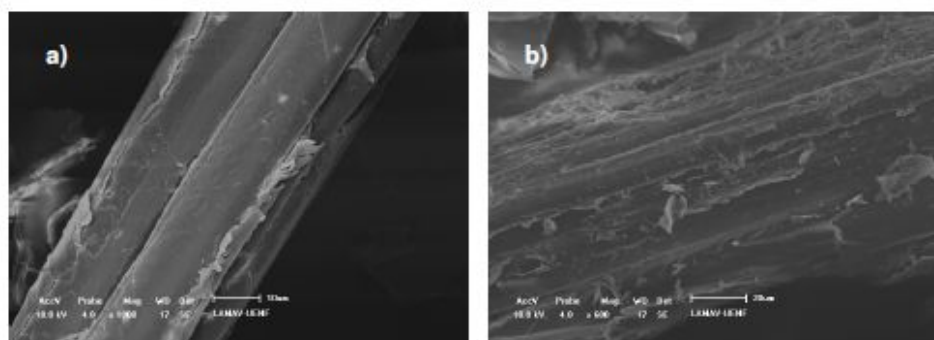


cana sem tratamento. O tratamento conjugado de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) e hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ), apresentou maior teor de celulose e menor quantidade de lignina, que é uma barreira física à ação dos extratos enzimáticos. Delatorre et al., (2018) descreve em seu trabalho que o pré-tratamento alcalino ocasionam uma diminuição do teor de hemicelulose solubilizando-a. Isso se dá devido a capacidade de extração de hemiceluloses e lignina pelas soluções alcalinas, provocando as modificações na composição química das fibras.

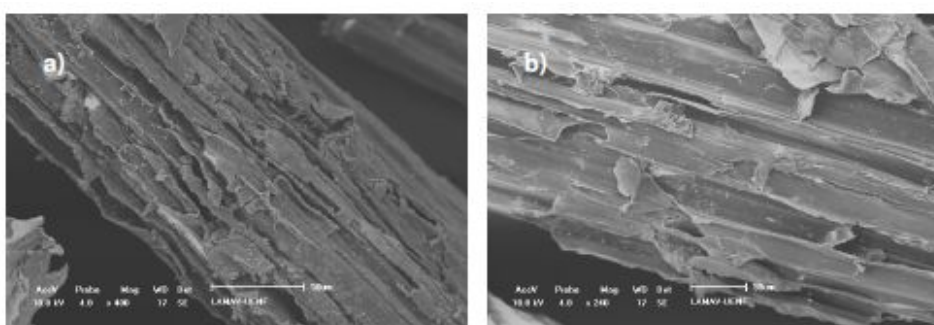
**Tabela 1. Composição do bagaço de cana de açúcar submetido a diferentes tratamentos.**

Tratamento	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Celulose (%)
Controle	18,98	22,28	50,85
NaOH	15,27	18,32	45,57
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	13,53	26,77	43,32
$\text{NaOH}.\text{Ca}(\text{OH})_2$	16,37	13,22	48,46

A ação dos tratamentos químicos sobre a estrutura física do bagaço de cana foi avaliada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na análise de superfície do bagaço exposto aos tratamentos foi possível verificar as diferenças estruturais das fibras. Na Figura 2, onde se encontra a fibra do bagaço não tratada, observa-se a disposição das fibras intactas sem nenhuma alteração ou ruptura da parede celular. Já nas Figuras 3, 4, 5, é possível notar alterações na estrutura das fibras do bagaço de cana.



**Figura 2. Estrutura do bagaço de cana de açúcar sem tratamento químico ou físico. (a) Aumento de 1000 vezes e (b) Aumento de 600 vezes.**



**Figura 3. Estrutura do bagaço de cana de açúcar tratado com hidróxido de cálcio. (a) aumento 400 vezes e (b) aumenta 240 vezes.**



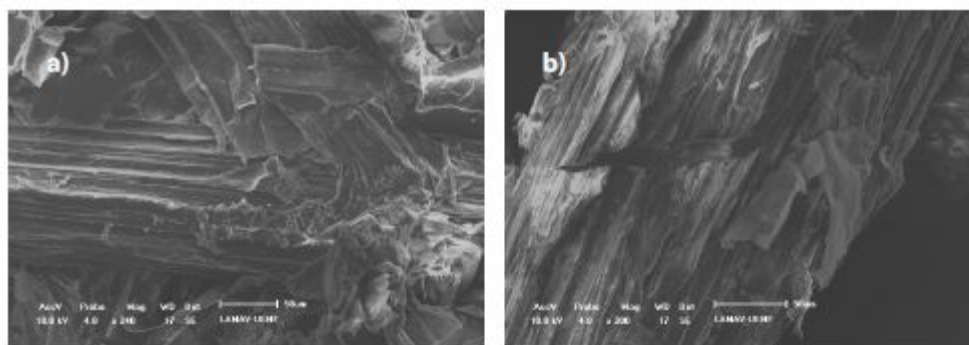
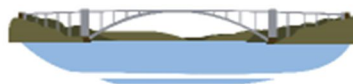


Figura 4. Estrutura do bagaço de cana de açúcar tratado com hidróxido desódio. (a) aumento de 240 vezes e (b) aumento de 300 vezes.

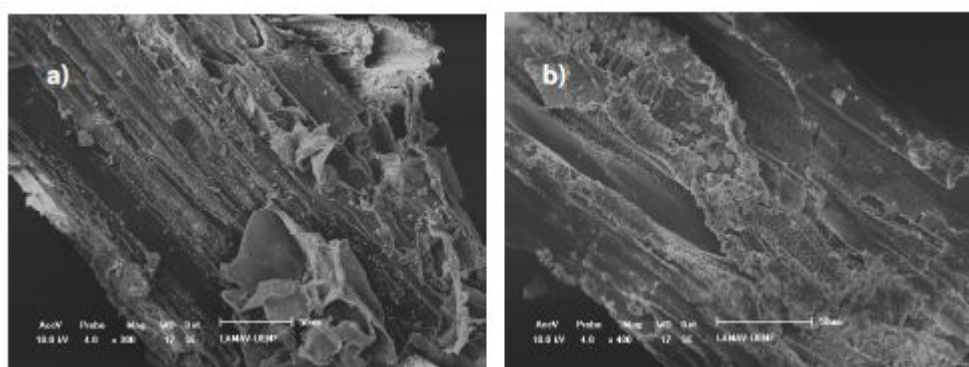


Figura 5. Estrutura do bagaço de cana de açúcar tratado com conjugado hidróxido de cálcio e sódio. (a) aumento de 300 vezes e (b) aumento de 400 vezes.

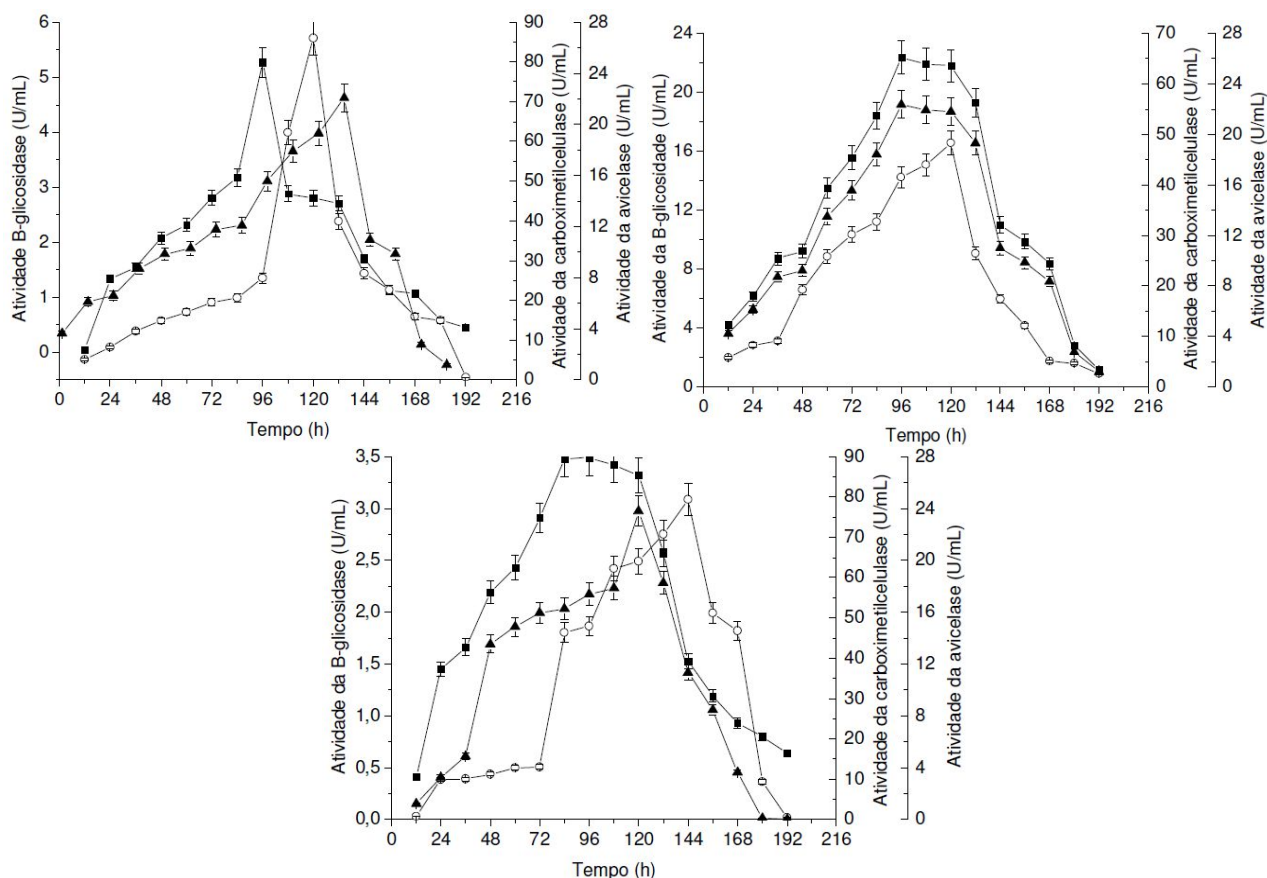
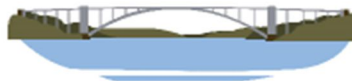
O pré-tratamento do bagaço de cana com uma combinação dos álcalis  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e  $\text{NaOH}$  foi o que causou uma maior quebra na estrutura da fibra, observada pela microscopia eletrônica de varredura. Os níveis de atividade da avicelase foram similares para os três tratamentos utilizados. Já para a carboximetilcelulase os maiores níveis foram encontrados quando o bagaço foi tratado com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  em combinação com  $\text{NaOH}$ . Os maiores níveis de atividade da  $\beta$ -glicosidase foram encontrados para o tratamento do bagaço com  $\text{NaOH}$ .

De acordo com Ferreira *et al.*, (2006), o tratamento com  $\text{NaOH}$  além de remover impurezas e tornar a superfície da fibra mais rugosa retira parcialmente a lignina da fibra e solubiliza a hemicelulose deixando a celulose mais exposta ao ataque enzimático

Delatorre *et al.*, (2019) em seu trabalho, mostrou por meio de microscopia eletrônica de varredura, que a morfologia das fibras do bagaço de cana tratadas com álcalis indicando perda da consistência fibrilar e desestruturação da lignina. Em seus resultados, o tratamento do bagaço de cana (BCT) com uma solução conjugada de 4%  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e 4% de  $\text{NaOH}$  promoveu um aumento de cerca de 4 vezes na atividade máxima da CMCase, em relação ao bagaço de cana não tratado (BCNT).

*Crescimento e atividade de celulases secretadas por Bacillus sp SMIA-2 utilizando o bagaço de cana submetido a diferentes tratamentos.*

A atividade das enzimas avicelase, CMCase e  $\beta$ -glicosidase no extrato bruto, obtido do meio de cultura contendo o bagaço de cana tratado com hidróxido e cálcio, hidróxido de sódio e o conjugado de hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio foi determinada, respectivamente. Conforme mostrado na Figura 6.



**Figura 6:** atividade do complexo enzimático, carboximetilcelulose (O), avicelase (▲) e β-glicosidase (■), secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2. Gráfico (a): meio mineral contendo 0,5% de bagaço de cana tratado com hidróxido de cálcio (b) meio mineral contendo 0,5% de bagaço de cana tratado com hidróxido de sódio (c), meio mineral contendo 0,5% de bagaço de cana tratado com o conjugado de hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio.

Na Figura 6 estão mostrados os resultados do crescimento, teores de açúcares redutores e a atividade das enzimas avicelase, CMCase e β-glicosidase secretadas no meio de cultura por *Bacillus* sp contendo como substrato o bagaço de cana tratado com hidróxido de sódio junto com o hidróxido de cálcio.

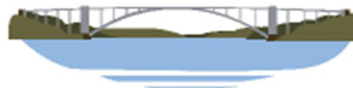
Os níveis da atividade da CMCase encontrados foram similares aos encontrados para o meio contendo o bagaço de cana tratado com cálcio e inferiores ao do meio cujo bagaço foi tratado com sódio. Além disso, foi observado que a máxima atividade desta enzima foi alcançada mais tardiamente em relação aos meios em que o tratamento com as bases foi realizado separadamente.

A máxima atividade da avicelase foi alcançada após 120 horas de crescimento do microrganismo e a máxima atividade da β-glicosidase após 72 horas. O crescimento do microrganismo foi iniciado logo após a incubação da cultura e alcançou a máxima densidade ótica em 96 horas. Um mesmo perfil dos teores de açúcares redutores foi encontrado em comparação aos meios de cultura em que se utilizou o bagaço tratado com sódio ou cálcio.

## CONCLUSÃO

*Bacillus* sp SMIA-2 secretou carboximetilcelulase e avicelase quando cultivado em um meio de cultura contendo como fonte de carbono carboximetilcelulose e avicel, respectivamente. A utilização do bagaço de cana de açúcar como substrato no meio de cultura (em substituição a carboximetilcelulose e avicel) induziu a síntese das enzimas. Os níveis de atividade encontrados foram inferiores aqueles observados quando carboximetilcelulose e avicel foram utilizadas como fonte de carbono no meio. O pré-tratamento do bagaço de cana com uma combinação dos álcalis  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e  $\text{NaOH}$  foi o que causou uma maior quebra na estrutura da fibra, observada pela microscopia eletrônica de varredura.

Os níveis de atividade da avicelase foram similares para os três tratamentos utilizados. Já para a carboximetilcelulase os maiores níveis foram encontrados quando o bagaço foi tratado com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  em combinação com  $\text{NaOH}$ . Os maiores níveis de atividade da β-glicosidase foram encontrados para o tratamento do bagaço com  $\text{NaOH}$ . As enzimas carboximetilcelulase, avicelase e β-glicosidase foram produzidas por *Bacillus* sp SMIA-2 de maneira indutiva quando em contato com o substrato celulolítico.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Delatorre, A. B.; Andrade, M. V. V.; Ladeira, S. A.; Perez, V. H.; Martins, M. L. L. **Utilização De Resíduos Agroindustriais Para A Produção De Proteases Por Fermentação Submersa Usando O Termofílico Bacillus sp Smia-2. Ciências e Cultura.** Vol. 04, n. 1, p. 41-48, 2009.
2. Delatorre, A. B.; Ladeira, S. A. Aguiar, C. J.; Almeida, T. de F.; Martins, M. L. L. **Produção de Carboximetilcelulase e Avicelase pelo Bacillus sp SMIA-2.** In: congresso sul-americano de resíduos sólidos e sustentabilidade. Gramado, 2018.
3. Delatorre, A. B.; Ladeira, S. A. Gonçalves, M. V. V. A. Aguiar, C. J.; Almeida, T. de F.; Martins, M. L. L. **Produção de carboximetilcelulase e avicelase pelo Bacillus sp smia-2 em meio contento bagaço de cana-de-açúcar.** Gestão de Resíduos Sólidos; v. 2. Ed. Atena. Ponta Grossa- PR, 2019.
4. Dillon, A. **Celulases.** In: Said, S.; Pietro, R.C.L. **Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa,** p. 243-270, 2004.
5. Nunes, A.S.; Martins, M.L.L. **Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic Bacillus.** Brazillian Journal of Microbiology, 32:p. 271-275, 2001.
6. Ladeira, S. A.; Andrade, M. V. V.; Delatorre, A. B.; Perez, V. H.; Martins, M. L. L. **Utilização De Resíduos Agroindustriais Para A Produção De Proteases Pelo Termofílico Bacillus sp em Fermentação Submersa: Otimização Do Meio De Cultura Usando A Técnica De Planejamento Experimental.** Química Nova (online). Vol. 33, N o . 2, p. 324-328, 2010.
7. Kubicek, C. P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R. L.; Kubicek-Pranz, E. M. **The Trichoderma reesei cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus.** Enzyme and Microbial Technology, v. 15, p. 90-99, 1993.
8. Lynd, L.R., Baskaran, S.; Casten, S. **Salt accumulation associated with KOH added for pH control, and not ethanol, limits growth of Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum HG-8 at elevated feed xylose concentrations in continuous culture.** Biotech. Prog. 17:118-125, 2001.
9. Pandey, A.; Soccol, C.R. Economic utilization of crop residues for value addition: a futuristic approach. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 59, p. 12-22, 2000.
10. Tanaka, K.T.; Kawaguchi, Y.; Imada, T.; Arai, M. **Purification and properties of cellobiose phosphorylase from Clostridium thermocellum.** J. Ferment. Bioeng. 79:212-216, 1995.
11. Van Soest, P.J. (1963) Use of detergents in the analysis of fibrous feed II. A rapid method for determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agriculture Chemistry**, London, v. 46, n. 5, p. 829-35.
12. Wang, F.; Podell, E.R.; Zaug, A.J.; Yang, Y.; Baciú, P.; Cech, T.R.; Lei, M. **The POT1-TTP1 telomere complex is a telomerase processivity factor.** Nature, v.445, p.506-510, 2007.