

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ÁREA DE MICROBIOLOGIA APLICADA)**

---

**RECURSOS MICROBIANOS LIGNINOLÍTICOS: POTENCIAL PARA  
DESLIGNIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE LIGNINASES**

**VIVIANE CRISTINA PADILHA LOPES**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências biológicas (Área de Microbiologia Aplicada).

**Rio Claro – 2016**

RECURSOS MICROBIANOS LIGNINOLÍTICOS: POTENCIAL PARA  
DESLIGNIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE LIGNINASES

VIVIANE CRISTINA PADILHA LOPES

Tese apresentada ao Instituto de  
Biociências do Campus de Rio Claro,  
Universidades Estadual Paulista, como  
parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Ciências biológicas (Área de  
Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lara Durães Sette  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rafaella Costa Bonugli-Santos

Rio Claro  
2016

620.1122 Lopes, Viviane Cristina Padilha  
L864r Recursos microbianos ligninolíticos : potencial para deslignificação e  
produção de ligninases / Viviane Cristina Padilha Lopes. - Rio Claro, 2016  
131 f. : il., figs., gráfs., tabs., quadros, fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biotecnologia de Rio Claro

Orientadora: Lara Durães Sette

Coorientadora: Rafaella Costa Bonugli-Santos

1. Biodegradação. 2. Biomassa lignocelulósica. 3. Tratamento  
biológico. 4. Consórcio fúngico. 5. Otimização. 6. Planejamento  
experimental. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE: RECURSOS MICROBIANOS LIGNINOLÍTICOS: POTENCIAL PARA DESLIGNIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE LIGNINASES**

**AUTORA: VIVIANE CRISTINA PADILHA LOPES**

**ORIENTADORA: LARA DURÃES SETTE**

**COORIENTADORA: RAFAELLA COSTA BONUGLI SANTOS**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Professor Doutor REGINA TERESÃ ROSIM MONTEIRO  
Centro de Energia Nuclear na Agricultura / UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Prof. Dr. JONAS CONTIERO  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. ADILSON ROBERTO GONÇALVES  
IPBEN - Instituto de Pesquisa em Bioenergia / IPBEN - Instituto de Pesquisa em Bioenergia



Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 18 de novembro de 2016

*Aos meus amados pais, Luis Lopes e  
Evanildes, ao meu irmão Luis Felipe,  
pelo amor, compreensão e incentivo por  
todos esses anos.*

*Dedico*

## **Agradecimentos**

*A Deus por iluminar minha mente e me manter persistente nesse caminho;*

*A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Lara Sette, por ter confiado a mim essa oportunidade de trabalho, pelo desafio, pela orientação e apoio;*

*A minha co-orientadora Dr<sup>a</sup>. Rafaella Bonugli-Santos pelas contribuições e dúvidas sanadas ao longo do projeto;*

*Em especial à minha família, por todo apoio desde o primeiro passo dessa jornada (2010). Não foi fácil, mas com certeza sem vocês nada disso teria valido a pena;*

*Ao Diogo Milani, meu parceiro e melhor amigo, pelas infinitas horas de apoio, atenção, amor, paciência e de “mãos à obra” no laboratório também. MUITO OBRIGADA por você existir.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) da UNESP, Rio Claro, agradeço pela oportunidade concedida;*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo;*

*Agradeço aos docentes do departamento de Bioquímica e Microbiologia ao longo desses 6 anos de qualificação, pelos conhecimentos repassados, e aos técnicos por toda ajuda prestada;*

*Ao Prof. Dr. André Rodrigues e ao LESF pela colaboração e esclarecimentos ao longo do desenvolvimento desse trabalho.*

*A Josiani Pereira (Josi) por partilhar o conhecimento adquirido desde o princípio, pela gigantesca parceria estabelecida no projeto;*

*Ao amigo “achado” no meio desse caminho tortuoso, Tássio Brito, obrigado por todos os momentos MARA, de muitas risadas, de consultas, desabafos, de festas, melhor cia de viagem, parceiro de trabalho e de futuros trabalhos. Vejo você por aí, gato...*

*A minha família “rio-clarense”, Paixão, Thithi, Beto, Amá, Miagui, Cabral, Tati, Octi, Milaninho, Vanessita, Mariana, Finha, Gú, Barbarela, sem vocês, nada disso teria sido tão especial.*

*Ao Rafael Fernandes, pela ajuda imensa nos “45 do segundo tempo” do projeto. Sem você teria sido muito mais difícil. O primeiro IC, a gente não esquece;*

*A “velha guarda” da Microbiologia: Roberta, Dú, Batata, Cesarino, Chal, Bill, Grazy, Adriano, a minha amiga querida Paixão. Aos amigos do departamento Danilo, Ana Maria, Lorena, as meninas da copa, Samanta e Priscila pela parceria e momentos de descontração, aos colegas de laboratório Mari, Gabi, Jú, Pedro, aos mais novos, Igor, Lia, Marina, Fábio, Lídia e Emília.*

*A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.*

A nossa geração tem que escolher o que ela valoriza mais: lucros de curto prazo ou habitabilidade de longo prazo no nosso lar planetário?  
— Carl Sagan

Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica esta informação.  
— Carl Sagan

## Resumo

A degradação biológica da lignina pode ser realizada por fungos de podridão branca, parda e mole, os quais produzem enzimas oxidativas especialmente lacases, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP). Neste trabalho, foi investigada a interação entre diferentes fungos filamentosos para formar consórcios capazes de remover a lignina de resíduos agroindustriais. Após triagens enzimáticas realizadas para LiP, MnP, Lacase e glicoxal oxidase (GLOX), 8 isolados apresentaram potencial para aplicação de degradação lignocelulósica e 5 fungos foram selecionados como os melhores produtores das enzimas estudadas. As capacidades de interação e inibição de crescimento dos isolados selecionados foram estudadas para posterior montagem dos consórcios. Desta maneira, 6 diferentes consórcios foram estruturados e submetidos a testes de degradação de lignina utilizando três diferentes resíduos derivados da agroindústria: sabugo de milho, casca de arroz e bagaço de cana. Dados de seletividade (celulose/lignina) foram também utilizados como parâmetro de avaliação dos consórcios. Os consórcios C5 (*Tinctoporellus* sp. e *Marasmiellus* sp. e *Aspergillus* sect. *flavi*) e C6 (*Tinctoporellus* sp. e *Marasmiellus* sp. *Fusarium* sp.) apresentaram resultados mais coerentes de degradação de lignina, seletividade e atividades enzimáticas no bagaço de cana após 7 dias a 28°C. A casca de arroz apresentou menor degradabilidade devido a uma maior resistência ao ataque microbiano. O sabugo de milho foi melhor degradado por consórcios que apresentaram habilidade em reduzir a lignina e os polissacarídeos. Sendo assim, os consórcios C5 e C6 foram submetidos aos experimentos de degradação do bagaço de cana por 15 dias. Os resultados revelaram que o consórcio C5 foi mais eficiente no processo de deslignificação e apresentou melhores resultados de seletividade. Para aumentar o rendimento da deslignificação, 3 experimentos de otimização do processo foram realizados utilizando o planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (PB). Aumentos sequenciais da deslignificação foram observados a cada experimento, onde as duas melhores condições de cultivo encontradas (PB3) apresentavam: i) inóculo fúngico (7), 8 mM de CuSO<sub>4</sub>, 0,4 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 2,5 g de bagaço de cana (ensaio 10) e ii) inóculo fúngico (7), 20 g/L de glicose, 2 g/L de extrato de levedura, 8 mM de CuSO<sub>4</sub> e 2,5 g de bagaço de cana (ensaio 5). As condições de cultivo dos ensaios 10 e 5 permitiram uma porcentagem de deslignificação correspondente a 57,65% e 49,73%, respectivamente. Os melhores resultados de seletividade (celulose/lignina e xilana/lignina) foram, de maneira geral, condizentes com os melhores resultados de deslignificação. Experimentos adicionais foram conduzidos visando avaliação da influência do sulfato de cobre no crescimento dos fungos dos consórcios e nos fungos de maneira isolada, e avaliação da deslignificação em



cultivos contendo extrato de malte e bagaço de cana. Os resultados revelaram que a presença do sulfato de cobre não interferiu na eficiência dos consórcios frente à deslignificação. Na presença do sulfato de cobre a porcentagem de seletividade da lignina do bagaço de cana pelo consórcio C5 (53,18%) foi muito próxima à obtida no PB3. Neste teste, houve produção de LiP e MnP, enquanto a lacase foi detectada na ausência do sulfato de cobre. Os resultados da deslignificação dos experimentos em meio malte e bagaço de cana foram inferiores aos resultados com o meio otimizado, destacando a importância da aplicação do planejamento experimental para a otimização de processos. Os resultados do presente trabalho evidenciam o potencial do consórcio C5 para a deslignificação do bagaço de cana em 7 dias de cultivo.

**Palavras-chave:** Biomassa lignocelulósica, tratamento biológico, consórcio fúngico, otimização, planejamento experimental.

## Abstract

Biological lignin degradation can be performed by white rot, brown, and soft fungi, which are able to produce oxidative enzymes such as lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) and Laccase. In this work, the interaction between different filamentous fungi (isolated from different environments) was investigated aiming to the structuration of consortia able to remove the lignin from agro-industrial wastes. After the enzymatic screening accomplished to LiP, MnP, laccase, and glyoxal oxidase (GLOX), 8 isolates presented potential application to lignocellulose degradation and 5 were selected as the best producers of the studied enzymes. The interaction and inhibition growth ability of the selected isolates was investigated for the subsequent consortia assembling. In this way, 6 different consortia were pooled and subjected to lignin degradation tests using 3 different waste materials derived from agro-industry: corn cobs, rice husks, and sugarcane bagasse. Data related to selectivity (cellulose/lignin) were also used for the consortia's evaluation. The consortia C5 (*Tinctoporellus* sp., *Marasmiellus* sp., and *Aspergillus* sect. *Flavi*) and C6 (*Tinctoporellus* sp., *Marasmiellus* sp., and *Fusarium* sp.) presented more coherent results of lignin degradation, selectivity, and enzymatic activities in sugarcane bagasse after 7 days incubation at 28°C. The rice husk showed lower degradability due to the higher resistance to the microbial attack. The corncob was better degraded by the consortia that showed ability to reduce the amount of lignin and polysaccharides (cellulose and xylan). In this sense, the consortia C5 and C6 were subjected to the experiments related to sugarcane bagasse degradation during 15 days. Results showed that the consortium C5 was more efficient during the delignification process and showed better results of selectivity. In order to increase the delignification efficiency, three experiments related to the process optimization were conducted using Plackett-Burman (PB) experimental design. Sequential improvements in delignification were observed to each experiment and the two better culture conditions found comprised: i) inoculum disks (7), 8 mM CuSO<sub>4</sub>, 0.4 g/L of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 2.5 g of sugarcane bagasse (assay 10), and ii) inoculum (7), 20 g/L glucose, 2 g/L yeast extract, 8 mM CuSO<sub>4</sub>, and 2.5 g of sugarcane bagasse (assay 5). The culture conditions of assay 10 and 5 allowed a delignification corresponding to 57.65% and 49.73%, respectively. In general, the better results of selectivity (cellulose /lignin and xilan/lignin) were consistent with the better results of delignification. Additional experiments were conducted in order to evaluate the effect of copper sulfate on the growth of the consortia fungal strains and the each single fungus, and to evaluate the delignification in cultures containing malt extract and sugarcane bagasse. Results reveal that the presence of copper sulphate did not interfere in the

consortia delignification efficiency. In the presence of copper sulphate the percentage of sugarcane bagasse delignification by the consortium C5 (53.18%) was almost the same that one obtained in the PB3. In general, in the presence of copper sulphate LiP and MnP were produced, while laccase was detected in the absence of this compound. Results related to the delignification in medium containing malt extract and sugarcane bagasse were lower than that ones with the optimized medium, highlighting the relevance of the experimental design to the process optimization. Results from the present study show the potential of the consortium C5 for the delignification of sugarcane bagasse in 7 days of cultivation.

**Keywords:** Lignocellulosic biomass, biological treatment, fungal consortia, optimization, experimental design.

## Lista de Abreviações

LiP – Lignina Peroxidase

MnP – Manganês Peroxidase

GLOX – Glioxal Peroxidase

SM – Sabugo de Milho

CA – Casca de Arroz

BC – Bagaço de Cana

PB – Plackett-Bunman

NERL – National Renewable Energy Laboratory

AFEX - Ammonia Fibre Explosion

CuSO<sub>4</sub> – Sulfato de Cobre

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de Potássio Monobásico

C1 – (*Marasmiellus* sp., *Aspergillus* sect. *flavi* e *Fusarium* sp.)

C2 – (*Marasmiellus* sp., *Lichtheimia ramosa* e *Fusarium* sp.)

C3 – (*Lichtheimia ramosa*, *Tinctoporellus* sp. e *Marasmiellus* sp.)

C4 – (*Aspergillus* sect. *flavi*, *Lichtheimia ramosa* e *Marasmiellus* sp.)

C5 – (*Tinctoporellus* sp. e *Marasmiellus* sp. e *Aspergillus* sect. *flavi*)

C6 – (*Tinctoporellus* sp. e *Marasmiellus* sp. *Fusarium* sp.)

## Lista de Ilustrações

- Figura 1** - Estrutura lignocelulósica ..... P.  
25
- Figura 2** - Teste qualitativo positivo utilizando guaiacol como indicador de produção de enzimas ligninolíticas..... P.  
43
- Figura 3** - Teste de antagonismo e da atividade inibitória aplicado aos 8 fungos selecionados ..... P.  
46
- Figura 4** - Árvore filogenética Neighbor-joining baseada nas sequências do gene  $\beta$ -tubulina de *Aspergillus secti Flavi* G25 ..... P.  
48
- Figura 5** - Composição do sabugo de milho, antes (*in natura*) e após o tratamento biológico e a relação entre celulose/lignina (seletividade) de 6 diferentes consórcios após 7 dias de incubação. (Média de triplicatas) ..... P.  
65
- Figura 6** - Composição da casca de arroz antes (*in natura*) e após o tratamento biológico e a relação entre celulose/lignina (seletividade) de 6 diferentes consórcios após 7 dias de incubação. (Média de triplicatas). ..... P.  
65
- Figura 7** - Composição do bagaço de cana antes (*in natura*) e após o tratamento biológico e a relação entre celulose/lignina (seletividade) de 6 diferentes consórcios após 7 dias de incubação. (Média de triplicatas) ..... P.  
66
- Figura 8** - Atividade enzimática da Glioxal oxidase após 7 dias de biotratamento dos resíduos lignocelulósicos usando os seis consórcios. (Média de triplicatas) ..... P.  
67
- Figura 9** - Atividade enzimática da LiP e MnP durante o tratamento biológico do bagaço de cana com os consórcios C5 e C6 ao longo de 15 dias. (Média de triplicatas) ..... P.  
85

<b>Figura 10</b> - Atividade enzimática da lacase durante o tratamento biológico do bagaço de cana com os consórcios C5 e C6 ao longo de 15 dias. (Média de triplicatas) .....	P.
85	
<b>Figura 11</b> - Atividade enzimática de xilanases e celulases durante o tratamento biológico do bagaço de cana com os consórcios C5 e C6 ao longo de 15 dias. (Média de triplicatas) .....	P.
86	
<b>Figura 12</b> - Atividades enzimáticas no PB 1. (Média de triplicatas) .....	P.
88	
<b>Figura 13</b> - Atividades enzimáticas do PB 2. (Média de triplicatas) .....	P.
90	
<b>Figura 14</b> - Atividades enzimáticas do PB 3. (Média de triplicatas) .....	P.
93	
<b>Figura 15</b> - Resposta da deslignificação e atividades enzimáticas do consórcio C5 nos ensaios 10 e 5 para de validação do 3ºPB. (Média de triplicatas) .....	P.
94	
<b>Figura 16</b> - Resposta da deslignificação e atividades enzimáticas dos isolados fúngicos nos ensaios 10 e 5 do 3ºPB. (Média de triplicatas) .....	P.
95	
<b>Figura 17</b> - Teste de cultivo dos ensaios 10 e 5 aplicados aos consórcios e os fungos individuais na presença de CuSO <sub>4</sub> . (Média de triplicatas) .....	P.
96	
<b>Figura 18</b> - Teste de cultivo dos ensaios 10 e 5 aplicados aos consórcios e os fungos individuais sem o CuSO <sub>4</sub> . (Média de triplicatas) .....	P.
97	
<b>Figura 19</b> - Teste de cultivo em malte aplicado aos consórcios e os fungos individuais utilizando as condições dos ensaios 10 e 5. (Média de triplicatas) .....	P.
98	

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Composição química parcial de materiais lignocelulósicos .....	P.
27	
<b>Tabela 2</b> - Dados relacionados à triagem qualitativa (meio sólido) e quantitativa (meio líquido) .....	P.
45	
<b>Tabela 3</b> - Consórcios fúngicos estabelecidos utilizando os 5 isolados selecionados .....	P.
46	
<b>Tabela 4</b> - Isolados de fungos filamentosos selecionados para identificação molecular .....	P.
47	
<b>Tabela 5</b> - Composição do sabugo de milho, antes (in natura) e após o tratamento biológico realizado para os 6 diferentes consórcios após 7 dias de incubação. Valores expressos em % .....	P.
63	
<b>Tabela 6</b> - Composição da casca de arroz antes (in natura) e após o tratamento biológico realizado para os 6 diferentes consórcios após 7 dias de incubação. Valores expressos em % .....	P.
63	
<b>Tabela 7</b> - Composição do bagaço de cana antes (in natura) e após o tratamento biológico realizado com os 6 diferentes consórcios após 7 dias de incubação. Valores expressos em % .....	P.
63	
<b>Tabela 8</b> - Níveis das variáveis estudadas no planejamento Plackett-Burman para deslignificação do bagaço de cana .....	P.
81	
<b>Tabela 9</b> - Caracterização química do bagaço de cana <i>in natura</i> e pré-tratado por 15 dias pelos consórcios C5 e C6 e a relação entre celulose/lignina (seletividade). (Média de triplicatas). .....	P.
84	
<b>Tabela 10</b> - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do PB1. <sup>a</sup> = melhores valores obtidos; <sup>c</sup> = pontos centrais. ....	P.
88	

<b>Tabela 11</b> - Análise estatística do PB 1 .....	P.
89	
<b>Tabela 12</b> - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do PB2. <sup>a</sup> = melhores valores obtidos; <sup>c</sup> = pontos centrais. ....	P.
90	
<b>Tabela 13</b> - Análise estatística do PB 2 .....	P.
91	
<b>Tabela 14</b> - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do PB3. <sup>a</sup> = melhores valores obtidos; <sup>c</sup> = pontos centrais. ....	P.
92	
<b>Tabela 15</b> - Análise estatística do PB 3 .....	P.
93	



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b> .....	17
<b>2.1. Bioenergia</b> .....	17
<b>2.2. Resíduos do setor agroindustrial</b> .....	18
2.2.1. <i>Bagaço de cana</i> .....	19
2.2.2. <i>Casca de arroz</i> .....	21
2.2.3. <i>Sabugo se milho</i> .....	22
<b>2.3. Biomassa Lignocelulósica</b> .....	24
2.3.1. <i>Composição</i> .....	24
2.3.2. <i>Pré-tratamentos</i> .....	27
2.3.3. <i>Degradação biológica</i> .....	28
<b>2.4. Fungos Ligninolíticos</b> .....	29
<b>2.5. Modificação Enzimática da Lignina</b> .....	30
2.5.1. <i>Lacases</i> .....	32
2.5.2. <i>Peroxidases</i> .....	33
2.5.3. <i>Lignina peroxidases e outras enzimas</i> .....	33
2.5.4. <i>Outras enzimas</i> .....	34
<b>CAPÍTULO 1 - Seleção de recursos genéticos com potencial produção de enzimas ligninolíticas</b> .....	36
<b>3.0. Resumo</b> .....	37
<b>3.1. Introdução</b> .....	38
<b>3.2. Material e Métodos</b> .....	39
3.2.1. <i>Fungos filamentosos</i> .....	39
3.2.2. <i>Cultivo e manutenção dos isolados</i> .....	39
3.2.3. <i>Seleção de isolados produtores de enzimas ligninolíticas</i> .....	39
3.2.3.1. <i>Triagem qualitativa (meio sólido)</i> .....	39
3.2.3.2. <i>Triagem qualitativa (meio líquido)</i> .....	39
3.2.4. <i>Seleção dos isolados e teste de inibição</i> .....	41
3.2.5. <i>Identificação taxonômica e depósito dos isolados ligninolíticos na CRM-UNESP</i> .....	41
3.2.6. <i>Montagem dos consórcios</i> .....	41
<b>3.3. Resultados</b> .....	42
3.3.1. <i>Triagem enzimática e estruturação dos consórcios</i> .....	42
3.3.2. <i>Caracterização taxonômica</i> .....	46
<b>3.4. Discussão</b> .....	49
<b>CAPÍTULO 2 – Degradação de lignina de resíduos agroindustriais por consórcios de fungos filamentosos</b> .....	53
<b>4.0. Resumo</b> .....	54
<b>4.1. Introdução</b> .....	55
<b>4.2. Material e Métodos</b> .....	56
4.2.1. <i>Preparação dos pré-inóculos fúngicos</i> .....	56

4.2.2. Material lignocelulósico .....	56
4.2.3. Tratamento biológico da biomassa lignocelulósica .....	57
4.2.4. Métodos analíticos .....	57
4.2.4.1. Análise composicional .....	57
4.2.4.2. Quantificação das enzimas ligninolíticas .....	58
4.2.4.3. Lignina peroxidase .....	59
4.2.4.4. Manganês peroxidase .....	59
4.2.4.5. Lacase .....	59
4.2.4.6. Glioxal oxidase (GLOX) .....	59
4.2.4.7 Análise estatística .....	60
<b>4.3. Resultados</b> .....	60
4.3.1. Análise do desenvolvimento e crescimento dos consórcios .....	60
4.3.2. Efeito do tratamento biológico na remoção da lignina .....	60
4.3.3. Resposta enzimática dos consórcios em relação ao cultivo em diferentes substratos lignocelulósicos .....	64
<b>4.4. Discussão</b> .....	67
<b>CAPÍTULO 3 – Avaliação de diferentes fatores na deslignificação do bagaço de cana</b> .....	73
<b>5.0. Resumo</b> .....	74
<b>5.1. Introdução</b> .....	76
<b>5.2. Material e Métodos</b> .....	77
<b><u>PARTE I</u></b>	
5.2.1. Avaliação do melhor consórcio degradador da lignina presente em bagaço de cana .....	77
5.2.2. Análise composicional .....	78
5.2.3. Avaliação enzimática .....	79
5.2.3.1. Ligninases .....	79
5.2.3.2. Celulases .....	79
5.2.3.3. Curva padrão de glicose .....	79
5.2.3.4. Xilanases .....	80
<b><u>PARTE II</u></b>	
5.2.4. Desenho experimental .....	80
5.2.5. Condições otimizadas: teste em meio malte .....	82
5.2.6. Condições otimizadas: teste com e sem CuSO <sub>4</sub> .....	82
5.2.7 Análise estatística .....	83
<b>5.3. Resultados</b> .....	83
<b><u>PARTE I</u></b>	
5.3.1. Tratamento biológico e a resposta enzimática dos consórcios .....	83
<b><u>PARTE II</u></b>	
5.3.2. Desenho experimental .....	87
5.3.3. Condições otimizadas: teste com e sem CuSO <sub>4</sub> .....	95
5.3.4. Condições otimizadas: teste em meio malte .....	97
<b>5.4. Discussão</b> .....	98
5.4.1. Seleção do melhor consórcio .....	98

5.4.2. <i>Otimização da degradação do bagaço de cana</i> .....	100
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	106
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	108
<b>8. APÊNDICES</b> .....	125

## 1. INTRODUÇÃO

Em virtude de uma alta demanda de energia baseada em fontes fósseis finitas e instáveis de combustíveis e outros derivados, novas alternativas para a substituição dessa matriz energética tem sido procurada. Dentre os recursos não-renováveis existentes, o consumo do petróleo para a geração de energia tem atingido 35% do total, seguido pelo carvão mineral (27%) e gás natural (21%) (AIE, 2012). Além disso, o constante esgotamento desses recursos naturais pode levar a uma situação caótica de desenvolvimento humano na Terra. De acordo com o relatório da Organização das Nações Unidas (ONU, 2015), a população mundial tende a chegar a 8,5 bilhões de pessoas até o ano de 2030 e em consequência disso, haverá também a necessidade de aumento no consumo de combustíveis, energia e alimentos.

Nesse contexto, políticas de utilização consciente e principalmente o investimento em energias renováveis serão a base para o controle da problemática envolvendo o petróleo. Em particular os biocombustíveis, desde os anos 80, têm apresentado bons resultados em termos de produção e utilização sendo um potencial recurso energético sustentável. O etanol, exemplo mais difundido no mundo todo, obtido através do processo de fermentação, atingiu no ano de 2010 a escala de produção de 13,2 milhões galões (FICHMAN, 2011). Atualmente, esse valor chega a mais de 22,6 bilhões de galões produzidos mundialmente, dos quais em sua grande parte são produzidos pelo Brasil e os EUA (SINGH et al., 2016). Em adição ao etanol lignocelulósico, outros tipos de monoculturas também têm sido explorados, incluindo sementes de oleaginosas, tais como, canola, girassol, soja e feijão (América do Norte, Europa e Brasil) ou de óleo de palma (Ásia), além de alguns bulbos e raízes como a beterraba e a batata. Entretanto, independentemente do sucesso do processo implementado a partir desses cultivos energéticos, alguns fatores limitantes ainda preocupam, como a segurança alimentar, a exploração da terra e a alta necessidade de irrigação.

Dessa maneira, toda a biomassa derivada de materiais lignocelulósicos oriundos do setor agrícola e industrial tem sido amplamente explorada como fonte sustentável para a geração de biocombustíveis e outros biomateriais. Muitas tecnologias têm sido desenvolvidas ao longo de 80 anos para que o custo-benefício do processo tenha condições de entrar no mercado atual. Contudo, alguns desafios ainda precisam ser vencidos, como por exemplo o pré-tratamento da matéria lignocelulósica, a eficiência da hidrólise enzimática e a recuperação do álcool final. Dentre as estratégias aplicadas a conversão de biomassa, a de maior vantagem é a utilização da sacarificação enzimática. Porém, a maior dificuldade do uso dessa técnica é a baixa acessibilidade à celulose

contida na fibra vegetal devido a sua forte associação com a lignina. Portanto, quebrar a lignina de modo a tornar a celulose mais acessível à hidrólise enzimática para a conversão é o objetivo fundamental do pré-tratamento. Sendo assim, os recursos biológicos aplicados na deslignificação têm despertado alto interesse industrial e tecnológico principalmente por se tratar de um processo economicamente mais acessível, seguro, com baixo consumo de energia e ambientalmente viável.

Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo geral, encontrar e selecionar recursos microbianos (fungos filamentosos) eficientemente ligninolíticos, bem como o conhecimento e entendimento do processo enzimático durante a deslignificação, buscando a identificação da principal enzima ou do complexo enzimático para aplicação biotecnológica referente à produção de bioetanol. Este estudo faz parte do Temático Fapesp 2010/12624-0 intitulado “Aplicação de métodos físico-químicos e enzimáticos na sacarificação do bagaço de cana: Estudos de microrganismos, processos fermentativos relacionados e métodos de hidrólise” coordenado pela Profa. Dra. Eleni Gomes (IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto). O trabalho foi organizado em três capítulos, sendo apresentado na primeira parte, uma revisão dos principais trabalhos desenvolvidos utilizando a biomassa lignocelulósica como forma de reaproveitamento de resíduos destinados a produção de biocombustível.

No capítulo 1 foi realizada a seleção de novas fontes de recursos genéticos ligninolíticos (fungos filamentosos) a partir de isolados previamente obtidos nos projetos Fapesp 2010/12624-0 (Temático), Fapesp 2010/519925-5 e Fapesp 2005/60175-2 (Temático). A seleção teve como base uma triagem qualitativa em meio sólido e uma triagem quantitativa em meio líquido. Os fungos selecionados por apresentar capacidade de produção das enzimas estudadas que não haviam sido previamente identificados foram caracterizados taxonomicamente pelo grupo de pesquisa do Prof. André Rodrigues (UNESP/Rio Claro). Com base na identificação dos fungos e nos resultados de antagonismo (em meio sólido), consórcios fúngicos foram estruturados visando a degradação de biomassa lignocelulósica.

O capítulo 2 teve como objetivo a avaliação da capacidade de degradação da lignina pelos consórcios selecionados no capítulo 1 utilizando diferentes tipos de substrato lignocelulósico, paralelamente foi realizada a avaliação da produção de enzimas ligninolíticas em cada um dos substratos estudados, visando seleção do consórcio com maior potencial de deslignificação.

No capítulo 3 foi avaliado o efeito de diferentes fatores na degradação da lignina do bagaço de cana-de-açúcar e na produção das enzimas ligninolíticas pelo consórcio

fúngico selecionado utilizando o desenho experimental e visando otimização do processo de deslignificação. A avaliação da atividade enzimática durante a degradação da lignina também foi estudada, para maior entendimento e identificação da principal enzima ou do complexo enzimático com potencial de degradação de materiais lignocelulósicos. Nesse capítulo também foi estudada a influência do sulfato de cobre no desenvolvimento dos fungos em consórcio e em separado, bem como o efeito nas atividades das enzimas ligninolíticas. Em adição, foi realizado um experimento adicional de deslignificação do bagaço de cana e meio malte visando comparação com a deslignificação obtida com o meio otimizado.

## 2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 2.1. Bioenergia

Entende-se por bioenergia, tudo aquilo que pode ser utilizado para gerar energia a partir de uma biomassa derivada de resíduos sólidos, líquidos e gasosos oriundos de matérias-primas biológicas (IEA, 2013). Isso inclui, biocombustíveis (bioetanol e o biodiesel) para transportes, produtos aplicados para gerar eletricidade e calor (lascas de madeira e *pallets*), bem como o biogás (biometano e o biohidrogênio) produzido a partir do processamento de materiais biológicos de resíduos urbanos e industriais (HO et al., 2014). Toda bioenergia pode ser uma fonte renovável, entretanto, nem toda fonte renovável gera uma bioenergia. A energia renovável é obtida de fontes naturais capazes de se regenerar. Dessa maneira, além das fontes amplamente difundidas no país, tais como, a energia hidráulica, eólica e solar, a biomassa também vem angariando espaço no setor energético brasileiro. Desde a década de 1970, com a primeira crise do petróleo, responsável pela elevação do preço do barril, a busca por matérias-primas renováveis geradoras de energia foi rapidamente explorada pelos setores acadêmicos e governamentais como alternativa de substituição ao petróleo, visando também a diminuição do impacto ambiental (SILVA, 2010).

Desde então, o uso do etanol até o presente momento, tem mostrado ser a melhor opção frente ao uso de fontes fósseis para produção de combustíveis. Nesse contexto, o Brasil é conhecido mundialmente pelo seu pioneirismo na produção do etanol de primeira geração derivado da fermentação da cana-de-açúcar. Segundo estimativas recentes da UNICA (União da Indústria de Cana-de-Açúcar, 2016), a safra de 2015/2016, produzirá em média, 617 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, sendo 28 bilhões de litros de etanol. Paralelamente a isso, a quantidade de resíduos gerados também será maior em relação à safra anterior. Mais de dois terços da atual bioenergia gerada é produzida por matérias-primas derivadas de terras cultivadas, implicando em uma crescente preocupação sobre a disputa de terras e água para a produção de alimentos e outras questões ambientais relacionadas ao manejo da terra (MUSSATTO et al., 2010). Portanto, o uso de resíduos para a produção de bioenergia tem sido foco de interesse, já que na maioria das vezes, estes encontram-se prontamente disponíveis em diversos países.

A cana-de-açúcar é apenas um, dentre vários outros tipos de biomassa produzida abundantemente no país por setores agrícolas, florestais e industriais, cujo destino final nem sempre é bem aproveitado. Além disso, algumas dessas matérias-primas acabam

sendo destinadas em geral a mercados alternativos mais remuneradores, como alimentos ou insumos para outros fins (BALAT, 2011).

Os resíduos lignocelulósicos agroindustriais são materiais com grande potencial uma vez que podem ser utilizadas não somente para a produção de etanol, mas também para a fabricação de outros produtos (SILVA, 2010). Uma grande variedade de produtos químicos pode ser desenvolvida de maneira sustentável a partir do componente principal presente em todos os resíduos lignocelulósicos, que é a lignina (OLIVEIRA, 2015; VANDERGHEM, 2011). Além disso, para a conversão dessa biomassa em energia, há uma ampla variação de tecnologias que incluem desde uma simples combustão até a aplicação de processos complexos que podem ser físicos, químicos ou biológicos ou a combinação deles.

Dessa forma, a perspectiva do uso da biomassa para a conversão de produtos de alto valor agregado irá reduzir o valor do biocombustível gerado, minimizando a geração e descarte de resíduos e principalmente reduzir a dependência de produtos à base de petróleo. A escolha de uma bioenergia moderna é um elemento chave para a transição geral de sustentabilidade por muitas razões, entre elas, a de fornecer diversas opções renováveis para finalidades diferentes implicando na mitigação da mudança climática. Entretanto, a transição energética não se trata somente de substituições dos combustíveis existentes ou implantar tecnologias de conversão. Para se estabelecer uma inovadora plataforma de bioenergia, é preciso que todas as formas (sólido, líquido e gasoso) de combustíveis sejam exploradas abrangendo vários setores, não somente o industrial e de transporte (SILVEIRA; JOHNSON, 2016). Isso significa que apenas as políticas e incentivos econômicos não serão suficientes para alcançar um sistema bem-sucedido. Obter novas soluções de energia implica no deslocamento de velhas práticas e em uma constante disseminação de novas alternativas tecnológicas e de gestão para a integração dos sistemas existentes.

## **2.2. Resíduos do setor agroindustrial**

A biomassa de resíduos agrícolas, especialmente a de resíduos lignocelulósicos não é vista somente como uma fonte sustentável geradora de eletricidade para muitas indústrias, mas também um recurso para a produção de biogás e combustíveis de segunda geração em países em desenvolvimento (ZHONG et al., 2011). Estima-se que a América Latina tenha o maior potencial para produção de biomassa mesmo levando em conta a produção de alimentos e algumas limitações de recursos (JANSSEN; RUTZ, 2011; RAMBO et al., 2015). O Brasil faz parte desses importantes países produtores de grandes



quantidades de biomassa residual. Graças a algumas particularidades propícias na produção de biomassa como, condições geográficas favoráveis, solos e condições climáticas agricultáveis, radiação solar por longos períodos e diversas opções de cultivo a serem aplicadas o ano todo (SANTOS, 2014). Os resíduos agrícolas, tais como, palhas, cascas de cereais, sementes e frutas, lascas de madeira, folhas verdes, melaço, vinhaça, entre outros, são potenciais fontes de energias renováveis. Essas matérias-primas de segunda geração derivadas de biomassa lignocelulósica podem ser classificadas em três grupos principais: (I) homogêneos, tais como, lascas de madeira oriundas de cultivos energéticos; (II) quase homogêneas, incluído resíduos agrícolas e florestais; e os (III) não-homogêneos, que englobam os resíduos sólidos municipais e industrial (HO et al., 2014; LEE; LAVOIE, 2013). Esses materiais contêm energia química armazenada a partir da radiação solar transformada em energia. Essa energia química pode ser diretamente liberada por combustão ou convertida alternativamente em outras fontes de energia de acordo com a finalidade do processo. Em busca da minimização de impactos ambientais provocados pelo descarte em massa desses resíduos ou da própria queima para geração de energia, desde 2010, têm sido investigadas alternativas de empregabilidade dessa biomassa na geração de biocombustíveis e na produção de alguns químicos (COTANA et al., 2014). Anualmente, toneladas de resíduos de cultivos de cana-de-açúcar, soja, milho, mandioca, café, entre outros são descartadas no Brasil. A seguir estão descritos os resíduos utilizados no presente estudo como substratos para o crescimento microbiano visando deslignificação.

### **2.2.1. Bagaço de cana**

No Brasil, o etanol é produzido exclusivamente pela cana-de-açúcar, com o *ranking* médio de produção de 7.500 L/hectare (NOVA CANA, 2016). É um sistema de agroenergia bastante eficiente, devido a ótima adaptação da cana em relação ao solo e climas brasileiros. Atualmente, a cana é produzida por 23 estados brasileiros, dentre os quais, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Pernambuco são os de maior destaque. Frente a esse sistema, o bagaço de cana surge como resíduo derivado da moagem da cana-de-açúcar que é composto de fibras e resquícios de caldo. Nos últimos anos, têm-se buscado o aumento da produção e rendimento da cana e ao mesmo tempo o aumento da fração de biomassa a ser transformada (SOCCOL et al., 2010).

A cada tonelada de cana-de-açúcar moída na indústria, são gerados cerca de 250 a 300 kg de bagaço úmido (CANAONLINE, 2016; BURGI, 1995). Este é um material

lignocelulósico oriundo, sobretudo, das indústrias de açúcar e álcool, encontrado em grandes quantidades e bastante valorizado como matéria-prima na fabricação de bioetanol, especialmente em países de clima úmido e tropical, como o Brasil, Índia, Malásia e China (MARTÍN et al., 2007). Sua composição pode ser muito variada, já que este material depende de uma enorme quantidade de aspectos correspondentes ao cultivo de cana-de-açúcar, onde: a variedade, as condições climáticas, o estágio de maturação da planta, as propriedades químicas e microbiológicas do solo, entre outras, irão interferir na classificação estrutural dessa biomassa (BRIENZO et al., 2014).

De acordo com Brienzo e colaboradores (2014), a cana pode ser dividida em colmos (caule), folhas e raiz, tendo uma complexa formação intermediada por nós e entrenós, caracterizados por uma epiderme composta de diferentes células com diferentes tipos de paredes celulares. Esta característica da cana é, portanto, considerada um dos grandes desafios a ser vencido na conversão desse material em biocombustíveis. Contudo, do ponto de vista físico, o bagaço também é formado por um conjunto de fragmentos bastante heterogêneos sendo constituídos de 50% de umidade, 45% de estruturas fibrilares e 5% de extrativos e outros componentes inorgânicos (metais) (MARABEZI, 2009). Quimicamente, o bagaço compreende a celulose, hemicelulose, lignina e extrativos bem como a maioria das biomassas vegetais. Para Cowling e Kirk (1976), essa composição foi estimada em 25-40% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 15-35% de lignina. Recentemente, outros autores determinaram esses teores em 42,3% de celulose, 28,8% de hemicelulose, 24,7% de lignina e 3,5% de extrativos e cinzas, respectivamente (ROCHA et al., 2012; ROCHA et al., 2015). Dificilmente o resultado dessas caracterizações alcançará um balanço de 100% na massa, principalmente se o número de etapas e análises desse processo forem estendidos, ocasionando erros ou sobreposições de valores. Por esse motivo, a composição química da cana não é um padrão observado em todas as espécies, visto que, essa planta sofre diversas influências durante o período de cultivo.

Por anos, a principal função do bagaço foi mantida como fonte de energia elétrica e de aquecimento aplicadas na própria usina para manutenção das caldeiras, entretanto, a grande quantidade gerada dessa biomassa não acompanha a co-geração, acarretando no problema de disposição e armazenamento. Nas indústrias de polpa e papel o consumo do bagaço é apreciado, pois além de mais barato, emite uma quantidade relativamente menor de gases estufa durante o processamento do papel se comparado com lascas de madeira e necessita de uma quantidade ínfima de branqueadores químicos (AMARASEKARA, 2014). O bagaço de cana tem sido utilizado como material

adsorvente de baixo custo para remoção de algumas substâncias poluentes tais como, metais pesados, fenóis e corantes (BONI et al., 2016; VIEIRA et al., 2010; FERREIRA et al., 2015). Além disso, também tem sido destinado para produção de ração animal, na construção civil como material alternativo, utilizados como adubo em solos, e também na geração de biomassa microbiana (DOHERTY et al., 2011).

### **2.2.2. Casca de Arroz**

O arroz é um dos mais importantes alimentos básicos para uma grande parte da população humana, especialmente na Ásia Oriental, Sudeste da Ásia, Sul da Ásia, Oriente Médio, e no oeste da Índia. É considerado o segundo maior grão consumido seguido do trigo. Dentre os países produtores de arroz pertencentes ao bloco do Mercosul, o Brasil é responsável por 75,75% (12 milhões toneladas) da produção deste cereal (CONAB, 2015). São esperadas 10,4 mil toneladas colhidas desse grão para a safra de 2016. Cada kg de grão colhido é acompanhado por uma produção de 1,5 kg de palha de arroz (MAIORELLA, 1985). Este dado revela uma estimativa de que entre 700-800 toneladas de resíduos são gerados por ano globalmente, da qual grande parte é destinada a alimentação de gado e o restante é descartado como resíduo agrícola (AMARASEKARA, 2014).

A prática mais comum entre os agricultores tem sido a queima desse material para a retirada do resíduo dos campos de beneficiamento, já que as opções de armazenamento ou disposição da palha e da casca de arroz são limitadas por sua baixa densidade, lenta degradação no solo, e pela ameaça de alojamento de doenças no caule do arroz. Entretanto, em consequência dessa prática, pode haver um aumento intrínseco da emissão de gases na atmosfera e comprometer a qualidade da saúde pública devido a poeira respirável contendo sílica cristalina e outras substâncias perigosas (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). As cinzas obtidas após a queima dessa biomassa possuem de 87 a 95% de sílica, fonte apropriada para a fabricação de materiais à base de silicone (OLUPOT et al., 2016).

Além do uso da casca de arroz para a produção de biocombustíveis, esse resíduo pode ser utilizado na fabricação de painéis particulados, placas de isolamento, placas utilizadas como teto, adicionados em tijolos, artigos cerâmicos e de vidro, e até usado como fertilizante. No país, apenas uma pequena parte da energia elétrica gerada é oriunda da queima dos resíduos derivados especificamente do arroz, 9MW dos 200 MW consumidos em geral. Apesar dos grandes benefícios apontados para aplicação da casca de arroz, somente 17% da produção mundial é aproveitado a cada ano, ressaltando,

portanto, que uma enorme quantidade ainda permanece sem destino (OLUPOT et al., 2016).

Bem como qualquer outra biomassa vegetal, a composição química da casca de arroz também pode variar em função das espécies, de fatores ambientais e de maturidade da planta. Este resíduo possui uma quantidade elevada de celulose e hemicelulose e por isso é vista como fonte propícia para hidrólise de açúcares fermentescíveis. A casca de arroz, corresponde a 23% da quantidade total de resíduos advindos do cultivo do arroz, sendo este em média quimicamente composta por 34,4% de celulose, 16,2% de xilana, 1,3% de arabinana e 23% de lignina (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). Alguns estudos têm mostrado que para obtenção desses açúcares, é necessário o uso de algum tipo de pré-tratamento na biomassa, antes da hidrólise enzimática. Esse comportamento segue válido para a maioria das biomassas de resíduos agroindustriais, onde a grande dificuldade está no rompimento da camada de lignina e no acesso dos carboidratos. Sendo assim, com a casca de arroz, alguns métodos já foram empregados como, entre outros, aquecimento (110°C), uso de solventes (ANG et al., 2012; LYNAM et al., 2012), uso de micro-organismos (POTUMARTHI et al., 2013; GHORBANI et al., 2015). Para melhorar a natureza recalcitrante dessa biomassa o pré-tratamento precisa ser um passo eficiente para que essa estrutura complexa se rompa a fim de remover as pentoses e hexoses da camada hemicelulósica sem que haja a formação de compostos inibidores durante esse processo.

### **2.2.3. Sabugo de milho**

O sabugo de milho é um resíduo lignocelulósico sólido derivado do debulhamento do milho, bem como a palha, que são abandonados em campo após a colheita e se tornam resíduos excedentes e sem aproveitamento direto. Com plantações mundialmente agricultadas, o milho é destinado principalmente a alimentação humana e animal devido a suas conhecidas propriedades nutricionais. É um tipo de monocultura anual que se adapta bem a várias condições ambientais. Diversos países tem o cultivo do milho como base para produção de outros derivados e fazem desse cereal o principal produto de exportação. Além disso, a utilização do milho não é semelhante entre os países que o produzem. No México, o milho é a base da alimentação da população, enquanto que os Estados Unidos e o Canadá, utilizam para produção de ração animal, para combustíveis e exportação (SILVEIRA, 2010). No Brasil, 65% são destinados a alimentação animal e 11% é usufruído pela indústria com diversas finalidades, tais como, a fabricação de espessantes, colantes e óleos a partir de sementes (SILVEIRA, 2010).

Espera-se que a safra mundial de 2016/17, arrecade mais de 1 bilhão de toneladas desse cereal, sendo os EUA responsável por mais de 50% da produção, além da China, Índia, Brasil, Argentina, França e África do Sul (USDA, 2016). No Brasil a produção média/ano do milho, é estimada entre 76-86 milhões de toneladas (CONAB, 2016). Entretanto, como nem toda parte dessa planta é utilizada de forma direta, ocorre uma subutilização dos resíduos gerados. Resíduos estes que tem a possibilidade de serem aproveitados para geração de outros produtos com alto valor agregado. Recentemente, a proposta de agregar valor a esses resíduos que anteriormente não eram aproveitados, têm atraído a atenção de muitos produtores devido a rentabilidade e o lucro agregado ao ciclo de produção de cereais. Dessa forma, o sabugo de milho entra nessa categoria de resíduo lignocelulósico cujo potencial ainda não foi totalmente explorado (LATIF et al., 2011).

Estruturalmente o sabugo é formado por celulose (31,7%), hemicelulose (34,7%) e lignina (20,31%) (AGUIAR, 2010; SANTOS, 2014). No entanto, a hemicelulose, fração majoritária contida em cereais e gramíneas compreende em grande parte moléculas de xilana, um polímero de cadeias lineares  $\beta$ - (1,4) ligadas a resíduos d-xilopiranosilo (EILEN, et al., 2011; LI, et al., 2016). Esse polímero confere aos cereais maior vantagem em relação aos outros tipos de biomassa, já que apresenta em sua composição uma quantidade desejável de açúcares disponíveis ao reaproveitamento e promissores para produção de bioetanol.

Segundo Kim; Dale (2004), se os resíduos do milho fossem plenamente utilizados como matéria-prima para a produção de bioetanol, então 9,3 GL de bioetanol poderiam ser produzidos para substituir 6,3 GL de gasolina se este fosse utilizado como combustível veicular. Nesse mesmo contexto, Li, et al. (2016) também destacaram o potencial aproveitamento de outros resíduos derivados do milho como o caule, folha, flor e a palha durante o processo de sacarificação para produção de etanol. Contudo, o melhor rendimento de etanol observado, foi obtido a partir do sabugo de milho ( $24.0 \text{ g L}^{-1}$ ). Assim como o bagaço de cana possui diferenças em sua composição estrutural, na planta como um todo, o sabugo de milho também compartilha da mesma problemática, influenciando diretamente na produção desse biocombustível.

Além do bioetanol, o sabugo de milho do ponto de vista industrial já vem sendo aproveitado e aplicado desde a década de 80, nos mais diversificados ramos desde a produção de explosivos utilizando sua farinha; como veículos de vitaminas; e até a obtenção de novos compostos químicos como o furfural (LOPES, 2015; FOLEY; VANDER-HOOVEN, 1981). Em parâmetros industriais, o sabugo de milho pode ser empregado na fabricação de óleos vegetais como aditivos, pode ser utilizado como fonte

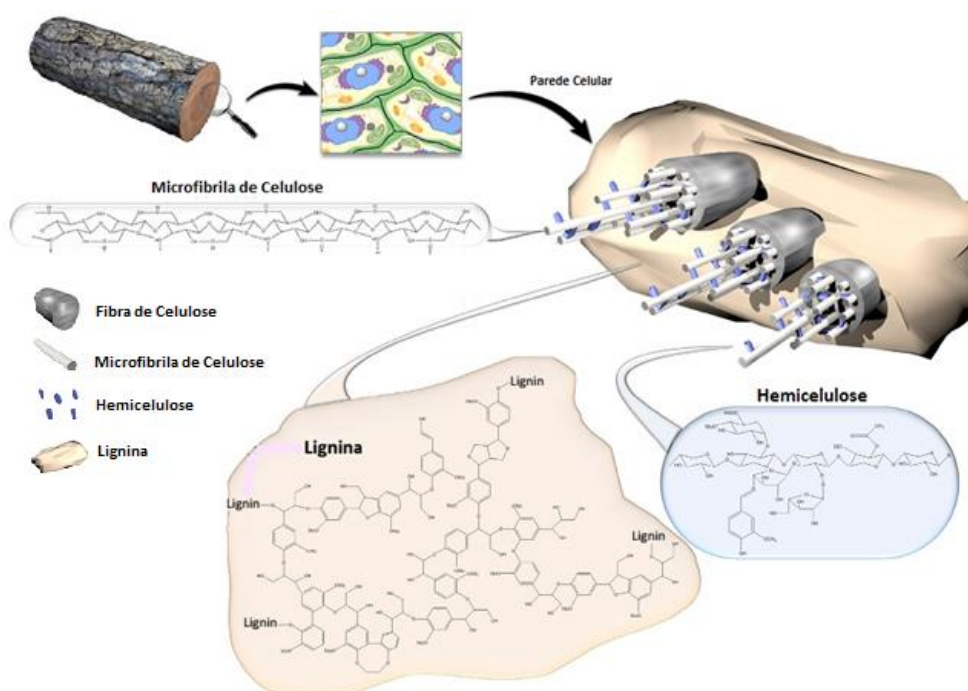
de fibras alimentares destinadas a fabricações de alimentos como bolos, pães e pizza. Por décadas, este material também tem sido empregado em pesquisas voltadas a área médica, na extração dos polímeros naturais, os polissacarídeos (xilana e heteroxilana) para produção de imunostimuladores (EBRINGEROVÁ, 2005; HROMÁDKOVÁ; EBRINGEROVÁ; MALOVÍKOVÁ, 2005), anti-inflamatórios (SAMUELSEN et al., 1998), antitumorais (CAO; IKEDA, 2009; MAKKY et al., 2013), anticoagulantes (SILVEIRA, 2010; LEITE et al., 1998), entre outros.

## 2.3. Biomassa Lignocelulósica

### 2.3.1. Composição

Materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, composta principalmente por polissacarídeos celulose e hemicelulose (cerca de 70% da massa seca) entrelaçados por outra macromolécula formada de álcoois aromáticos, conhecida como lignina. Como demonstrado na Figura 1 esses três componentes estão fortemente unidos entre si por meio de forças não-covalentes e por ligações covalentes cruzadas (SOCCOL et al., 2011; PÉREZ et al., 2002). A composição varia de acordo com o tipo da biomassa vegetal, e por isso também podem ser encontrados resinas, ácidos graxos, fenóis, taninos, compostos nitrogenados e sais minerais (cálcio, potássio e magnésio) (NEUREITER et al., 2002; SILVA, 2010).

**Figura 1** - Estrutura Lignocelulósica.



A celulose é um polímero linear composto de subunidades de D-glicose, ligadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 carbono-carbono e por ligações de hidrogênio intramoleculares (entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes) formando o dímero de celobiose. As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez, enquanto que as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação das fibrilas, estruturas altamente organizadas que se associam entre si, formando as fibras de celulose (SILVA, 2010). As fibrilas de celulose são geralmente apresentadas como uma estrutura altamente cristalina somada a outra pequena parte formada de cadeias de celulose menos organizadas, denominadas fração amorfa, sendo esta última a fração mais susceptível a degradação enzimática (LORENCINI, 2013). Todas essas características da celulose juntamente com o fato desta estar envolta pela molécula de lignina, tornam esse polissacarídeo resistentes a hidrólise representando um grande desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas e principalmente na produção de etanol de segunda geração (BIRENZO et al., 2014).

A hemicelulose é um polissacarídeo com menor massa molecular do que a celulose, consiste de cadeias ramificadas de açúcares que incluem unidades de aldopentoses como D-xilose, L-arabinose, D-aldohexoses incluindo D-manose, D-galactose, e a D-glicose, além de alguns ácidos como, 4-O-metil-glucurônico, D-galacturônico e D-glucurônico (SANCHEZ, 2009; SILVA, 2010). De acordo com os seus monômeros, as hemiceluloses podem ser classificadas como xilanas, mananas, arabinoxilanas, arabinogalactanas e arabinana (SILVANIA, 2013). A principal diferença entre a hemicelulose e a celulose é que a hemicelulose possui ramificações de pequenas cadeias laterais mantidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 formadas por diferentes açúcares, além de não possuir regiões cristalinas sendo, portanto, mais susceptível a hidrólise química em condições mais brandas (MENON; RAO, 2012). As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, e estão mais concentradas nas camadas primárias e secundárias, onde encontram-se fortemente associadas à celulose e a lignina (PANDEY, 2009).

A lignina está ligada a ambos polímeros de celulose e hemicelulose e atua como uma espécie de selo físico, formando uma barreira impenetrável da parede celular das plantas. É uma macromolécula tridimensional amorfo, não solúvel em água, formado por unidades de fenilpropano unidas entre si por ligações não-hidrolisáveis (SOCCOL et al., 2011; SANCHEZ, 2009). A lignina é formada a partir da geração de radicais livres que são liberados pela desidrogenação mediada por peroxidases, de três álcoois

fenilpropiônicos: álcool coniferílico (guaiacil propanol) (G), álcool cumárico (p-hidroxifenil propanol) (H), e álcool sinapílico (siringil propanol) (S). A lignina apresenta uma grande variabilidade de grupos funcionais incluindo grupos hidroxila alifáticos, grupos fenólicos, e grupos carboxílicos, o que a torna uma macromolécula atrativa para a síntese de polímeros (DOHERTY et al., 2011; MONTEIL-RIVERA et al., 2013). Entretanto, a distribuição e proporção desses monômeros e grupos funcionais seguem a origem filogenética de cada biomassa vegetal. Assim como exposto anteriormente, essa variação será estabelecida em função da espécie, do órgão e tecidos vegetais e até mesmo das frações da parede celular.

A lignina representa um dos maiores estoques de carbono/energia da natureza, representando o maior depósito de estruturas químicas aromáticas, considerada uma fonte potencial para geração de valiosos insumos para a indústria química. A particular composição química da lignina confere a essa macromolécula funções biológicas de suporte e rigidez estrutural a parede secundária de plantas vasculares, tornando-a hidrofóbica e recalcitrante, capaz de impedir não somente a maioria das formas de ataques microbianos como também de resistir a radiação UV (WANG; SUN, 2012).

A composição química da biomassa lignocelulósica é constituída em média de 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas. Na Tabela 1, pode ser visualizada a variação da composição química básica de alguns tipos de biomassa lignocelulósica.

**Tabela 1** - Composição química parcial de materiais lignocelulósicos.

<b>Material lignocelulósico</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Bagaço de cana	40,2	26,4	25,2
Bambu	26-43	15-26	21-31
Casca de arroz	34,4	17,5	23
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Palha de sorgo	34,0	44,0	20,0
Serragem	45,0	15,1	25,3
<i>Eucalyptus grandis</i>	40,2	15,7	26,9
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31

Fonte: SILVA (2010); SILVANIA (2013); DYK; PLETSCHKE, (2012); ROWELL (1992), SANCHÉZ, 2009.



### 2.3.2. Pré-tratamentos

A conversão da biomassa lignocelulósica seja para a produção de bioetanol ou para obtenção de qualquer outro produto químico de interesse que necessite da celulose, requer um prévio tratamento antes da hidrólise do polissacarídeo pois este, permanece envolto pelas moléculas de lignina e hemicelulose. Dessa maneira, em um pré-tratamento eficiente considera-se necessário romper a estrutura da lignina para liberar a celulose, e reduzir sua cristalinidade (SILVA, 2010). Além de reduzir a recalcitrância da biomassa vegetal, um pré-tratamento adequado deve minimizar a formação de produtos que possam interferir na etapa de hidrólise e posterior fermentação. Em adição, esse também deve ser um processo com baixo capital e custos operacionais (AGBOR et al., 2011). Algumas técnicas de tratamento têm sido amplamente estudadas e ainda continuam em desenvolvimento, pois é difícil avaliar e comparar tecnologias de pré-tratamentos que envolvem, entre outros, os custos de *upstream* e *downstream*, a reciclagem química e sistema de tratamento de resíduos, e a preparação do processo, como por exemplo, a redução do tamanho da fibra vegetal (JEOH et al. 2007). Todas essas características são importantes a fim de que ocorra um equilíbrio entre os resultados do pré-tratamento e o custo sobre a etapa de recuperação do produto resultando na escolha do método mais adequado para a matéria-prima aplicada. Existem diversos tipos de pré-tratamentos, com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e conseqüente impacto nas etapas subseqüentes. Os mais comuns, são agrupados em 3 categorias (BHASKAR, et al., 2011; AGBOR et al., 2011; SOCCOL et al, 2011)

- i. *Pré-tratamentos físicos*: moagem (moinho de bolas, moagem de dois rolos, martelo de moagem, moagem coloidal, moinho de facas), irradiação (raios gama, feixe de elétrons, micro-ondas), outros (hidrotermal - AFEX, vapor de alta pressão, a expansão, extrusão, pirólise);
- ii. *Pré-tratamentos químicos e físico-químicos*: explosão (explosão de vapor, explosão da fibra com amônia, explosão de CO<sub>2</sub>, explosão SO<sub>2</sub>), tratamento alcalino (tratamento com hidróxido de sódio, amônia ou sulfito de amônia), tratamento ácido (ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido fosfórico), tratamento de gás (dióxido de cloro, dióxido de nitrogênio, dióxido de enxofre), a adição de agentes oxidantes (peróxido de hidrogênio, oxidação úmida, ozônio), extração com solvente de lignina (extração de etanol-água, extração de benzeno-água, extração de etileno-glicol, extração butanol-água, agentes de inchaço);
- iii. *Pré-tratamentos biológicos*: utilização de micro-organismos.

Embora nem todos os métodos de pré-tratamentos tenham sido desenvolvidos o suficiente para ser viável, a maioria deles pode ser aplicados em larga-escala. A estratégia de combinação entre pré-tratamentos também pode ser uma outra alternativa eficiente para o aumento da digestibilidade da biomassa.

### **2.3.3. Degradação biológica**

Na natureza, a degradação da biomassa lignocelulósica acontece por meio de uma mistura sinérgica de enzimas hidrolíticas como, as celulases e hemicelulases e também pelo complexo lignocelulolítico, por meio da ação de fungos e outros micro-organismos capazes de degradar a lignina, a hemicelulose e os polifenóis. Dentre as alternativas já existentes, o pré-tratamento biológico vem sendo destacado como uma técnica vantajosa em relação aos tratamentos termo-químicos, incluindo a não especificidade química, baixo gasto de energia, condições ambientais brandas e aplicabilidade ambientalmente correta (MENON; RAO, 2012). Neste contexto, a capacidade de degradação das fibras da parede celular vegetal pelos micro-organismos tem sido investigada durante as últimas décadas na tentativa de diminuição da recalcitrância da biomassa (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009). Atualmente, várias atividades em pesquisa e desenvolvimento tem acontecido para detectar as alterações na estrutura química e na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica após o pré-tratamento biológico. Todavia, para que ocorra a quebra da lignina, algumas enzimas ligninolíticas produzidas por basidiomicetos precisam estar presentes no meio.

O mecanismo da degradação da lignina mais estudado tem sido observado em fungos filamentosos pertencentes ao grupo dos basidiomicetos (filo Basidiomycota), sendo o *Phanerochaete chrysosporium* o representante mais amplamente analisado (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). As enzimas responsáveis pela degradação da lignina podem ser encontradas também em algumas espécies de bactérias filamentosas, incluindo o gênero *Streptomyces* e *Clostridium* (BALAT, 2011). Algumas espécies de *Pseudomonas* e actinobactérias também conseguem deslignificar a parede celular vegetal da mesma forma que os fungos, por meio de enzimas do complexo ligninolítico, além das desmetilases, catalases e fenoloxidasas (HATAKKA, 2005). Os mecanismos típicos incluem a solubilização da lignina, clivagens enzimáticas de ligações C-C por radicais gerados a partir da oxidação de um carbono da cadeia lateral do grupo carbonila, clivagens do tipo alquil-aril, desmetilações e a formação de alguns produtos monoméricos como o guaiacol, ácido vanílico e o 4-etoxi-3-metoxibenzaldeído (RABEMANOLONTSOA;

SAKA, 2016). Segundo Salvachua et al. (2015), determinadas bactérias podem até conseguir a clivagem do anel de compostos aromáticos.

A principal desvantagem do método biológico aplicado à degradação da lignina é o tempo necessário para o tratamento. Geralmente, várias semanas ou meses são necessários para obtenção de um elevado grau de degradação da lignina utilizando micro-organismos (LEE, 1997; MENON; RAO, 2012). Desta forma, para que haja um avanço do custo-benefício do pré-tratamento biológico de materiais lignocelulósicos é necessário dar continuidade às pesquisas e buscar novos recursos microbianos capazes de deslignificar o material vegetal de forma rápida e eficiente. Atualmente, existe uma necessidade de encontrar consórcios únicos para o pré-tratamento biológico. Uma biodegradação bem-sucedida da biomassa lignocelulósica é decorrente da ação sinérgica enzimática que poderá ser proporcionada por um consórcio microbiano (ABDEL-HAMID et al., 2013). As vantagens na utilização de consórcios microbianos incluem o aumento da adaptabilidade, a melhoria da produtividade, o controle do pH durante a utilização do açúcar e o aumento da utilização de substrato (KALYANI et al., 2013).

#### **2.4. Fungos Ligninolíticos**

Desde a descoberta das enzimas integrantes do complexo ligninolítico a partir de 1983, a maioria das informações obtidas em estudos sobre a degradação da lignina foram adquiridas a partir de experimentos com o fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* (GLENN et al., 1983; AGUIAR; FERRAZ, 2011). Ao longo dos anos, outros fungos como o *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia subserialis* e *Ceriporiopsis subvermispota* (HAMMEL; CULLEN, 2008) também tem sido fonte de estudos e fonte de novas informações para o entendimento do intrincado processo de desestruturação da lignina. Este grupo de micro-organismo apresenta enzimas específicas capazes de oxidar subestruturas da lignina na presença de peróxido de hidrogênio ou redução de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O com simultâneas oxidações de subunidades fenólicas (ARANTES, 2009). Os basidiomicetos degradadores de madeira são tradicionalmente classificados em fungos da podridão branca, fungos da podridão parda e fungos da podridão branda (WAN; LI, 2012) CAMERON et al., 2000; SUHARA et al., 2012); recebem essa classificação em função da aparência e coloração da podridão causada. Além disso, esses fungos podem ser diferenciados por possuírem diferentes conjuntos de enzimas para a despolimerização de materiais lignocelulósicos. Recentemente, outro novo aspecto de classificação foi sugerido por Riley et al. (2014) devido a diversos mecanismos de apodrecimento da madeira revelados pelo genoma de fungos basidiomicetos.

Os fungos da podridão branca são os mais eficazes na degradação da maioria dos componentes vegetais, incluindo a celulose, hemicelulose e lignina. A principal característica diferencial dos fungos da podridão branca em relação aos outros é que este fungo consegue produzir uma matriz de peroxidases modificadoras da lignina juntamente com várias outras enzimas produtoras de  $H_2O_2$ . Alguns fungos de podridão branca, incluindo *C. subvermispora*, *Phellinus pini*, *Phlebia* spp. e *Pleurotus* spp. deslignificam a madeira atacando diretamente a lignina e em seguida a hemicelulose e celulose, deixando o meio enriquecido com a celulose (ABDEL-HAMID et al., 2011).

Fungos da podridão parda apresentam uma estratégia diferente de degradação do material vegetal. Estes micro-organismos conseguem degradar a maioria da celulose e hemicelulose, deixando por último a lignina demetoxilada. Ao contrário do fungo de degradação branca, os basidiomicetos da degradação parda, despolimerizam a celulose não por meios enzimáticos, mas sim usando os radicais hidroxilas altamente reativos gerados pela reação de Fenton (MAKELA et al., 2015).

A podridão branda é uma degradação muito típica causada por um grande número de fungos ascomicetos e alguns anamórficos, tais como *Chaetomium globosum*, *Ustilina deusta*, *Alternaria alternata*, *Thielavia terrestris* e *Paecilomyces* spp. Fungos da podridão mole preferem crescer em plataformas mais localizadas, como o interior da parede celular secundária. Eles degradam lentamente polissacarídeos da parede celular nas imediações de suas hifas e afetam fracamente a lignina (SIGOILLOT, et al., 2012). As hifas podem ser observadas em canais no interior da parede secundária. Suas limitadas ações resultam em uma consistência macia da madeira, mas não apodrecida, quando presentes em ambientes úmidos ou em aquáticos, sendo mais comumente encontrados em madeira dura (MAKELA et al., 2015).

## **2.5. Modificação Enzimática da Lignina**

Devido à natureza complexa da estrutura e também da ampla variedade de ligações químicas na lignina, a sua biodegradação requer a ação sinérgica de diversas enzimas como mencionado previamente. Numerosos estudos têm creditado o sucesso da quebra da lignina à determinado grupo de fungos e a suas ações enzimáticas, entretanto, a interação dessas enzimas com a lignina é um fator de extrema importância, uma vez que a parede celular vegetal apresenta baixa porosidade impedindo a infiltração de certas moléculas e proteínas (KIRK; CULLEN, 1998). Cada grupo de fungos responsável pela biodegradação se comporta de maneira diferente quando estão em contato com a superfície vegetal. Alguns atacam exclusivamente a lignina logo no estágio inicial de

colonização, enquanto outros degradam todos os componentes da parede celular, cada um em uma velocidade específica de crescimento (AGUIAR; FERRAZ, 2011). Com base nesses aspectos, é evidente que a medida que as hifas fúngicas colonizam a superfície vegetal, estas produzem diversos metabólitos extracelulares que atuam na degradação, sendo os componentes da parede celular vegetal obrigatoriamente transformados em moléculas menores e solúveis que são então consumidos como fonte de energia (MARTÍNEZ et al., 2005).

Por muitos anos, os mecanismos de degradação dos materiais lignocelulósicos tem sido alvo de estudos, e até os dias atuais existem muitas dúvidas sobre o real papel de cada enzima no processo geral de oxidação. Todavia, de acordo com Kirk e Farrell (1987) e Mester e Tien (2000) as enzimas ligninolíticas são extracelularmente secretadas pelos fungos para a oxidação dos substratos. Para Lee (1997) a degradação da lignina acontece durante o metabolismo secundário dos micro-organismos, em consequência da falta de nutrientes nitrogenados no meio, obrigando-os a consumir as fontes de carbono disponíveis. Dessa maneira, as enzimas ligninolíticas são secretadas em maior quantidade dando o início ao ciclo de oxidação. Essas enzimas efetuam a oxidação de um elétron por vez gerando radicais catiônicos da estrutura aromática. Os radicais catiônicos podem sofrer reações químicas espontâneas tais como a clivagem das ligações C-C ou hidroxilações resultando em compostos hidrofílicos. Esses produtos são absorvidos pelas células fúngicas e co-metabolizados na presença de uma fonte de carbono, para dióxido de carbono (HAMMEL et al., 1991). Esse é um complexo processo de oxidação, redução, metilação e hidroxilação. A reação das enzimas ligninolíticas extracelulares ainda é bastante complicada, envolvendo numerosos cofatores de pequena massa molar. Muitos desses compostos foram identificados em cultivos de fungos decompositores de madeira, porém, o modo de ação desses compostos consiste em atuar diretamente sobre a parede celular vegetal ou agir como mediadores das enzimas oxidativas (AGUIAR; FERRAZ, 2011; MESTER; TIEN, 2000).

De forma geral, duas classes distintas de enzimas estão envolvidas no processo de quebra da lignina: as fenoloxidasas e as enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio (peroxidases). As fenoloxidasas englobam um grupo característico pertencentes às metaloproteínas. Entre as fenoloxidasas, existem ainda dois subgrupos; o grupo das enzimas dependentes de peróxido (lignina peroxidase – LiP, e a manganês peroxidase – MnP) e o segundo grupo, as lacases, que não dependem de peróxido e são cuproproteínas (ABDEL-HAMID et al., 2011). Além dessas, existem também outras enzimas que produzem  $H_2O_2$  e auxiliam as peroxidases gerando o peróxido *in situ*. As mais conhecidas

são glicose oxidase e metanol oxidase, glioxal oxidase (GLOX) (intracelulares) e aril-álcool oxidase (extracelulares) (POMPEU, 2010).

### 2.5.1. Lacases

As lacases (EC: 1.10.3.2) são oxidases multi-cobre, ou seja, uma glicoproteína que contém cobre em seu sítio ativo, que não requer  $H_2O_2$  para sua atividade catalítica, sendo encontradas em plantas, fungos e bactérias. Foi primeiramente isolada em 1883 quando extraída da laca de uma árvore japonesa da espécie *Rhus vernicifera* (YOSHIDA, 1883). Em geral, as lacases apresentam 4 átomos de cobre, os quais são distribuídos em diferentes sítios de ligação e são classificados em três tipos: cobre tipo 1 (centro cobre mononuclear), 2 (aglomerado de cobre trinuclear) e 3 (núcleo de cobre normal), que são diferenciados por propriedades específicas, tendo importante papel no mecanismo catalítico da enzima (HOEGGER et al., 2006; ABDEL-HAMID et al., 2011). Esta enzima atua na destoxificação de compostos e também pode oxidar grupos fenólicos, agindo como enzima inicial da clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina (POMPEU, 2010; TIEN; KIRK, 1998). De acordo com Aguiar e Ferraz (2011), as lacases atuam pela abstração de 1 elétron dos fenóis, em função da redução de  $Cu^{2+}$  a  $Cu^{1+}$  que, por sua vez, reduz  $O_2$  a  $H_2O$ , permitindo que a enzima atue de forma cíclica. Entretanto, essas enzimas também podem degradar estruturas aromáticas não fenólicas por meio da oxidação de alguns mediadores sintéticos como o hidroxibenzotriazol (HBT), ou mesmo naturais como derivados do ácido benzoico e íons  $Mn^{2+}$  (ARANTES et al., 2011).

As lacases fúngicas têm demonstrado boa eficiência quanto a degradação de compostos-modelo de lignina fenólica, entretanto, a degradação de compostos não-fenólicos de lignina, só acontece na presença de mediadores sintéticos, como o 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato) (ABTS), 1-hidroxibenzotriazol, e o ácido violúrico (LI et al., 1999). Esses mediadores funcionam como um substrato inicial, que por sua vez, oxida a lignina por mecanismos ainda não claramente definidos. Na ausência de mediadores foi verificado que a lignina degradada consegue se repolimerizar (ROCHEFORT, et al., 2004; AGUIAR; FERRAZ, 2011).

Por ser uma enzima não específica ao substrato, as lacases podem oxidar compostos como corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, difenilmetanos, benzopirenos, organofósforos e modelos de fenóis de lignina. A capacidade destas enzimas de usar o oxigênio atmosférico como receptor de elétrons, juntamente com as suas diversas especificidades de substrato e bons rendimentos, faz com que essas enzimas catalisadoras sejam atraentes para as tecnologias ambientais (MARTÍNKOVÁ et al., 2016).

### 2.5.2. Manganês peroxidases (MnP)

A manganês peroxidase (EC: 1.11.1.13) é uma hemiperoxidase com elevada especificidade pelo íon manganês ( $Mn^{2+}$ ) como substrato redutor (POMPEU, 2010). As MnPs também são dependentes de  $H_2O_2$  para sua atividade que oxida o doador de um elétron  $Mn^{2+}$  para  $Mn^{3+}$ , o que por sua vez, pode oxidar um grande número de substratos fenólicos (KUWAHARA et al., 1984). O ciclo catalítico das MnPs é semelhante ao das enzimas hemiperoxidases e da LiP. Segundo Abdel-Hamid (2013) a enzima manganês peroxidase é ativa pela oxidação do  $H_2O_2$  formando o composto I (C1) que é um radical complexo  $Fe^{4+}$ -oxo-porfirina. O íon  $Mn^{2+}$  doa um elétron para a o composto mediador porfirina para formar Composto II, e é oxidado para  $Mn^{3+}$ . Então, uma enzima nativa é gerada a partir do Composto II de forma semelhante através da doação de um elétron de  $Mn^{2+}$  para formar  $Mn^{3+}$ . Os íons quelados  $Mn^{3+}$  gerados por MnP atuam como poderosos mediadores de transferência de carga difusíveis, permitindo que a oxidação de vários substratos fenólicos, tais como fenóis simples, aminas, corantes, bem como, compostos-modelo de lignina fenólica. As MnPs de fungos causadores da podridão branca vêm sendo empregadas em estudos de biodegradação da lignina (HILDEN et al., 2000), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (WANG et al., 2003), corantes sintéticos (HEINFLING et al., 1998) e poluentes clorados (HAAS et al., 2004).

### 2.5.3. Lignina peroxidases (LiP)

A lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) primeiramente descoberta no meio extracelular do fungo de podridão branca *P. chrysosporium* (KIRK; FARRELL, 1987). Várias isoformas da LiP foram observadas em *P. chrysosporium* e outros fungos basidiomicetos como *T. versicolor* (JOHANSSON et al., 1993), *Phanerochaete sordida* (SUGIURA et al., 2009) *Phlebia radiata* (MOILANEN et al., 1996) e *Phlebia tremellosa* (VARES et al., 1994). A LiP foi a primeira enzima estudada quanto à capacidade em atacar compostos de lignina (TIEN E KIRK, 1984), sendo a principal responsável na degradação de compostos não fenólicos da molécula. As LiPs podem abstrair elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas, dando origem a radicais cátion. A LiP extracelular, na presença de  $H_2O_2$  pode degradar a lignina através da clivagem oxidativa da ligação C-C da cadeia principal, da oxidação e a hidroxilação de grupos metileno benzílicos, da oxidação de fenóis e álcoois benzílicos, entre outros. A interação da LiP com o  $H_2O_2$  gera um radical catiônico porfirina com alto potencial redox que pode extrair um único elétron de um anel aromático contido na estrutura da lignina e gerar um radical aromático. Isto é

acompanho se uma série de reações degradativas espontâneas através de radicais catiônicos intermediários (LEE, 1997).

A LiP já demonstrou capacidade de oxidação de vários compostos-modelos não-fenólicos de lignina como as ligações tipo  $\beta$ -O-4, éteres arilglicerol-aril, na presença de  $H_2O_2$ . Durante o crescimento de *P. chrysosporium* na lignina, álcool veratrílico (VA) é produzido como um metabolito que aumenta a atividade de LiP e, conseqüentemente, a taxa de degradação da lignina. Diferentes LiPs mostraram capacidade de mineralizar vários compostos aromáticos recalcitrantes, de oxidar numerosos policíclicos aromáticos e também compostos fenólicos (DURÁN; ESPOSITO, 2000), bifenilas policloradas e diversos corantes (WESENBERG et al., 2003).

#### 2.5.4. Outras enzimas

Além das lacases, MnP e LiP, outras enzimas também auxiliam no processo geral de degradação da lignina, beneficiando a maioria das peroxidases de forma indireta. As álcool-veratril-oxidases (VP) (EC 1.11.1.16) são enzimas oxidativas, agem como catalisadoras da reação do álcool veratrílico a  $H_2O_2$ , elemento necessário para a atividade das peroxidases. São produtos do metabolismo secundário dos fungos, e possui um ciclo catalítico muito similar ao da lacase, atuando como um potencial mediador. De acordo com Breen e Singleton (1999), o principal papel desempenhado pelas VPs é a de reciclagem da atividade da LiP, prevenindo a sua inativação através do peróxido de hidrogênio.

As glioxal-oxidases (GLOX), são enzimas extracelulares que atuam na transferência de elétrons de aldeídos de baixa massa molar para o  $O_2$ , resultando em  $H_2O_2$ . Por isso, acredita-se que a GLOX seja a principal enzima auxiliar geradora de peróxido durante o processo de degradação da lignina (BREEN; SINGLETON, 1999). A Glox foi descrita pela primeira vez em *P. chrysosporium* (KERSTEN, 1990), como uma glicoproteína monomérica extracelular de massa molecular de 68 kDa, sobre duas isoformas diferentes (SIGOILLOT et al., 2012). A atividade dessa enzima é desencadeada por diversos substratos, e oxida aldeídos simples como o glioxal ou o metilglioxal, e seus respectivos ácidos carboxílicos.

As aril-álcool oxidases (AAO) são enzimas pertencentes ao grupo glicoproteínas capazes de produzir  $H_2O_2$ . São produzidas por uma pequena quantidade de espécies fúngicas e por isso sua fisiologia já foi exaustivamente estudada. Foi observada pela primeira vez em *Polystictus versicolor* por Farmer et al. (1960) e atividades semelhantes as da AAO foram encontradas em outras três diferentes espécies de *Pleurotus*



(SIGOILLOT et al., 2012). A principal ação oxidante das AAOs ocorre nas ligações  $\alpha$ - e  $\beta$ - de aril- $\gamma$ -álcoois insaturados e seus correspondentes aldeídos com a concomitante redução de  $O_2$  a  $H_2O_2$  (DASHTABAN et al., 2005).

## *Capítulo 1*

# **Seleção de recursos genéticos com potencial produção de enzimas ligninolíticas**

### 3.0. Resumo

Neste estudo foi investigado o potencial de produção de enzimas ligninolíticas de 28 linhagens fúngicas oriundas de diferentes ambientes, com o objetivo de selecionar os melhores isolados visando a montagem de consórcios degradadores de biomassa lignocelulósica. No primeiro *screening* realizado em meio sólido suplementado com guaiacol, 19 linhagens foram positivas para a formação do halo marrom-avermelhado indicando a produção de enzimas ligninolíticas. No segundo *screening*, as linhagens positivas foram submetidas à quantificação das enzimas LiP, MnP, Lacase e GLOX. Os resultados revelaram que oito diferentes fungos foram capazes de produzir as enzimas estudadas. A lacase (ABTS) foi a enzima observada com maior atividade (12,65 U.L<sup>-1</sup>) sendo a MnP e a LiP detectadas em quantidades muito baixas. A GLOX apresentou valores semelhantes à atividade da lacase. Os oito isolados selecionados foram submetidos a teste de inibição em meio sólido para avaliação da atividade de antagonismo. O fungo 205 apresentou atividade inibitória e os isolados i1D3 e UNK cresceram por todo o meio se sobrepondo aos outros fungos sendo, portanto, descartados do estudo. Os cinco fungos restantes foram utilizados para a estruturação dos consórcios. As análises taxonômicas indicaram a presença de nove diferentes taxons entre os 28 isolados fúngicos. Os cinco fungos selecionados pertencem aos gêneros *Tinctoporellus*, *Marasmiellus*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Lichtheimia*. Com base nesses resultados, seis consórcios foram estruturados, sendo cada consórcio constituído por três dos melhores fungos produtores de ligninases.

**Palavras chave:** Fungos filamentosos, enzimas ligninolíticas, guaiacol, antagonismo.

### 3.1. Introdução

O reino fúngico é extremamente diverso com um amplo número de espécies e de grupos funcionais envolvidos na regulação de energia e de ciclagem de nutrientes em ecossistemas naturais. A diversidade de fungos existente no planeta está estimada em 5,1 milhões de espécies, sendo que até o ano de 2013 foram catalogadas cerca de 1,9% (97.330) das espécies (KIRK et al., 2008; ABRAHÃO, 2013). Seja atuando como micro-organismos decompositores, como patógenos ou micosimbiontes, os fungos comandam o ciclo do carbono (MATHIEU et al., 2013). Estes são considerados os principais organismos responsáveis pela degradação de matéria orgânica na natureza, incluindo resíduos lignocelulósicos, devido à alta eficiência atribuída ao aparato enzimático presente nesses organismos (LEE, 1997).

A conversão biológica de plantas realizada por micro-organismos desempenha um papel essencial no ciclo do carbono presente em ecossistemas terrestres. Esta atividade microbiana vem sendo por décadas considerada como uma potencial solução para o aproveitamento da biomassa destinada à produção de biocombustíveis e bioquímicos. Conhecidos como micro-organismos saprofíticos, os fungos desenvolveram ao longo dos anos estratégias diferentes para utilização de polímeros da parede celular de plantas como fonte de carbono. Estas estratégias estão associadas aos fungos em diferentes nichos funcionais devido à especificidade de seus coquetéis enzimáticos (BARBI et al., 2016; TALBOT et al., 2015). Em particular, os basidiomicetos degradadores de madeira, principalmente os fungos da podridão branca, são os de maior relevância na conversão de compostos aromáticos e desestruturação da lignina (MAKELA et al., 2015).

A habilidade degradadora desse grupo de fungos é bem estabelecida devido à forte atividade oxidativa e a baixa especificidade por substratos necessários às enzimas ligninolíticas (SÁNCHEZ, 2009). Em contraste aos basidiomicetos, outros estudos têm considerado também a aplicação de ascomicetos na degradação lignocelulósica (LOPEZ et al., 2007; SIGOILLOT et al., 2012). Os ascomicetos representam o segundo mais importante grupo de fungos colonizadores da madeira, contabilizando uma extensa degradação da lignina.

Considerando a extraordinária capacidade dos fungos em habitar ambientes diversificados, bem como degradar a biomassa lignocelulósica, em especial a complexa e recalcitrante molécula de lignina, o presente capítulo teve como objetivo triar 28 fungos filamentosos visando a seleção dos melhores isolados produtores de enzimas ligninolíticas e posterior estruturação de consórcios com potencial deslignificação de biomassa lignocelulósica.

## **3.2. Material e Métodos**

### **3.2.1. Fungos filamentosos**

Foram utilizados no presente projeto fungos filamentosos previamente isolados de diferentes substratos:

- 8 fungos filamentosos isolados de composteira, pilha de bagaço de cana-de-açúcar (Temático Fapesp 2010/12624-0).
- 17 fungos filamentosos ligninolíticos isolados da compostagem do zoológico de São Paulo (Auxílio pesquisa Fapesp 2010/51992-5).
- 3 basidiomicetos ligninolíticos isolados de esponjas marinhas (Temático Fapesp 2005/60175-2).

### **3.2.2. Cultivo e manutenção dos isolados**

Todos os fungos cedidos para este estudo foram recebidos em placas separadas contendo meio malte e ágar batata-dextrose (PDA) ou em culturas preservadas pelo método de Castellani. Os fungos foram mantidos em geladeira à temperatura de 4°C até a sua manipulação. Para a reativação dos isolados e cultivo ao longo do trabalho, foi utilizado o meio malte MA2 (2% de malte e 1,5% de Agar) sólido e líquido (2% de malte). Os fungos foram incubados em estufa bacteriológica a 28°C durante um período de 7 dias.

### **3.2.3. Seleção de isolados produtores de enzimas ligninolíticas**

#### **3.2.3.1. Triagem qualitativa (meio sólido)**

Os fungos foram submetidos a uma primeira triagem em meio sólido utilizando a metodologia descrita por Verma et al. (2010). Para tanto, os fungos foram cultivados em meio de cultura B&K (10 g/L glicose, 2 g/L peptona, 1 g/L extrato de levedura e 20 g/L de agar) acrescido de 4 mM de guaiacol. Neste método, a presença de coloração marrom-avermelhada sobre e ao redor do micélio em meio suplementado com guaiacol, é indicativo da presença da atividade de lacase (Lac).

#### **3.2.3.2. Triagem quantitativa (meio líquido)**

Os fungos positivos previamente selecionados na etapa anterior, foram cultivados em meio MA2 e após o crescimento em placa, 3 cilindros de 5 mm de diâmetro da margem das colônias foram transferidos para frascos Erlenmeyers de 150 mL contendo 50 mL de meio MA2 líquido. Os ensaios foram incubados a 28°C por 7 dias a 140 rpm. Após este

período os extratos foram obtidos por centrifugação e a atividade enzimática foi determinada como descrito abaixo.

**Lignina Peroxidase (LiP)** (EC: 1.11.1.14): A atividade da lignina peroxidase foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS a partir do aldeído veratrílico produzido ( $\epsilon_{310\text{nm}} = 9300\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) na oxidação do álcool veratrílico que foi usado como substrato. A mistura era composta de 1 mL de tampão tartarato de sódio 125 mM (pH 3,0); 0,5 mL de álcool veratrílico 10 mM; 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM e 0,5 mL do caldo enzimático. A reação foi iniciada adicionando o peróxido de hidrogênio e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm, após 10 min de reação (ARORA; GILL, 2001).

**Manganês Peroxidase (MnP)** (EC: 1.11.1.13): A atividade desta enzima foi quantificada pelo método modificado de Wariishi et al. (1992) com a adição de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM em 0,8 mL de tampão malonato de sódio 60 mM (pH 4,5), 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnSO}_4$  10 mM e 0,1 mL de caldo enzimático. A formação do complexo  $\text{Mn}^{+3}$ -malonato foi acompanhada a 270 nm ( $\epsilon = 11590\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) após 5 min de reação.

**Lacase** (EC: 1.10.3.2): A atividade enzimática de lacase foi determinada por dois métodos distintos: 1) Oxidação da siringaldazina ( $\epsilon_{525\text{nm}} = 65.000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), onde a mistura continha 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), 0,1 mL de água deionizada, 0,6 mL de caldo enzimático e 0,1 mL de siringaldazina 1 mM preparada em etanol (P.A.) (BONUGLI-SANTOS et al., 2010). O monitoramento do aumento da absorbância foi verificado a 525 nm e 2) Oxidação do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS): a mistura continha 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 0,1 mL de solução de ABTS a 0,03% e 0,6 mL do caldo enzimático (BUSWELL et al., 1996). A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm, após 10 min de incubação a 37°C.

**Glioxal-Oxidase (GLOX)** (EC 1.2.3.5): A atividade da GLOX foi determinada mediante da oxidação do metilglioxal (KERSTEN; KIRK, 1987) pelo aumento da absorbância a 436 nm. A reação ocorreu a partir da mistura de: 10  $\mu\text{L}$  de caldo enzimático, 10  $\mu\text{L}$  de solução estoque (100x) de 2,8 mM guaiacol; 10  $\mu\text{L}$  de 1  $\text{mg L}^{-1}$  de solução de peroxidase, 50  $\mu\text{L}$  de metilglioxal (acetilformaldeído) e 120  $\mu\text{L}$  de solução tampão de ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio (pH 6,0).

Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em  $\text{U.L}^{-1}$  do caldo enzimático e os cálculos realizados a partir da equação descrita abaixo, derivada da Lei de Lambert-Beer:

$$U L^{-1} = \Delta A \cdot V \cdot 10^6 / \epsilon \cdot R \cdot t$$

onde:

$\Delta A$	diferença entre a absorvância final e a inicial
$V$	volume da reação (0,001 L em todos os casos)
$10^6$	converte os mols de $\epsilon$ para $\mu\text{mols}$
$\epsilon$	coeficiente de extinção ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
$R$	quantidade de caldo enzimático (L)
$T$	tempo de reação (min)

### 3.2.4. Seleção dos isolados e teste de inibição

Após a triagem dos melhores produtores de enzimas do complexo ligninolítico, os fungos selecionados foram submetidos a um teste de antagonismo. A atividade inibitória dos micro-organismos foi realizada seguindo a metodologia de Gerardo et al. (2006) usando placas Petri contendo meio MA2 sólido. O ágar foi recortado em formato de uma cruz na placa e foram adicionados: um fungo ao centro e outros 3 isolados diferentes em cada uma das extremidades da cruz, deixando uma das extremidades sem inóculo (controle). Para tanto, os fungos foram cultivados nas placas em diferentes combinações. Este teste avalia a capacidade inibitória entre fungos durante o crescimento na mesma placa, além de monitorar o comportamento de crescimento dos mesmos.

### 3.2.5. Identificação taxonômica e depósito dos isolados ligninolíticos na CRM-UNESP

Os fungos que apresentaram atividade significativa das enzimas ligninolíticas foram identificados por meio de taxonomia polifásica. Esta etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, UNESP – Rio Claro/SP. Após o crescimento em MA2, os fungos foram identificados utilizando marcadores morfológicos (características macro e microscópica) e moleculares (sequenciamento da região ITS e  $\beta$ -tubulina). O DNA genômico dos isolados foi extraído realizando lise física das células com microesferas de vidro (425-600  $\mu\text{m}$  de diâmetro, SAMPAIO et al., 2001). Após extração do DNA, a região ITS ou  $\beta$ -tubulina foi amplificada com os *primers* ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990) e  $\beta\text{t}2\text{a}$  e  $\beta\text{t}2\text{b}$  (GLASS; DONALDSON, 1995), respectivamente. As reações de amplificação consistiram em 0,2 mM de cada dNTP, tampão KCl 5x, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,5  $\mu\text{M}$  de cada *primer* e 1U da enzima *Taq* polimerase, em volume final de 25  $\mu\text{L}$ . Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% para checar os produtos de amplificação, os quais foram corados com GelRed (Biotium) e visualizados em transluminador UV. A purificação da reação de

amplificação foi realizada com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) e quantificado em *NanoDrop®* (Thermo Scientific). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando *BigDye® Terminator Cycle Sequencing kit v. 3.1* (Life Technologies), segundo o protocolo do fabricante e aplicados em sequenciador ABI 3330 (Life Technologies). As sequências *forward* e *reverse* geradas foram checadas quanto à qualidade e reunidas em uma sequência consenso utilizando BioEdit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Os *contigs* foram comparados com sequências homólogas presentes em bancos de dados públicos como o CBS ([www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl)) e NCBI-GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Foi utilizado a ferramenta MegaBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

As sequências *forward* e *reverse* foram reunidas em *contigs* no BioEdit v7.1.3 (HALL, 1999). Os *contigs* foram comparados com sequências homólogas no banco de dados NCBI-GenBank. Sempre que possível, foram recuperadas sequências de linhagens de referência (na sua maioria provenientes da Fungal Biodiversity Centre CBS-KNAW) com base nos estudo realizado por Soares et al. (2012). O alinhamento foi realizado no *software* MAFFT v. 7.158 (KATOY; STANDLEY, 2013). A árvore filogenética foi inferida no MEGA v.5.05 (TAMURA et al., 2011), utilizando o algoritmo *neighbor-joining* e Kimura 2-parâmetros como o modelo de substituição nucleotídica, os *gaps* foram excluídos da análise. O suporte dos ramos foram calculados utilizando 1000 pseudo-réplicas de *bootstrap*. Os isolados ligninolíticos com potencial aplicação biotecnológica e identificados taxonomicamente foram depositados na coleção de cultura do Instituto de Biociências da UNESP campus Rio Claro, intitulada Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP), utilizando dois métodos distintos de preservação: criopreservação a -80°C e Castellani (preservação em água a 4°C).

### **3.2.6. Montagem dos consórcios**

Para a estruturação dos consórcios foi levado em consideração os resultados do teste de antagonismo e a atividade enzimática ligninolítica. Cada consórcio foi constituído por 3 diferentes fungos produtores de pelo menos 2 diferentes enzimas do complexo ligninolítico.

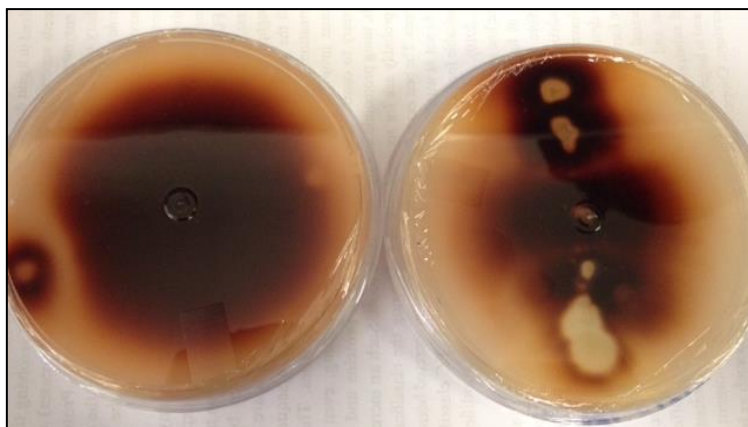
## **3.3. Resultados**

### **3.3.1. Triagem enzimática e estruturação dos consórcios**

Os resultados da triagem qualitativa revelaram que dentre os 28 fungos filamentosos estudados, 19 foram capazes de produzir o composto de coloração marrom-avermelhada a partir do guaiacol utilizado como indicador (Figura 2, Tabela 2).



**Figura 2.** Teste qualitativo positivo utilizando guaiacol como indicador de produção de enzimas ligninolíticas.



De acordo com Thomás-Barberán e Espín (2001) a formação da coloração marrom-avermelhada confirma a habilidade de fungos em produzir enzimas do tipo peroxidases bem como a lacase. Em seguida, 9 diferentes taxons de fungos foram identificados como sendo positivos para a produção de enzimas do complexo ligninolítico (Tabela 2): *Aspergillus* sect. *Fumigati* (n = 17), *Aspergillus* sect. *Flavi* (n = 1), *Aspergillus* sect. *Nigri* (n = 1), *Lichtheimia ramosa* (n = 1), *Myceliophthora thermophila* (n = 1), *Rhizomucor pusillus* (n = 1), *Trichoderma asperelloides* (n = 2), *Marasmiellus* sp. (n = 1), *Peniophora* sp. (n = 1), *Tinctoporellus* sp. (n = 1) e *Fusarium* sp. (n = 1). Após 3 dias de incubação, o composto de coloração marrom-avermelhado foi observado ao redor das colônias dos basidiomicetos marinhos *Marasmiellus* sp., *Peniophora*, sp. e *Tinctoporellus* sp. Para os outros dezesseis fungos positivos para produção de enzimas ligninolíticas em meio sólido o resultado foi observado após 7 dias de cultivo. Os 19 isolados selecionados na triagem qualitativa como produtores de enzimas do complexo ligninolítico foram submetidos a um segundo *screening*, o qual foi baseado em uma triagem quantitativa das enzimas. Para tanto, as enzimas lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), lacase (siringaldazina e 2,2-azino-bis-etilbenthiazolina (ABTS) e glioxal-oxidase (GLOX) foram quantificadas e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Os isolados que não apresentaram composto de coloração marrom-avermelhada na triagem qualitativa (1B, 1A, 2A, 3A, 7, 9, 14, 55-30 e 55-45), foram também submetidos ao experimento de triagem quantitativa visando confirmação a possibilidade de produção do complexo ligninolítico em meio líquido. Para esses isolados os resultados mostraram que a lacase foi produzida somente quando a siringaldazina foi utilizada como substrato, com exceção do isolado 1A que produziu lacase - ABTS e MnP em quantidades muito baixas (Tabela 2). Para a maioria dos isolados a atividade enzimática ligninolítica

foi ausente ou muito baixa, corroborando o resultado negativo do teste qualitativo em meio sólido com guaiacol. Esses isolados não foram considerados como potenciais recursos genéticos para a deslignificação da biomassa lignocelulósica, sendo desconsiderados para a estruturação dos consórcios. Os isolados F22 e G03 também foram descartados da seleção, pois não apresentaram atividades para LiP, MnP, GLOX ou lacase (ABTS).

Considerando os resultados da triagem qualitativa e quantitativa, oito fungos (154, 155, 205, i1D3, UNK, G25, B19 e GF1.5) foram selecionadas como candidatas para a composição dos consórcios. Para esses fungos, a atividade da enzima lacase utilizando o substrato ABTS foi maior do que para o substrato siringaldazina. A GLOX apresentou valores semelhantes a lacase sendo a maior atividade de 12 U.L<sup>-1</sup>. A MnP e a LiP foram produzidas em quantidades muito baixas. O fungo de origem marinha *Marasmiellus* sp. 155 foi capaz de produzir todas as enzimas estudadas além de obter o maior valor de atividade para a enzima lacase (12,65 U.L<sup>-1</sup>).

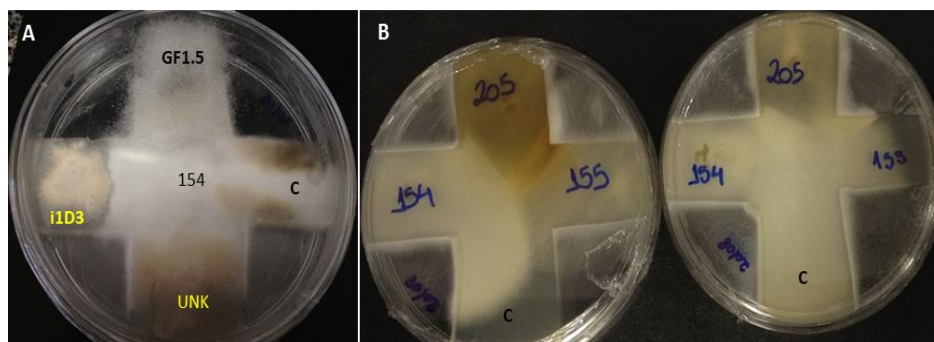
**Tabela 2** - Dados relacionados à triagem qualitativa (meio sólido) e quantitativa (meio líquido).

ID	Taxa	Origem	Guaiacol	LiP (U.L <sup>-1</sup> )	MnP (U.L <sup>-1</sup> )	Lac. Siring. (U.L <sup>-1</sup> )	Lac. ABTS (U.L <sup>-1</sup> )	GLOX (U.L <sup>-1</sup> )
1B	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	-	-	-	0,11	-	-
1A	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	-	-	0,11	0,06	0,39	-
2A	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	-	-	-	0,21	-	-
3A	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	-	-	-	0,14	-	-
i4	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	+	-	-	0,51	-	-
i5	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	+	-	-	0,51	-	-
i6	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	+	-	-	0,50	-	-
F02	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	+	-	-	0,53	-	-
F24	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	+	-	-	2,19	-	-
F48	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	+	-	-	0,52	-	-
F49	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	+	-	-	0,74	-	-
F50	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	+	-	-	0,74	-	-
7	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	-	-	-	0,11	-	-
9	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	-	-	-	0,21	-	-
14	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	-	-	-	0,06	-	-
55-30	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	-	-	-	0,43	-	-
55-45	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Fumigati</i>	CZ	-	-	-	0,40	-	-
154	<i>Tinctoporellus</i> sp.	EB	+	-	2,30	3,15	4,78	0,22
155	<i>Marasmiellus</i> sp.	EB	+	0,21	0,17	0,09	12,60	0,29
205	<i>Peniophora</i> sp.	EB	+	0,04	-	3,00	2,77	12,0
i1D3	<i>Myceliophthora thermophila</i>	PBC	+	-	-	0,04	1,85	-
UNK	<i>Rhizomucor pusillus</i>	-	+	-	2,12	0,45	2,00	0,29
B19	<i>Fusarium</i> sp.	SC	+	-	0,74	2,92	-	-
F22	<i>Trichoderma asperelloides</i>	SC	+	-	-	0,81	-	-
G03	<i>Trichoderma asperelloides</i>	SC	+	-	-	0,41	-	-
G08	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Nigri</i>	SC	+	-	-	0,32	-	-
G25	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Flavi</i>	SC	+	0,07	1,49	0,15	2,93	-
GF1.5	<i>Lichtheimia ramosa</i>	CL	+	-	3,16	0,83	1,85	0,48

(+) = positivo; (-) negativo ou produção não detectada. Origem do isolado: CZ – compostagem do zoológico de São Paulo; EB - esponjas marinhas da costa brasileira; PBC – pilha de bagaço de cana; SC – solo de canavial; CL – compostagem de lixo.

Os fungos selecionados foram submetidos ao teste de antagonismo em cultivo sólido (Figura 3). Inicialmente a compatibilidade de crescimento foi monitorada para os três basidiomicetos marinhos (154, 155 e 205), pois estes cresciam mais lentamente do que os outros e, por esse motivo, foram testados em conjunto. Após 7 dias de incubação, o isolado 205 apresentou atividade inibitória quando cultivado com os isolados 154 e 155 e foi descartado do estudo. Os fungos i1D3 e o UNK cresceram por todo o meio e se sobrepuseram aos outros fungos no quinto dia de incubação e foram por essa razão descartados da seleção.

**Figura 3.** Teste de antagonismo e da atividade inibitória aplicado aos 8 fungos selecionados.



A – Frente da placa com os fungos inoculados, sendo C = controle sem inoculo; B – dorso da placa inoculada apenas com os basidiomicetos marinhos.

Os isolados 154, 155, B19, G25 e GF1.5 apresentaram comportamento semelhante e não impediram os outros fungos de crescer após 7 dias de incubação. Considerando os resultados de dinâmica de crescimento e inibição, esses 5 fungos foram selecionados e combinados em 6 consórcios, cada um composto por 3 diferentes fungos (Tabela 3). O critério de agrupamento estabelecido considerou a produção de pelo menos uma das enzimas do sistema ligninolítico.

**Tabela 3.** Consórcios fúngicos estabelecidos utilizando os 5 isolados selecionados.

Consórcios	Isolados	Composição
C1	155, G25, B19	<i>Marasmiellus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sect. <i>flavi</i> e <i>Fusarium</i> sp.
C2	155, GF1.5, B19	<i>Marasmiellus</i> sp., <i>Lichtheimia ramosa</i> e <i>Fusarium</i> sp.
C3	GF1.5, 154, 155	<i>Lichtheimia ramosa</i> , <i>Tinctoporellus</i> sp. e <i>Marasmiellus</i> sp.
C4	G25, GF1.5, 155	<i>Aspergillus</i> sect. <i>flavi</i> , <i>Lichtheimia ramosa</i> e <i>Marasmiellus</i> sp.
C5	G25, 155, 154	<i>Tinctoporellus</i> sp. e <i>Marasmiellus</i> sp. e <i>Aspergillus</i> sect. <i>flavi</i>
C6	B19, 154, 155	<i>Tinctoporellus</i> sp. e <i>Marasmiellus</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.

### 3.3.2. Caracterização taxonômica

Alguns dos fungos utilizados no presente trabalho já haviam sido taxonomicamente caracterizados, como é o caso dos 3 basidiomicetos marinhos 154, 155 e 205 identificados por Bonugli-Santos et al. (2010) como *Tinctoporellus* sp. (CBMAI 1061/CRM 592), *Marasmiellus* sp. (CBMAI 1062/CRM 593) e *Peniophora* sp. (CBMAI 1063/CRM 594), respectivamente. Os isolados 1B, 2A, 3A, i4, i5, i6, F02, F24, F48, F50, 7, 9, 14, 55-30, 55-45, F02, F49, F50 e i4 foram identificados utilizando a taxonomia convencional (caracterização morfológica) como pertencentes ao gênero *Aspergillus* seção *Fumigati*. Tendo em vista a pouca ou nenhuma atividade enzimática desses isolados o que os eliminou da seleção para os consórcios, a identificação molecular não foi

realizada. Além disso, representantes da seção Fumigati são considerados como micro-organismos potencialmente patogênicos oferecendo riscos ao ambiente de manipulação.

Os 3 isolados restantes constituintes dos consórcios (GF1.5, G25, B19) isolados no âmbito do projeto Temático Fapesp 2010/12624-0 (coordenado pela Profa. Dra. Eleni Gomes, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto) do qual o presente trabalho está associado, foram identificados em parceria com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. André Rodrigues (IB-UNESP, Rio Claro). Para tanto, foram utilizados marcadores moleculares apropriados para essa identificação. Os resultados estão apresentados na Tabela 4. Para esses isolados, análises morfológicas foram realizadas confirmando a identificação molecular. O isolado GF1.5 foi identificado em nível de espécie como *Lichtheimia ramosa*, sendo que para os outros 2 fungos a identificação foi em nível de gênero. O isolado B19 não pôde ser identificado até o nível de espécie, pois a região ITS é muito conservada dentro do gênero e a amplificação do gene fator de elongação  $\alpha$ , que melhor resolve a identificação desse grupo, está em processo de padronização. O isolado G25 teve sua identificação realizada a partir do sequenciamento do gene  $\beta$ -tubulina e o resultado das análises de Blast indicou que várias espécies de *Aspergillus* da seção *Flavi* apresentam 99% de similaridade de sequência. Essas espécies estão intimamente relacionadas e são morfológicamente similares. Os dados das análises filogenéticas mostraram que o isolado G25 está muito relacionado ao *A. arachidicola* (Figura 4) mas os resultados não foram conclusivos. Sendo assim, esse isolado foi identificado como *Aspergillus* sect. *Flavi*.

**Tabela 4.** Isolados de fungos filamentosos selecionados para identificação molecular.

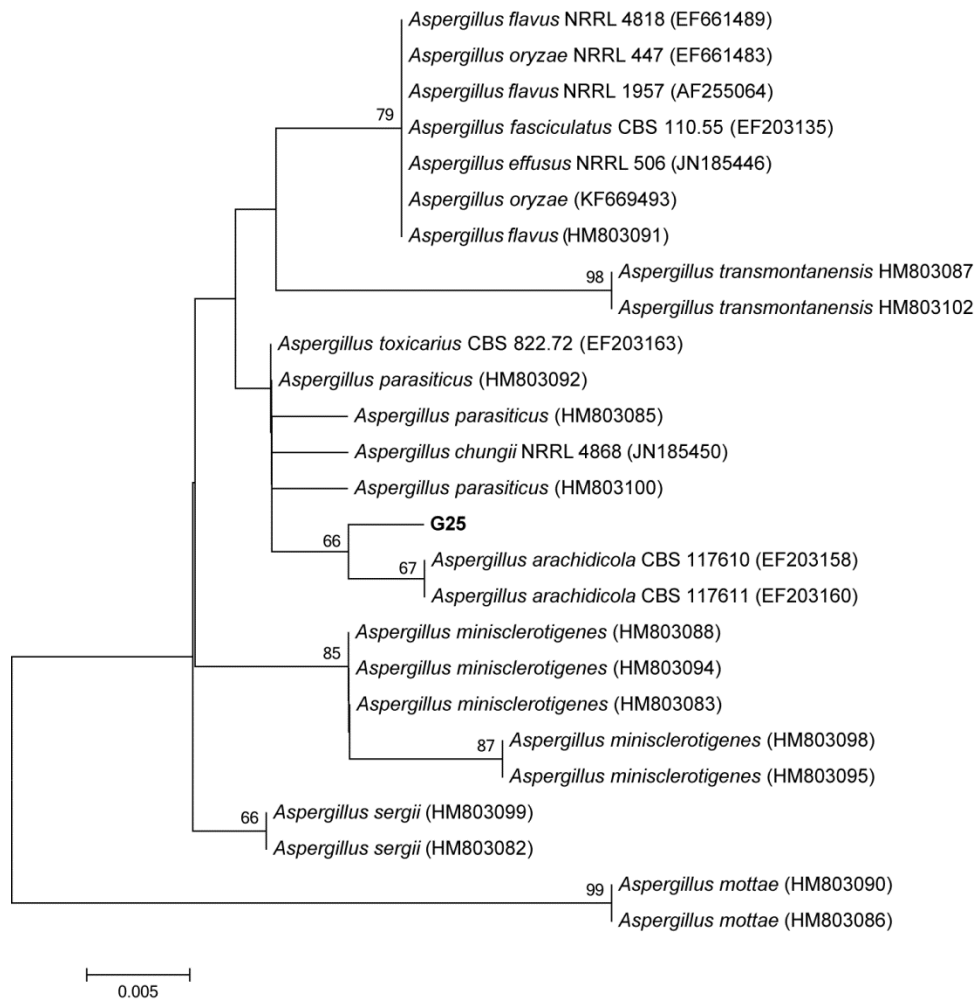
Código	Identificação	Genbank (Número de acesso Genbank)	Nº de acesso	Id <sup>3</sup> (%)	Região <sup>2</sup>
GF1.5	<sup>1</sup> <i>Lichtheimia ramosa</i>	<i>Lichtheimia ramosa</i> CBS 269.65	GQ342857	99	ITS
G25	<sup>1</sup> <i>Aspergillus</i> sect. <i>Flavi</i>	<i>A. parasiticus</i> KCCM35079	HQ285589	99	$\beta$ -tubulina
		<i>A. sojae</i> KCCM60354	HQ285598	99	
B19	<sup>1</sup> <i>Fusarium</i> sp.	<i>F. proliferatum</i> NRRL 31071	AF291061	99	ITS
		<i>F. oxysporum</i> ATCC MYA-3928	FJ196766	99	

<sup>1</sup>Nomes atuais das espécies de acordo com o *Index Fungorum*.

<sup>2</sup>Marcadores moleculares utilizados na identificação: ITS: *internal transcribed spacer*; TUB: gene  $\beta$ -tubulina;

<sup>3</sup>Identidade (em %) das sequências dos homólogos presentes no NCBI - GenBank database.

**Figura 4** – Árvore filogenética Neighbor-joining baseada nas sequências do gene  $\beta$ -tubulina de *Aspergillus* secti *Flavi* G25.



A árvore foi inferida sob Kimura 2-parametros com substituição de modelo. Os números nas ramificações indicam os valores de bootstrap a partir das 1000 pseudo-réplicas (valores menores que 50% não evidenciados). A barra de escala indica 0,005 substituições por sítios. Todas as sequencias foram recuperadas a partir do GenBank (acessos são evidenciados nos parênteses). Os vouchers do CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) e o NRRL (National Center for Agricultural Utilization Research) também estão em evidenciadas.

### 3.4. Discussão

A triagem qualitativa teve como propósito selecionar fungos capazes de produzir enzimas ligninolíticas. Este é um teste simples e econômico que fornece um resultado visual rápido, revelando os isolados produtores das principais enzimas do complexo ligninolítico. O teste mostrou-se eficiente, visto que 19 isolados de fungos filamentosos representantes de 9 diferentes táxons, foram positivos na triagem qualitativa em meio sólido contendo guaiacol. Com exceção dos isolados positivos no teste qualitativo identificados como *Aspergillus* sect. *Fumigati*, *Trichoderma asperelloides* e *Aspergillus* sect. *Nigri*, todos os outros isolados positivos foram capazes de produzir ao menos duas enzimas do complexo ligninolítico. Em adição, os 9 isolados considerados negativos para produção de enzimas ligninolíticas na triagem qualitativa em meio sólido (todos pertencentes ao gênero *Aspergillus* seção *Fumigati*) produziram apenas a enzima lacase em quantidades muito baixas utilizando como substrato a siringaldazina. Esses resultados, corroboram os dados do teste qualitativo sendo, portanto importante destacar que a oxidação do guaiacol pode revelar novas fontes de recursos genéticos fúngicos a serem exploradas e aplicadas em processos de degradação de poluentes ambientais e de decomposição de materiais lignocelulósicos.

Ao longo dos anos, um grande número de micro-organismos incluindo bactérias, leveduras e fungos têm sido estudados e caracterizados de acordo com suas habilidades em degradar a lignina, hemicelulose e celulose. Os fungos filamentosos são os organismos mais utilizados por conta da sua capacidade de produção e secreção de enzimas ligninolíticas para a degradação vegetal (VALENCIA; CHAMBERGO, 2013). Desta forma, um método eficiente e rápido de seleção de isolados se faz necessário.

O complexo ligninolítico desperta interesse, principalmente nos basidiomicetos da podridão branca devido a sua habilidade de oxidação da lignina e a uma ampla escala de compostos similares complexos incluindo os fenólicos e não fenólicos (WAN; LI, 2012). Apesar disso, existe uma enorme diversidade de micro-organismos não explorados (HIBBETT et al., 2011; KIRK et al., 2008), contribuindo para a falta de informação sobre outros grupos microbianos que possam desempenham papel similar. Dessa maneira, o presente trabalho também teve como objetivo contribuir com novas informações sobre recursos microbianos ainda pouco explorados para aplicação na área de degradação da biomassa lignocelulósica. Os fungos utilizados nesse trabalho são originalmente de ambientes distintos, cada um com um ecossistema particular. No entanto, todos esses ecossistemas possuem uma característica comum aos micro-organismos integrantes, que é a decomposição de matéria orgânica. Sejam eles fungos terrestres ou aquáticos, devem

possuir metabolismo adaptado e especializado no processo de degradação de matéria orgânica, incluindo um amplo complexo enzimático (BARLOCHER; BODDY, 2016).

Dois dos gêneros positivos para a produção enzimática, *Aspergillus* (fungo anamórfico) e *Lichtheimia* (Zygomycota) são derivados de compostagem. Os principais componentes desse ambiente são proteínas, lipídeos e lignina (PINTO, 2005). Contudo, nenhum deles apresentou elevados níveis de atividade enzimática para as enzimas monitoradas nas condições utilizadas no teste quantitativo. Esse resultado pode estar associado à fonte de carbono e energia do meio utilizado (extrato de malte), bem como às condições de cultivo, as quais são diferentes do de uma composteira. No estudo reportado por Malek et al. (1988) e Garcia et al. (2015) a máxima produção de enzimas celulolíticas pelos micro-organismos isolados de composteira *Streptomyces* e *Lichtheimia* só ocorreu em temperaturas maiores do que 28°C (37°C e 65°C respectivamente). O mesmo fato ocorreu para o único fungo isolado da pilha de bagaço de cana *Myceliophthora thermophila* (Ascomycota) complementando a ideia de que mesmo no caso de materiais orgânicos empilhados, o aquecimento gerado pela atividade de micro-organismos presentes nesse meio, pode ser um fator relevante na produção de enzimas ligninolíticas. Esse fungo foi encontrado crescendo em temperaturas entre 38-45°C, em composteiras, ambientes úmidos e solo superaquecido pelo sol (MAHESHWARI et al., 2000; LYSEK; JENNINGS, 1999). Em adição, Berka e colaboradores (1997) também avaliaram a capacidade de produção de lacase por *Myceliophthora thermophila* na aplicação industrial, visando utilização dessas enzimas para substituição de reagentes químicos perigosos empregados nas indústrias de polpa e papel e de corantes têxteis. De forma geral, a capacidade do micro-organismo em assimilar a biomassa lignocelulósica está relacionada não somente com a habilidade de produzir as enzimas necessárias para a degradação, mas também em estar envolvido em uma ação sinérgica com outras enzimas e/ou com outros micro-organismos.

Essa particularidade também deve ser considerada para os isolados oriundos do solo de canavial, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* sect. *Nigri* e *Aspergillus* sect. *Flavi*, onde a diversidade de micro-organismos existentes é muito alta. Estima-se o valor de 10<sup>9</sup> células microbianas por grama de solo, representando entre 10-30 mil genomas microbianos distintos (ROESCH et al., 2007). Segundo Purcena (2014), as biomoléculas e as enzimas presentes no solo do cultivo de cana-de-açúcar podem ser recursos indicadores de fertilidade, bem como ferramentas para a remediação de solos degradados. Os principais grupos de enzimas encontrados nesse ecossistema são as glicosidases, oxidoredutases e fosfatases. No presente trabalho, os fungos derivados de solo de canavial



(*Fusarium*, *Trichoderma* e *Aspergillus*) demonstraram capacidade de produção de enzimas degradadoras da lignina, e sobretudo a lacase, uma fenoloxidase, conhecida pelo seu potencial de degradação de compostos fenólicos, comumente presentes em poluentes. Apesar de estarem em quantidades baixas, as enzimas LiP e MnP foram produzidas pelo fungo de solo de canavial *Aspergillus* sect. *Flavi*. A presença de peroxidases em solos é de grande importância não apenas pelo seu papel na decomposição da lignina presente na matéria orgânica, mas também por sua participação no processo de humificação e transformação de xenobióticos (PURCENA, 2014).

O papel ecológico dos fungos que habitam o ambiente marinho é o mesmo dos fungos que habitam ambientes terrestres: decomposição de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes. Desta forma, os fungos de origem marinha têm sido foco de estudos relacionados com a degradação de compostos recalcitrantes. Fungos filamentosos isolados de diferentes substratos marinhos (e.g. invertebrados, madeira em decomposição, água do mar, sedimentos, detritos de mangue) têm sido reportados como produtores de enzimas hidrolíticas e/ou oxidativas tais como: liases alginato, amilases, celulases, quitinases, glicosidases, inulinases, queratinases, ligninases, lipases, nucleases, fitases, proteases e xilanases, (BONUGLI-SANTOS et al., 2015). Os isolados de origem marinha utilizados no presente trabalho *Tinctoporellus* sp., *Marasmiellus* sp. e *Peniophora* sp. (Basidiomycota) produziram todas as enzimas do complexo ligninolítico estudadas incluindo a GLOX e com destaque para as lacases. Esses isolados foram previamente estudados pelo nosso grupo de pesquisa e mostraram habilidade para produção significativa de enzimas ligninolíticas (BONUGLI-SANTOS et al., 2011; BONUGLI-SANTOS et al., 2010), bem como degradação de poluentes ambientais, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (MAGRINI, 2012) e corantes têxteis (BONUGLI-SANTOS et al., 2016; BONUGLI-SANTOS et al., 2012).

De acordo com Baldrian e Gabriel (2003) a produção de enzimas por fungos é dependente da fisiologia desses organismos e da composição do meio de cultivo. Fontes de carbono e nitrogênio são fundamentais para a produção enzimática e isso tem sido percebido tanto em fungos terrestres quanto em fungos marinhos (VELMURUGAN; LEE, 2012). Pouco se sabe ainda sobre o ambiente marinho e seus ecossistemas. Entretanto, ao longo dos anos inúmeros esforços vêm sendo realizados para ampliar o conhecimento em relação a diversidade de fungos marinhos principalmente por causa do interesse em suas enzimas que podem apresentar propriedades específicas e suas possíveis aplicações a indústrias.

A degradação microbiana da lignina tem sido bem estudada utilizando fungos ou bactéria de forma individual. Recentemente, pesquisas relacionadas com a aplicação de consórcios ao pré-tratamento do material lignocelulósico, na produção de enzimas e sacarificação têm sido reportadas em literatura (PÉREZ-RANGEL, 2015; LIANG J. et al., 2015; DHIMAN et al., 2015). A mistura de culturas fúngicas tem muitas vantagens se comparada à monocultivos, incluindo o melhoramento da produtividade, da adaptabilidade e da utilização do substrato (KALYANI et al., 2013). Na área de tratamento de águas residuais por exemplo, utilização de múltiplos micro-organismos têm demonstrado uma eficiência maior do que quando se utiliza um micro-organismo isolado (LV et al., 2014). Chandra (2001) utilizou um consórcio microbiano de *Pseudomonas putida*, *Citrobacter* sp. e *Enterobacter* sp. para tratar o efluente de indústria de polpa e papel por meio do processo de lodo ativado e percebeu que os organismos não só diminuíram a coloração para 98% como também diminuíram a DQO, DBO e compostos fenólicos em 96,63%, 96,80%, 96,92%, respectivamente após 24h de processo.

No presente trabalho, os estudos relacionados com a produção de enzimas do complexo ligninolítico e antagonismo, permitiram a estruturação de seis consórcios fúngicos com potencial para degradação de biomassa lignocelulósica.

## ***CAPÍTULO 2***

### **Degradação de lignina de resíduos agroindustriais por consórcios de fungos filamentosos**

#### 4.0. Resumo

Diferentes métodos de pré-tratamento (químico, físico e biológico) têm sido explorados para aumentar a acessibilidade aos substratos lignocelulósicos. Dessa maneira, nesse capítulo foram investigados seis consórcios previamente selecionados quanto à capacidade de produção de ligninases, para aplicação da degradação de lignina contida em sabugo de milho, casca de arroz e bagaço de cana. Os biotratamentos foram realizados por um período de 7 dias a 28°C e 140 rpm. Todos os ensaios foram avaliados quanto à composição química final dos resíduos, seletividade (porcentagem de celulose/lignina) e a atividade enzimática das enzimas LiP, MnP, Lacase (Siringaldazina e ABTS) e GLOX. O efeito do tratamento microbiano revelou perfis variáveis de degradação da lignina e seletividade por parte dos consórcios estudados. O desempenho enzimático revelou que o sabugo de milho e bagaço de cana tiveram maior influência na produção das enzimas ligninolíticas sendo a LiP e a MnP detetadas em quantidades baixas enquanto a lacase foi observada em maiores quantidades em todos os consórcios. Em relação à biomassa, o bagaço de cana foi considerado o resíduo que mais sofreu alteração em sua composição ao final do processo, sendo modificado por todos os consórcios estudados (exceto pelo C4), seguido pelo sabugo de milho para os consórcios 2, 4, 5 e 6. A casca de arroz foi o resíduo mais resistente ao ataque dos micro-organismos empregados, sendo parcialmente atacada pelos consórcios C5 e C6. Com relação à seletividade, o bagaço de cana foi o resíduo que apresentou maior número de consórcios (exceto o C2) com valores de celulose/lignina maiores do que a biomassa *in natura* quando comparado com os outros dois resíduos. Os consórcios C5 e C6 apresentaram os maiores valores de seletividade quando comparados com os outros 4 consórcios para os 3 resíduos estudados. Estes dois consórcios apresentaram também valores maiores de seletividade do que os valores da biomassa *in natura* quando cultivados nos resíduos casca de arroz e bagaço de cana.

**Palavras-chave:** Resíduos agroindustriais, consórcios microbianos, enzimas lignocelulolíticas, degradação de lignina.

#### 4.1. Introdução

O recente cenário energético tem estimulado o melhoramento de tecnologias que favoreçam a produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica utilizada como uma fonte alternativa de energia, visando redução do consumo de combustíveis fósseis. A conversão da biomassa lignocelulósica por fermentação é um assunto extremamente discutido por décadas e ainda é considerado um grande desafio. A produção de combustíveis ou de produtos químicos de valor agregado a partir da biomassa verde requer a sua hidrólise em açúcares fermentescíveis, um estágio crucial na eficiência do processo (BINOD et al., 2011; ROPARS et al., 1992). A lignina presente no material lignocelulósico é o segundo composto mais abundante na natureza depois da celulose, sendo aproximadamente  $5 \times 10^6$  toneladas desse polímero produzido por ano (MAI et al., 2000; POLLEGIONI, 2015).

A lignocelulose é uma mistura complexa de polímeros de carboidratos de celulose, hemicelulose e lignina, onde os polímeros de carboidratos estão fortemente ligados à lignina principalmente por ligação de hidrogênio e também por algumas ligações covalentes (KUHAD et al., 2011; LEE, 1997). A lignina é composta por unidades de fenilpropano tais como, álcool p-cumaril, álcool coniferil e o álcool sinapílico e são muito resistentes à degradação (MENON; RAO, 2012; VAN DYK; PLETSCHE, 2012; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). A composição de vários materiais lignocelulósicos, assim como a composição da lignina, é variável entre plantas de madeiras duras (angiospermas) e madeiras moles (gimnospermas). A biomassa vegetal em geral consiste de 40-50% de celulose, 25-30% de hemicelulose, 15-20% de lignina e outros componentes extrativos (SANTOS, 2012), por isso a escolha apropriada da biomassa está diretamente associada ao sucesso do processo de conversão.

Diferentes métodos de pré-tratamento (químico, físico e biológico) têm sido explorados para aumentar a acessibilidade aos substratos lignocelulósicos. Entretanto, a maioria dos pré-tratamentos demanda muita energia ou gera algum subproduto tóxico que afeta a sua viabilidade econômica (SIMS et al., 2010; LUCAS, et al., 2012). Dessa maneira, o pré-tratamento biológico tem se tornado uma “estratégia verde” de otimizar o processo de quebra da lignina como intuito de melhorar a hidrólise e a digestibilidade da biomassa (TIWARI et al., 2013; GUPTA et al., 2011; SALVACHÚA, 2011). O tratamento biológico ainda possui a vantagem de ser aplicado isoladamente ou em conjunto com os outros pré-tratamentos.

Durante anos, esforços têm sido concentrados na utilização dos fungos da podridão branca para o tratamento da biomassa levando em consideração a habilidade desses micro-organismos em degradar compostos aromáticos e em produzir enzimas ligninolíticas. Portanto, a aplicação de fungos pertencentes ao filo Basidiomycota de maneira isolada, pode acabar limitando o processo, já que estes necessitam de um longo período de incubação. Além disso, em um ecossistema natural, a quebra da lignina ocorre por uma ação sinérgica de várias enzimas produzidas por diferentes fontes microbianas (TAHA et al., 2015; ARO et al., 2005). Isso reforça a ideia de que o consórcio microbiano representa uma promissora abordagem, útil no entendimento da interação do complexo de micro-organismos e na relação sinérgica do mix de enzimas gerados na natureza para a biodegradação de biomassa lignocelulósica.

Dessa forma, o presente capítulo aborda a avaliação do desempenho de 6 consórcios microbianos formados por micro-organismos de origem marinha e de solo de canal no processo de deslignificação de resíduos agroindustriais, bem como o estudo da produção de enzimas ligninolíticas. Para tanto, o trabalho teve como objetivos: i) avaliação do crescimento dos consórcios em meio de cultivo; ii) quantificação da atividade enzimática das enzimas ligninolíticas (LiP, MnP, Laccase e GLOX); iii) avaliação da mudança composicional dos resíduos após o biotratamento.

## **4.2. Material e Métodos**

### ***4.2.1. Preparação dos pré-inóculos fúngicos***

Todos os isolados foram cultivados em ágar malte (2%) e incubados a 28°C por 7 dias a fim de se obter biomassa microbiana para preparação do pré-inóculo. O pré-inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 150 mL contendo 50 mL de meio MB2 líquido (2% de extrato de malte). Foram adicionados a esses frascos separadamente 3 plugs (5 mm de diâmetro) cortados das bordas das colônias dos fungos cultivados em placa. Os ensaios foram mantidos em shaker sob agitação de 140 rpm a 28°C por 7 dias. Após essa etapa, os pré-inóculos foram destinados aos ensaios de tratamento das biomassas.

### ***4.2.2. Material lignocelulósico***

Os resíduos lignocelulósicos foram obtidos por doação de um produtor de Minas Gerais (Pouso Alegre) que cultivava cana-de-açúcar, arroz e milho em uma mesma fazenda. Os materiais foram processados de acordo com cada necessidade antes da execução dos ensaios. O bagaço de cana foi previamente lavado com água por três vezes

para a remoção dos açúcares residuais e de outras impurezas oriundas da fazenda, e em seguida foi seco em estufa por uma semana a 80°C por 24h. O bagaço foi triturado e passado em peneira com malha de 16-18 mesh para sua homogeneização. A espessura da fibra do bagaço obtida foi de 1 mm a 2 mm. O sabugo de milho foi separado dos grãos, foi seco em temperatura ambiente por 1 semana e triturado em pequenos pedaços de 5 mm de espessura cada. A casca de arroz também foi separada do grão e foi mantida sua forma e tamanho original (4-6 mm). Todos os resíduos após a sua preparação foram divididos em pequenas quantidades e mantidos em temperatura ambiente dentro de sacos plásticos, armazenados em uma caixa hermeticamente fechada para controle de umidade.

#### **4.2.3. Tratamento biológico da biomassa lignocelulósica**

O biotratamento foi realizado utilizando o bagaço de cana (BC), a casca de arroz (CA) e o sabugo de milho (SM) já processados em um ensaio de fermentação semissólida. A biomassa bruta (2,5 g) foi adicionada a um frasco Erlenmeyer de 150 mL contendo 20 mL de meio mineral *Savitha* (SAVITHA et al. 2007) esterilizado composto por (g.L<sup>-1</sup>): 7,0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O, 1,0 extrato de levedura, 0,1 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,008 FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,0001 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,5 tartarato de diamônio. Em seguida, 10 mL de pré-inóculo correspondente a cada fungo cultivado previamente em malte foi inserido no meio de cultura. O experimento foi mantido em shaker sob agitação de 140 rpm a 28 °C durante 7 dias. Ao final desse período todos os ensaios foram retirados do agitador para dar sequência à análise de dados. Após a hidrólise, a biomassa foi separada do meio líquido por meio de filtração e os micélios fúngicos foram cuidadosamente removidos. O líquido filtrado foi submetido a análise de atividade enzimática, enquanto os substratos lignocelulósicos foram mantidos em estufa de secagem a 80°C por 24 horas ou até que o peso se mantivesse constante e, só após esse procedimento, foi dado início à análise composicional.

#### **4.2.4. Métodos analíticos**

##### **4.2.4.1. Análise composicional**

Os substratos lignocelulósicos, incluindo a condição não tratada (antes do bioprocessamento) e biotratada (depois do bioprocessamento) foram avaliados seguindo a norma para determinação de carboidratos estruturais e lignina da biomassa, desenvolvida pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) dos Estados Unidos (SLUITER et al., 2008). As quantidades de celulose, hemicelulose e lignina dos substratos foram avaliadas a partir de uma hidrólise ácida de duas fases. A quantidade total de lignina foi

calculada com base nas quantidades de lignina ácida (LAS) solúvel e de lignina ácida insolúvel (LAI), as quais foram obtidas por análises gravimétricas e de espectrofotometria de UV-vis, respectivamente. A hemicelulose e a celulose foram monitoradas usando a glicose e a xilose como parâmetro e foram obtidas a partir do líquido filtrado da hidrólise ácida, o qual foi mensurado por cromatografia de trocas de iônica, usando o HPAEC-PAD (Thermo Scientific (Dionex ICS-5000, Sunnyvale, Califórnia, USA) com coluna de troca aniônica CarboPac® PA-1 a 25°C. Os diluentes foram preparados com água deionizada ultrapura de 18 MΩ e desgaseificada com N<sub>2</sub>. O fluxo usado foi de 1 ml min<sup>-1</sup> com solvente A (água ultrapura) e B (NaOH 500 mmol L<sup>-1</sup>), usando o modo de eluição isocrática com 4,8% de B e 95,2% de A, durante 25 minutos. A degradação da lignina foi determinada pela porcentagem total de lignina diminuída ao final do biotratamento. Esse valor foi calculado usando a diferença entre os pesos secos, antes e depois do biotratamento. A eficiência da lignina removida foi calculada seguindo a equação abaixo:

$$LR (\%) = \frac{(L_O - L_T) \times 100}{L_O}$$

Onde, LR significa a eficiência da lignina removida, L<sub>O</sub> é a quantidade de massa de lignina na amostra original do substrato e L<sub>T</sub> é a quantidade de lignina da amostra tratada.

Em paralelo ao cálculo composicional, foram também realizadas análises visando correlacionar a relação entre a celulose e a lignina, sendo denominado de Seletividade, onde adotou-se a razão:

$$\text{Seletividade} = \frac{\% C_f}{\% L_f}$$

Onde C<sub>f</sub>, significa a porcentagem final de celulose contida na biomassa após o tratamento biológico, e L<sub>f</sub> é a porcentagem final de lignina contida na biomassa após o tratamento biológico.

#### **4.2.4.2. Quantificação das enzimas ligninolíticas**

A atividade enzimática foi medida a partir do caldo enzimático bruto filtrado após o biotratamento (140 rpm, 28 °C, 7 dias). Esse caldo enzimático foi centrifugado a 10.000 rpm, por 30 minutos a temperatura de 5°C. A partir do sobrenadante é que foram avaliadas as atividades das enzimas lignina peroxidase (EC: 1.11.1.14) (LiP), manganês peroxidase (EC: 1.11.1.13) (MnP), lacase (EC: 1.10.3.2) (siringaldazina e ABTS) e Glioxal oxidase (EC 1.2.3.5) (GLOX).



#### **4.2.4.3. Lignina Peroxidase**

A atividade da lignina peroxidase foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS a partir do aldeído veratrílico produzido ( $\epsilon_{310\text{nm}} = 9300\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) na oxidação do álcool veratrílico que foi usado como substrato. A mistura era composta de 1 mL de tampão tartarato de sódio 125 mM pH 3,0; 0,5 mL de álcool veratrílico 10 mM; 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,5 mL do caldo enzimático. A reação foi iniciada adicionando o peróxido de hidrogênio e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado a 310 nm, após 10 minutos de reação (ARORA; GILL, 2001).

#### **4.2.4.4. Manganês Peroxidase**

Esta atividade foi quantificada pelo método modificado de Wariishi et al. (1992) com a adição de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 mM) em 0,8 mL de tampão malonato de sódio (60 mM; pH 4,5), 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnSO}_4$  (10 mM), e 0,1 mL de extrato enzimático. A formação do complexo  $\text{Mn}^{+3}$ -malonato foi acompanhada a 270 nm ( $\epsilon = 11590\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) após 5 min de reação.

#### **4.2.4.5. Lacase**

A atividade enzimática de lacase foi determinada por espectrofotômetro por dois métodos distintos: 1) Oxidação da siringaldazina ( $\epsilon_{525\text{nm}} = 65.000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ): A mistura continha 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), 0,1 mL de água deionizada, 0,6 mL da solução enzimática e 0,1 mL de siringaldazina 1,0 mM preparada em etanol (P.A.). O monitoramento do aumento da absorvância foi verificado a 525 nm. e 2) Oxidação do 2,2-azino-bis-etilbenthiazolina (ABTS): a mistura continha 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 0,1 mL de solução de ABTS a 0,03% e 0,6 mL da solução enzimática (BUSWELL et al., 1996). A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorvância a 420 nm, após 10 minutos de incubação a 37°C.

#### **4.2.4.6. Glioxal oxidase (GLOX)**

A atividade da GLOX foi determinada através da oxidação da metilglioxal (KERSTEN & KIRK, 1987) pelo aumento da absorvância a 436 nm. A reação ocorreu a partir da mistura de: 10 $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, 10 $\mu\text{L}$  de solução stock (100x) de 2,8 mM guaiacol (Sigma, Aldrich); 10 $\mu\text{L}$  de 1mgL<sup>-1</sup> de solução de peroxidase, 50 $\mu\text{L}$  de metilglioxal (acetilformaldeído, Sigma) e 120  $\mu\text{L}$  de solução tampão de ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio de pH 6,0.

Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em  $\text{U L}^{-1}$  do caldo enzimático e os cálculos realizados a partir da equação descrita abaixo, derivada da Lei de Lambert-Beer:

$$\text{U L}^{-1} = \Delta A \times V \times 10^6 / \epsilon \times R \times t$$

onde:

- $\Delta A$  diferença entre a absorvância final e a inicial
- $V$  volume da reação (0,001 L em todos os casos)
- $10^6$  converte os mols de  $\epsilon$  para  $\mu\text{mols}$
- $\epsilon$  coeficiente de extinção ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )
- $R$  quantidade de caldo enzimático (L)
- $T$  tempo de reação (min)

#### 4.2.4.7. *Análise Estatística*

Todos os experimentos apresentados nos gráficos e nas tabelas foram realizados em réplicas, sendo calculado o desvio padrão para todas as amostras.

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. *Análise do desenvolvimento e crescimento dos consórcios*

Ao longo do período de 7 dias, foi possível notar que os 6 consórcios foram capazes de crescer nos substratos empregados. A temperatura de 28°C não interferiu de forma negativa no desenvolvimento dos isolados utilizados. O crescimento e a adesão micelial nos substratos foram visualmente observados no 5º dia de incubação, confirmando o potencial desses fungos de crescerem juntos e sob as condições estipuladas.

#### 4.3.2. *Efeito do tratamento biológico na remoção da lignina*

O efeito do tratamento microbiano revelou perfis variáveis de degradação da lignina por parte dos consórcios estudados. Porém, como o balanço das massas apresentou um valor total de 61,01% para o sabugo de milho, 66,53% para a casca de arroz e 65,35% para o bagaço de cana, a análise de correlação entre a porcentagem de celulose e de lignina (denominada seletividade) após os tratamentos para os 3 resíduos estudados, foi aplicada em conjunto com a análise de deslignificação.

Durante os sete dias de incubação, o consórcio C1 (*Marasmiellus* sp., *Aspergillus* sect. *flavi* e *Fusarium* sp.) apresentou maior dificuldade em degradar o sabugo de milho

e a casca de arroz, apresentando quantidades maiores de lignina em relação ao resíduo *in natura* (Tabela 5 e 6). No entanto, esse mesmo consórcio apresentou o melhor resultado para remoção da lignina do bagaço de cana, apresentando no final do processo 11,38% de lignina enquanto que o bagaço não tratado continha 21,88% de lignina. Esse resultado corresponde a 47,94% da eficiência na deslignificação do material (Tabela 7). A análise de seletividade para esse consórcio apresentou valores inferiores para o sabugo de milho e a casca de arroz quando comparado com os outros consórcios e com a biomassa *in natura*.

O consórcio C2 (*Marasmiellus* sp., *Lichtheimia ramosa*, *Fusarium* sp.), obteve o segundo melhor resultado quanto à diminuição do teor de lignina quando cultivado em bagaço de cana (41,54%) (Tabela 7) e sabugo de milho (30,33%) (Tabela 5). Quando adicionado ao tratamento da casca de arroz (Tabela 6), o consórcio não apresentou capacidade de deslignificação, permanecendo com 19,70% de lignina na composição. Contrariamente aos perfis de deslignificação, a análise de seletividade apontou valores inferiores aos valores dos outros consórcios (de maneira geral) e também ao valor da biomassa *in natura* (Tabela 5, 6 e 7).

Os resultados do consórcio C3 (*Lichtheimia ramosa*, *Tinctoporellus* sp., *Marasmiellus* sp.) foram muito semelhantes aos do C1, a deslignificação (31,85%) foi observada no cultivo com bagaço de cana não havendo resposta positiva no cultivo de casca de arroz e sabugo de milho (Tabela 5). Por outro lado, a análise de seletividade demonstrou que as razões entre os valores de celulose/lignina foram maiores nos resíduos casca de arroz (Tabela 6) e bagaço de cana (Tabela 7) do que a razão obtida para biomassa *in natura*. Em relação aos outros consórcios, o resultado de seletividade foi melhor do que para os consórcios C1 e C2.

Os resultados do tratamento biológico com o consórcio C4 (*Aspergillus* sect. *flavi*, *Lichtheimia ramosa*, *Marasmiellus* sp.), revelaram que o cultivo em sabugo de milho foi o único dos três substratos com redução da lignina, que passou de 19,52% (*in natura*) para 16,05%, equivalendo a 17,75% de deslignificação (Tabela 5). No entanto, o resultado de seletividade para este resíduo foi menor do que da biomassa *in natura* e maior do que os resultados dos consórcios C1, C2 e C3. Para os resíduos casca de arroz (Tabela 6) e bagaço de cana (Tabela 7) os resultados de seletividade foram maiores do que os da biomassa *in natura*.

Os consórcios C5 (*Tinctoporellus* sp., *Marasmiellus* sp., *Aspergillus* sect. *flavi*) e C6 (*Tinctoporellus* sp., *Marasmiellus* sp., *Fusarium* sp.) revelaram comportamento semelhante durante o tratamento dos resíduos. Ambos obtiveram resultados parciais de

remoção da lignina nos três resíduos avaliados. Para o sabugo de milho (Tabela 5) e a casca de arroz (Tabela 6), a deslignificação ocorreu em pequenas quantidades em relação ao bagaço de cana (Tabela 7), sendo 1,53% e 1,96% correspondentes ao C5 e 11,77% e 1,84 % correspondentes ao C6, respectivamente. Para o bagaço de cana, a porcentagem de lignina diminuída foi equivalente a 29,41% para o consórcio C5 e 19,76% para o consórcio C6. O resultado da seletividade apontou valores maiores do que os obtidos com os outros 4 consórcios nos cultivos com sabugo de milho (Tabela 5), casca de arroz (Tabela 6) e bagaço de cana (Tabela 7). Porém, os valores de seletividade foram maiores do que os valores da biomassa *in natura* apenas para os resíduos casca de arroz e bagaço de cana.

De acordo com as análises de deslignificação, o bagaço de cana (Tabela 7) foi considerado o resíduo que mais sofreu alteração em sua composição ao final do processo, sendo modificado por todos os consórcios estudados (exceto pelo C4), seguido pelo sabugo de milho para os consórcios 2, 4, 5 e 6. A casca de arroz foi o resíduo que mais se mostrou resistente ao ataque dos micro-organismos empregados, sendo apenas parcialmente atacada pelos consórcios C5 e C6 (Tabela 6). Com relação à seletividade, o bagaço de cana foi o resíduo que apresentou um maior número de consórcios (todos exceto o C2) com valores de celulose/lignina maiores do que a biomassa *in natura* (Tabela 7) quando comparado com os outros dois resíduos.

A composição da celulose e da xilana variaram ao longo dos tratamentos empregados, apresentando de maneira geral uma leve diminuição ou aumento de acordo com os resíduos ou consórcios empregados. Os seis consórcios apresentaram valores de celulose menores ou iguais à metade do valor da celulose do sabugo de milho *in natura* (Tabela 5), o mesmo foi observado para o consórcio C2 quando cultivado em bagaço de cana (Tabela 7). Para a xilana, os valores foram de forma geral, menores do que a biomassa *in natura* para os resíduos casca de arroz (Tabela 6) e bagaço de cana (Tabela 7). O consórcio C2 apresentou uma porcentagem de xilana bastante reduzida para os 3 resíduos estudados, o consórcio C1 para casca de arroz e bagaço de cana, enquanto que o C4 e C6 apresentaram porcentagem de xilana bastante reduzida quando cultivados em casca de arroz.

**Tabela 5.** Composição do sabugo de milho, antes (*in natura*) e após o tratamento biológico e a relação entre celulose/lignina (seletividade) de 6 diferentes consórcios após 7 dias de incubação. (Média de triplicatas).

Consórcios	C1	C2	C3	C4	C5	C6	<i>In natura</i>
*Celulose	8,15	6,41	11,67	10,63	13,56	14,29	28,74 ± 9
*Xilana	13,50	5,76	20,90	26,35	22,98	25,48	12,55 ± 0,86
*Lignina	20,30	13,60	25,45	16,05	19,22	17,22	19,52 ± 0,7
*Deslignificação	-	30,33	-	17,75	1,53	11,77	-
Seletividade (Celulose/Lignina)	0,40	0,47	0,46	0,66	0,71	0,85	1,47

\*Valores expressos em %.

**Tabela 6.** Composição da casca de arroz antes (*in natura*) e após o tratamento biológico e a relação entre celulose/lignina (seletividade) de 6 diferentes consórcios após 7 dias de incubação. (Média de triplicatas).

Consórcios	C1	C2	C3	C4	C5	C6	<i>In natura</i>
*Celulose	20,21	14,64	27,45	32,58	31,29	26,86	18,43 ± 0,43
*Xilana	2,20	3,94	12,34	7,10	12,55	7,78	29,66 ± 1,03
*Lignina	23,43	19,70	23,62	23,62	18,07	18,10	18,44 ± 1,8
*Deslignificação	-	-	-	-	1,96	1,84	-
Seletividade (Celulose/Lignina)	0,86	0,74	1,16	1,38	1,73	1,48	1,00

\*Valores expressos em %.

**Tabela 7.** Composição do bagaço de cana antes (*in natura*) e após o tratamento biológico e a relação entre celulose/lignina (seletividade) de 6 diferentes consórcios após 7 dias de incubação. (Média de triplicatas).

Consórcios	C1	C2	C3	C4	C5	C6	<i>In natura</i>
*Celulose	16,38	13,24	24,45	31,08	35,71	29,54	26,02 ± 0,60
*Xilana	2,86	2,80	12,26	19,05	16,83	13,53	17,45 ± 0,44
*Lignina	11,38	12,78	14,91	22,11	15,44	17,55	21,88 ± 1,7
*Deslignificação	47,94	41,54	31,85	-	29,41	19,76	-
Seletividade (Celulose/Lignina)	1,44	1,04	1,64	1,41	2,31	1,68	1,18

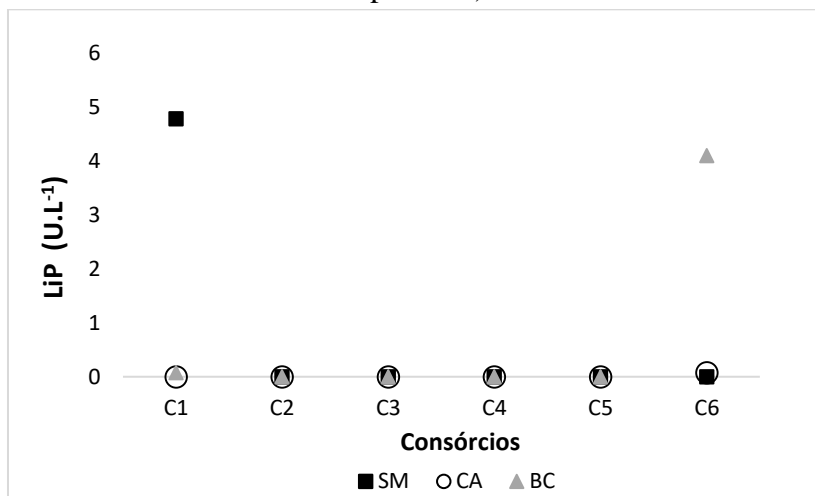
\*Valores expressos em %.

### ***4.3.3. Resposta enzimática dos consórcios em relação ao cultivo em diferentes substratos lignocelulósicos***

Os resultados relacionados ao desempenho enzimático dos consórcios estudados nesse trabalho revelaram que as biomassas lignocelulósicas sabugo de milho e bagaço de cana tiveram maior influência na produção das enzimas ligninolíticas. Quando os consórcios foram cultivados em sabugo de milho, as enzimas LiP (Figura 5) e MnP (Figura 6) foram detectadas apenas por alguns consórcios e em baixas quantidades ( $\leq 5,0$  U.L<sup>-1</sup>), enquanto que a lacase (Figura 7) apresentou uma atividade mais expressiva para todos os consórcios. Para o cultivo com o bagaço de cana a presença da LiP (Figura 5) e da MnP (Figura 6) foi verificada em dois dos consórcios monitorados diferentes dos que apresentaram essas mesmas enzimas em sabugo de milho. No bagaço de cana a produção de lacase (Figura 7) foi também mais expressiva do que a de LiP e MnP.

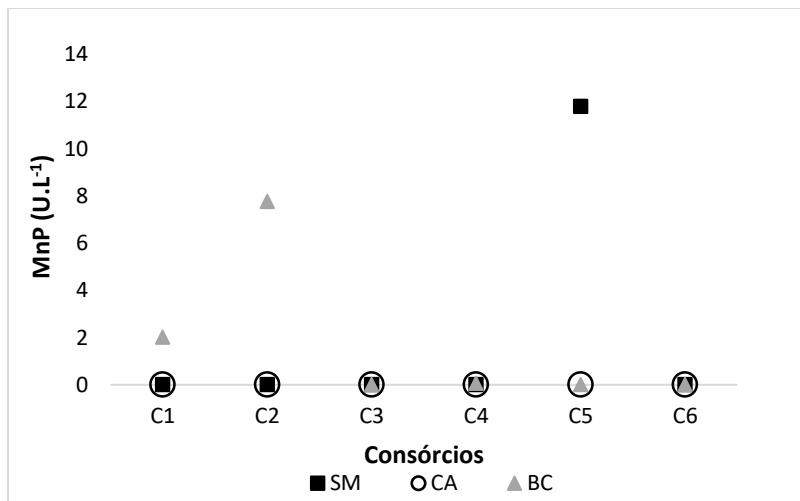
No bioprocessamento utilizando a casca de arroz a produção das enzimas LiP e MnP não foi detectada, havendo apenas produção da enzima lacase. A enzima GLOX (Figura 8) foi detectada apenas em alguns dos consórcios e substrato em quantidades muito baixas ( $< 0,4$  U.L<sup>-1</sup>). A lacase foi a enzima com o melhor resultado durante o tratamento biológico dos três resíduos. Tanto para o substrato siringaldazina, quanto para o substrato ABTS (Figura 7). Nesse aspecto, as melhores atividades para as duas lacases foram obtidos nos cultivos em casca de arroz e bagaço de cana. O maior valor desta enzima utilizando o substrato siringaldazina foi obtida pelo consórcio C3 (143,93 U.L<sup>-1</sup>) e utilizando o substrato ABTS pelo consórcio C1 (138,27 U.L<sup>-1</sup>). Após os cultivos em bagaço de cana foram detectados valores de 129,09 U.L<sup>-1</sup> (siringaldazina) e 127,47 U.L<sup>-1</sup> (ABTS) para os consórcios C4 e C1, respectivamente. Em adição, os consórcios C2 e C3 foram os que menos apresentaram atividade de lacase durante os experimentos.

**Figura 5.** Atividade enzimática da lignina peroxidase após 7 dias de biotratamento dos resíduos lignocelulósicos usando os seis consórcios. (Dados obtidos de amostras em triplicadas).



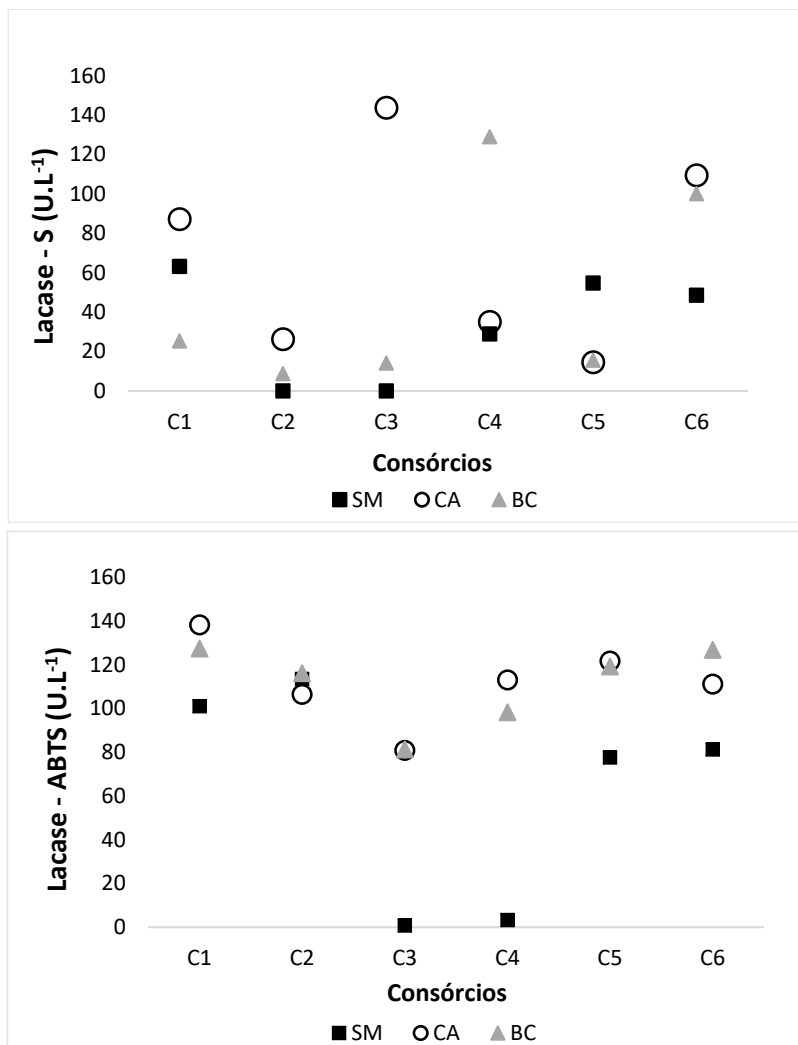
SM = sabugo de milho; CA = casca de arroz; BC = bagaço de cana

**Figura 6.** Atividade enzimática do manganês peroxidase após 7 dias de biotratamento dos resíduos lignocelulósicos usando os seis consórcios. (Dados obtidos de amostras em triplicadas).



SM = sabugo de milho; CA = casca de arroz; BC = bagaço de cana

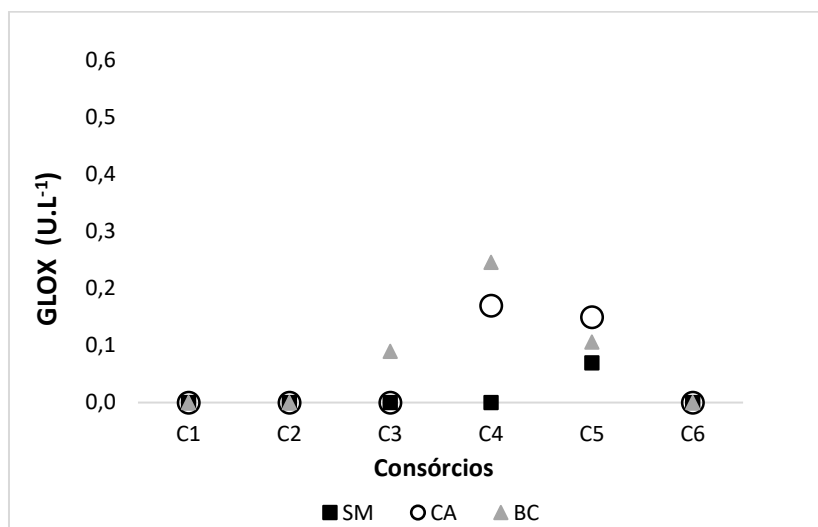
**Figura 7.** Atividade enzimática da lacase após 7 dias de biotratamento dos resíduos lignocelulósicos usando os seis consórcios. A siringaldazina (S) e o ABTS foram usados como substratos. (Dados obtidos de amostras em triplicadas).



SM = sabugo de milho; CA = casca de arroz; BC = bagaço de cana



**Figura 8.** Atividade enzimática da Glioxal oxidase após 7 dias de biotratamento dos resíduos lignocelulósicos usando os seis consórcios. (Dados obtidos de amostras em triplicadas.)



SM = sabugo de milho; CA = casca de arroz; BC = bagaço de cana

Considerando os resultados acima mencionados, um apanhado geral dos consórcios e de suas atividades enzimáticas ligninolíticas foi estipulado da seguinte forma:

- C1, apresentou melhor produção enzimática quando cultivado em sabugo de milho e bagaço de cana, sendo observadas atividades para a lacase, LiP e MnP, não havendo presença da GLOX.
- C2, mostrou-se mais eficiente na produção de lacases e MnP na seguinte sequência de substratos BC > SM > CA. A LiP e a GLOX não foram detectadas para esse consórcio.
- C3 e C4, apresentaram melhores atividade enzimáticas quando cultivados em casca de arroz e bagaço de cana. A lacase foi a enzima em destaque nesses cultivos. Não houve registro de atividade para as outras enzimas monitoradas.
- C5, apresentou boas atividades enzimáticas em todos os substratos, com produção de lacase e MnP.
- C6, apresentou melhores atividades enzimáticas quando cultivado em bagaço de cana, com produção de LiP e lacase. Foi observado também, atividade de lacase em sabugo de milho e casca de arroz. Não houve detecção de MnP e GLOX.

#### 4.4. Discussão

A parede celular vegetal tem sido alvo de estudos intensos devido à sua importância na formação e desenvolvimento da planta e na resistência aos estresses (a) bióticos. Esta estrutura é também considerada por muitos como uma fonte rica de

biopolímeros compostos de açúcares e outras moléculas, além de ser uma alternativa sustentável para o uso de petroquímicos. Pensando nisso, o presente estudo teve como foco a avaliação da capacidade de deslignificação de 3 diferentes materiais lignocelulósicos oriundos da agroindústria para aplicação em áreas biotecnológicas, de biomateriais e de biocombustíveis.

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que a composição do material vegetal influenciou diretamente o desempenho dos consórcios durante o tratamento biológico dos resíduos. A recalcitrância desses materiais e suas diferentes morfologias foram fundamentais durante o processo. Para avaliação dos diferentes processos aplicados, faz-se necessária a caracterização da composição química do material lignocelulósico durante as fases envolvidas. Nesse estudo, o balanço final das massas obtidas não foi satisfatório, pois atingiu valor máximo de 66,53%, apontando então uma possível ineficiência do método utilizado para quantificação da composição dos resíduos lignocelulósicos estudados. A técnica de caracterização utilizada no presente trabalho se baseia na hidrólise ácida (laboratório NREL, EUA) (SLUITER, 2008) e foi desenvolvida para análise de resíduos lignocelulósicos do milho como substrato. No entanto, esta metodologia é amplamente adotada para estudos que utilizam diversas fontes de biomassas lignocelulósicas. Tendo em vista a baixa porcentagem da composição da biomassa, uma análise comparativa das relações entre as porcentagens de celulose e lignina foi adicionalmente aplicada para análise da seletividade dos micro-organismos dos consórcios sobre a lignina. Sendo assim, o estudo do pré-tratamento biológico dos resíduos lignocelulósicos foi baseado na interpretação dos dados de deslignificação e seletividade. Para uma maior eficiência na detecção dos componentes da biomassa, métodos específicos para os diferentes resíduos devem ser aplicados, como é o caso do método desenvolvido por Rocha e colaboradores (2014) para a separação completa e eficiente dos componentes do bagaço de cana. Entretanto, como o presente trabalho fez uso de 3 diferentes resíduos, um único método foi aplicado para fornecer base comparativa, o qual foi escolhido por ser um método comumente reportado em literatura.

Os mesmos consórcios que apresentaram 47,94% (C1) e 31,85% (C3) de deslignificação do bagaço de cana, não foram capazes de utilizar de forma eficiente o sabugo de milho ou a casca de arroz. Em adição, o consórcio C4 também apresentou baixa eficiência na deslignificação de dois dos resíduos utilizados (bagaço de cana e casca de arroz). Os resultados evidenciaram que para a grande maioria, a casca de arroz foi o único substrato com porcentagens mínimas ou inexistentes de deslignificação. Vários fatores podem ter prejudicado o processo e estes podem estar associados às características dos

substratos e às características das enzimas durante a quebra dos mesmos. Os resultados de seletividade foram condizentes com os resultados de deslignificação para o bagaço de cana, onde todos os consórcios (exceto o C2) apresentaram valores de celulose/lignina maiores do que a biomassa *in natura*, sendo os consórcios C5 e C6 os maiores para seletividade. Entretanto, para o resíduo sabugo de milho os resultados de seletividade foram todos menores em relação a biomassa *in natura*, mesmo onde deslignificação tenha sido evidenciada por valores maiores do que 10% pelos consórcios C2, C4 e C6. Para a casca de arroz os resultados de seletividade foram maiores do que o da biomassa *in natura* para os consórcios C3, C4, C5 e C6, apesar da deslignificação ter sido extremamente baixa e apenas evidenciada nos consórcios C5 e C6.

Quanto aos aspectos relacionados aos resíduos lignocelulósicos, vale à pena ressaltar a alteração da porosidade da matéria, a área superficial exposta a degradação, o acúmulo de lignina e mudanças no grau de polimerização (PITARELO, 2013). No caso do sabugo de milho e da casca de arroz, o alto teor de lignina podem dificultar a degradação do material, onde as quantidades de cinzas e sílica contribuem para esse bloqueio. Alguns autores (PRICHULA et al., 2010; REGINA et al., 2009) relataram resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho, onde a maior restrição à degradação foi a casca de arroz, mesmo sendo detectadas atividades das enzimas celulasas, xilanases, lacases, celobioses, desidrogenases e MnP. Em adição, de acordo com Tengerdy e Szakacs (2003) o crescimento dos fungos em substratos lignocelulósicos ocorre em um ritmo logarítmico limitado devido ao espaço e/ou a acessibilidade ao substrato. Portanto, a granulometria da casca do arroz e do sabugo de milho (> 2 mm de espessura) pode ter sido uma barreira a mais para a deslignificação. Além disso, ainda que os consórcios contenham micro-organismos produtores de enzimas degradadoras de material lignocelulósico, os basidiomicetos (*Tinctoporellus* sp e, *Marasmiellus* sp.) empregados parece não ter sido suficientes para a deslignificação da casca de arroz e sabugo de milho.

Frente a essa questão, dois outros fatores podem estar fortemente ligados a esse resultado além das dificuldades citadas acima: a composição do meio de cultivo e a capacidade de expressar essas enzimas no meio. De acordo com os perfis enzimáticos obtidos a resposta enzimática dos consórcios C1, C3 e C4, em relação à biodegradação do material foi limitada. A atividade enzimática observada foi essencialmente a da enzima lacase, sendo LiP e MnP produzidas em baixas quantidades. Sabe-se que a lacase por si só não possui um potencial redox forte o suficiente para agir nas partes não fenólicas da lignina e também de compostos poluentes. De acordo com Durán e Espósito (2007) a

lacase quando não associada a um mediador sintético (que atua na elevação do seu potencial redox) pode acabar diminuindo a eficiência do processo de degradação, através da baixa capacidade de oxidação.

Além disso, no decorrer do experimento as fontes nutricionais iniciais eram bastante limitadas, com o intuito de induzir o consórcio a utilizar o substrato como fonte de carbono, e em consequência disso produzir as enzimas ligninolíticas. Todavia, essa hipótese também não teve êxito, implicando baixa produção enzimática e também da degradação de alguns dos resíduos utilizados. De acordo com Boyle (1998) a natureza e a concentração da fonte de nitrogênio disponível exercem uma grande influência sobre a produção de enzimas ligninolíticas por basidiomicetos que degradam madeira. Fernandes; Silva (2012), também verificaram que a baixa disponibilidade de nitrogênio em meio de cultivo de casca de arroz suplementado com farelo de milho (70:30) não foi o suficiente para induzir *P. ostreatus* a produzir lacase ao longo de 70 dias.

Do ponto de vista ecológico, todos os micro-organismos presentes no consórcio tinham capacidade de degradar matéria orgânica e de produzir enzimas ligninolíticas como apresentado no Capítulo 1 do presente trabalho. Inclusive, a maioria dos fungos utilizados nesse trabalho já foram empregados em estudos de produção de enzimas como xilanase, celulase e lacases e de degradação de agrotóxicos (PERISSINI, 2015) e corantes (BONUGLI-SANTOS et al., 2011; BONUGLI-SANTOS et al., 2012). É conhecido o fato de que micro-organismos que desempenham papel degradador em um ambiente específico quando cultivados em laboratório podem perder ou diminuir essa capacidade. Este fato se deve a várias condições, mas a principal delas é ausência de sinergia com outros micro-organismos presentes no meio original. Por isso, a formação de consórcios pode constituir uma situação mais favorável para aplicação em processos biodegradativos.

Resultados favoráveis à degradação da lignina presente no bagaço de cana e sabugo de milho foram observado para o C2, composto pelos mesmos fungos basidiomicetos e ascomicetos empregados nos outros consórcios. Ainda que as atividades enzimáticas correspondentes a esse consórcio se encaixem no mesmo padrão de expressão observado para os outros consórcios, há a possibilidade de outras enzimas não monitoradas terem atuado em primeira instância, facilitando a subsequente atuação da lacase. Apesar de existir muitas pesquisas envolvendo a produção de enzimas ligninolíticas, o mecanismo de degradação da lignina em si, ainda não foi totalmente esclarecido. A degradação pode ser afetada por outros sistemas enzimáticos e também por fatores não enzimáticos, entre os quais podem-se destacar os cofatores de baixas

massas moleculares (CBMM) que servem como mediadores de óxido-redução (MESTER; TIEN, 2000, COELHO, 2007), os níveis de  $H_2O_2$  produzidos no meio reacional e os radicais hidroxilas produzidos pelos fungos.

Os CBMM são produzidos como resultado do metabolismo secundário dos basidiomicetos e iniciam o processo de degradação da lignina, atuando como mensageiros das enzimas. O mediador oxidado conta com um mecanismo de oxidação não disponível para a enzima (FABBRINI et al., 2002), visto que esta é tão grande que não consegue penetrar na madeira (JUNG et al., 2002). Assim, as células fúngicas produzem mediadores que são excretados para o meio extracelular antes das enzimas e que, conseqüentemente, participam da oxidação da lignina (COELHO, 2007). Os CBMM produzidos durante a degradação por fungos de degradação branca e parda são gerados a partir de vários sistemas oxidativos, onde os mais conhecidos são, o mediador da lacase, álcool veratrílico, compostos aromáticos clorados, ácido oxálico, as reações de Fenton (ARANTES et al., 2011).

Em todos os consórcios houve diminuição ou aumento da celulose e da xilana. Em algumas situações, onde houve redução da taxa de lignina, houve também a redução de celulose e xilana, as quais devem ter ocorrido pela ação de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, cujas atividades não foram monitoradas nesse estudo. O oposto disso também ocorreu, onde não houve a redução da lignina, houve a diminuição da celulose e/ou da xilana. Esse comportamento pode estar relacionado com a facilitação do acesso dessas enzimas a parede vegetal através da ação dos CBMM e/ou também pela ação de outras enzimas que participam de processos oxidativos no meio de cultivo, tais como hidrolases, celobioses e outras.

A heterogeneidade dos substratos celulósicos em função da presença de quantidades variadas de hemicelulose e lignina podem acarretar efeitos adicionais sobre a ação das enzimas (RAMOS, 2000). A lignina não precisa ser completamente removida para aumentar a digestibilidade da celulose, já que apresenta maior efeito negativo quando está “blindando” as microfibrilas da mesma (EPOBIO, 2006). Esse aspecto foi muito importante para ajudar a construir e entender o perfil enzimático de cada consórcio utilizado nos experimentos, sendo eles apresentados como ligninolíticos ou celulolíticos/hidrolíticos.

Os consórcios C5 e C6 diferentemente dos outros consórcios exibiram um perfil ligninolítico para todos os resíduos testados, apresentando principalmente degradação da lignina e da xilana. O resíduo casca de arroz foi fracamente degradado, bem como o sabugo de milho. Este resultado pode estar relacionado com a estrutura morfológica

desses resíduos, bem como com os micro-organismos presentes nos consórcios (2 basidiomicetos marinhos e 2 fungos mesofílicos derivados de solo de canavial) e na capacidade enzimática dos mesmos. Esses 2 consórcios apresentaram os maiores valores de seletividade quando comparados com o restante dos consórcios para os 3 resíduos estudados. Em adição, para os resíduos casca de arroz e bagaço de cana, os consórcios C5 e C6 apresentaram valores maiores de seletividade do que os valores da biomassa *in natura*.

Estudos anteriores realizados com os fungos derivados marinhos utilizados nos dois consórcios (C5 e C6), revelaram que esses fungos são capazes de produzir enzimas ligninolíticas e degradar corante têxtil (BONUGLI-SANTOS et al, 2011; BONUGLI-SANTOS et al, 2012; RODRIGUEZ et al, 2015). As mesmas características podem ser associadas o isolado G25, uma vez que este fungo foi recuperado de solo de canavial e apresentou capacidade para degradar o herbicida Diuron (EGEA, 2010). Portanto, esses fungos possuem potencial capacidade para utilizar substratos lignocelulósicos. Em adição o fungo B19 também oriundo de solo de canavial, foi utilizado em estudos relacionados com a produção de enzimas hidrolíticas e de lacase (EGEA et al., 2010). Embora a atividade enzimática para os isolados estudados tenha sido baixa, estudos relacionados com a produção enzimática do complexo ligninolítico ainda é bastante limitado para fungos que não pertencem ao filo Basidiomycota, e também para fungos de origem marinha. Desta forma, o presente trabalho fornece informações complementares sobre o comportamento enzimático desses isolados fúngicos.

Considerando os resultados obtidos no presente Capítulo, os consórcios C5 e C6 foram selecionados para os estudos subsequentes de remoção de lignina. Esses consórcios apresentaram maior estabilidade nos resultados do biotratamento dos resíduos lignocelulósicos. Dessa maneira, os consórcios C1, C2, C3 e C4 não foram continuados no trabalho devido aos perfis menos satisfatórios quanto à deslignificação, seletividade e produção enzimática quando cultivados em sabugo de milho e casca de arroz, estando à disposição para futuros estudos de degradação de bagaço de cana e/ou outros substratos lignocelulósicos.

## **CAPÍTULO 3**

### **Avaliação de diferentes fatores na deslignificação do bagaço de cana**

## 5.0. Resumo

Nesse trabalho dois consórcios anteriormente estudados (C5 e C6) foram empregados no processo de degradação do bagaço de cana para avaliação do melhor desempenho. O consórcio C5 composto pelos isolados *Tinctoporellus* sp., *Marasmiellus* sp., *Aspergillus* sect. *flavi*, apresentou melhor eficiência na deslignificação do bagaço de cana (29,28%) no período de 7 dias a 28°C sob agitação de 140 rpm. Os resultados de seletividade (celulose/lignina) foram maiores no quinto, sétimo e décimo terceiro dias de incubação. As enzimas LiP e MnP apresentaram baixos níveis de atividade, sendo verificada somente uma correlação entre a maior deslignificação e o pico da atividade de lacase (46,73 U.L<sup>-1</sup>). O consórcio C5 apresentou atividade praticamente nula para as enzimas celulasas e xilanases. Visando aumentar a eficiência da deslignificação, o consórcio C5 foi submetido a experimentos de avaliação de diferentes variáveis e otimização do processo por meio de planejamento experimental. Foram aplicados três planejamentos do tipo Plackett-Burnman (PB). O aumento da deslignificação do bagaço de cana foi sequencial, sendo os dois melhores resultados do PB3 responsáveis pela diminuição de 57,65% (ensaio 10). Em adição, no planejamento experimental, os melhores resultados de seletividade (celulose/lignina e xilana/lignina) foram, de maneira geral, condizentes com os melhores resultados de deslignificação. As condições de cultivo do ensaio 10: inóculo de sete discos de cada fungo, 8 mM de CuSO<sub>4</sub>, 0,4 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 2,5 g de bagaço de cana. As enzimas ligninolíticas foram produzidas em baixas quantidades pelo consórcio C5 nas condições de cultivo do ensaio 10, sendo a LiP a única enzima detectada em quantidades maiores durante o processo de deslignificação. Experimentos na presença e ausência de CuSO<sub>4</sub> nas duas melhores condições otimizadas (ensaio 10 e 5 do PB3) foram realizados no intuito de avaliar o efeito desse composto no desenvolvimento dos fungos do consórcio e dos fungos de forma individualizada. A presença do CuSO<sub>4</sub> não afetou a eficiência de deslignificação do bagaço, sendo o melhor resultado obtido pelo consórcio C5 nas condições de cultivo do ensaio 5 (53,18%). De maneira geral, na presença do sulfato de cobre houve produção de LiP e MnP, enquanto a lacase foi detectada na ausência do sulfato de cobre. O consórcio C5 e os fungos em separado foram cultivados em meio contendo extrato de malte visando avaliar a deslignificação do bagaço de cana em meio malte. Os resultados da deslignificação dos experimentos em meio malte foram inferiores aos resultados com o meio otimizado, revelando a importância do planejamento experimental para otimização do processo de deslignificação. O fungo de origem marinha *Marasmiellus* sp. (155) presente no consórcio C5 demonstrou habilidade para deslignificar o bagaço de cana quando



cultivado em separado, apresentando altas porcentagens de deslignificação no experimento de validação, nos experimentos sem o sulfato de cobre e nos experimentos em meio malte.

**Palavras-chave:** Otimização, degradação de lignina,  $\text{CuSO}_4$ , enzimas ligninolíticas, planejamento experimental.

## 5.1. Introdução

O estudo da degradação da lignina por fungos filamentosos através da ação de enzimas oxidativas (LV et al., 2014) tem recebido muita atenção. Entretanto, são poucos os estudos que tem tentado acessar a relação entre a produção de enzimas ligninolíticas e a degradação de lignina (KNEŽEVIĆ et al., 2014; ARORA et al., 2002; MARTÍNEZ et al., 2005; ROBERTSON et al., 2008). O maior obstáculo para a utilização de biomassa é a completa separação da lignina e de seus complexos carboidratos. Portanto, a eficiência dos complexos processos de degradação depende não só do potencial dos micro-organismos e seus mecanismos oxidativos, como também das condições de cultivo.

A partir de variados recursos pode-se alcançar uma condição ótima de cultivo e o meio resultante pode ser eficientemente aplicado aos processos que demandam altas exigências nutricionais. A otimização do meio de cultura para obtenção de enzimas aplicadas aos processos de biodegradação de corantes (ALAM et al., 2009; TRUPKIN et al., 2003; BABIČ et al., 2012, BONUGLI-SANTOS et al., 2016) e de biomassa (LV et al., 2014; LEVIN et al., 2008) têm se mostrado ser uma estratégia eficiente. Para Babič e colaboradores (2012), a ótima produção de enzimas depende não só da composição química do meio, mas também do material de apoio que oferece uma superfície de aderência e crescimento. Vários tipos de madeira com diferentes composições físico-químicas têm diversos efeitos sobre a produção da enzima durante o cultivo de *Ganoderma lucidum* (SOUZA et al., 1999), sendo este um aspecto a mais a ser considerado.

Fatores ambientais (e.g. pH, temperatura, nutrientes, entre outros) podem influenciar o crescimento dos micro-organismos, bem como a sua eficiência em degradar a biomassa. A avaliação de diferentes variáveis no processo de degradação pode ser realizada variando-se um fator por vez ou através de delineamentos fatoriais. De acordo com Rodrigues e Iemma (2009) para minimizar o tempo e os custos em estudos onde há um número alto de variáveis a ser analisadas a aplicação do planejamento experimental pode ser considerada uma escolha bastante viável para alcançar a maximização do rendimento do processo. Neste sentido, diferentes modelos podem ser utilizados, sendo os delineamentos fatoriais fracionados ou Plackett & Burman (PB) comumente utilizados para seleção prévia das variáveis que devem ser consideradas até que se chegue ao planejamento fatorial completo (Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR). Ao final do processo é importante avaliar a reprodutibilidade do resultado obtido, sendo necessária a repetição do experimento para garantir a estabilidade do processo (validação).

Além de permitir a avaliação de diferentes variáveis no processo estudado, o planejamento experimental funciona como um processo de triagem de variáveis influentes, podendo culminar na diminuição de custos do bioprocesso. A diminuição do custo tanto para a produção de enzimas quanto para o desenvolvimento de processos degradativos é um fator importante a ser considerado para que se possa estar competitivo frente às tecnologias convencionais. Nesse contexto, e levando em consideração os resultados obtidos no Capítulo 2, os objetivos desse estudo foram: i) escolher o melhor consórcio produtor de enzimas ligninolíticas e com habilidade para degradação de lignina do bagaço de cana; ii) otimizar as condições de cultivo do tratamento biológico do bagaço de cana; iii) melhorar a eficiência da biodegradação do bagaço de cana; iv) avaliar a influência do sulfato de cobre sobre o crescimento do consórcio; v) ampliar o conhecimento do processo de biodegradação do bagaço de cana por consórcio de fungos.

## 5.2. Material e Métodos

### **Parte I:**

#### ***5.2.1. Avaliação do melhor consórcio degradador da lignina presente em bagaço de cana***

A fim de selecionar o melhor consórcio com potencial degradador de lignina do bagaço de cana, foi realizado um experimento com monitoramento do crescimento dos consórcios **C5** (G25, 154, 155) e **C6** (B19, 154, 155) por 15 dias. Os pré-inóculos dos fungos de cada consórcio foram preparados por meio do cultivo dos mesmos (em separado) em Erlenmeyer de 150 mL contendo meio líquido malte 2% (MB2) e incubação em shaker a 28°C por 7 dias a 140 rpm. Após esse período, os pré-inóculos foram transferidos para outros frascos Erlenmeyer contendo 2,5 g de bagaço de cana previamente moído e peneirado (1mm) e 20 mL de meio mineral *Savitha* (SAVITHA et al. 2007) esterilizado composto por (g.L<sup>-1</sup>): 7,0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,0 extrato de levedura, 0,1 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,008 FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,0001 ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,5 tartarato de diamônio. Em seguida todos os frascos foram mantidos a 28°C, em 140 rpm por 15 dias. A cada 3 dias uma triplicata pertencente a cada consórcio foi removida da incubadora com agitação visando separação da biomassa e sobrenadante. A biomassa foi separada do meio líquido por filtração, sendo a parte líquida filtrada armazenada em tubos Falcons para posterior análise enzimática (item 5.3.3). Os micélios fúngicos foram cuidadosamente removidos do substrato, e este foi levado para secagem em estufa por um período de 24 horas a 80°C.

### 5.2.2. Análise composicional

Os substratos lignocelulósicos, na condição antes e após o bioprocesso e foram avaliados seguindo a norma para determinação de carboidratos estruturais e lignina da biomassa, desenvolvida pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) dos Estados Unidos (SLUITER et al., 2008). As quantidades de celulose, hemicelulose e lignina dos substratos foram avaliadas a partir de uma hidrólise ácida de duas fases. A quantidade total de lignina foi calculada com base nas quantidades de lignina ácida (LAS) solúvel e de lignina ácida insolúvel (LAI), as quais foram obtidas por análises gravimétricas e de espectrofotometria de UV-vis, respectivamente. A hemicelulose e a celulose foram monitoradas usando a glicose e a xilose como parâmetro e foram obtidas a partir do líquido filtrado da hidrólise ácida, o qual foi mensurado por cromatografia de trocas de iônica, usando o HPAEC-PAD (Thermo Scientific (Dionex ICS-5000, Sunnyvale, Califórnia, USA) com coluna de troca aniônica CarboPac® PA-1 a 25°C. Os diluentes foram preparados com água deionizada ultrapura de 18 MΩ e desgaseificada com N<sub>2</sub>. O fluxo usado foi de 1 ml min<sup>-1</sup> com solvente A (água ultrapura) e B (NaOH 500 mmol L<sup>-1</sup>), usando o modo de eluição isocrática com 4,8% de B e 95,2% de A, durante 25 minutos. A degradação da lignina foi determinada pela porcentagem total de lignina diminuída ao final do biotratamento. Esse valor foi calculado usando a diferenças entre os pesos secos, antes e depois do biotratamento. A eficiência da lignina removida foi calculada seguindo a equação abaixo:

$$LR (\%) = \frac{(L_0 - L_T) \times 100}{L_0}$$

Onde, LR significa a eficiência da lignina removida, L<sub>0</sub> é a quantidade de massa lignina na amostra original do substrato e L<sub>T</sub> é a quantidade de lignina da amostra tratada.

Em paralelo ao cálculo composicional, foram também realizadas análises visando correlacionar a relação entre a celulose e a lignina, sendo nomidade de Seletividade, onde adotou-se a razão:

$$\text{Seletividade} = \frac{\% C_f}{\% L_f}$$

Onde C<sub>f</sub>, significa a porcentagem final de celulose contida na biomassa após o tratamento biológico, e L<sub>f</sub> é a porcentagem final de lignina contida na biomassa após o tratamento biológico.

### 5.2.3. Avaliação enzimática

#### 5.2.3.1. Ligninases

A atividade enzimática foi medida a partir do caldo enzimático bruto filtrado após o biotratamento (140 rpm, 28 °C, 15 dias). Esse caldo enzimático foi centrifugado a 10.000 rpm, por 30 minutos a temperatura de 5°C. A partir do sobrenadante é que foram avaliadas as atividades das enzimas lignina peroxidase (EC: 1.11.1.14) (LiP), manganês peroxidase (EC: 1.11.1.13) (MnP), lacase (EC: 1.10.3.2) ABTS.

A atividade da Lip foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS seguindo o método de Arora; Gill (2001). A MnP foi determinada pelo método modificado de Wariishi et al. (1992) e para a lacase somente foi determinada a atividade com a oxidação do substrato 2,2-azino-bis-etilbenthiazolina - ABTS, seguindo protocolo de Busewell et al., (1996).

#### 5.2.3.2. Celulases

A atividade da celulase foi determinada por meio da estimativa da liberação de açúcares utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (ADNS) (CHOSE, 1987; MILLER, 1959) usando como substrato uma solução de CMC 1.0 % em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4.8. As leituras de absorbância foram realizadas em triplicata a 540 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose por minuto por mL, de acordo com a curva padrão de glicose. Foi utilizada a seguinte fórmula para a conversão de valores:

$$U = \frac{1}{\epsilon} * \frac{Vr}{Ve} * \frac{1}{T} * 1000 * Abs * Diluição$$

Onde:

U = Unidade de atividade.

ε = Obtido na curva de açúcar: ε = a . Massa molar da glicose

a = a da reta da curva padrão da glicose

Vr= Volume da reação (tampão + caldo enzimático), em μL.

Ve = Volume pipetado do caldo enzimático, em μL.

T= tempo da reação enzimática, em minutos.

Abs = Média da absorbância das réplicas.

#### 5.2.3.3. Curva padrão de Glicose

Para a estruturação da curva padrão de glicose foi utilizada uma solução de glicose 0,005 M (1,47g de xilose em 100 mL de água destilada). A partir desta solução foram feitas 9 diluições. Para obtenção da diluição 0 (mais concentrada) foi utilizado 100 μL da

solução padrão, a partir daí foram utilizados 10 µL a menos da solução padrão para cada diluição (90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10 µL) e o volume foi completado com água destilada para 100 µL.

Na sequência elaborou-se um gráfico relacionando absorvância e concentração de açúcar (mg/mL), na qual foi obtido a linha de tendência e a equação da reta.

#### 5.2.3.4. *Xilanases*

A atividade de xilanase foi determinada pelo método de Miller (1959) mediante a quantidade de açúcares redutores liberados a partir de xilana *birchwood* (Sigma-Aldrich) conforme descrito por Bailey *et al.* (1992). Os açúcares redutores foram dosados pelo método do ácido 3,5 dinitro-salicílico, também chamado Reagente de Summer (MARTINELLI; PANEK, 1968). Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de xilose por minuto nas condições de ensaio, e calculados conforme equação abaixo:

$$U/mL = 1 \cdot v_f \cdot 1 \cdot 103 \cdot \text{média Abs.} \cdot d \cdot \epsilon \cdot v_i \cdot 5$$

Onde:

**Vf** = volume final (substrato + tampão + extrato)

**Vi** = volume de amostra (extrato)

**1/5** = tempo (5 minutos)

**103** = mg para µg

**d** = diluição

**ε**: absorvância da xilose: a (coeficiente obtido da reta padrão da xilose) x M (massa molecular da xilose).

### **Parte II:**

#### 5.2.4. *Desenho experimental*

A investigação das condições de cultivo sobre o pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar com o consórcio selecionado a fim de se obter as condições necessárias para uma eficiente deslignificação, foi realizada por uma sequência de delineamentos experimentais do tipo Plackett–Burman (PB).

A montagem dos ensaios foi realizada em frascos Erlenmeyers (150 mL) contendo 2,5 g de bagaço de cana triturado e homogeneizado (1 mm) e 50 mL de água destilada. A partir dessa padronização é que foram adicionadas as quantidades das outras variáveis selecionadas. Os diferentes ensaios foram submetidos a 7 dias de cultivo. No primeiro estudo estatístico foram utilizadas as seguintes variáveis independentes: fontes de C e N,

pH, indutores enzimáticos e quantidades de inóculo fúngico, conforme matriz do planejamento apresentada na Tabela 8 utilizando o software STATISTICA 7.0 (STAT SOFT, INC. 1995). As quantidades/concentrações das variáveis foram estipuladas com base em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial, LAMAI/UNESP Rio Claro e de acordo com a literatura consultada (PASSARINI et al., (2015), VASCONCELOS et al., (2000), POINTING et al. (2000), LEVIN et al. (2008), LIANG et al., 2012).

**Tabela 8** - Níveis das variáveis estudadas no planejamento Plackett-Burman para desdesignação do bagaço de cana.

<b>Variável</b>	<b>Nível inferior -1</b>	<b>Ponto central 0</b>	<b>Nível superior +1</b>
1. Inóculo fúngico*	1	2	3
2. Glicose (g/L)	0	5	10
3. Extrato de malte (g/L)	0	10	20
4. Peptona (g/L)	0	1	2
5. Extrato de levedura (g/L)	0	1	2
6. Álcool Veratrílico (µL)	0	10	20
7. CuSO <sub>4</sub> (mM)	0	2,5	5
8. Tween 80 (%)	0	0,25	0,5
9. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	0	0,05	0,1
10. pH	5.0	6.0	7.0

\* Cilindros (MA2 + micélio) de 5 mm de diâmetro

Todas as 10 diferentes variáveis foram preparadas em dois níveis, designados como -1 para o inferior e +1 para o superior, totalizando 20 ensaios estruturados de acordo com a matriz PB16 em anexo (ANEXO A) (RODRIGUES & IEMMA, 2009). A agitação e temperatura foram previamente determinados antes do início do planejamento experimental e fixados em 140 rpm e 28°C, respectivamente. A partir dos resultados obtidos no primeiro planejamento do tipo PB (PB 1) foi realizado um segundo PB (PB 2) para avaliar 7 das mesmas variáveis citadas na Tabela 8, totalizando 16 ensaios estruturados de acordo com a matriz PB12 em anexo (ANEXO B) (RODRIGUES & IEMMA, 2009). Em seguida, a partir dos resultados obtidos no PB 2, foi realizado um terceiro PB (PB 3) para avaliar 6 das mesmas variáveis citadas na Tabela 8, totalizando também 16 ensaios estruturados de acordo com a matriz PB12 em anexo (ANEXO C) (RODRIGUES & IEMMA, 2009). Para todos os PB, foram acrescentados à matriz quatro

ensaios no ponto central para a determinação do erro padrão durante a análise dos resultados.

Após transcorrido o tempo de incubação (7 dias) para todos os ensaios dos PBs, foi aplicado o mesmo procedimento citado no item 5.3.1. para separação do bagaço de cana do caldo enzimático, visando avaliação da composição química da biomassa e da atividade enzimática. A influência das variáveis na deslignificação do bagaço de cana (item 5.3.2) e na atividade enzimática (item 5.3.3.1.) foi analisada utilizando o software STATISTICA 7.0 (STAT SOFT, INC. 1995).

Ao final do PB 3 foram selecionados os dois melhores resultados para validação das condições de cultivo.

#### ***5.2.5. Condições otimizadas: teste em meio malte***

Na sequência dos experimentos de desenho experimental, foram realizados experimentos empregando as duas melhores condições encontradas no desenho experimental em um cultivo utilizando 2,5 g de bagaço de cana em 30 mL de meio líquido malte 2%, por 7 dias, a 28°C e 140 rpm. Este ensaio foi realizado tanto para o consórcio quanto para os fungos que compõem o consórcio de forma individualizada. Dessa forma, foram montados ensaios na condição do ensaio 10 do PB3 (A): consórcio e fungos individuais; condição do ensaio 5 do PB3 (B) B: consórcio e fungos individuais. Todo o experimento foi realizado em tríplicas. Ao final do tempo de incubação, as amostras foram avaliadas quanto à composição química do bagaço (item 5.3.2.) e quanto à atividade enzimática ligninolítica (item 5.3.3.1.) produzida no período.

#### ***5.2.6. Condições otimizadas: teste com e sem CuSO<sub>4</sub>***

A proposta deste teste foi avaliar a influência do sulfato de cobre sobre o crescimento fúngico nos consórcios e sobre o crescimento de cada isolado pertencente ao consórcio (cultivados separadamente), bem como sobre a deslignificação da lignina do bagaço de cana. De maneira semelhante ao tópico anterior, foram realizados experimentos empregando as duas melhores condições encontradas e no desenho experimental PB 3 em um cultivo contendo: 10) 2,5 g de bagaço de cana em 30 mL de água destilada com CuSO<sub>4</sub>, por 7 dias, a 28°C e 140 rpm; 5) 2,5 g de bagaço de cana em 50 mL de água destilada sem CuSO<sub>4</sub>, por 7 dias, a 28°C e 140 rpm. Dessa forma, foram montados ensaios da seguinte forma:



	<b>Com CuSO<sub>4</sub></b>	<b>Sem CuSO<sub>4</sub></b>
<b>Condição A</b>	Consórcio	Consórcio
	Fungos individuais	Fungos individuais
<b>Condição B</b>	Consórcio	Consórcio
	Fungos individuais	Fungos individuais

Os experimentos foram realizados em tréplicas. Ao final do tempo de incubação, as amostras foram avaliadas quanto à composição química do bagaço (item 5.3.2.) e quanto à atividade enzimática ligninolítica (item 5.3.3. com exceção da celulase e xilanase) produzida no período.

### ***5.2.7. Análise Estatística***

Todos os experimentos apresentados no presente capítulo foram realizados em tréplicas, permitindo assim, o cálculo do desvio padrão.

## **5.3. Resultados**

### **Parte I:**

#### ***5.3.1. Tratamento biológico e a resposta enzimática dos consórcios***

As atividades enzimáticas e as caracterizações químicas foram determinadas ao final de 15 dias de pré-tratamento fúngico. A cada 3 dias de incubação, amostras dos dois consórcios foram retiradas, para monitoramento da deslignificação e produção enzimática. Os resultados revelaram que todas as condições utilizadas no biotratamento contribuíram para a remoção da lignina (Tabela 9). Entretanto, tendo em vista a baixa porcentagem do balanço total da biomassa *in natura* do bagaço de cana (62,05%), a análise de correlação entre a porcentagem de celulose e de lignina (denominada seletividade) após os tratamentos foi aplicada em conjunto com a análise de deslignificação.

Foi possível verificar com este experimento que ao sétimo dia de incubação, houve uma diminuição maior na quantidade de lignina para ambos os consórcios. O consórcio C5 apresentou uma redução de 29,28% enquanto o C6 apresentou 21,40% de deslignificação do bagaço de cana sob as condições estudadas. O segundo melhor resultado foi obtido no quinto dia de incubação para ambos os consórcios (25,51% e 18,54%, respectivamente).

Os resultados de seletividade (Tabela 9) demonstraram que a relação celulose/lignina foi maior do que a do bagaço de cana *in natura* em todos os dias de

incubação do consórcio C5, sendo os maiores valores obtidos nos dias 5, 7 e 13. Para o consórcio C6, a seletividade foi melhor nos dias 5, 13 e 15.

Portanto, a melhor performance do tratamento biológico foi estabelecida entre 5-7 dias. De acordo com a análise composicional, foi possível notar que os outros componentes pertencentes a fibra vegetal, também apresentaram discretas alterações ( $\pm$  1-4% para a celulose e  $\pm$  3-6% for hemicelulose) no mesmo período. Após nono dia de incubação o padrão de deslignificação para os consórcios permaneceu o mesmo, entre 2-6% de remoção da lignina.

**Tabela 9** – Caracterização química do bagaço de cana *in natura* e pré-tratado por 15 dias pelos consórcios C5 e C6 e a relação entre celulose/lignina (seletividade). (Média de triplicatas).

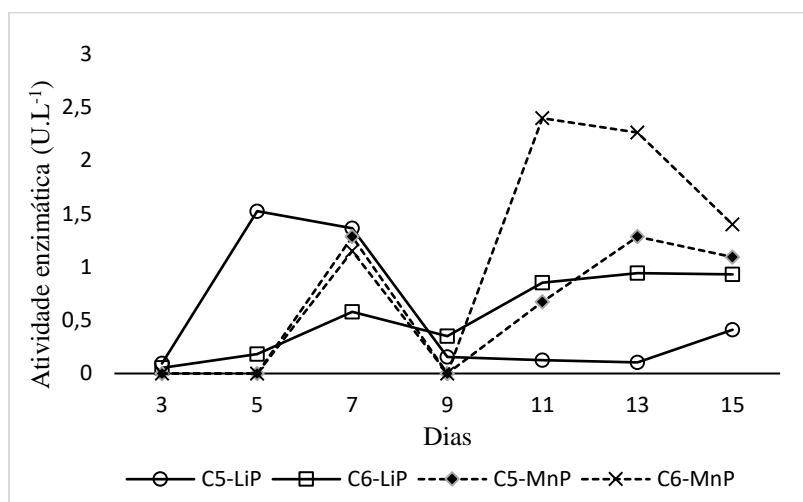
<i>Consórcio C5</i>								
Dias	3	5	7	9	11	13	15	<i>In natura</i>
*Celulose	27.54	26.31	22.47	25.14	26.53	28.38	24.06	26.21 $\pm$ 0.60
*Xilana	5.44	6.3	9.52	4.85	8.23	10.07	10.6	12.48 $\pm$ 0.44
*Lignina	22.63	17.40	16.52	22.09	22.8	17.84	20.14	23.36 $\pm$ 5.8
*Deslignificação	3.12	25.51	29.28	5.43	2.39	23.63	13.784	-
Seletividade (Celulose/Lignina)	1,21	1,51	1,36	1,13	1,16	1,59	1,19	1,12
<i>Consórcio C6</i>								
Dias	3	5	7	9	11	13	15	<i>In natura</i>
*Celulose	23,7	24,22	19,36	23,51	26,51	28,45	30,56	26.21 $\pm$ 0.60
*Xilana	5,52	5,03	4,1	5,19	8,71	11,38	14,09	12.48 $\pm$ 0.44
*Lignina	22,32	19,03	18,36	21,51	22,98	21,04	19,66	23.36 $\pm$ 5.8
*Deslignificação	4,45	18,54	21,40	7,92	1,63	9,93	15,84	-
Seletividade (Celulose/Lignina)	1,06	1,27	1,05	1,09	1,15	1,35	1,55	1,12

\*Valores expressos em %.

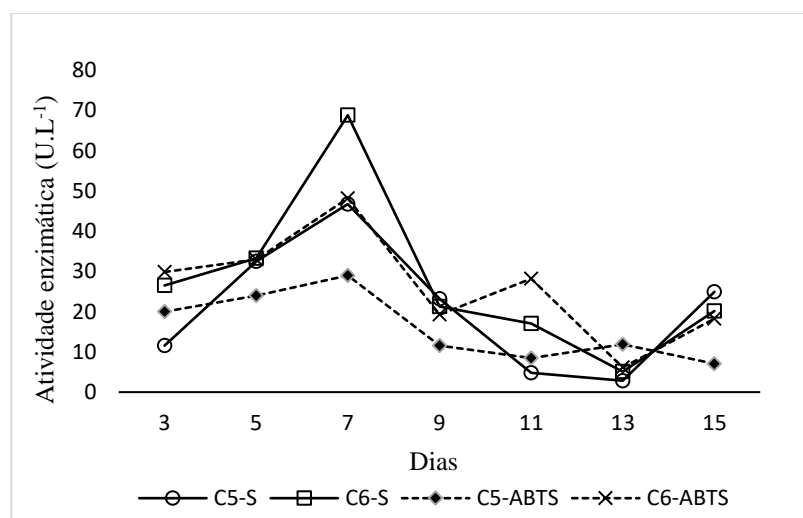
A atividade enzimática ligninolítica foi notavelmente diferente ao longo dos 15 dias de processo (Figura 9, 10 e 11). As atividades das peroxidases monitoradas revelaram valores muito baixos. A maior atividade de LiP foi detectada no quinto e no sétimo dia correspondendo a 1,52 U.L<sup>-1</sup> e 1,36 U.L<sup>-1</sup> para C5 e no décimo primeiro e décimo terceiro dias para C6, 0,85 U.L<sup>-1</sup> e 0,94 U.L<sup>-1</sup>. Para a manganês peroxidase, a melhor atividade enzimática foi detectada no sétimo dia (1,28 U.L<sup>-1</sup>) para o consórcio C5 e no décimo primeiro para o consórcio C6 (2,39 U.L<sup>-1</sup>). As atividades de lacase foram detectadas em

maiores quantidades no sétimo dia para ambos os consórcios: C5 (siringaldazina = 46,73 U.L<sup>-1</sup>; ABTS = 29,00 U.L<sup>-1</sup>) e C6 (siringaldazina = 68,80 U.L<sup>-1</sup>; ABTS = 48,16 U.L<sup>-1</sup>) (Figura 10). Os resultados demonstraram que para o consórcio C5 houve uma correlação entre o pico da atividade de lacase e a maior deslignificação, que foram após 7 dias de tratamento.

**Figura 9** – Atividade enzimática da LiP e MnP durante o tratamento biológico do bagaço de cana com os consórcios C5 e C6 ao longo de 15 dias. (Dados equivalentes a amostras em triplicata).



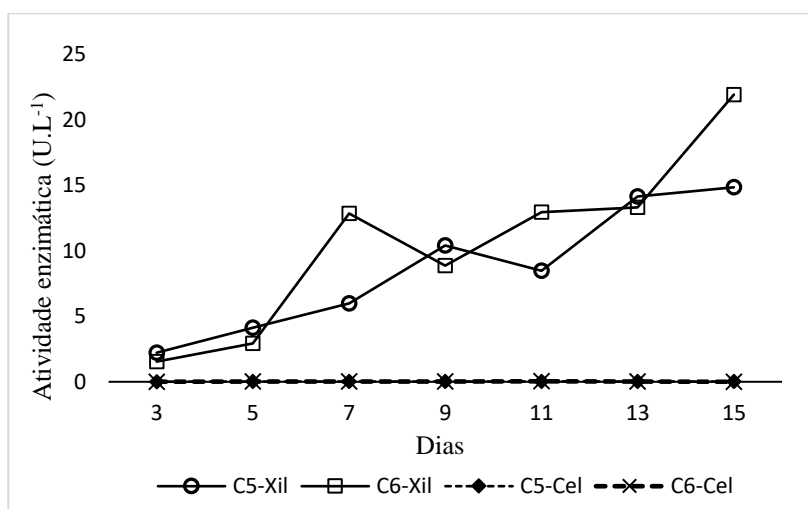
**Figura 10** – Atividade enzimática da lacase durante o tratamento biológico do bagaço de cana com os consórcios C5 e C6 ao longo de 15 dias. (Dados equivalentes a amostras em triplicata).



S = siringaldazina e ABTS = 2,2-azino-bis-etilbenthiazolina.

Enquanto as atividades ligninolíticas foram observadas (principalmente as atividades de lacase) durante o processo, os níveis de produção das enzimas celulases foram praticamente nulos ao longo de todo o experimento. Para a atividade de xilanases, foi observado um resultado mais expressivo ao sétimo e décimo quinto dias no caso do consórcio C5 e no nono e décimo primeiro dia para o consórcio C6 (Figura 11). Esses resultados revelam a capacidade do consórcio C5 em reduzir principalmente lignina e xilana. O consórcio C6 apresentou um perfil enzimático bastante diferente do C5, obtendo níveis melhores de produção das enzimas em dias variados do processo, sendo no geral, um possível consórcio a ser estudado para aplicação de processo mais longos.

**Figura 11** – Atividade enzimática de xilanases e celulases durante o tratamento biológico do bagaço de cana com os consórcios C5 e C6 ao longo de 15 dias. (Dados equivalentes a amostras em triplicata).



Xil = xilanase e Cel = celulase.

A partir do décimo primeiro dia, a atividade da xilanase permaneceu aumentando, fundamentando a ideia de que, 7 dias pode ser considerado um ótimo período de tempo para se estabelecer o processo de degradação da lignina do bagaço de cana correlacionando também, seu bom comportamento enzimático nesse mesmo período sem causar muitos danos aos açúcares presentes na fibra vegetal. Considerando os resultados obtidos para a deslignificação, seletividade e as atividades enzimáticas, o consórcio C5 foi o escolhido para dar continuidade ao estudo de otimização da deslignificação do bagaço de cana, sendo então submetido aos experimentos subsequentes.

## **Parte II:**

### ***5.3.2. Desenho experimental***

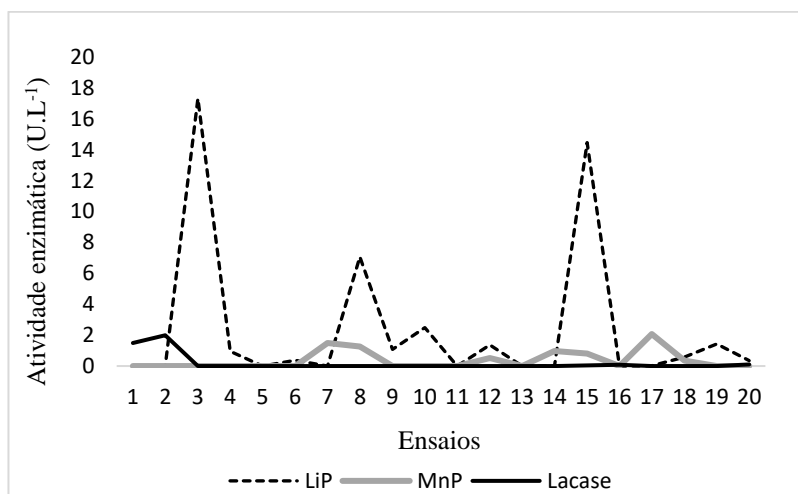
Após a confirmação do período de incubação e da escolha do consórcio a ser empregado, foi dado início ao planejamento do tipo Plackett–Burman (PB) com o intuito de avaliar a influência de 10 variáveis (Tabela 8) na degradação da lignina e no aumento da produção enzimática. Após a incubação dos ensaios por 7 dias, o mesmo procedimento de avaliação da composição química e das atividades enzimáticas foram aplicados a cada réplica dos ensaios.

O principal parâmetro adotado para avaliação do processo de otimização foi o aumento na porcentagem de deslignificação do bagaço de cana. Apesar dos resultados do balanço de massa (bagaço de cana *in natura*) dos planejamentos experimentais terem sido mais coerentes (76,18% no PB1, 84,36% no PB2 e 98,47% no PB3), houve uma discrepância nos valores da % de lignina no PB2 e PB3. Desta forma, como no Capítulo anterior, a seletividade foi também avaliada nesta etapa do trabalho, sendo neste caso avaliadas as razões celulose/lignina e xilana/lignina. Os resultados do primeiro PB mostraram que dentre os 20 ensaios realizados em diferentes condições (ANEXO A), os ensaios 13 e 10 revelaram melhores resultados quanto à deslignificação, alcançando valores de 30,58% e 28,78%, respectivamente (Tabela 10). Valores estes, maiores do que os encontrados no último experimento (Tabela 9). Os resultados de seletividade tanto para celulose/lignina quanto para xilana/lignina foram maiores nas condições dos ensaios 10 e 13, corroborando os dados de deslignificação. Além disso, os valores de seletividade obtidos para esses dois ensaios foram maiores do que os valores de seletividade do bagaço de cana *in natura* (Tabela 11). Entretanto, não houve detecção de atividade enzimática nesses ensaios. Apenas foi detectado uma baixa quantidade de LiP ( $2,49 \text{ U.L}^{-1}$ ) no ensaio 10 (Figura 12).

**Tabela 10** - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do PB1. <sup>a</sup> = melhores valores obtidos; <sup>c</sup> = pontos centrais.

Ensaio	% Lignina	% Celulose	% Xilana	% Deslignificação	Seletividade (C/L)	Seletividade (X/L)
<i>In natura</i>	22,84 ±10	36,52 ± 0,70	16,82 ± 0,56	-	1,59	0,73
1	24,15	37,18	15,79	-	1,53	0,65
2	18,30	26,80	12,44	19,87	1,46	0,67
3	21,86	41,85	16,33	4,26	1,91	0,74
4	20,15	33,09	13,81	11,75	1,64	0,68
5	23,22	38,29	15,98	-	1,64	0,68
6	19,41	35,91	13,73	15,01	1,85	0,7
7	18,92	34,08	14,54	17,15	1,80	0,76
8	21,24	31,61	12,56	6,98	1,48	0,59
9	19,46	34,67	14,78	14,76	1,78	0,75
10 <sup>a</sup>	16,26	31,99	13,53	28,77	1,96	0,83
11	25,08	31,81	13,55	-	1,26	0,54
12	22,04	35,77	15,13	3,48	1,62	0,68
13 <sup>a</sup>	15,85	39,02	17,59	30,57	2,46	1,10
14	20,20	32,81	13,54	11,55	1,62	0,67
15	23,53	39,72	17,39	-	1,68	0,73
16	25,16	32,85	14,56	-	1,30	0,57
17 <sup>c</sup>	16,90	36,19	15,45	26	2,14	0,91
18 <sup>c</sup>	22,42	30,70	12,09	1,8	1,36	0,53
19 <sup>c</sup>	22,52	34,04	14,19	1,39	1,51	0,63
20 <sup>c</sup>	24,41	35,33	15,15	-	1,44	0,62

**Figura 12** – Atividades enzimáticas no PB 1. (Dados equivalentes a amostras em triplicata).



De acordo com as análises estatísticas, as únicas variáveis significativas no PB1 ( $p\text{-valor} \leq 0,1$ ), foram glicose e álcool veratrílico, ambas com efeitos positivos na deslignificação do bagaço de cana (Tabela 11). Com exceção das variáveis extrato de levedura,  $\text{CuSO}_4$  e Tween 80, todas as outras variáveis testadas tiveram efeito negativo na otimização do meio de cultivo. O desvio padrão calculado para os ensaios do ponto central do PB1 foi de 12,4.

**Tabela 11** – Análise estatística do PB1.

	Efeito	p-valor
Variáveis	8,81238	0,002579
Inóculo	-1,49105	0,746494
Glicose	11,26678	0,035326 <sup>a</sup>
Extrato de malte	-0,93890	0,838370
Peptona	-4,98395	0,295775
Extrato de levedura	4,97178	0,296874
Álcool Veratrílico	8,45738	0,094233 <sup>a</sup>
$\text{CuSO}_4$	1,22105	0,790988
Tween 80 (%)	2,69021	0,562709
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	-0,90971	0,843316
pH	4,97178	0,296874

<sup>a</sup> indica as variáveis de efeito significativo ( $p < 0,1$ ).

Os resultados obtidos no PB1 serviram de base para a estruturação do PB2, contendo 7 variáveis, totalizando 16 ensaios estruturados de acordo com a matriz PB12 (ANEXO B). Para o segundo PB, a única variável fixada foi o extrato de levedura, enquanto as outras tiveram ajustes nas concentrações. As variáveis álcool veratrílico e Tween foram retiradas dos testes, não por não estarem presentes no ensaio com melhor resultado de deslignificação. A partir desse PB o pH foi estabelecido em 7,0.

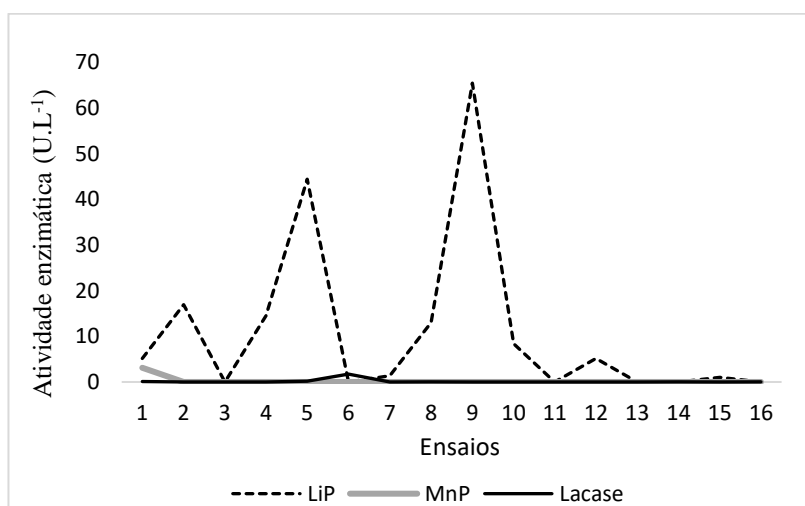
Os resultados do PB2 revelaram que a melhor porcentagem de deslignificação (41,04%) ocorreu nas condições do ensaio 10 (Tabela 12), sendo o segundo maior valor (40,14%) apresentado no ensaio 6. Os pontos centrais do PB2 apresentaram desvio padrão baixo, com uma mínima variação de 2,41 entre os quatro pontos, dando confiabilidade aos resultados apresentados. No PB2, os maiores valores de seletividade não foram observados nos ensaios que resultaram em uma maior deslignificação. Entretanto, o ensaio 10 apresentou valor de seletividade (celulose/lignina) maior do que o valor obtido no bagaço de cana *in natura* (Tabela 12).

**Tabela 12** - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do PB2. <sup>a</sup> = melhores valores obtidos; <sup>c</sup> = pontos centrais.

Ensaios	% Lignina	% Celulose	% Xilana	% Deslignificação	Seletividade (C/L)	Seletividade (X/L)
<i>In natura</i>	35,02 ± 6,3	34,52 ± 0,84	14,82 ± 1,8	-	0,98	0,42
1	22,0	32,50	4,84	37,60	1,47	0,22
2	21,2	22,43	3,94	39,67	1,05	0,18
3	24,3	20,79	3,67	30,82	0,85	0,15
4	23,0	20,90	3,89	34,34	0,9	0,16
5	23,2	17,30	2,61	33,41	0,74	0,11
6 <sup>a</sup>	21,0	13,20	1,80	40,14	0,62	0,08
7	22,9	18,26	5,87	34,55	0,79	0,25
8	22,7	15,24	4,49	35,04	0,67	0,19
9	22,6	10,78	3,50	35,50	0,47	0,15
10 <sup>a</sup>	20,4	20,56	6,65	41,04	1,00	0,32
11	22,5	23,31	7,62	35,91	1,03	0,33
12	22,2	26,91	8,14	36,74	1,21	0,36
13 <sup>c</sup>	24,1	34,29	5,99	31,07	1,42	0,24
14 <sup>c</sup>	23,7	38,82	5,19	32,80	1,63	0,21
15 <sup>c</sup>	22,1	36,12	4,64	36,81	1,63	0,20
16 <sup>c</sup>	23,3	34,48	4,96	33,20	1,47	0,21

As atividades enzimáticas do segundo PB estão apresentadas na Figura 12, onde pode-se perceber níveis de atividade baixos, com um discreto aumento da LiP em relação ao PB1 (8,37 U.L<sup>-1</sup>). Além da LiP, houve também a produção de lacase no ensaio 6, com 1,72 U.L<sup>-1</sup>.

**Figura 13** - Atividades enzimáticas do 2º PB. (Dados equivalentes a amostras em triplicata).





Nenhuma das variáveis apresentou efeito estatisticamente significativo na deslignificação do bagaço de cana, como demonstrado na Tabela 13. Além disso, as variáveis glicose, peptona e extrato de levedura mostraram efeito negativo perante otimização do meio de cultivo.

O teste estatístico foi também realizado para LiP, já que esta enzima foi produzida de forma mais expressiva em mais de um ensaio (Figura 13). Para a LiP, duas variáveis apresentaram efeito estatisticamente significativo, porém uma com efeito negativo (extrato de malte) e outra com efeito positivo (peptona).

**Tabela 13** – Análise estatística do PB2.

Variáveis	% Deslignificação		LiP	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
	35,54499	0,000000	10,9560	0,016853
Inóculo	2,94100	0,161946	0,7265	0,933285
Glicose	-0,95976	0,628648	-8,1338	0,361799
Extrato de malte	1,63011	0,417947	-17,7352	0,068003 <sup>a</sup>
Peptona	-1,62372	0,419697	22,8345	0,026449 <sup>a</sup>
Extrato de levedura	-0,47669	0,809089	14,7152	0,118290
CuSO <sub>4</sub>	1,36410	0,495159	0,8405	0,922852
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05320	0,978447	-4,9432	0,572907

<sup>a</sup> indica as variáveis de efeito significativo a  $p < 0,1$ .

A partir dos dados apresentados na Tabela 11, e após a análise das variáveis presentes no ensaio que apresentou maior valor de deslignificação, foi estruturado um terceiro PB, com 6 variáveis. No PB3 o extrato de malte foi excluído. As variáveis utilizadas foram então: glicose, peptona e extrato de levedura, com as mesmas quantidades do PB 2, ou seja, foram fixadas e as variáveis: inóculo, sulfato de cobre e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sofreram reajustes nas suas concentrações (ANEXO C). Assim, ao final do PB3 (PB12), foi possível constatar maiores porcentagens de deslignificação do bagaço de cana nas condições dos ensaios 10 e 5 (Tabela 14), onde o bagaço de cana sofreu uma redução da lignina equivalente a 57,65% e 49,73%, respectivamente. Os resultados de seletividade para xilana/lignina foram maiores nas condições dos ensaios 5 e 10, corroborando os dados de deslignificação. Para a seletividade celulose/lignina, valores mais altos também foram observados nos ensaios 5 e 10, porém outros ensaios apresentaram valores similares (ensaio 3 e 12). Os valores de seletividade obtidos para os ensaios 5 e 10 foram maiores do que os valores de seletividade do bagaço de cana *in natura* (Tabela 14).

A condição de cultivo do ensaio 10 continha: 7 cilindros de cada isolado fúngico, 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$  e 0,4g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e a condição do ensaio 5: 7 cilindros de cada isolado fúngico, 1,0 g de glicose, 0,1 g de extrato de levedura e 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$ . De acordo com o teste estatístico somente a variável inóculo apresentou efeito estatisticamente significativo ( $p$ -valor  $\leq 0,1$ ) apesar de ter tido efeito negativo para o meio de cultivo. As variáveis 5 ( $\text{CuSO}_4$ ) e 6 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) também apresentaram efeito negativo (Tabela 15). Os pontos centrais do PB3 apresentaram desvio padrão de 3,8.

**Tabela 14** - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do PB3. <sup>a</sup> = melhores valores obtidos; <sup>c</sup> = pontos centrais.

Ensaio	% Lignina	% Celulose	% Xilana	% Deslignificação	Seletividade (C/L)	Seletividade (X/L)
<i>In natura</i>	53,13 $\pm$ 10	33,52 $\pm$ 0,84	11,82 $\pm$ 1,8	-	0,63	0,22
1	28,86	33,13	6,45	45,67	1,14	0,22
2	32,54	30,16	5,05	38,75	0,92	0,15
3	33,76	31,33	5,32	36,45	0,92	0,15
4	29,98	29,89	5,66	43,56	0,99	0,18
5 <sup>a</sup>	26,71	30,79	7,32	49,73	1,15	0,27
6	27,98	33,29	6,55	47,32	1,18	0,23
7	29,81	22,75	4,95	43,89	0,76	0,16
8	38,37	37,03	7,30	27,77	0,96	0,19
9	32,40	35,17	5,58	39,02	1,08	0,17
10 <sup>a</sup>	22,50	31,73	7,42	57,65	1,41	0,32
11	33,18	37,53	5,45	37,53	1,13	0,16
12	29,91	35,47	6,18	43,70	1,18	0,20
13 <sup>c</sup>	30,20	34,29	5,99	43,16	1,13	0,19
14 <sup>c</sup>	29,57	38,82	5,19	44,33	1,31	0,17
15 <sup>c</sup>	30,08	36,12	4,64	43,37	1,20	0,15
16 <sup>c</sup>	33,98	34,48	4,96	36,03	1,01	0,14

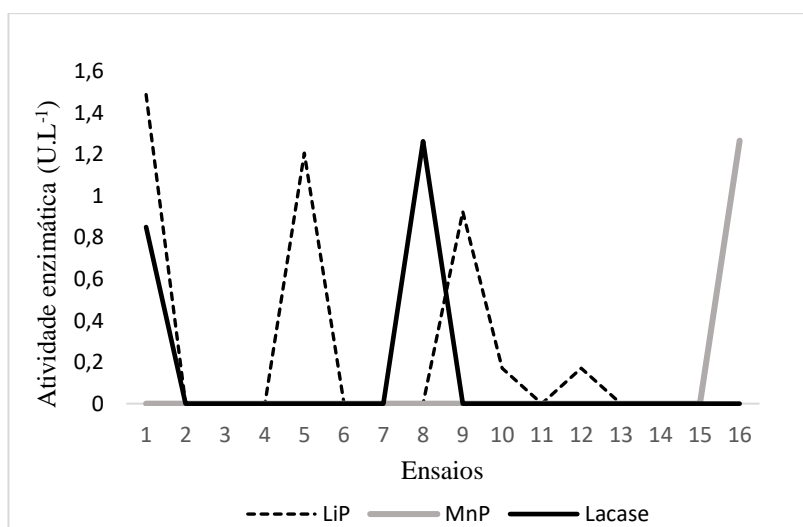
**Tabela 15** – Análise estatística do PB 3.

	Efeito	p-valor
Variáveis	57,62792	0,000000
Inóculo	-9,05136	0,018225 <sup>a</sup>
Glicose	0,61690	0,848827
Peptona	3,62124	0,279161
Extrato de levedura	4,26951	0,207606
CuSO <sub>4</sub>	-0,80511	0,803682
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-4,48560	0,187488

<sup>a</sup> indica as variáveis de efeito significativo a  $p < 0,1$ .

Os resultados das atividades enzimáticas para os dois ensaios (10 e 5), revelaram a capacidade do consórcio em produzir as três enzimas estudadas, porém em valores abaixo do esperado (Figura 14).

**Figura 14** - Atividades enzimáticas do PB3. (Dados equivalentes a amostras em triplicata).

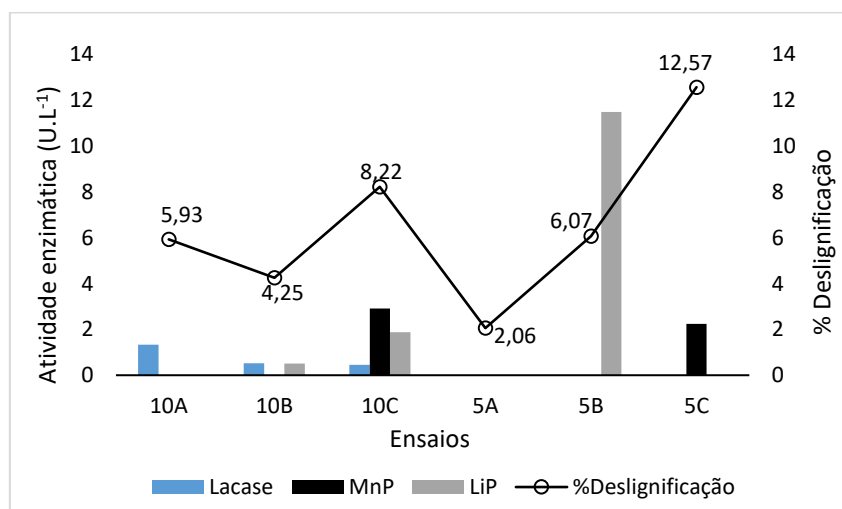


Considerando os resultados obtidos nos três planejamentos experimentais, as melhores condições de cultivo para a deslignificação do bagaço de cana foram as apresentadas nos ensaios 5 e 10 do PB3. Desta forma, esses ensaios foram submetidos ao processo de validação. Para tanto, foram repetidas as mesmas condições do ensaio 5 e 10 em tréplicas, sendo novamente avaliadas a deslignificação e a produção enzimática. Nestes ensaios a seletividade não foi avaliada.

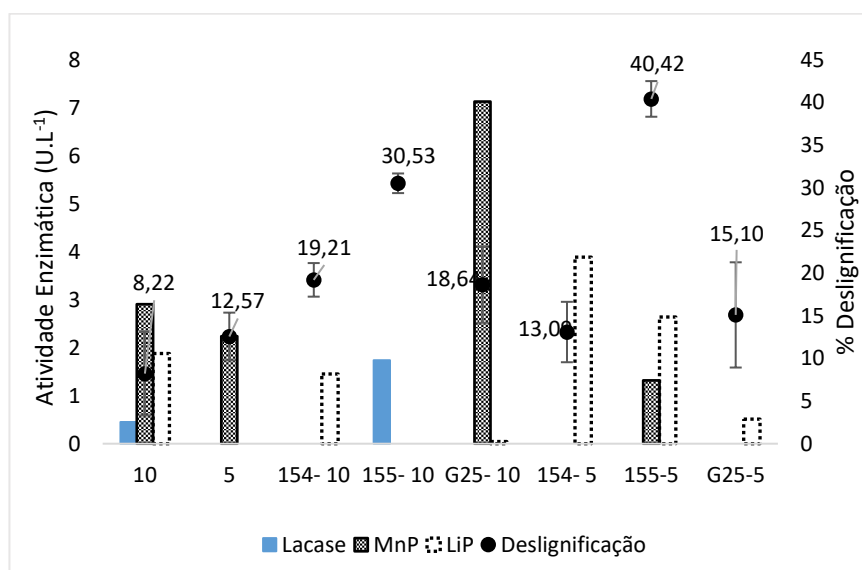
Nos experimentos de validação as porcentagens de deslignificação foram bem menores do que as obtidas nos ensaios 5 e 10 do PB3, sendo 12,57% para o ensaio 5 e 8,22% para o ensaio 10. Nestas condições foi observado um leve aumento nas atividades

das enzimas (Figura 15). Nesses experimentos foi observada uma menor produção de biomassa, sugerindo inibição do desenvolvimento de alguns dos fungos do consórcio. Desta forma, em paralelo a esta validação, foram também feitos ensaios nas mesmas condições de cultivo utilizando os fungos de forma separada. Os resultados desses experimentos estão apresentados na Figura 16, onde pode ser observado que os melhores resultados de deslignificação foram obtidos pelos isolado 155 (*Marasmiellus* sp.) na condição do ensaio 5 (40,42%) e do ensaio 10 (33,45%). Todas as enzimas monitoradas foram produzidas, entretanto em baixas quantidades. Os melhores resultados enzimáticos foram observados para os isolados 155 (*Marasmiellus* sp.) na condição do ensaio 5 e G25 (*Aspergillus* sect. *Flavi*) na condição do ensaio 10.

**Figura 15** – Resposta da deslignificação e atividades enzimáticas do consórcio C5 nos ensaios 10 e 5 para de validação do 3ºPB. (Dados equivalentes a amostras em triplicata).



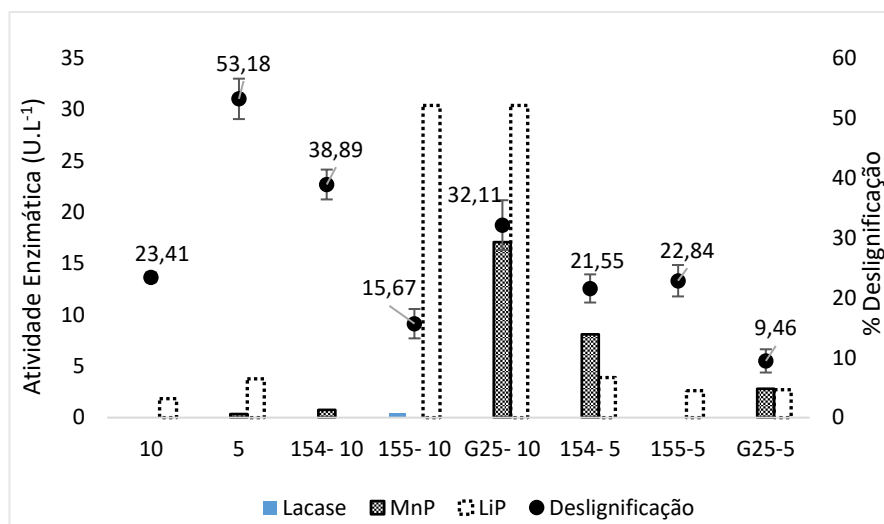
**Figura 16** - Resposta da deslignificação e atividades enzimáticas dos isolados fúngicos nos ensaios 10 e 5 do 3ºPB. (Dados equivalentes a amostras em triplicata).



### 5.3.3. Condições otimizadas: teste com e sem CuSO<sub>4</sub>

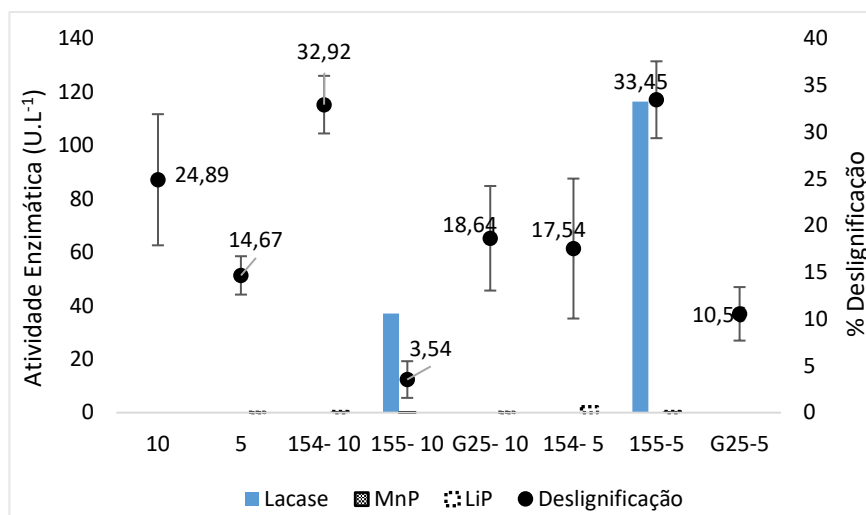
Ensaio nas condições otimizadas com e sem a presença de CuSO<sub>4</sub> foram realizados no intuito de elucidar a influência deste composto no desenvolvimento da biomassa fúngica do consórcio nos ensaios de validação. Os resultados demonstraram que a presença do sulfato de cobre não interferiu na eficiência dos consórcios frente à deslignificação (Figura 17). O valor máximo de deslignificação alcançado foi o de 53,18% nas condições de cultivo do consórcio no ensaio 5. Nestes experimentos, o isolado 154 (*Tinctoporellus* sp.) obteve a segunda maior taxa de deslignificação quando cultivado na condição do ensaio 10. A atividade da LiP e MnP foram mais expressivas nesses experimentos, enquanto que lacase foi detectada apenas para o isolado 155 (*Marasmiellus* sp.) em níveis muito baixos. Os resultados desses experimentos revelaram que o isolado G25 (*Aspergillus* sect. *Flavi*) também foi capaz de reduzir a lignina do bagaço de cana e produzir LiP e MnP nas duas condições avaliadas.

**Figura 17** – Teste de cultivo dos ensaios 10 e 5 aplicados aos consórcios e os fungos individuais na presença de  $\text{CuSO}_4$ . (Dados equivalentes a amostras em triplicata).



Os experimentos conduzidos sem o sulfato de cobre em sua composição, apresentaram resultados opostos ao com o sulfato de cobre (Figura 18). A maior porcentagem de deslignificação foi obtida não pelo consórcio fúngico, mas sim pelo fungo 155 (*Marasmiellus* sp.) na condição do ensaio 5 (33,45%). Neste experimento, houve produção expressiva de lacase, sendo a maior atividade desta enzima (116,5 U.L<sup>-1</sup>) produzida pelo isolado 155 (*Marasmiellus* sp.) no experimento com a melhor porcentagem de deslignificação. O isolado 154 (*Tinctoporellus* sp.) apresentou o segundo melhor valor de deslignificação (32,92%). Na ausência do sulfato de cobre, além de uma menor eficiência de deslignificação do consórcio fúngico, não foi observada produção de enzimas ligninolíticas.

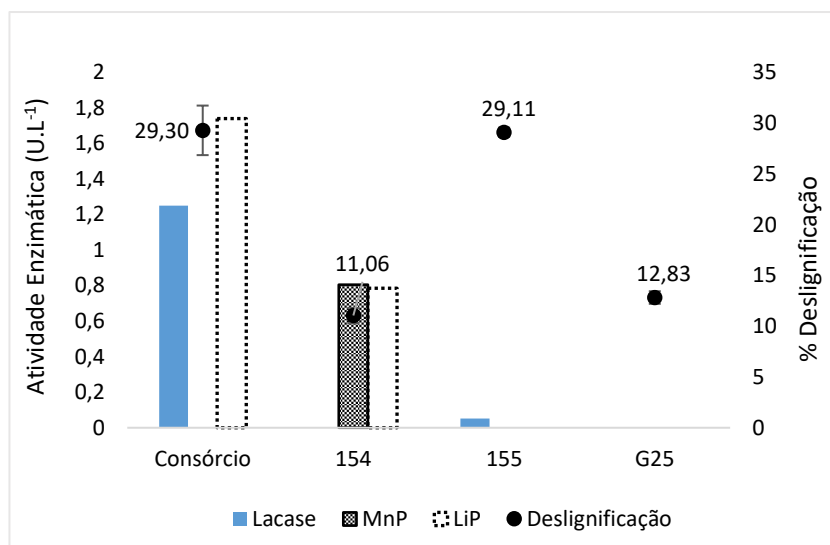
**Figura 18** - Teste de cultivo dos ensaios 10 e 5 aplicados aos consórcios e os fungos individuais sem o  $\text{CuSO}_4$ . (Dados equivalentes a amostras em triplicata).



#### 5.3.4. Condições otimizadas: teste em meio malte

Visando avaliar a composição do meio de cultivo frente à deslignificação do bagaço de cana, os experimentos utilizando os consórcios e os fungos individualizados foram conduzidos em meio extrato de malte 2%. Os resultados estão apresentados na Figura 19, onde pode ser observado que a maior deslignificação obtida foi de 29,30% para o consórcio C5. Novamente, o isolado 155 (*Marasmiellus* sp.) apresentou melhor desempenho na deslignificação (29,11%) perante aos outros dois fungos do consórcio. Para todos os experimentos a produção enzimática foi detectada em níveis baixos. Nesses experimentos, o isolado 154 (*Tinctoporellus* sp.) também conseguiu deslignificar o bagaço de cana.

**Figura 19** – Teste de cultivo em malte aplicado aos consórcios e os fungos individuais utilizando (Dados equivalentes a amostras em triplicata).



## 5.4. Discussão

### 5.4.1 Seleção do melhor consórcio

Um dos objetivos específicos do presente estudo foi avaliar a deslignificação em um curto espaço de tempo sem comprometer a produção enzimática. Desta forma, a remoção de lignina foi avaliada durante um período de 15 dias, obtendo-se o melhor resultado de deslignificação no sétimo dia para ambos os consórcios C5 (29,28%) e C6 (21,40%) e de seletividade nos dias 5, 7 e 13 para o Consórcio C5 e 5, 13 e 15 para o consórcio C6. Apesar de ter sido detectado baixos níveis de atividade enzimática ao longo do experimento, ainda assim, foi possível confirmar a capacidade dos dois consórcios de produzir enzimas do complexo ligninolítico, bem como as enzimas hidrolíticas celulase e xilanase. Os valores mais baixos obtidos para LiP e MnP durante o biotratamento podem ter sido influenciados pelas condições do meio de cultura ou ainda pela falta de alguns compostos indutores.

O bagaço de cana-de-açúcar pode servir como fonte de carbono para o desenvolvimento de micro-organismos como relatado por Pompeu (2010). No entanto, os parâmetros naturais no ambiente geralmente incluem outras fontes de carbono e nitrogênio, além de micronutrientes (e.g. enxofre, ferro, magnésio, cálcio e sódio). A disponibilidade destes elementos varia em diferentes ambientes e podem atuar como elementos propulsores de otimização da biodegradação, e conseqüentemente na produção de enzimas degradadoras, tais como as ligninolíticas. Estudos de outros autores também apontaram uma baixa produção de LiP em fermentação em estado sólido ou cultivo



submerso pelo fungo ligninolítico *Phanerochaete chrysosporium* (PINTO et al., 2012; SHI et al., 2009).

Em contraste aos baixos níveis das peroxisades, os resultados para a enzima lacase em ambos os substratos estudados foram mais altos também no sétimo dia de cultivo nos dois consórcios, sugerindo uma possível correlação com a deslignificação. Resultados semelhantes foram observados por Rajarathnam e colaboradores (1987) e Menezes et al. (2009) após o cultivo de *Pleurotus* utilizando fermentação submersa com bagaço de cana-de-açúcar. Apesar dos baixos níveis de enzimas ligninolíticas detectados no presente estudo, as lacases podem estar indiretamente ligadas à deslignificação já que elas são conhecidas pelo seu baixo potencial redox que permite a oxidação direta somente de unidades de lignina fenólica aumentando sua capacidade de oxidar substratos de potencial redox alto na presença de mediadores (DURÁN; ESPÓSITO, 2007). Assim como explicitado no capítulo anterior, a possível presença de mediadores sintéticos que atuam em conjunto com as enzimas ligninolíticas podem ter dado início ao processo de desestruturação da parede vegetal e as outras enzimas, ainda que em menor quantidade podem ter atuado de forma sinérgica para a redução da lignina.

É importante ressaltar que a melhor atividade da lacase foi obtida sem indutores, destacando o potencial deste consórcio para a deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e estimulando novos estudos relacionados à otimização do processo (produção enzimática e remoção de lignina). Na natureza, a degradação da lignina ocorre por uma interação sinérgica de várias enzimas, incluindo enzimas do tipo oxidase, tais como LiP, MnP, versátil peroxidase ou lacase, ou uma combinação delas (CRAGG et al., 2015). A eficiência do sistema enzimático depende do potencial do organismo degradador, de seus mecanismos oxidativos e das condições de cultivo aplicadas no processo. De acordo com a literatura existe uma relação entre o tempo e a eficiência do biotratamento e muitas vezes é necessário um período mais longo para degradar o material lignocelulósico (QUINTANAR et al., 2012, MENEZES et al., 2009, MA; RUAN, 2015).

No presente estudo outras enzimas também foram monitoradas sendo elas enzimas ativas que agem na conversão dos polissacarídeos. Entretanto, não houve produção significativa de celulase e xilanase ao longo dos 15 dias do biotratamento. A melhor atividade foi de xilanase obtida entre o nono e décimo quinto dia para o consórcio C5 e entre sétimo e décimo quinto dia para o consórcio C6, o que pode estar relacionado com a acessibilidade da associação hemicelulose-lignina presente na biomassa vegetal, favorecendo a atividade de outros tipos de enzimas oxidantes da lignina, não monitoradas nesse trabalho. Outros exemplos de enzimas envolvidas são aril-álcool desidrogenases,

oxidases de radical cobre, multicobre oxidases, celobiose desidrogenases, glucose-metanol-colina oxideructases e quinonas redutases (COELHO et al., 2007; ABDELAZIZ et al., 2016). Este resultado sugere que o perfil de micro-organismos atribuído ao consórcio C5 é mais ligninolítico do que hidrolítico. Os resultados evidenciam o potencial dos consórcios estudados tendo em vista a melhor taxa de deslignificação ter sido obtida no 7º dia do biotratamento. Outros estudos relacionados ao tratamento e biodegradação de resíduos agroindustriais os quais utilizaram micro-organismos conhecidos apresentaram resultados significativos apenas após 20 dias de tratamento (SALVACHÚA et al., 2011; GHORBANI et al., 2015).

Apesar dois consórcios terem desempenhado papéis semelhantes quanto à deslignificação do bagaço de cana, o consórcio C5 apresentou um perfil mais coerente para todos os parâmetros estudados nesse trabalho, sendo ele, portanto, o eleito para a etapa de avaliação de diferentes fatores na deslignificação e otimização do biotratamento.

#### ***5.4.2. Otimização da degradação do bagaço de cana***

Métodos estatísticos para otimização do meio de cultivo têm provado ser uma ferramenta poderosa e útil para a biotecnologia. Neste sentido, o método de Plackett-Burman (PLACKETT; BURMAN, 1946) foi aplicado no presente estudo visando investigar as variáveis com efeito significativo no meio de cultivo que contribuíssem com o aumento da deslignificação do resíduo lignocelulósico em questão. Os resultados demonstraram, de forma geral, que em todos os desenhos experimentais houve um aumento na capacidade do consórcio em deslignificar o material lignocelulósico. Os três PBs apresentaram resultados sequenciais de aumento na taxa de deslignificação do bagaço de cana em associação com o ajuste do meio de cultivo. Do PB1 para o PB2, o aumento da eficiência da deslignificação foi de pouco mais de 11%, e do PB2 para o PB3, o aumento foi de 16,6%. Em adição, os ensaios dos planejamentos experimentais que apresentaram os melhores resultados de seletividade (tanto de celulose/lignina quanto de xilana/lignina) foram, de maneira geral, condizentes com os maiores resultados de deslignificação. O êxito do processo de otimização está associado aos constituintes do meio de cultivo e suas concentrações/quantidades. No início do planejamento, havia diversas fontes de carbono e nitrogênio disponíveis como extrato de malte, extrato de levedura e glicose associados também aos indutores de produção enzimática como álcool veratrílico, sulfato de cobre,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e Tween 80. Esses são fatores comumente citados na literatura para a otimização da produção de ligninases (ALAM et al., 2009; LEVIN et

al., 2002; KARP, 2014). A medida em que essas variáveis foram sendo adaptadas, o rendimento da deslignificação foi aumentando.

No caso do PB1, o ensaio com o melhor desempenho na deslignificação (ensaio 13) continha glicose e extrato de levedura, fontes provavelmente responsáveis pelo crescimento dos fungos e de estímulo para a produção enzimática. Além disso, estavam presentes nesse ensaio também o álcool veratrílico e tween 80. Segundo Levin et al., tanto a quantidade de nitrogênio disponíveis no meio quanto a natureza do fungo empregado no bioprocessamento, exercem uma grande influência sobre a produção de enzimas ligninolíticas extracelulares por basidiomicetos com podridão de madeira sendo fatores essenciais na degradação biológica. Além disso, no PB1, o álcool veratrílico e a glicose foram as variáveis com efeito positivo quanto à redução da lignina. Álcoois aromáticos como o álcool veratrilo (metabolito secundário produzido por culturas ligninolíticas de fungos de podridão-branca, conhecido por ser um co-fator envolvido na degradação de lignina e poluentes xenobióticos pela LiP) têm sido relatados como indutores da produção de lacase (LEVIN et al., 2005; JONG et al., 1994). No entanto, esse aspecto não foi observado na produção enzimática do consórcio e tanto o tween quanto o álcool veratrílico não foram continuadas no PB seguinte.

No PB2 o ensaio com melhor deslignificação apresentou continha uma maior quantidade de inóculo fúngico, a mesma quantidade de extrato de levedura anterior, e a adição de sulfato de cobre e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . A maior quantidade de inóculo pode ter contribuído para o aumento da deslignificação. A menor exigência nutricional desse PB foi um fator benéfico do ponto de vista econômico do processo mesmo com a adição de outros dois indutores enzimáticos. O sulfato de cobre e o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  podem também estar associados ao resultado do PB2. Estes compostos apresentaram efeito positivo na produção enzimática de ligninases em outros trabalhos (MAKELA et al., 2013, SHANKAR, 2012.). O cobre tem sido relatado como um forte indutor de lacase em várias espécies de fungos, entre elas *P. chrysosporium* e *Trametes versicolor* (DITTMER et al., 1997; COLLINS; DOBSON, 1997). Sabe-se que o cobre induz tanto a transcrição da lacase quanto a atividade, e o aumento da atividade é proporcional à quantidade de cobre adicionado (LEVIN et al., 2005). No caso desse estudo nenhuma variável do meio de cultivo teve efeito positivo sobre a deslignificação, nem mesmo o sulfato de cobre. Por isso, a segunda prioridade de escolha foi dada para as variáveis estatisticamente significativas na atividade da LiP, sendo elas a peptona e o extrato de malte (ausente no melhor ensaio). Por isso no PB3 a peptona também foi escolhida para compor as variáveis do planejamento experimental. Das 6 variáveis presentes no PB3, somente as variáveis

inóculo, sulfato de cobre e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  estavam presentes no meio de cultivo do ensaio com a melhor deslignificação (ensaio 10). Para esse planejamento a única variável estatisticamente significativa foi a quantidade de inóculo adicionado, entretanto, contrariamente a isso, o efeito dela foi negativo na deslignificação. Apenas as variáveis glicose, peptona e extrato de levedura tiveram efeito positivo, mas não foram estatisticamente significativos.

Os resultados dos planejamentos experimentais revelaram que os fungos do consórcio C5 não dependeram de uma quantidade elevada de fonte de carbono e nitrogênio nem de muitos componentes indutores para aumentar o rendimento da deslignificação. O planejamento experimental permitiu a fixação e eliminação de componentes do meio de cultivo. Do ponto de vista econômico, isso pode ser considerado uma vantagem do biotratamento com o consórcio C5. Geralmente, em aplicações biotecnológicas, quanto menos o processo depender de etapas e reagentes nutricionais, mais viável e simplificado ele se torna, despertando o interesse industrial. De acordo com Matkar et al., (2013), para uma ampla aplicação das enzimas obtidas por fungos, o custo atribuído ao processo é um dos principais fatores que determinam a viabilidade de implantação. Reduzir os custos da produção de enzimas por meio de otimização do meio de fermentação é uma pesquisa fundamental antes da aplicação industrial. A utilização de diferentes modelos estatísticos para otimização do meio tem sido empregada com sucesso para a produção de uma vasta gama de enzimas (VASCONCELOS et al., 2000; FRANCIS et al., 2003; ARANTES et al., 2011).

Quanto ao perfil das atividades enzimáticas nos diferentes meios, não foi possível estabelecer uma correlação entre a produção de enzimas com a melhor deslignificação e seletividade. Os picos de atividade enzimática estavam presentes em outros ensaios, com menores valores de deslignificação e seletividade e outras condições de cultivo. Esses resultados podem estar relacionados aos micro-organismos empregados nos experimentos e ao comportamento dos mesmos quando cultivados em consórcio. Diferentes condições de cultivo podem favorecer o melhor desenvolvimento de diferentes fungos do consórcio.

Mesmo que o teste de inibição realizado no Capítulo 1 tenha indicado crescimento compatível entre os fungos em meio sólido, durante o biotratamento em meio semi-sólido e sob condições limitadas de fontes de nitrogênio e carbono mais facilmente metabolizáveis, os fungos podem ter entrado em competição por essas fontes nutricionais, influenciando o seu desenvolvimento e a expressão enzimática. Durante todos os experimentos as enzimas ligninolíticas estavam presentes nos cultivos, entretanto, em

baixos níveis, com destaque para a LiP, com uma maior frequência de produção durante a otimização.

Entretanto, os resultados de deslignificação e de seletividade foram significativos mesmo com os baixos níveis das enzimas monitoradas, sugerindo a influência de outros fatores, incluindo a presença outras enzimas com capacidade de deslignificação e de mediadores enzimáticos. Os fungos filamentosos produzem várias “enzimas acessórios” que ajudam na degradação enzimática da lignina, tais como aril-álcool desidrogenases, oxidases e radical de cobre, celobiose desidrogenases, glucose-metanol-colina oxidoreductases e quinona-redutases (ABDELAZIZ et al., 2016; AYYACHAMY et al., 2013). Além dos recursos enzimáticos, alguns fungos são capazes de produzir radicais hidroxilas reativos, via processo químico de oxidação de Fenton, proporcionando a esses radicais hidroxilas a capacidade de oxidar compostos próximos a cadeia de lignina, tornando a estrutura da lignina mais acessível as outras enzimas (ARANTES et al., 2011; ABDELAZIZ et al., 2016).

Os resultados dos experimentos de validação das duas melhores condições de cultivo (ensaio 10 e ensaio 5 do PB 3) não foram satisfatórios, apresentando valores bem menores de deslignificação dos que os observados durante o planejamento experimental. Nesses experimentos, foi visualmente observado uma diminuição da biomassa fúngica para todas as réplicas, sugerindo alteração na viabilidade celular do(s) inóculo(s) ou antagonismo entre os fungos do consórcio. Em adição, nos experimentos onde a biomassa fúngica não foi visivelmente evidente o sulfato de cobre estava presente. O sulfato de cobre tem sido utilizado como indutor para a produção de lacases (CHEN et al., 2011; SHANKAR, 2012; MAKELA et al., 2013) e LiP (ALAM et al., 2009). Em contrapartida, Passarini et al., (2015) observaram que a presença desse indutor em concentrações maiores que 10  $\mu\text{M}$  pode ter o efeito inibidor sobre a atividade da lacase em *Nigrospora* sp. Outros autores mostram que o aumento na concentração de cobre inibe também o crescimento de alguns fungos como o de *T. villosa*, mas estimula a produção de lacase e peroxidases (YAMANAKA et al., 2008, FAN-XIANG, 1995; FOLTRAN, 2009). Considerando o fato de que a resposta da colonização fúngica está diretamente associada à escala de colonização, a parte mais exposta da fibra vegetal pode estar mais suscetível a sofrer ações das enzimas extracelulares de fungos. Neste sentido, foram realizados experimentos nas condições do ensaio 10 e 5 (PB3) com sulfato (30 mL de meio) e sem sulfato de cobre (50 mL de meio) para os cultivos em consórcio (C5) e para os isolados em separado

Os resultados revelaram que na presença do sulfato de cobre a taxa de deslignificação do bagaço de cana pelo consórcio C5 foi muito próxima à obtida no 3ºPB, ausência da produção de lacase, sendo a LiP a única enzima presente nos ensaios 10 e 5. Com relação à atividade enzimática, para os ensaios que continham o sulfato de cobre a atividade da lacase foi notavelmente mais baixa tanto para o consórcio quanto para os fungos em individual. Em contrapartida, a atividade da LiP foi elevada principalmente para os isolados 155 e G25 na condição 10 do ensaio otimizado. A produção de MnP foi mais frequente nesses experimentos.

Nos experimentos sem o sulfato de cobre, o efeito na atividade enzimática foi contrário. A maior produção da lacase foi observada no cultivo individual do basidiomiceto *Marasmiellus* sp. (155) na condição do ensaio 5 e a segunda maior produção desta enzima foi também observada para este fungo na condição do ensaio 10. Cabe destacar que na mesma condição onde foi verificada a maior produção de lacase, ocorreu a maior porcentagem de deslignificação. Nos experimentos sem a presença do sulfato de cobre, as enzimas LiP e da MnP quando detectadas foram produzidas em quantidades muito baixas. Desta forma, concluímos que na presença do sulfato de cobre houve produção de LiP e MnP, de forma geral, e na ausência do sulfato de cobre a produção de lacase pelo fungo *Marasmiellus* sp. (155) foi favorecida, sendo LiP e MnP praticamente ausentes em todos os experimentos. Para as duas condições (com e sem o sulfato de cobre) a deslignificação se fez presente, entretanto a maior delas ocorreu quando o consórcio C5 foi cultivado nas condições do ensaio 5 do PB3, na presença de sulfato de cobre.

O crescimento de biomassa fúngica não foi afetada pela redução do volume líquido final dos meios de cultivo, mas provavelmente pelas condições nutricionais. Os resultados mostraram que, independentemente do sulfato de cobre, na condição do ensaio 5 a colonização do bagaço de cana foi melhor tanto para o consórcio quanto para os fungos em separado (análise visual). Isso deve ter ocorrido muito provavelmente porque na condição do ensaio 5 as fontes de carbono e nitrogênio estavam mais disponíveis contribuindo com o rápido crescimento. O sulfato de cobre favoreceu a deslignificação do bagaço de cana pelo consórcio na condição do ensaio 5, e para os fungos individuais na condição do ensaio 10. Na ausência do sulfato de cobre a degradação da lignina aumentou quando o consórcio foi cultivado na condição do ensaio 10, mas não foi maior do que a deslignificação obtida pelo fungo *Marasmiellus* sp. (155) quando incubado na condição do ensaio 5. Esse resultado corrobora os relatos de outros estudos reportados em literatura referentes à alta capacidade de fungos basidiomicetos em agir isoladamente

sobre a lignina de resíduos agroindustriais. Shankar (2012) encontrou várias alterações estruturais na lignina durante o tratamento enzimático com lacase (com e sem mediadores) do basidiomiceto *Peniophora* sp. em condições de cultivo otimizadas. Atuhaire e colaboradores (2016) também demonstraram a capacidade de *P. sajor caju* para quebrar a barreira da lignina contida na palha de milho a uma temperatura de 25°C, pH 5, e na ausência de luz. Sharma; Aora (2010) verificaram a potencial aplicação de *Phlebia floridensis* na degradação da palha de trigo, tendo aumentado a digestibilidade desse resíduo em condições otimizadas, *in vitro*.

No intuito de avaliar a composição do meio de cultivo frente à deslignificação do bagaço de cana, experimentos utilizando os consórcios e os fungos individualizados foram conduzidos em meio extrato de malte 2%, utilizando as condições dos ensaios 10 e 5 do PB 3. Os resultados revelaram que os experimentos realizados com o consórcio e os fungos individuais em meio malte + bagaço de cana, exibiram um perfil de deslignificação e produção enzimática muito similar aos dos experimentos realizados no Capítulo 2, onde a taxa de deslignificação foi praticamente a mesma, mas com altos níveis de atividade da lacase. Nos experimentos em meio malte + bagaço de cana foram detectadas atividades de lacase, MnP e LiP para alguns dos ensaios realizados, entretanto em quantidades muito baixas. Os resultados de deslignificação dos cultivos em malte + bagaço de cana não foram melhores do que os obtidos nas condições de cultivo otimizadas utilizando o planejamento experimental.

Os experimentos realizados no presente capítulo, evidenciam a importância da aplicação do planejamento experimental para a avaliação de diferentes fatores na degradação biológica e otimização de processos. Os resultados revelam o potencial do consórcio C5 na deslignificação do bagaço de cana, onde as maiores porcentagens de deslignificação foram obtidas nas condições otimizadas (ensaios 10 e 5 do PB3). Em adição, os resultados obtidos revelam a importância do fungo basidiomiceto de origem marinha *Marasmiellus* sp. (155) no consórcio selecionado, visto que quando avaliado separadamente apresentou altas porcentagens de deslignificação no experimento de validação, nos experimentos sem o sulfato de cobre e nos experimentos em meio malte.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia de seleção de fungos com potencial para deslignificação foi aplicada com sucesso, permitindo a seleção de cinco novas fontes de recursos genéticos com potencial para aplicação em processos de biodegradação de biomassa lignocelulósica.

Os fungos filamentosos isolados de diferentes ambientes foram capazes de crescer em conjunto e de secretar enzimas do complexo ligninolítico, com destaque para as lacases.

Seis consórcios foram estipulados a partir dos cinco fungos selecionados (*Tinctoporellus* sp., *Marasmiellus* sp., *Lichtheimia ramosa*, *Fusarium* sp., *Aspergillus* sect. *flavi*), sendo cada um com sua particularidade, proporcionando a futura possibilidade de aplicação a outros estudos envolvendo a biodegradação de compostos recalcitrantes.

Este é um dos poucos trabalhos atuais a reportar a utilização de consórcios de fungos filamentosos de origem marinha e de solo de canavial na degradação de resíduos agroindustriais servindo, portanto, como base para estudos futuros.

O tratamento biológico do bagaço de cana foi o mais eficiente para todos os consórcios empregados, tanto do ponto de vista da deslignificação quanto da seletividade. Em contrapartida, foi verificada certa dificuldade na padronização do processo de biodegradação do bagaço de cana, visto que a composição heterogênea desse resíduo pode ter implicado na resistência ao ataque microbiano em algumas amostras analisadas.

A casca de arroz foi o resíduo menos degradado pela atividade microbiana dos consórcios nas condições de cultivo utilizadas, apresentando leve redução da lignina pelos consórcios C5 e C6.

Após o monitoramento prévio por 15 dias da atividade enzimática, da degradação da lignina e da seletividade no resíduo bagaço de cana o consórcio C5 foi o escolhido e submetido aos estudos de otimização do processo de degradação.

A aplicação de 3 delineamentos experimentais do tipo Plackett-Burnman para a otimização da degradação do bagaço de cana pelo consórcio C5 foi bem sucedida, havendo um aumento sequencial da deslignificação. Nos planejamentos experimentais os melhores resultados de seletividade, de maneira geral, corroboraram os resultados deslignificação. A LiP foi a única enzima detectada em quantidades um pouco maiores durante o processo de deslignificação.



As melhores condições de cultivo para a degradação da lignina do bagaço de cana foram: i) inóculo fúngico (7), 8 mM de  $\text{CuSO}_4$ , 0,4 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 2,5 g de bagaço de cana (ensaio 10) e ii) inóculo fúngico (7), 20 g/L de glicose, 2 g/L de extrato de levedura, 8 mM de  $\text{CuSO}_4$  e 2,5 g de bagaço de cana (ensaio 5).

A presença do  $\text{CuSO}_4$  não afetou a eficiência de deslignificação do bagaço, sendo o melhor resultado obtido pelo consórcio C5 nas condições de cultivo do ensaio 5 (53,18%). De maneira geral, na presença do sulfato de cobre houve produção de LiP e MnP, enquanto a lacase foi detectada na ausência do sulfato de cobre.

Os experimentos em meio malte foram inferiores aos resultados com o meio otimizado, revelando a importância do planejamento experimental para otimização do processo de deslignificação.

O fungo de origem marinha *Marasmiellus* sp. (155) presente no consórcio C5 demonstrou habilidade para deslignificar o bagaço de cana quando cultivado em separado, apresentando altas porcentagens de deslignificação no experimento de validação, nos experimentos sem o sulfato de cobre e nos experimentos em meio malte.

Os resultados apresentados no presente trabalho revelam o potencial do consórcio C5 para a deslignificação do bagaço de cana, estimulando novos estudos de aplicação dos mesmos em tratamentos de resíduos agroindustriais e produção de etanol de segunda geração.

Este estudo enfatiza também a necessidade em ampliar o conhecimento sobre outras enzimas secretadas pelos micro-organismos do consórcio C5, presentes no processo de biodegradação da lignina, através de estudos de metatranscriptoma.

## 7.0. REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, A.M.; SOLBIATI, J.O.; CANN, I. K. O. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. **Advances in Applied Microbiology**, Elsevier Inc., v. 82, 2013.
- ABDELAZIZ, O. Y.; BRINK, D. P.; PROTHMANN, J.; RAVI, K.; SUN, M.; GARCÍA-HIDALGO, J. et al. Biological valorization of low molecular weight lignin, In Press, **Biotechnology Advances**, 2016.
- ABRAHÃO, M. C. **Diversidade e ecologia de Agaricomycetes lignolíticos do cerrado da Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, estado de São Paulo, Brasil (exceto Agaricales e Corticiales)**. 2012. 132 p. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2012.
- AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675–685, 2011.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v.34, n.10, p. 1729-1738, 2011.
- AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. 118p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, 2010.
- AGENCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA - AIE, 2012. Acessado em 23/06/2016. Disponível em: < <http://www.iea.org/>>.
- ALAM, M. Z.; MANSOR, M. F.; JALAL, K. C. A. Optimization of decolorization of methylene blue by lignin peroxidase enzyme produced from sewage sludge with *Phanerocheate chrysosporium*. **Journal of Hazardous Materials**, v.162, p.708-715, 2009.
- ALCALDE, M. Engineering the ligninolytic enzyme consortium. **Trends in biotechnology**, v.33, p.155-162, 2015.
- AMARASEKARA, A. S. Feedstocks for Cellulosic Ethanol Production, **Handbook of Cellulosic Ethanol**. Scrivener Publishing LLC. Published by John Wiley & Sons, Inc. p.87, 2014.
- ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M.; LEE, M. G. Elucidation of the effect of the ionic liquid pretreatment on rice husk via structural analyses. **Biotechnology Biofuels**, v. 5, p. 67, 2012.
- ARANTES, V. **Química Nova**. Main, v. 32, n. 6, p. 1586-1595, 2009.
- ARANTES, V.; MILAGRES, A. M.; FILLEY, T. R.; GOODELL, B. Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v.38, p.541-555, 2011.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS microbiology reviews**, v.29, p.719-739, 2005.
- ARORA, D. S.; CHANDER, M.; GILL, P. K. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.50, p.115-120, 2002.

- ARORA, D. S.; GILL, P. K. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. **Bioresource Technology**, v.77, p.89-91, 2001.
- ATUHAIRE, A. M.; KABI, F.; OKELLO, S.; MUGERWA, S.; EBONG, C. Optimizing bio-physical conditions and pre-treatment options for breaking lignin barrier of maize stover feed using white rot fungi. In Press, **Animal Nutrition**, 2016.
- AYYACHAMY, M.; CLIFFE, F. E.; COYNE, J. M.; COLLIER, J.; TUOHY, M. G. Lignin: untapped biopolymers in biomass conversion technologies. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v.3, p.255-269, 2013.
- BABIČ, J.; LIKOZAR, B.; PAVKO, A. Optimization of ligninolytic enzyme activity and production rate with *Ceriporiopsis subvermisporea* for application in bioremediation by varying submerged media composition and growth immobilization support. **International journal of molecular sciences**, v.13, p.11365-11384, 2012.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v.23, p.257-270, 1992.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v.52, p.858-875, 2011.
- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. **FEMS Microbiology letters**, v.220, p.235-240, 2003.
- BARBI, F.; PRUDENT, E.; VALLON, L.; BUÉE, M.; DUBOST, A.; LEGOUT A.; MARMEISSE R.; FRAISSINET-TACHET, L.; LUIS, P. Tree species select diverse soil fungal communities expressing different sets of lignocellulolytic enzyme-encoding genes. **Soil Biology and Biochemistry**, v.100, p.149–159, 2016.
- BÄRLOCHER, F.; BODDY, L. Aquatic fungal ecology—How does it differ from terrestrial? **Fungal Ecology**, v.19, p.5-13, 2016
- BERKA, R. M.; SCHNEIDER, P.; GOLIGHTY, E. J.; BROWN, S. H.; MADDEN, M.; BROWN, K. M.; HALKIER, T.; MONDORF, K.; XU, F. Characterization of the gene encoding extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.63, p.3151–3157, 1997.
- BHASKAR, T.; BHAVYA B.; RAWEL S.; NAIK, D. V.; KUMAR, A.; GOYAL, H. B. Thermochemical conversion of biomass to biofuels. **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Elsevier Inc. i.3, 2011.
- BINOD, P.; JANU, K. U.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. **Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes**, published by Elsevier, cap.10, p.229-250, 2011.
- BONI, H. T.; OLIVEIRA, D.; SOUZA, A. A. U.; SOUZA S. M. A. G. U. Bioadsorption by sugarcane bagasse for the reduction in oil and grease content in aqueous effluent. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v.13, p.1169–1176, 2016.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; DOS SANTOS VASCONCELOS, M. R.; PASSARINI, M. R.; VIEIRA, G. A.; LOPES, V. C.; MAINARDI, P. H.; SANTOS, J. A.; DUARTE, L. A.; OTERO, I. V. R.; YOSHIDA, A. M. S.; PESSOA JR, A.; FEITOSA, V. A.; SETTE, L. D. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.269-269. 2015.

- BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. **Water, Air, & Soil Pollution**, v.223, p.2333-2345, 2012.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; MAGRINI, M. J.; VASCONCELOS, M. R. S.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. Potencial biotecnológico de fungos marinhos para produção de enzimas ligninolíticas e degradação de poluentes ambientais. **Microbiologia in foco**, v.14, p.29-37, 2011.
- BONUGLI-SANTOS, R.C., DURRANT, L.R. & SETTE, L.D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Fungal Biology**, v. 114: p. 863-872, 2010b.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; VIEIRA, G. A.; COLLINS, C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A.; MURRAY, P.; SETTE, L. D. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, 8659-8668, 2016.
- BOYLE, D. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.817-823, 1998.
- BREEN, A.; SINGLETON, F. L. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Environmental biotechnology**, Current opinion, v.10, p.252-258, 1999.
- BRIENZO, M.; FERREIRA, S.; VICENTIM, M. P.; DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C. Comparison study on the biomass recalcitrance of different tissue fractions of sugarcane culm. **BioEnergy Research**, v.7, p.1454-1465, 2014.
- BURGI, R. Utilização de resíduos culturais e de beneficiamento na alimentação de bovinos. **Simpósio sobre nutrição de bovinos**. FEALQ, Anais, Piracicaba: p.153-169, 1995.
- BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Ligninolytic enzyme production and secretion in edible mushroom fungi. **Mushroom Biology and Mushroom Products**, Penn State University, Pennsylvania, 1996.
- CAMERON M. D.; TIMOFEEVSKI S.; AUST, S. D. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.54, p.751-8, 2000.
- CAO, Y.; IKEDA, I. Antioxidant activity and antitumor activity (in vitro) of xyloglucan selenious ester and surfated xyloglucan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.45, p.231-235, 2009.
- CHANDRA, R. Microbial decolourisation of pulp and paper mill effluent in presence of nitrogen and phosphorus by activated sludge process. **Journal of environmental biology/Academy of Environmental Biology**, v.22, p.23-27, 2001.
- CHEN, H. Y.; XUE, D. S.; FENG, X. Y.; YAO, S. J. Screening and production of ligninolytic enzyme by a marine-derived fungal *Pestalotiopsis* sp. J63. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.165, p.1754-1769, 2011.
- COELHO, G. D. **Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybe castanella* CCB444 durante crescimento em solo**. 2007. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, 2007.
- COLLINS, P. J.; DOBSON, A. D. W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Appl. Environ. Microbiol**, v.63, p.3444-3450, 1997.

- CONAB, Companhia Nacional de Desenvolvimento. Acompanhamento da safra brasileira de grão, v.3, safra 2015/16, n.9, 2016. Acessado em junho de 16: <<http://www.conab.gov.br>>.
- COTANA, F.; CAVALAGLIO, G.; NICOLINI, A.; GELOSIA, M.; COCCIA, V.; PETROZZI, A.; BRINCHI, L. Lignin as co-product of second generation bioethanol production from ligno-cellulosic biomass. **Energy Procedia**, v. 45, p. 52-60, 2014.
- COWLING, E. B.; KIRK, T. K. Properties of cellulose and lignocellulose materials as substrate for enzymatic conversion process. **Biotechnology and Bioenergy Symposium**, v. 6, p. 95-123, 1976.
- CRAGG, S. M.; BECKHAM, G. T.; BRUCE, N. C.; BUGG, T. D.; DISTEL, D. L.; DUPREE, P.; et al. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. Current Opinion, **Chemical Biology**, v. 29, p. 108-119, 2015.
- D'SOUZA, T. M.; MERRITT, C. S.; REDDY, C. A. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, p. 5307-5313, 1999.
- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues: Opportunities & Perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 578-595, 2009.
- DHIMAN, S. S.; HAW, J. R.; KALYANI, D.; KALIA, V. C.; KANG, Y. C.; LEE, J. K. Simultaneous pretreatment and saccharification: Green technology for enhanced sugar yields from biomass using a fungal consortium. **Bioresource technology**, v. 179, p. 50-57, 2015.
- DITTMER J. K.; PATEL, N. J.; DHAWALE S. W.; DHAWALE, S. S. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. **FEMS Microbiol. Lett**, v. 149, p. 65–70, 1997.
- DOHERTY, W.O.S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C.M. Value-adding to cellulosic ethanol: lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 259–276, 2011.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 28, p. 83–99, 2000.
- EBRINGEROVÁ, A. Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. **Macromolecular Symposia**, v. 232, p. 1–12, 2005.
- EGEA, T. C. **Avaliação do perfil de produção de enzimas e potencial de degradação do herbicida diuron pelos fungos isolados de solo de plantação de cana-de-açúcar**. 2010. 102 p. Dissertação (Mestrado em microbiologia). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2010.
- EGEA, T. C.; RODRIGUES, A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production of xylanase, cellulase and laccase by mesophilic fungi isolated from sugar cane soil. **Journal of Biotechnology**, v.150, p.419, 2010.
- EPOBIO. Cell wall saccharification. EPOBIO project, 2006. Acesso em out. 2016 <[http://www.epo-bio.net/pdfs/0611CellWallSaccharificationReport\\_c.pdf](http://www.epo-bio.net/pdfs/0611CellWallSaccharificationReport_c.pdf)>.
- EYLEN, D. V.; DONGEN, F. V.; KABEL, M.; DE BONT, JAN. Corn fiber, cobs and stover: Enzyme-aided saccharification and co-fermentation after dilute acid pretreatment. **Bioresource Technology**, v.102, p.5995–6004, 2011.

FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.16, p.231-240, 2000.

FAN-XIANG K. Influence of copper, manganese, and pH on the growth and several enzyme activities in mycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **Chemosphere**, v.30, p.199–207, 1995.

FARMER, V.; HENDERSON, M.; RUSSEL, J. Aromatic-alcohol-oxidase activity in the growth medium of *Polysticus versicolor*. **Biochemistry Journal**, v.74, p.257–262, 1960.

FERNANDES M. L. P.; SILVA, E. M. **Produção de enzimas extracelulares por *Agaricus blazei* e *Pleurotus ostreatus* cultivados em casca de arroz suplementado com farelo de milho**. 2012. 5 p. Iniciação Científica, Universidade Federal do Tocantins, 2012.

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BOM, E. P. S. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. **Waste Biomass Valor**, v.1, p.65–76, 2010.

FERREIRA, B. C. S.; TEODORO, F. S.; MAGESTE, A. B.; GIL, L. F.; FREITAS, R.P.; GURGEL, L. V. A. Application of a new carboxylate-functionalized sugarcane bagasse for adsorptive removal of crystal violet from aqueous solution: Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. **Industrial Crops and Products**, v.65, p.521-534, 2015.

FICHMAN, B. T. Annual Energy Review, U.S. **Energy Information Administration**, 2011.

FOLEY, K. M.; VANDER-HOOVEN, D. I. B. Properties and industrial uses of corncobs. In: POMERANZ, Y.; MUNCK, L. Cereals a renewable resource. The **American Association of Cereals Chemists**, 1981.

FOLTRAN, C. **Caracterização da atividade biodegradadora e de biosorção de corantes têxteis por três isolados de fungos do ambiente**. 2009. 53p. Iniciação Científica (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI. K. M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amilase by *Aspergillus oryzae*. **Biochem. Eng. J.**, v.15, p.107–115, 2003.

GARCIA, N. F. L.; SANTOS, F. R. D. S.; GONÇALVES, F. A.; PAZ, M. F. D.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production of  $\beta$ -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.18, p.314-319, 2015.

GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **PLoS Biology**, v.4, p.e235, 2006.

GHORBANI, F.; KARIMI, M.; BIRIA, D.; KARIMINIA, H.R.; JEIHANIPOUR A. Enhancement of fungal delignification of rice straw by *Trichoderma viride* sp. to improve its saccharification. **Biochemical Engineering Journal**, v.101, p.77–84, 2015.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1323-1330, 1995.

GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; MAYFIELD, M. B.; KUWAHARA, M.; GOLD, M. H. An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry Biophysics Research Communications**, v.114, p.1077, 1983.

GUPTA, R.; MEHTA, G.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of cellulose. **Biodegradation**, v.22, p.797-804, 2011.

HAAS, R.; TSIVUNCHYK, O.; STEINBACH, K.; LÖW, E. V.; SCHEIBNER, K.; HOFRICHTER, M. Conversion of adamsite (phenarsarzin chloride) by fungal manganese peroxidase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.63, p.564–566, 2004.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In **Nucleic acids symposium series**, v.41, p.95-98, 1999.

HAMMEL, K. E., MOEN, M. A. Depolymerization of a synthetic lignin in vitro by peroxidase. **Enzyme Microbiology Technology**, v.13, p.15-18, 1991.

HAMMEL, K. E.; CULLEN, D. Current. **Opinion of Biotechnology**, v.11, p.349, 2008.

HATAKKA, A. Biodegradation of lignin. In: **Biopolymers Online**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.

HEINFLING, A.; MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T.; BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. Purification and characterization of peroxidases from the dye decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. **FEMS Microbiology Letters**, v.165, p.43–50, 1998.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v.100, p.10-18, 2009.

HIBBETT, D. S.; OHMAN, A.; GLOTZER, D.; NUHN, M.; KIRK, P.; NILSSON, R. H. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. **Fungal Biology Reviews**, v.25, p.38-47, 2011.

HILDÉN, L.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G.; LI, J.; LJUNGQUIST, P.; HENRIKSSON, G. Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation? **FEBS Letters**, v. 477, p.79–83, 2000.

HO, D. P.; NGO H. H.; GUO, W. A mini review on renewable sources for biofuel. **Bioresource Technology**, v.169, p.742–749, 2014.

HOEGGER, P. J.; KILARU, S.; JAMES, T. Y.; THACKER, J. R.; KUES, U. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. **FEBS Journal**, v.273, p.2308-2326, 2006.

HROMÁDKOVÁ, Z.; EBRINGEROVÁ, A.; MALOVÍKOVÁ, A. The structural, molecular and functional properties of lignin-containing beechwood glucuronoxylan. **Macromolecular Symposia**, v.232, p.19–26, 2005.

IEA, International Energy Agency. World Energy Outlook 2013, International Energy Agency. IEA/OECD, Paris, 2013.

- JANSSEN, R.; RUTZ, D. D. Sustainability of biofuels in Latin America: risks and opportunities, **Energy Policy**, v.39, p.5717–5725, 2011.
- JENNINGS, D. H.; LYSEK, G. Fungal biology. Understanding the fungal lifestyle. **BIOS Sci Pub**, 2nd ed. Nueva York: Springer, 1999.
- JEOH, T.; ISHIZAWA, C. I.; DAVIS M. F.; HIMMEL, M. E.; ADNEY, W. S.; JOHNSON, D. K. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. **Biotechnology Bioenergy**, v.98, p.112–22, 2007.
- JOHANSSON, T.; WELINDER, K. G.; NYMAN, P. O. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. II. Partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.300, p.57–62, 1993.
- JONG, E.; FIELD, J. A.; DE BONT, J. A. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi **FEMS Microbiol. Rev**, v.13, p.153–188, 1994.
- JUNG, H.; XU, F.; LI, K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7, **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.161-168, 2002.
- KALYANI, D.; LEE, K. M.; KIM, T. S.; LI, J.; DHIMAN, S. S.; KANG, Y. C.; LEE, J. K. Microbial consortia for saccharification of woody biomass and ethanol fermentation. **Fuel**, v.107, p.815-822, 2013.
- KARP, S. G. **Development of a biotreatment for delignification of sugarcane bagasse and production of laccases**. 2012. 148 p. Tese (Doutorado em engenharia de bioprocessos e biotecnologia), Universidade Federal do Parana, Curitiba, 2012.
- KATOH, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT. Multiple sequence alignment software, version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 772-780, 2013.
- KERSTEN, P. J. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.87, p.2936–2940, 1990.
- KERSTEN, P. J.; KIRK, T. K. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**, p.169, p.2195-2201, 1987.
- KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, v.26, p.361–375, 2004.
- KIRK, P.M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. **10th ed. Wallingford: CAB International**, p.771, 2008.
- KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**. Wiley, New York, p.273-307, 1998.
- KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Revision Microbiology**, v.41, p.465-505, 1987.
- KNEŽEVIĆ, A.; STAJIĆ, M.; VUKOJEVIĆ, J.; MILOVANOVIĆ, I. The effect of trace elements on wheat straw degradation by *Trametes gibbosa*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.96, p.152-156, 2014.



- KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; KHASA, Y. P.; SINGH, A.; ZHANG, Y. H. P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, p.4950-4962, 2011.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v.169, p.247–250, 1984.
- LATIF, F.; RAJOKA, M. I. Production of ethanol and xylitol from corncobs by yeasts. **Bioresource Technology**, v.77, p.57-63, 2001.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v.56, p.1–24, 1997.
- LEE, R. A.; LAVOIE, J. M. From first-to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. **Animal Frontiers**, v.3, p.6-11, 2013.
- LEITE, E. L.; MEDEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVA, L. F.; CHAVANTE, S. F.; ABREU, L. D.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröderi*. **Plant science**, v. 132, i. 2, p. 215–228, 1998.
- LEVIN, L.; FORCHIASSIN, F.; VIALE, A. Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. **Process Biochemistry**, v.40, p.1381-1387, 2005.
- LEVIN, L.; FORCHIASSIN, F.; RAMOS, A. M. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. **Mycologia**, v.94, p.377-383, 2002.
- LEVIN, L.; HERRMANN, C.; PAPINUTTI, V. L. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white- rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p.207–214, 2008.
- LI, K.; XU, F.; ERIKSSON, K. E. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2654–2660, 1999.
- LI, P.; CAI, D.; LUO, Z.; QIN, P.; CHEN, C.; WANG, Y.; ZHANG, C.; WANG Z.; TAN, T. Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production. **Bioresource Technology**, v.206, p.86–92, 2016.
- LIANG, H.; GAO, D. W.; ZENG, Y. G. Effects of phosphorus concentration on the growth and enzyme production of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v.107, p.535-538, 2012.
- LIANG, J.; LIN, Y.; WU, S.; LIU, C.; LEI, M.; ZENG, C. Enhancing the quality of bio-oil and selectivity of phenols compounds from pyrolysis of anaerobic digested rice straw. **Bioresource technology**, v.181, p.220-223, 2015.
- LOPES, M. M. **Avaliação do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho suplementado com proteína de farelo de soja solubilizada para a obtenção de bioetanol**. 2015. 106p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.
- LOPEZ, M. J.; VARGAS-GARCÍA, M. C.; SUÁREZ-ESTRELLA, F.; NICHOLS, N. N.; DIEN, B. S.; MORENO, JOAQUIN. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a

lignocellulosic substrate treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 794–800, 2007.

LORENCINI, P. **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio**. 2013. 74p.

Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

LUCAS, M.; HANSON, S. K.; WAGNER, G. L.; KIMBALL, D. B.; RECTOR, K. D. Evidence for room temperature delignification of wood using hydrogen peroxide and manganese acetate as a catalyst. **Bioresource technology**, v.119, p.174-180, 2012.

LV, Y.; CHEN, Y.; SUN, S.; HU, Y. Interaction among multiple microorganisms and effects of nitrogen and carbon supplementations on lignin degradation. **Bioresource Technology**, v.155, p.144-151, 2014.

LYNAM, J.G.; REZA, M.T.; VASQUEZ, V.R.; CORONELLA, C.J. Pre-treatment of rice hulls by ionic liquid dissolution. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 629–636, 2012.

MA, K.; RUAN, Z. Production of a lignocellulolytic enzyme system for simultaneous bio-delignification and saccharification of corn stover employing co-culture of fungi. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 586-593, 2015.

MAGRINI, M. J. Degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas. 2012. 91 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.

MAI, C.; MAJCHERCZYK, A.; HÜTTERMANN, A. Chemo-enzymatic synthesis and characterization of graft copolymers from lignin and acrylic compounds. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 167-175, 2000.

MAIORELLA, B. L. Ethanol. In: Moo-Young, M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**. Pergamon Press, Oxford: p. 861–914, 1985.

MÄKELÄ, M. R.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A.; HILDÉN, K. Effect of copper, nutrient nitrogen, and wood-supplement on the production of lignin-modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. **Fungal Biology**, v. 117, p. 62-70, 2013.

MÄKELÄ, M. R.; MARINOVIĆ, M.; NOUSIAINEN, P.; LIWANAG, A. J.; BENOIT, I.; SIPILÄ, J.; HATAKKA, A.; DE VRIES, R. P.; HILDÉN, K. S. Aromatic metabolism of filamentous fungi in relation to the presence of aromatic compounds in plant biomass. **Advances in Applied Microbiology**, v. 91, p. 63-137, 2015.

MAKKY E. A.; ONG, J. J.; KARIM, MD. R.; LEE C. M. Production and optimization of L-asparaginase by *Bacillus* sp. KK2S4 from corncob. **African Journal of Biotechnology**, v.12, p.2654-2658, 2013.

MALEK, M. A.; CHOWDHURY, N. A.; YOUSOUF, Q. M.; CHOUDHURY, N. Bacterial cellulases and saccharification of lignocellulosic materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.750-753, 1988.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar**. 2009. 158 p. Tese (Doutorado em Ciência Físico-Química). Universidade de São Paulo, 2009.

- MARTELLI, H. L.; PANEK, A. D. Bioquímica experimental. Rio de Janeiro, Ao Livro Técnico, 1968.
- MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.426–432, 2007.
- MARTÍNEZ, A. T.; SPERANZA, M. RUIZ-DUE NAS F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F; ET AL. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **Int Microbiol**, v.8, p.195-204, 2005.
- MARTÍNKOVA, L.; KOTIK, M.; MARKOVA, E.; HOMOLKA, L. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenoloxidases: A review. **Chemosphere**, v.149, p.373-382, 2016.
- MATHIEU, Y.; PROSPER, P.; FAVIER, F.; HARVENGT, L.; DIDIERJEAN, C.; JACQUOT, J-P.; MOREL-ROUHIER, M.; GELHAYE, E. Diversification of Fungal Specific Class A Glutathione Transferases in Saprotrophic Fungi. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80298, 2013.
- MATKAR, K.; CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; NIGHOJKAR, A.; MADAMWAR, D. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.78, p.24-33, 2013.
- MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 5, p. 68-78, 2009.
- MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.38, p.522-550, 2012.
- MESTER, T.; TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.46, p.51-59, 2000.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- MOILANEN, A. M.; LUNDELL, T.; VARES, T.; HATAKKA, A. Manganese and malonate are individual regulators for the production of lignin and manganese peroxidase isozymes and in the degradation of lignin by *Phlebia radiata*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p.792–799, 1996.
- MONTEIL-RIVERA, F.; PHUONG, M.; YE, M.; HALASZ, A.; HAWARI, J. Isolation and characterization of herbaceous lignins for applications in biomaterials. **Industrial Crops and Products**, v.41, p.356–364, 2013.
- MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VINCENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v.28, p.817-830, 2010.
- NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dillute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98, p.49-58, 2002.
- OLIVEIRA, F. C. **Oxidação de lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos agroindustriais para obtenção de compostos químicos aromáticos de valor**

**agregado**. 2015. 199p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

OLUPOT, P.W.; CANDIA, A.; MENYA, E.; WALOZI, R. Characterization of rice husk varieties in Uganda for biofuels and their techno-economic feasibility in gasification. **Chemical Engineering Research and Design**, v.107, p.63–72, 2016.

ONU, Organização das Nações Unidas. Acessado em: maio de 2016: <<http://www.unric.org/pt/actualidade/31919-onu-projeta-que-populacao-mundial-cheque-aos-85-mil-milhoes-em-2030>>.

PANDEY, A. Handbook of plant-based biofuels. **Boca Raton: CRC Press**. ISBN, 1560221755, 2009.

PASSARINI, M. R. Z.; OTTONI, C. A.; SANTOS, C.; LIMA, N.; SETTE, L. D. Induction, expression and characterisation of laccase genes from the marine-derived fungal strains *Nigrospora sp.* CBMAI 1328 and *Arthopyrenia sp.* CBMAI 1330. **AMB express**, v.5, p.1, 2015.

PÉREZ-RANGEL, M.; QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; GONZÁLEZ-CASTAÑEDA, J.; VALDEZ-VAZQUEZ, I. Microscopic analysis of wheat straw cell wall degradation by microbial consortia for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.40, p.151-160, 2015.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE-LA-RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v.5, p.53–63, 2002.

PERISSINI, B. N. **Avaliação do potencial de degradação do herbicida diuron por fungos isolados de solo de canavial e suas tolerâncias aos metabólitos gerados**. 2015. 75 p. Dissertação (Mestrado em microbiologia). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.

PINTO, P. A.; DIAS, A. A.; FRAGA, I.; MARQUES, G.; RODRIGUES, M. A.; COLAÇO, J.; SAMPAIO, A.; BEZERRA, R. M. Influence of ligninolytic enzymes on straw saccharification during fungal pretreatment. **Bioresource technology**, 111, 261-267, 2012.

PITARELO, A. P. **Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor**. 2013. 162 p. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal do Paraná, 2013.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v.33, p.305-325, 1946.

POINTING, S. B.; JONES, E. B. G.; VRIJMOED, L. L. P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, v.92, p.139– 144, 2000.

POLLEGIONI, L.; TONIN, F.; ROSINI, E. Lignin-degrading enzymes. **FEBS Journal**, v.282, p.1190-1213, 2015.

POMPEU, G. B. **Comportamento enzimático de quatro fungos ligninolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol.** 2010. 96p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e Meio Ambiente) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PORTAL CANA ONLINE. São Paulo, Brasil, 2016, acessado em 20/05/2016. Disponível em: <<http://www.canaonline.com.br>>.

POTUMARTHI, R.; BAADHE, R. R.; NAYAK, P.; JETTY, A. Simultaneous pretreatment and saccharification of rice husk by *Phanerochete chrysosporium* for improved production of reducing sugars. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 113–117, 2013.

PRICHULA, J.; MACHADO, A. S.; SOUZA-CRUZ, P.; AYUB, M. A. Z. **Biodegradação de casca de arroz por *Ceriporiopsis subvermispota* em cultivos em estado sólido.** 2010, 18-22 p. Iniciação Científica, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, 2010.

PURCENA, L. L. A. **Prospecção de enzimas de solo de Cerrado sob plantio de cana-de-açúcar.** 2014. 106 p. Tese (Doutorado em Biologia) Universidade Federal de Goiás, 2014.

QUINTANAR, G. S.; ARANA-CUENCA, A.; MERCADO, F. Y.; GRACIDA, R. J. N.; TELLEZ-JURADO, A. Effect of particle size and aeration on the biological delignification of corn straw using *Trametes* sp. 44. **BioResources**, v. 7, 2012.

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v.199, p.83–91, 2016.

RAJARATHNAM, S.; BANO, Z.; MILES, P. G. Pleurotus mushrooms. Part I. A Morphology, life cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 26, p. 157-223, 1987.

RAMBO, M. K. D.; SCHMIDT, F. L.; FERREIRA, M. M.C. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. **Talanta**, v.144, p.696–703, 2015.

RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais. **Centro de Pesquisa em Química Aplicada**, p.11, 2000.

REGINA, M.; BROETTO, F.; GIOVANNOZZI-SERMANNI, G.; MARABOTINI, R.; PERANNI, C.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Oxidative enzymes activities from *Lentinula edodes* on agribusiness substrate. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.4, p.881-888, 2009.

REVISTA NOVA CANA. São Paulo, Brasil, 2016, acessado em 04/05/2016. Disponível em: <<http://www.novacana.com/n/>>.

RILEY, R.; SALAMOV, A. A.; BROWN, D. W.; NAGY, L. G.; FLOUDAS, D.; HELD, B. W.; LEVASSEUR, A. et al. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.111, p.9923–9928, 2014.

ROBERTSON, S. A.; MASON, S. L.; HACK, E.; ABBOTT, G. D. A comparison of lignin oxidation, enzymatic activity and fungal growth during white-rot decay of wheat straw. **Organic Geochemistry**, v.39, p.945-951, 2008.

ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇALVES, A. R.; SILVA, V. F. N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental

and physical–chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v.64, p.52–58, 2015.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SILVA, V. F. N.; GOMEZ, E. O.; GONÇALVES, A. R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v.111, p.447–452, 2012.

ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; SILVA, V. F. N.; CORSO, D.L.S.; GONÇALVES, A.R. Contributing to the environmental sustainability of the second generation ethanol production: delignification of sugarcane bagasse with sodium hydroxide recycling. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 63-68, 2014.

ROCHEFORT, D.; LEECH, D.; BOURBONNAIS, R.; **Green Chemistry**, v. 6, cap. 14, 2004.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Experimental design and process optimization. **CRC Press**. 2014.

ROESCH, L. F., FULTHORPE, R. R., RIVA, A., CASELLA, G., HADWIN, A. K., KENT, A. D., DAROUB, S. H.; CAMARGO, F. A. O. FARMERIE, W. G.; TRIPLETT, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v.1, p.283-290, 2007.

ROPARS, M.; MARCHAL, R.; POURQUIE, J.; VANDECASTEELE, J. P. Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 1: Pretreatment procedures. **Bioresource Technology**, v.42, p.197-204, 1992.

ROWELL, M. R. Opportunities for lignocellulosic materials and composites. Emerging technologies for material and chemicals from biomass: Proceedings of symposium. Washington, DC: **American Chemical Society**; Chap.2, p.26–31, 1992.

SALVACHUA, D.; KARP, E. M.; NIMLOS, C. T.; VARDON, D. R.; BECKHAM, G.T. Towards lignin consolidated bioprocessing: simultaneous lignin depolymerization and product generation by bacteria. **Green Chemistry**, v.17, p.4951-4967, 2015.

SALVACHÚA, D.; PRIETO, A.; LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; LU-CHAU, T.; MARTÍNEZ, Á. T.; MARTÍNEZ, M. J. Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource Technology**, v.102, p.7500-7506, 2011.

SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L.; PAIS, C.; FONSECA, A.; FELL, J. W. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospodium*: *Rhodospodium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.687-697, 2001.

SAMUELSEN, A. B.; PAULSEN, B. S.; WOLD, J. K.; KNUTSEN, S. H.; YAMADA, H. Characterization of a biologically active arabinogalactan from the leaves of *Plantago major* L. **Carbohydrate Polymers**, v.35, p.145-153, 1998.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol. Adv.** v.27, p.185–194, 2009.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**; v.99, p.5270-95, 2008.

SANTOS, M. S. R. **Estudos de pré-tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G**. 2014. 76p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

- SANTOS, R. B.; CAPANEMA, E. A.; BALAKSHIN, M. Y.; CHANG, H. M.; JAMEEL, H. Lignin structural variation in hardwood species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.4923-4930, 2012.
- SAVITHA, J.; SRIVIDYA, S.; JAGAT, R.; PAYAL, P.; PRIYANKI, S.; RASHMI, G. W.; ROSHINI, K. T.; SHANTALA, Y. M. Identification of potential fungal strain (s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **African journal of biotechnology**, v.6, p.564, 2007.
- SHANKAR, S. Laccase production and enzymatic modification of lignin by a novel *Peniophora* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v, 166, p.1082-1094, 2012.
- SHARMA, R. K.; ARORA, D. S. Production of lignocellulolytic enzymes and enhancement of in vitro digestibility during solid-state fermentation of wheat straw by *Phlebia floridensis*. **Bioresource Technology**, 101, 9248-9253, 2010.
- SHI, J.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; CHINN, M. S. Microbial pretreatment of cotton stalks by submerged cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource technology**, v. 100, p. 4388-4395, 2009.
- SIGOILLOT, J. C.; BERRIN, J. G.; BEY, M.; LESAGE-MEESSEN, L.; LEVASSEUR, A.; LOMASCOLO, A.; RECORD, E.; UZAN-BOUKHRIS, E. Fungal strategies for lignin degradation. **Adv Bot Res**, v.61, 263-308, 2012.
- SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109p. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- SILVANIA, A. L. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulases e xilanases por espécies de *Bacillus* sp.** 2013. 139p. Tese. (Doutorado em Produção Vegetal) Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2013.
- SILVEIRA, R. F. M. **Atividades biológicas de xilana de sabugo de milho**. 2010. 86p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.
- SILVEIRA, S.; JOHNSON, F. X. Navigating the transition to sustainable bioenergy in Sweden and Brazil: Lessons learned in a European and International context. **Energy Research & Social Science**, v. 13, p. 180–193, 2016.
- SIMS, R. E.; MABEE, W.; SADDLER, J. N.; TAYLOR, M. An overview of second-generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1570-1580, 2010.
- SINGH, V.; CHAUDHARY, D. K.; MANI, I.; DHAR, P. K. Recent advances and challenges of the use of cyanobacteria towards the production of biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 60, p. 1-10, 2016.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. National Renewable Energy Laboratory, US, **Laboratory Analytical Procedure**, p.16, 2008.
- SOARES, C. M.; RODRIGUES, P.; PETERSON, S. W.; VENÂNCIO, N. L. A. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. **Mycol**, v.104 p.682-697, 2012.
- SOCCOL, C. R.; FARACO, V.; KARP, S.; VANDENBERGHE, L. P. S.; THOMAZ-SOCCOL, V.; WOICIECHOWSKI, A.; PANDEY, A. Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Future Perspectives. **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Elsevier Inc. i. 5, 2011.

- STATSOFT, I. N. C. Statistica for Windows (Computer program manual). Tulsa, OK, 74104, 1995.
- SUGIURA, T.; YAMAGISHI, K.; KIMURA, T.; NISHIDA, T.; KAWAGISHI, H.; HIRAI, H. Cloning and homologous expression of novel lignin peroxidase genes in the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.73, cap.8, p.1793–1798, 2009.
- SUHARA, H.; KODAMA, S.; KAMEI, I.; MAEKAWA, N.; MEGURO, S. Screening of selective lignin-degrading basidiomycetes and biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of bamboo culms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.75, p.176–180, 2012.
- TAHA, M.; SHAHSAVARI, E.; AL-HOTHALY, K.; MOURADOV, A.; SMITH, A. T.; BALL, A. S.; ADETUTU, E. M. Enhanced biological straw saccharification through coculturing of lignocellulose-degrading microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.175, p.3709-3728, 2015.
- TALBOT, J. M.; MARTIN, F.; KOHLER, A.; HENRISSAT, B.; PEAY, K. G. Functional guild classification predicts the enzymatic role of fungi in litter and soil biogeochemistry. **Soil Biology and Biochemistry**, v.88, p.441-456, 2015.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.169-179, 2003.
- THOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality of fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, p. 853-876, 2001.
- TIEN M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. **Science**, v.221, p.661–663, 1983.
- TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, **Methods in enzymology**, v.161, p.238-249, 1988.
- TIWARI, R.; RANA, S.; SINGH, S.; ARORA, A.; KAUSHIK, R.; AGRAWAL, V. V.; SAXENA, A. K.; NAIN, L. Biological delignification of paddy straw and *Parthenium sp.* using a novel micromycete *Myrothecium roridum* LG7 for enhanced saccharification. **Bioresource technology**, v.135, p.7-11, 2013.
- TRUPKIN, S.; LEVIN, L.; FORCHIASSIN, F.; VIALE, A. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.682-690, 2003.
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA DE AÇÚCAR (UNICA), São Paulo, Brasil, 2016, acessado em: 04/05/2016. Disponível em:<<http://www.unicadata.com.br>>.
- USDA, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Acessado em junho de 2016: <<http://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/usda/173115-usda-espera-producaoenor-de-soja-na-safra-201516-com-reducao-de-area-e-produtividade.html#.V2g2cvkrK01>>.
- VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v.60, p.9-18, 2013.



- VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v.30, p.1458–1480, 2012.
- VANDERGHEM, C. Impact of formic/acetic acid and ammonia pre-treatments on chemical structure and physico-chemical properties of *Miscanthus miscanteus* lignin. **Polymer Degradation and Stability**, v.96, p.1761-1770, 2011.
- VARES, T.; NIEMENMAA, O.; HATAKKA, A. Secretion of ligninolytic enzymes and mineralization of <sup>14</sup>C-ring-labelled synthetic lignin by three *Phlebia tremellosa* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, cap.2, p.569–575, 1994.
- VASCONCELOS A. F. D.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SCARMINIO, I. S.; REZENDE, M. I. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response surface method. **Proc. Biochem**, v.35, p1131–1138, 2000.
- VELMURUGAN, N.; LEE, Y. S. Enzymes from marine fungi: current research and future prospects. Cap.21. **Marine Fungi and Fungal-like Organisms**, Edited by Jones, E. B. Gareth; Pang, Ka-Lai, p.441–474, 2012.
- VERMA, A. K.; RAGHUKUMAR, C.; VERMA, P.; SHOUCHE, Y. S.; NAIK, C. G. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. **Biodegradation**, v.21, p.217-233, 2010.
- VIEIRA, A. P.; SANTANA, S. A. A.; BEZERRA, C.W. B.; SILVA, H. A. S.; MELO, J. C. P.; SILVA FILHO, E. C.; AIROLDI, C. Copper sorption from aqueous solutions and sugar cane spirits by chemically modified babassu coconut (*Orbignya speciosa*) mesocarp. **Chemical Engineering Journal**, v.161, p.99–105, 2010.
- WAN, C.; LI, Y. Effectiveness of microbial pretreatment by *Ceriporiopsis subvermispora* on different biomass feed stocks. **Bioresource Technology**, v.102, p. 7507–7512, 2011.
- WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Advances**, p.1-11, 2012.
- WANG, K.; SUN, R. C. Biorefinery Straw for Bioethanol, Chapter 7.5, 2012.
- WANG, W.; GAO, P. J. Function and mechanism of a low molecular-weight peptide produced by *Gleophyllum trabeum* in biodegradation of cellulose. **Journal of Biotechnology**, v.101, p.119–130, 2003.
- WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.23688-23695, 1992.
- WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye eluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 161–187, 2003.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a Guide to Methods and Applications**, v.18, p.315-322, 1990.
- YAMANAKA, R.; SOARES, C. F.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* ccb176 under different culture conditions. **Braz J Microbiol**, v.39, p.78–84, 2008.
- YOSHIDA, H. Chemistry of lacquer (urushi). **Journal of the Chemical Society**, v.43, p.472–486, 1883.

ZHONG, W.; ZHANG, Z.; LUO, Y.; SUN, S.; QIAO, W.; XIAO, M. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. **Bioresource Technology**, v.102, p.11177–11182, 2011.



**APÊDICE B** – Condições estipuladas para os ensaios para o PB2.

Variáveis	Nível inferior	0	Nível superior
	-1		+1
1. N° de cilindros de pré-inóculo	3	4	5
2. Glicose (g/L)	0	10	20
3. Ext Malte (g/L)	0	15	30
4. Peptona (g/L)	0	1,5	3
5. Ext Levedura (g/L)	0	1	2
6. CuSO <sub>4</sub> mM	0	3	6
7. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	0,1	0,2

**APÊDICE B** – Matriz PB12 correspondentes aos ensaios do PB2.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7
<b>1</b>	1	-1	1	-1	-1	-1	1
<b>2</b>	1	1	-1	1	-1	-1	-1
<b>3</b>	-1	1	1	-1	1	-1	-1
<b>4</b>	1	-1	1	1	-1	1	-1
<b>5</b>	1	1	-1	1	1	-1	1
<b>6</b>	1	1	1	-1	1	1	-1
<b>7</b>	-1	1	1	1	-1	1	1
<b>8</b>	-1	-1	1	1	1	-1	1
<b>9</b>	-1	-1	-1	1	1	1	-1
<b>10</b>	1	-1	-1	-1	1	1	1
<b>11</b>	-1	1	-1	-1	-1	1	1
<b>12</b>	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
<b>13 (C)</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>14 (C)</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>15 (C)</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>16 (C)</b>	0	0	0	0	0	0	0

**APÊNDICE C – Condições estipuladas para os ensaios para o PB2.**

Variáveis	Nível inferior -1	0	Nível superior +1
1. N° de cilindros de pré-inóculo	5	6	7
2. Glicose (g/L)	0	10	20
3. Peptona (g/L)	0	1,5	3
4. Ext Levedura (g/L)	0	1	2
5. CuSO <sub>4</sub> mM	0	4	8
6. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	0,2	0,4

**APÊNDICE C- Matriz PB12 correspondente aos ensaios do PB3.**

Ensaio	1	2	3	4	5	6
<b>1</b>	1	-1	1	-1	-1	-1
<b>2</b>	1	1	-1	1	-1	-1
<b>3</b>	-1	1	1	-1	1	-1
<b>4</b>	1	-1	1	1	-1	1
<b>5</b>	1	1	-1	1	1	-1
<b>6</b>	1	1	1	-1	1	1
<b>7</b>	-1	1	1	1	-1	1
<b>8</b>	-1	-1	1	1	1	-1
<b>9</b>	-1	-1	-1	1	1	1
<b>10</b>	1	-1	-1	-1	1	1
<b>11</b>	-1	1	-1	-1	-1	1
<b>12</b>	-1	-1	-1	-1	-1	-1
<b>13 (C)</b>	0	0	0	0	0	0
<b>14 (C)</b>	0	0	0	0	0	0
<b>15 (C)</b>	0	0	0	0	0	0
<b>16 (C)</b>	0	0	0	0	0	0