
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rafael Dieguez Fernandes

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIGNINA PEROXIDASE POR CONSÓRCIO
FÚNGICO ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA DE BAGAÇO DE CANA-
DE-AÇÚCAR**



Rio Claro
2017

RAFAEL DIEGUEZ FERNANDES

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIGNINA PEROXIDADE POR CONSÓRCIO
FÚNGICO ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA DE BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lara Durães Sette

Co-orientador: Dr^a. Viviane Cristina Padilha Lopes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências biológicas.

Rio Claro

2017

547.758 Fernandes, Rafael Dieguez
F363o Otimização da produção de lignina peroxidase por consórcio fúngico
através da fermentação semi-sólida de bagaço de cana de açúcar / Rafael
Dieguez Fernandes. - Rio Claro, 2017
74 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Lara Durães Sette
Coorientadora: Viviane Cristina Padilha Lopes

1. Enzimas. 2. Ligninases. 3. Consórcio. 4. Otimização. 5. Peroxidase.
6. Fermentação. I. Título.

RESUMO

A busca por fontes de energia menos poluentes vem ganhando destaque nos últimos anos, e dentre elas a produção de energia utilizando biomassa vegetal é considerada promissora. Algumas barreiras na utilização da biomassa para produção de energia devem ser superadas para possibilitar uma produção em escala industrial. A lignina presente na parede celular dos vegetais é o principal problema nesse processo, e sua remoção é fundamental para tornar a celulose disponível para fermentação da biomassa e obtenção do etanol. O pré-tratamento da biomassa empregando micro-organismos lignocelulolíticos, tais como os fungos de podridão branca é um método alternativo e economicamente viável à deslignificação da biomassa. Estes, possuem um potencial complexo enzimático que degrada a molécula de lignina, tornando a celulose disponível para o processo de fermentação e produção de combustível. O presente trabalho teve como objetivo a otimização das condições de produção de lignina peroxidase (LiP) por meio da adição de indutores químicos em fermentação semissólida, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato do meio de cultivo. Para a deslignificação, foi utilizado um consórcio fúngico constituído de três isolados diferentes: *Marasmiellus* sp. (155; LAMAI 84; CRM 593) isolado de esponja marinha, *Tinctoporellus* sp. (154; LAMAI 83; CRM 592), isolado de esponja marinha e *Aspergillus* sect. Flavi (G25), isolado de solo de canavial. Nesse contexto, no desenho experimental foram utilizados os indutores álcool veratrílico, sulfato de cobre CuSO₄, Tween 80 e fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), os quais foram adicionados em meio de cultivo sob diferentes concentrações visando uma maior produção de LiP e a deslignificação do bagaço. Após o biotratamento foi feita uma caracterização química no bagaço para avaliar sua constituição, e a atividade enzimática da LiP foi determinada após o biotratamento por espectrofotometria UV/VIS a partir do aldeído veratrílico produzido na oxidação do álcool veratrílico. Os resultados foram processados e analisados em Excel e Statistica 8.0. Visando o aumento da produção de LiP e o aumento da deslignificação, foram realizados 3 experimentos do tipo Plackett-Burnman (PB). Os resultados mostraram que a maior produção de LiP foi encontrada no ensaio 6 do PB2, formulado com: glicose (20g/L), álcool veratrílico (30uL), CuSO₄ (350uL), Tween 80 (125uL), 3 cilindros de inóculo, peptona (2g/L) e KH₂PO₄ (0,1g) e pH 7. Um experimento adicional foi feito para avaliar a influência da água do mar na produção de LiP, MnP, Lac, e na deslignificação do bagaço de cana usando apenas o fungo *Marasmiellus*

sp. (155). O resultado desse experimento demonstrou que a salinidade pode ter influenciado a deslignificação do bagaço, tendo em vista que o experimento apresentou os maiores resultados para deslignificação, apresentando 48% e 38,7% para o meio de cultivo formulado com água do mar artificial e água do mar artificial com presença de indutores.

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica. Tratamento biológico. Planejamento experimental.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção mundial de etanol entre 2007 e 2015 (bilhões de galões).....	9
Figura 2 - Propriedades do bioetanol e da gasolina.....	9
Figura 3 - <i>Saccharum officinarum</i>	10
Figura 4 - Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico.....	12
Figura 5 - Fórmula química da celulose.....	13
Figura 6 - Estrutura molecular da hemicelulose.....	14
Figura 7 - Exemplo de uma possível estrutura molecular de lignina.....	15
Figura 8 - Atividade enzimática no PB 1 (dados equivalentes a amostras em triplicata).....	37
Figura 9 - Resposta da deslignificação e atividade enzimática da Lip no PB1	37
Figura 10 - Atividade enzimática no PB 2 (dados equivalentes a amostras em triplicata).....	40
Figura 11 - Resposta da deslignificação e atividade enzimática da Lip no PB2.....	41
Figura 12 - Resposta da deslignificação e atividade enzimática da Lip no PB3.....	43
Figura 13 - Atividade enzimática no 4 experimento (dados equivalentes a amostras em triplicata).....	46
Figura 14 - Resposta da deslignificação e atividade enzimática da Lip no experimento final.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis das variáveis estudadas no planejamento Plackett-Burman para deslignificação do bagaço de cana no 1º PB.....	29
Tabela 2 - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do PB1.....	35
Tabela 3 - Análise estatística do PB1.....	36
Tabela 4 - Níveis das variáveis estudadas no planejamento Plackett-Burman para deslignificação do bagaço de cana no 2º PB.....	38
Tabela 5 - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do PB2.....	39
Tabela 6 - Análise estatística do PB2.....	40
Tabela 7 - Níveis das variáveis estudadas no planejamento Plackett-Burman para deslignificação do bagaço de cana no 3º PB.....	41
Tabela 8 - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do PB3.....	44
Tabela 9 - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do último experimento.....	44
Tabela 10 - Análise estatística do PB3.....	45

LISTA DE SIGLAS

Lac - Lacase

MnP - Manganês peroxidase

LiP - Lignina peroxidase

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

TNT - Trinitrotolueno

PVC - Policloreto de vinila

RMS - Response Surface Methodology

PB - Plackett-Burnman

CuSO₄ - Sulfato de cobre

KH₂PO₄ - Fosfato de Potássio Monobásico

C5 - (*Aspergillus* sect. *flavi*, *Lichtheimia ramosa* e *Marasmiellus* sp.)

PDA - Potato Dextrose Agar

MEA - Malt Extract Agar

ASW - Artificial Seawater (água do mar artificial)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1 Etanol.....	8
2.2 Cana-de-açúcar.....	10
2.2.1 <i>Celulose</i>	12
2.2.2 <i>Hemicelulose</i>	13
2.2.3 <i>Lignina</i>	14
2.3 Pré-tratamento biológico.....	16
2.4 Enzimas ligninolíticas.....	17
2.4.1 <i>Manganês peroxidase (Mnp)</i>	18
2.4.2 <i>Lacase (Lac)</i>	19
2.4.3 <i>Lignina peroxidase (LiP)</i>	20
2.5 Consórcio fúngico.....	22
2.6 Otimização do meio de cultura.....	23
3 OBJETIVOS.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Origem dos fungos.....	27
4.2 Cultivo e manutenção dos isolados.....	27
4.3 Preparação do bagaço.....	27
4.4 Bio-tratamento.....	28
4.5 Atividade enzimática.....	30
4.6 Caracterização do bagaço	32
4.7 Análise dos resultados.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6 CONCLUSÕES.....	48
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
8 ANEXOS.....	67

1. INTRODUÇÃO

O aumento na demanda de energia no mundo e o esgotamento progressivo das reservas de petróleo motivam a busca por novas fontes de energia alternativa, especialmente as de origem de materiais renováveis, como a biomassa vegetal (SAXENA et al., 2009). Estima-se que o crescimento da produção de combustíveis derivados de petróleo de fácil acesso não irá suprir as necessidades mundiais por volta de 2040-2050, já que a demanda de petróleo crescerá para 105 milhões de barris/dia em 2030 (BRADSHAW, 2010), enquanto que o número de veículos crescerá para 1.3 bilhões em 2030 e para 2 bilhões em 2050 (BALAT, 2011). Como resultado da crescente demanda, o preço do barril de petróleo aumentou para mais de US\$ 112,00 em 2011 e estima-se que em 2035 o valor seja de US\$ 125,00 (EIA, 2012).

Em consequência desse alto consumo, a preocupação global sobre a mudança climática e a implicante necessidade de diminuir as emissões de gases com efeito estufa têm incentivado o uso do bioetanol como um substituto ou aditivo da gasolina (BALAT et al., 2008), fato este, segundo Pereira Jr. et al. (2008) tem mobilizado internacionalmente e de forma ímpar setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais, com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos de menor impacto ambiental. Segundo Lora (1997), as fontes renováveis de energia (e.g. solar, eólica, geotérmica, biomassa) são caracterizadas por gerarem impactos ambientais muito menores que o uso de combustíveis fósseis e, portanto, bastante atraentes para a produção energética.

Tendo em vista esses fatos, o uso de biomassa vegetal para geração de energia ganha destaque principalmente para os países em desenvolvimento, que geralmente possuem atividade agrícola bastante acentuada, e pode trazer significativas melhorias socioambientais, tais como a diminuição da poluição, geração de emprego e aumento na qualidade de vida (GUARDABASSI, 2006). Demirbas (2009) estima que a produção global de biomassa seja da ordem de 146 bilhões de toneladas por ano, entre produção agropecuária, lixo orgânico, adensamento florestal e ciclagem bioquímica.

A quantidade estimada de biomassa existente na Terra é da ordem de 1,8 trilhão de toneladas (ANEEL, 2009). No Brasil, a fonte que tem se destacado é a biomassa da cana-de-açúcar, que além do seu crescente destaque na produção de etanol, seus subprodutos, o bagaço e a palha da cana, assim como a maioria dos resíduos de biomassa obtidos nas atividades agrícolas

e industriais, possuem elevados teores de materiais lignocelulósicos (DIAS et al., 2009). Para ser usado como matéria-prima para produção de bioetanol, o bagaço de cana deve ser processado para produzir açúcares fermentescíveis (MOSIER et al., 2005). Um grande desafio para o total aproveitamento do potencial da biomassa lignocelulósica é superar a sua alta resistência à degradação (LEE et al., 2005). A estrutura da parede celular e as dificuldades em hidrolisar seus principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) limitam a aplicação de biomassa vegetal (RODRIGUES et al., 2010). Um processo de pré-tratamento é necessário para separar a lignina da celulose, reduzir a sua cristalinidade e aumentar a porosidade do bagaço, melhorando assim a hidrólise da celulose (KUO; LEE, 2009). Para ser eficiente, o pré-tratamento deve evitar a necessidade de reduzir as partículas da biomassa, preservar a hemicelulose, limitar a formação de produtos degradantes, minimizar a demanda energética e o agente do pré-tratamento deve ter custo reduzido e ter a capacidade de ser reciclado sem grandes custos (BINOD et al., 2010).

Os pré-tratamentos comumente aplicados podem ser classificados em três grupos principais: físicos, químicos, biológicos, além de combinações entre eles (MOSIER et al., 2005; SUN; CHENG, 2002). Dentre os métodos físicos, podemos citar: moagem e trituração (bola, energia vibratória, rolo duplo, pressão, martelo), radiação (raios de elétrons, raios gama, micro-ondas), altas temperaturas (pirólises, explosão a vapor). Esses tipos de tratamentos aumentam a área superficial e tamanho dos poros da partícula, além de diminuir o grau de polimerização (AZUMA et al., 1985; KOULLAS et al., 1992; RAMOS et al., 1993). Os métodos químicos se utilizam de bases, ácidos, gases, agentes oxidantes e redutores e solventes orgânicos. Esses métodos agem na deslignificação, diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose associada com o aumento da porosidade do material (FARID et al., 1983; SZCZODRAK et al., 1986; BES et al., 1989). Já o método biológico usa enzimas produzidas por fungos para deslignificar o material, além de reduzir o grau de polimerização da celulose e hemicelulose (AGUIAR et al., 2010; GUPTA et al., 2011)

Tanto na perspectiva econômica quanto ambiental, o pré-tratamento fúngico utilizando micro-organismos lignocelulolíticos, principalmente fungos de podridão branca, tem sido visto com grande interesse como uma alternativa ao pré-tratamento térmico/químico para produção de etanol celulósico. A viabilidade do pré-tratamento fúngico para melhorar a quebra enzimática de vários tipos de biomassa, como palha de milho (KELLER et al., 2003; XU et al., 2010), palha de trigo (DIAS et al., 2010), palha de arroz (BAK et al., 2009), resíduos de algodão (SHI et al.,

2009), e biomassa lenhosa (YU et al., 2009), tem sido relatada ao longo dos anos. O tempo longo de pré-tratamento fúngico, devido à baixa taxa de deslignificação, é uma das principais barreiras na aplicação em larga escala. Geralmente várias semanas ou meses são necessários para obter um alto grau de degradação da lignina (KELLER et al., 2003; SAWADA et al., 1995; SHI et al., 2009), e por isso novos esforços devem ser realizados para aprimorar esse processo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

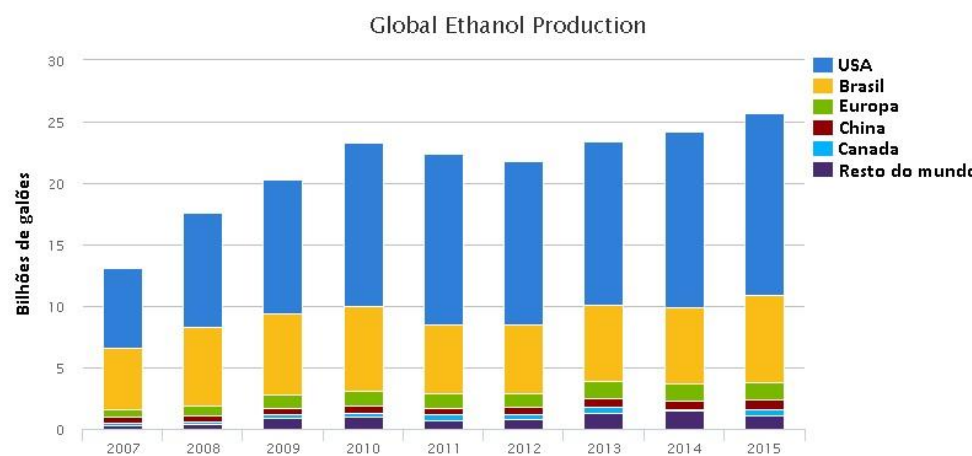
Materiais lignocelulósicos são compostos principalmente de celulose (polímero de glicose), hemicelulose (mistura de polissacarídeos composta principalmente por glicose, manose, xilose e arabinose) e lignina (SILVA et al., 2010). O Brasil é um dos maiores produtores de etanol do mundo, e tem usado cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de bioetanol em larga escala por mais de 30 anos (GOLDEMBERG, 2007). O bagaço de cana é um dos principais subprodutos gerados durante a produção convencional de bioetanol de cana-de-açúcar. A hidrólise de biomassa no Brasil tem grande potencial para o seu aproveitamento, pois além de o país possuir grande disponibilidade de matéria prima, ainda há a possibilidade da sua integração complementar aos processos usados em usinas de açúcar, destilarias e plantas de co-geração (CORTEZ et al., 2008).

2.1 Etanol

Etanol ou álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) é um líquido incolor, volátil e inflamável, com peso molecular de 46.07 g e densidade de 780 kg/m³ a 20°C (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2017). Ele pode ser obtido pela indústria petroquímica através da hidratação do etileno (ROBERTS; CASEIRO, 1977) na presença de um catalizador, normalmente ácido fosfórico (NAIM et al; 2011). O etanol para uso em bebidas alcoólicas e a maioria do etanol utilizado como combustível é produzido por fermentação. Algumas espécies de leveduras (*Saccharomyces cerevisae*) e bactérias (*Zymomonas mobilis*) metabolizam açúcares e produzem etanol e dióxido de carbono.

O Brasil e Estados Unidos representam aproximadamente 85% da oferta mundial de bioetanol (Figura 1).

Figura 1 - Produção mundial de etanol entre 2007 e 2015 (bilhões de galões).



Fonte: Renewable Fuels Association (2016). *1 galão equivale a 3,7851 L

Mais de 20% dos carros brasileiros são capazes de usar 100% de etanol como combustível, incluindo motores a etanol e motores "flex". As características do etanol possibilitam a combustão mais limpa e o melhor desempenho dos motores, contribuindo para a redução das emissões poluidoras (Figura 2). Além disso, comporta-se como um verdadeiro aditivo para a gasolina (GOLDEMBERG et al., 2008).

Figura 2 - Propriedades do bioetanol e da gasolina.

Parâmetro	Unidade	Gasolina	Etanol
Poder calorífico	kJ/kg	43.500	28.225
	kJ/litro	32.180	22.350
Densidade	kg/litro	0,72 – 0,78	0,792
Octanagem RON (<i>Research Octane Number</i>)	—	90 – 100	102 – 130
Octanagem MON (<i>Motor Octane Number</i>)	—	80 – 92	89 – 96
Calor latente de vaporização	kJ/kg	330 – 400	842 – 930
Relação ar/combustível estequiométrica	—	14,5	9,0
Pressão de vapor	KPa	40 – 65	15 – 17
Temperatura de ignição	° C	220	420
Solubilidade em água	% volume	~ 0	100

Fonte: GOLDEMBERG; MACEDO (1994)

Como consequência de sua composição, comparativamente às gasolinas típicas, a combustão da gasolina com etanol e do etanol puro em motores produz menores emissões de monóxido de carbono, óxidos de enxofre, hidrocarbonetos e outros compostos poluentes (GOLDEMBERG et al., 2008). O aumento da produção do etanol só é possível por meio da expansão da área de cultivo de cana-de-açúcar, do melhoramento das técnicas de cultivo, do desenvolvimento de novas tecnologias industriais ou aprimoramento das tecnologias existentes.

2.2 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (Figura 3) é uma gramínea originária do sudeste asiático, e foi introduzida no Brasil pelos portugueses no início do século XVI, sendo hoje muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais do país (ROSILLO-CALLE et al., 2005). O plantio de cana-de-açúcar no Brasil é uma atividade plenamente estabelecida, e nos últimos anos a indústria tem mostrado que é possível agregar valor aos coprodutos do açúcar e do álcool.

Figura 3 - *Saccharum officinarum*



Fonte: www.plant-pictures.de

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), e o plantio é feito em 23 estados brasileiros, principalmente São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Pernambuco. O bagaço de cana é um resíduo poroso composto pelos talos da cana após o processo de extração do suco (SOCCOL et al. 2011), constituído por três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) (Figura 4), as quais, juntas, constituem mais de 90% da massa total (PANDEY et al., 2000). 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 química do bagaço de cana varia de acordo com alguns fatores, dentre eles o tipo de cana, o tipo de solo, as técnicas de colheita e até o manuseio. O teor de cinzas pode variar de acordo com a parte do vegetal, sendo aproximadamente 29% na porção externa e 22% no nó e entrenó da planta (BRIENZO et. al., 2014).

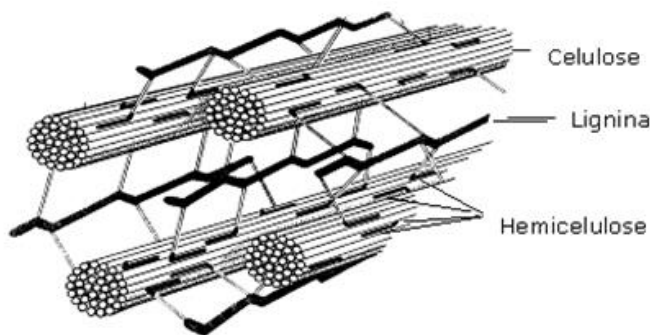
A parede celular possui outros componentes que não estão ligados com a matriz lignocelulósica, como fenóis, gorduras, resinas, entre outros. Esses compostos podem ser solubilizados em solventes (e.g. etanol, hexano, água) e variam em quantidade de acordo com o cultivar de cana-de-açúcar, das condições de crescimento e idade da planta, representando de 3 a 14% do conteúdo do bagaço (BRIENZO et. al., 2014). A porção inorgânica da biomassa é chamada de teor de cinzas, e representa componentes como cálcio, magnésio, sílica, sódio, potássio, estrôncio, manganês e fósforo (SZCZERBOWSKI et al., 2015). É determinado pela queima da biomassa em uma mufla e quantificada via gravimetria, girando em torno de 2% da composição do bagaço (CANILHA et al., 2011; BRIENZO et al., 2009; SANTOS et al., 2011). O bagaço de cana, quando entra em contato com o solo do cultivo apresentam maior teor de cinzas, resultado do excesso de solo e poeira (SZCZERBOWSKI et al., 2015). De acordo com algumas pesquisas recentes o teor de celulose no bagaço de cana gira em torno de 42%, hemicelulose 30%, lignina 20%, extrativos 6,4% e teor de cinzas 2,4% (MARYANA et al., 2014; ROCHA et al., 2015; BRIENZO et al., 2015; GUILHERME et al., 2015).

Normalmente o bagaço é utilizado como combustível para caldeiras, fornecendo a energia necessária para a planta (usina), enquanto o lixo de cana de açúcar, anteriormente queimado para melhorar o processo de colheita, hoje na sua maioria é deixado no campo para fins agrícolas (ALONSO PIPPO et al., 2011). Devido à grande quantidade de bagaço de cana produzido e suas características físico-químicas, esse material é utilizado para diversas

finalidades, tendo destaque a produção de ração animal, uso na indústria química, fabricação de papel e derivados, material alternativo na formulação de materiais para a construção civil e na produção de biomassa microbiana (DOHERTY et al., 2011), além de poder ser usado como material adsorvente de contaminantes orgânicos com resultados satisfatórios (BONI et al., 2016; VIEIRA et al., 2010; FERREIRA et al., 2015). Cada tonelada de cana-de-açúcar processada gera em torno de 140 kg de bagaço (CENBIO, 2003). Entre 60 e 90% do resíduo é utilizado pela própria indústria sucroalcooleira como combustível para geração de energia e calor, porém nem todo material é utilizado, e o excedente gera problemas ambientais e de estocagem (SUN et al., 2004).

A proibição da prática da queimada em alguns locais aumentou significativamente a quantidade de sub-produtos de cana-de-açúcar disponíveis para a indústria (SEABRA et al., 2010). Esse sub-produto excedente pode ser processado para dar origem ao etanol de segunda geração através da fermentação da celulose, porém é necessário um pré-tratamento para tornar a celulose disponível para a fermentação. O foco do pré-tratamento é separar a lignina da celulose, passo normalmente feito por processos termoquímicos.

Figura 4 - Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico.



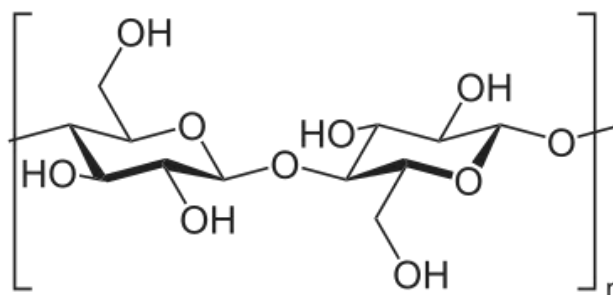
Fonte: LEE (1997)

2.2.1 Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é o bio-polímero mais abundante do planeta e o principal constituinte da parede celular das células vegetais (BOERJAN et al., 2003), possuindo grande

resistência à hidrólise devido a sua estrutura cristalina. Foi descoberta em 1838 pelo químico francês Anselme Payen, que a isolou de matéria vegetal e determinou sua fórmula química (CRAWFORD, 1981). Sua estrutura básica é demonstrada na Figura 5.

Figura 5 - Fórmula química da celulose

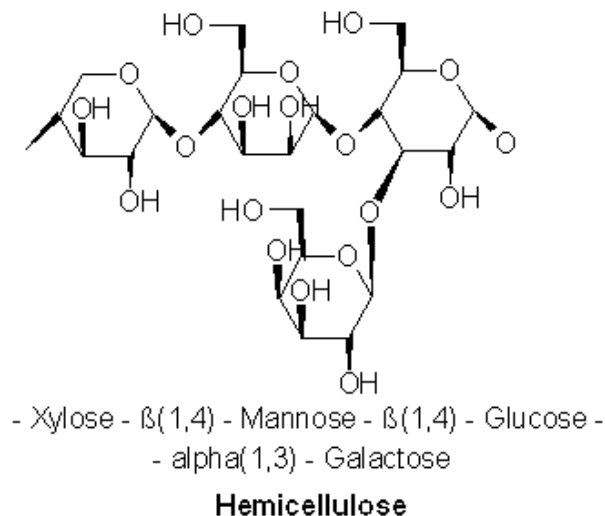


Fonte: <https://www.wikipedia.org/>

Sua cadeia é constituída por unidades de glicose, unidas por ligações glicosídicas β -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 (LOPES, 2017). A estrutura química da celulose não é completamente uniforme na sua extensão, possuindo regiões cristalinas e regiões amorfas. As regiões cristalinas são mantidas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, tornando a celulose muito resistente a tratamentos químicos e biológicos, enquanto que a parte amorfa é mais suscetível a tratamentos (SILVA, 2010; LORENCINI, 2013). As enzimas utilizadas no processo de hidrólise enzimática quebram as ligações glicosídicas β -1,4, liberando glicose que servirá de substrato para a *Sacharomyces cerevisiae* no processo de fermentação alcoólica (SANTOS, 2010).

2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose (Figura 6) é um heteropolissacarídeo com menor massa molecular se comparado com a celulose, e é constituído principalmente por pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose), e diferente da celulose, consiste em cadeias mais curtas de açúcares (GIBSON, 2013).

Figura 6 – Estrutura molecular da hemicelulose

Fonte: <https://www.wikipedia.org/>

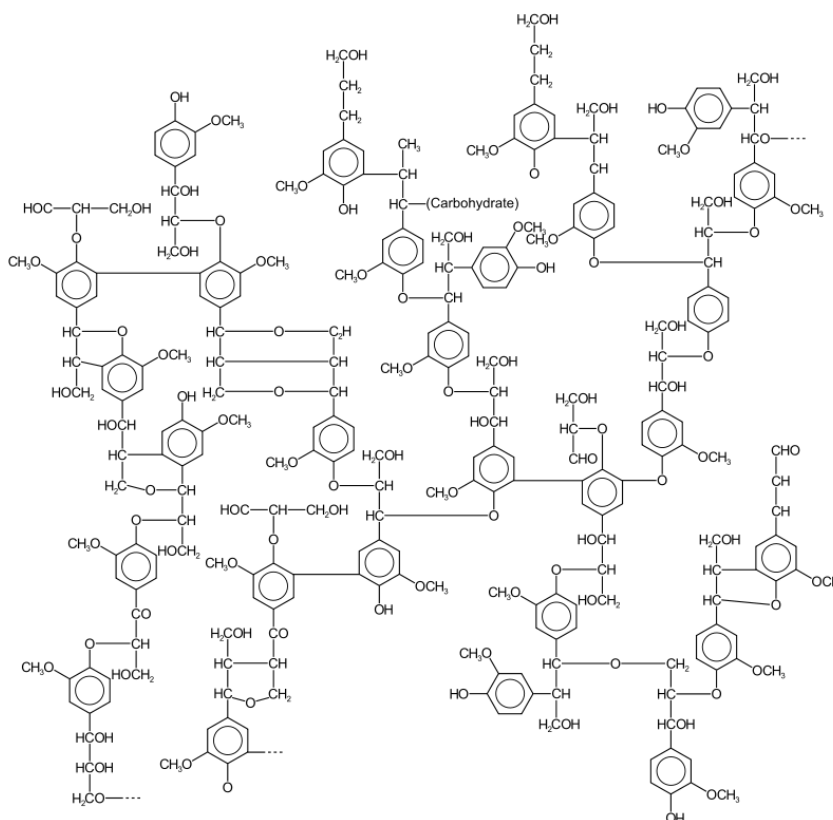
As hemiceluloses são classificadas com base nos resíduos de açúcar da cadeia principal da molécula, podendo ser xilanas, mananas, arabinoxilanas, arabinogalactanas e arabinana (SILVANIA, 2013). As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, e estão mais concentradas nas camadas primárias e secundárias, onde encontram-se fortemente associadas à celulose e a lignina (PANDEY, 2009). Atualmente são conhecidas várias leveduras capazes de converter xilose em etanol, como a *Candida succiphila*, *Candida jeffriesii*, *Candida intermedia*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipitis*, *Pichia tannophilus*, *Hansenula polymorpha*, *Debaryomyces hansenii*, *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae*, produzindo etanol com diferentes graus de rendimento (HÄHN-HÄGERDAL et al., 1994; TAVARES et al., 2000; GÁRDONYI et al., 2003; RYABOVA et al., 2003; STAMBUK et al., 2003; NGUYEN et al., 2006; JEFFRIES et al., 2007; CADETE et al., 2009).

2.2.3 Lignina

Do latim *lignum*, que significa madeira, a lignina (Figura 7) está presente na parede celular das plantas para dar suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e a oxidação (FENGEL; WEGENER, 1984; RAES et al., 2003; CABANÉ et al., 2004). É uma macromolécula tridimensional, amorfa e heterogênea, que reveste ou preenche

espaços entre os demais polissacarídeos (TAIZ & ZEIGER, 2009). Ela é responsável pela rigidez, proteção contra patógenos e pela baixa reatividade dos materiais lignocelulósicos (FONSECA, 2009). A lignina diminui a eficiência de produção do etanol celulósico, pois além de sua hidrofobicidade, ela dificulta o acesso das enzimas e ácidos aos substratos, podendo ainda promover a adsorção das celulasas durante o processo (JORGENSEN; OLSSON, 2006; SANTOS, 2010).

Figura 7 - Exemplo de uma possível estrutura molecular de lignina



Fonte: <https://www.wikipedia.org/>

A deslignificação de materiais lignocelulósicos é importante na obtenção de biocombustíveis usando bio-refinarias (CHARLTON et al., 2009; HAYES, 2013), para aumentar a digestibilidade dos alimentos de ruminantes (VAN KUJIK et al., 2015) e na fabricação de produtos de papel (YAGHOUBI et al., 2008). Para converter a biomassa vegetal para a produção de bioetanol ou para obter a celulose é necessário um tratamento prévio antes da hidrólise do polissacarídeo pois o mesmo permanece envolto pelas moléculas de lignina e hemicelulose.

Além de reduzir a recalcitrância da biomassa vegetal, o pré-tratamento deve minimizar a formação de produtos que possam interferir na etapa de hidrólise e posterior fermentação e também deve ser um processo com baixos custos operacionais (AGBOR et al., 2011).

2.3 Pré-tratamento biológico

A degradação da biomassa lignocelulósica na natureza acontece por ação de fungos e outros micro-organismos, que possuem aparato enzimático para degradar a lignina, a hemicelulose e polifenóis. O pré-tratamento feito por micro-organismos vem ganhando destaque como uma alternativa vantajosa em relação às técnicas convencionais devido a não especificidade química e ao baixo consumo de energia (MENON; RAO, 2012). Apesar da lignina resistir ao ataque da maioria dos micro-organismos, os fungos de podridão branca são capazes de degradar esse polímero de modo eficiente (WONG, 2009) pois eles produzem várias enzimas ligninolíticas extracelulares, como a lacase (Lac), manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP) (NAGAI et al., 2007).

Os basidiomicetos degradadores de madeira são tradicionalmente classificados em fungos da podridão branca, fungos da podridão parda e fungos da podridão mole (WAN; LI, 2012; CAMERON et al., 2000; SUHARA et al., 2012). Uma das diferenças entre esses grupos de fungos é a diversidade de enzimas lignocelulíticas que são produzidas. A principal diferença entre os fungos da podridão branca e os outros tipos é que este grupo consegue produzir uma matriz de peroxidases modificadoras da lignina juntamente com várias outras enzimas produtoras de H_2O_2 .

Os fungos de podridão branca, como o *Trametes versicolor*, *Ganoderma australe*, *Pleurotus* spp. e outros, podem degradar os polissacarídeos da madeira atacando diretamente a lignina e hemicelulose, causando fraturas na fibra, o que resulta em um material marrom correspondente a lignina oxidada (MARTINEZ, 2005; ABDEL-HAMID et al., 2011). Já os fungos de podridão parda, como o *Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, *Piptoporus betulinus*, entre outros, atacam preferencialmente a celulose, usando os radicais hidroxila altamente reativos resultantes da reação de Fenton (MAKELA et al., 2015) e hemicelulose, sendo a lignina pouco modificada (MARTINEZ, 2005).

2.4 Enzimas ligninolíticas

As enzimas são proteínas sintetizadas dentro da célula e secretadas para fora dela, tendo como função nos fungos a quebra de macromoléculas complexas em unidades menores (SINSABAUGHT, 1994), que serão absorvidas pela célula como fonte de carbono, nutrientes e energia (BURNS et al., 2013). As principais reações catalisadas pelas enzimas ligninolíticas ocorrem extracelularmente permitindo a despolimerização, desmetoxilação, descarboxilação, hidroxilação e a quebra de anéis aromáticos do substrato (HAMMAN, 2004; HORMIGA et al., 2008 *apud* LOPES, 2016). A literatura destaca as maiores famílias de enzimas produzidas por fungos ligninolíticos: manganês peroxidases (MnP) (E.C:1.11.1), lacases (Lac) (E.C:1.10.3.2) e lignina peroxidases (LiP) (E.C:1.11.1.14), sendo as duas últimas, as mais importantes do ponto de vista industrial (D'SOUZA et al., 2006). Elas são responsáveis pela oxidação da lignina e uma ampla gama de compostos análogos da lignina (WINQUIST et al., 2008).

Os primeiros modelos estruturais da lignina surgiram nos anos 70 (NIMZ, 1974; ADLER, 1977) e desde então novas estruturas foram descobertas através de técnicas analíticas (KARHUNEN et al., 1995; ZHANG et al., 2006; DEL RIO et al., 2007). Antes dessas descobertas, não existiam informações substanciais sobre a estrutura da lignina, o que impedia estudos relacionados a sua degradação por micro-organismos. Ligninas sintéticas foram utilizadas no ataque da lignina (ERIKSSON et al., 1990). Devido a complexidade dos primeiros modelos de lignina que surgiram e aos primeiros compostos identificados como responsáveis pela sua biodegradação, pesquisadores propuseram a existência de diferentes enzimas que atacavam diferentes subestruturas da lignina, resultando em diferentes subprodutos (CHEN; CHANG, 1985).

No entanto, trabalhos posteriores mostraram que os organismos ligninolíticos adotaram a estratégia oposta. Ao invés de várias enzimas catalisando as diferentes reações observadas anteriormente, esses fungos produziam enzimas inespecíficas que atacavam os anéis aromáticos da lignina, desestabilizando a molécula, quebrando várias ligações através da instabilidade dos radicais formados (KIRK; FARREL, 1987). Mais adiante foi possível demonstrar que apenas um grupo de enzimas dos fungos de podridão branca era capaz de atacar diretamente os compostos não fenólicos da lignina (MARTÍNES, 2002; HAMMEL; CULLEN, 2008). Faziam parte desse grupo as lignina peroxidases, inicialmente descrita em *Phanerochaete chrysosporium*, o primeiro

basidiomiceto com genes sequenciados devido ao interesse biológico na degradação da lignina (MARTÍNES et al., 2004), e as peroxidases versáteis encontradas em *Pleurotus* (MARTINES et al., 1994), capazes de oxidar Mn^{2+} , como a manganês peroxidase. O Mn^{3+} resultante da ação dessas peroxidases oxidam compostos fenólicos, mas na presença de lipídeos insaturados também podem oxidar compostos não fenólicos através da peroxidação de radicais (BAO et al., 1994). As lacases, outro grupo de enzimas, são conhecidas a muitos anos em plantas, fungos e insetos, cumprindo diferentes papéis incluindo a síntese de pigmentos, morfogênese e desintoxicação (MAYER; STAPLES, 2002). Estão envolvidas no processo de pigmentação de esporos de fungos, na regeneração de protoplastos do tabaco, na virulência de fungos e na lignificação das paredes celulares de vegetais e deslignificação durante o apodrecimento causado pelos fungos, e seu uso comercial é relacionado com deslignificação de materiais lignocelulósicos, produção de etanol, processos de biorremediação destinado ao tratamento de efluentes, entre outros (MAYERS; STAPLES, 2002).

Nos últimos anos o número de pesquisas relacionadas a essas enzimas tem aumentado devido ao grande interesse na área industrial e ambiental. A ampliação do conhecimento nessa área e o desenvolvimento de novas tecnologias são fundamentais para o barateamento dos custos, redução de resíduos e eficiência nos processos de biocatálise utilizando enzimas fúngicas.

2.4.1 Manganês peroxidase (MnP)

Descoberta em *Phanerochaete chrysosporium* em 1983, seu notável potencial de degradação a MnP tem sido estudado para atender as mais diversas aplicações biotecnológicas. Alguns trabalhos demonstram que a enzima MnP junto com a lacase pode ser utilizada para remediação de poluentes como a vinhaça (FERREIRA, 2009). Hirano et al. (2005) demonstrou que a manganês peroxidase produzida pelo fungo *Pleurotus ostreatus* conseguia degradar bisfenol A, composto químico prejudicial ao sistema endócrino. Diversos estudos têm sido realizados utilizando as MnPs de fungos de podridão branca para a biodegradação de 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).

Essa enzima requer o íon Mn^{2+} que é oxidado a Mn^{3+} , podendo oxidar e despolimerizar lignina, bem como outros xenobióticos recalcitrantes, como nitroaminotoluenos e tintas sintéticas (WESENBERG et al., 2003). O ciclo catalítico das MnPs é parecido com o das enzimas hemiperoxidasas e da LiP. De acordo com Abdel-Hamid (2013) a enzima manganês peroxidase é ativa pela oxidação do H_2O_2 formando o Composto I que é um radical complexo Fe^{4+} -oxo-porfirina. O íon Mn^{2+} doa um elétron para 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.

2.4.2 Lacases (LAC)

Na natureza, as lacases apresentam um papel multifuncional, sendo amplamente observadas em plantas superiores, alguns insetos, bactérias e fungos e estão envolvidas em várias funções fisiológicas, como a síntese da lignina em tecidos lenhosos (HATAKKA, 1994), a pigmentação em *Aspergillus nidulans* e *A. fumigatus*, a morfogênese em *Lentinula edodes* e, em *Cryptococcus neoformans*, lacases podem contribuir para a patogenicidade e resistência a fungicidas (MAYER; STAPLES, 2002). São enzimas oxidativas que possuem quatro átomos de cobre no sítio ativo (MAYER; STAPLES, 2002; WESEMBERG et al., 2003), capazes de oxidar compostos aromáticos sem a necessidade de peróxido de hidrogênio, como as peroxidases (DURÁN et al. 2002). A produção de água como subproduto torna a lacase uma das enzimas menos poluentes (MATE et al., 2010).

A lacase foi amplamente estudada nos últimos anos e seu uso na área de biorremediação tem demonstrado resultados eficientes. As pesquisas mostraram que alguns tipos de corante presentes em efluentes da indústria têxtil podem ser degradados usando lacase (CLAUS et al., 2002; PALMIERI et al., 2005; SAYAHI et al., 2016). Alguns trabalhos demonstram que hidrocarbonetos aromáticos policíclicos também podem ser degradados usando lacase (LOW et al., 2009). Estudos com lacases de *Trametes villosa* (FUKUDA et al. 2001), *Corioloropsis polyzona* (CABANA et al., 2007) *T. polyzona* (CHAIRIN et al., 2013), *T. versicolor*, *Polyporus*

pinisitus (KIN et al., 2008; MARGOT et al., 2013) e *Grifola frondosa* (NITHERANONT et al., 2011) dentre outros revelaram o potencial oxidativo das enzimas para degradação de bisfenol A, usado na fabricação de polímeros sintéticos incluindo resinas epóxi e policarbonatos (FLINT et al., 2012). Esse composto químico possui efeitos negativos no sistema endócrino pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) e é considerado um problema social e ambiental (MOHAPATRA et al., 2010).

2.4.3 Lignina peroxidases (LiP)

A LiP, considerada o oxidante mais eficaz capaz de catalisar a oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos, aminas aromáticas, éteres aromáticos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (BREEN; SINGLETON, 1999; MARTINEZ et al., 2009), é muito importante no processo de degradação natural da lignina, produzida por diversas espécies de fungos e bactérias (EOM; KIM, 2014). Foi descoberta no meio extracelular do fungo de podridão branca *P. chrysosporium* (KIRK; FARRELL, 1987) e foi a primeira enzima estudada quanto à capacidade em atacar compostos de lignina (TIEN; KIRK, 1984). A lignina peroxidase desse fungo se mostrou capaz de mineralizar uma variedade grande de compostos aromáticos recalcitrantes e oxidar compostos aromáticos policíclicos e compostos fenólicos (RYU et al., 2008).

É uma das enzimas fúngicas que possui maior potencial redox, atacando unidades não fenólicas da lignina através da produção de radicais intermediários (ABDELAZIZ et al., 2016). A LiP usa o poder oxidativo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para iniciar a degradação dos compostos, catalisando a oxidação através de mediadores. O mediador redox mais significativo é um metabólico secundário fúngico chamado álcool veratrílico (HARVEY et al., 1986; HAMMEL; MOEN, 1991; CANDEIAS; HARVEY, 1995; GOODWIN et al., 1995), um dos substratos redutores de maior preferência pela LiP, que é oxidado a veratraldeído (KIRK; FARREL, 1987).

A lignina peroxidase contém um grupo prostético heme e sua ação depende da presença de H_2O_2 , o qual oxida a enzima e o intermediário oxidado retira um elétron de núcleos aromáticos formando radicais aril, que se decompõem espontaneamente via reações de caráter iônico e radicalar. Porém, nem todos os fungos ligninolíticos a secretam, pelo menos, em determinadas condições de cultivo (RAGHUKUMAR et al., 1999; CAMELO et al., 1999;

D'SOUZA et al., 1999). Os primeiros estudos sobre produção de LiP em cultura líquida por *P. chrysosporium* mostraram que a produção da enzima poderia estar relacionada com a quantidade de carbono, nitrogênio e enxofre no meio de cultivo (KIRK et al., 1978). Esses estudos também mostraram que a agitação da cultura promovia melhor crescimento do fungo, mas diminuía o poder de degradação da lignina e também os níveis de atividade da LiP (KIRK et al., 1978; FAISON; KIRK, 1985; LEISOLA; FIECHTER, 1985), a menos que um surfactante fosse adicionado na formulação da cultura líquida (JAGER et al., 1985; ASTHER et al., 1987; MICHEL et al., 1990).

A produção e a abundância de LiP varia consideravelmente dependendo das condições de cultivo, conforme mostrado por Kirk e Farrell (1987). Algumas abordagens foram estudadas para promover a produção de enzimas, como a adição de Tween80, a otimização da composição do meio de cultivo através da manipulação das concentrações de nitrogênio e carbono, adição de álcool veratrílico, sais de manganês, ácidos orgânicos, fosfolipídios, dentre outros (KAPICH et al., 2004).

Depois da sua descoberta, o uso dessas enzimas na degradação da lignina foi amplamente estudado devido a sua importância ambiental e potenciais aplicações biotecnológicas (JANUSZ et al., 2013). Um dos principais exemplos tem sido na indústria têxtil, onde existe uma grande utilização de componentes químicos durante o processo de tingimento, o que resulta em efluentes altamente complexos e recalcitrantes. Alguns desses corantes são considerados carcinogênicos e/ou mutagênicos, e podem ser degradados pelas enzimas LiP e MnP (Kunz et al., 2002), como vem demonstrando diversos estudos na área de biorremediação de efluentes da indústria têxtil (CRIPPS et al., 1990; POINTING, 2001; ROBLES-HERNÁNDEZ et al., 2008; GOMES et al., 2009). Pesquisas mais recentes demonstraram que além da capacidade de degradação das tintas, ocorre também a diminuição da toxicidade dos efluentes industriais contendo corantes (SHAHEEN et al. 2017).

Além da capacidade de degradar corantes, a LiP também é eficiente na degradação de diclorodifeniltricloroetano (DDT), pesticida amplamente utilizado depois da Segunda Guerra Mundial, o explosivo trinitrotolueno (TNT) e também o policloreto de vinila (PVC) (KÖLLER et al., 2000; ABRAHAM et al., 2002; OHTSUBO et al., 2004; ROBLES-HERNÁNDEZ et al., 2008; GOMES et al., 2009; WEN et al., 2009; KHAN et al. 2017). Além das diversas aplicações industriais das enzimas fúngicas já mencionadas, as lignina peroxidases podem ser utilizadas

pela indústria papelreira no processo de branqueamento do papel (BAJPAI, 2004; SIGOILLOT et al. 2005), possuem potencial para produzir flavorizantes (LESAGE-MEESSEN et al., 1996; LOMASCOLO et al., 1999; ZORNET et al., 2003; BARBOSA et al., 2008), produtos cosméticos para a pele (BELINKY et al., 2005) e também no desenvolvimento de biossensores, na área de nanotecnologia (CHRISTENSON et al., 2004).

2.5 Consórcio fúngico

Consórcio microbiano, ou a mistura de vários tipos de organismos que agem cooperativamente, tem sido proposto como uma abordagem eficiente para a produção de antibióticos e vários tipos de comidas fermentadas, e para a bio-conversão de resíduos de destilaria e esgoto doméstico (WONGWILAIWALIN, 2010). Misturas de culturas fúngicas possuem muitas vantagens comparadas com monoculturas, incluindo a melhora na produtividade, adaptabilidade e utilização do substrato (DASHTBAN et al., 2009). A sinergia entre as enzimas ocorre quando a ação combinada de duas ou mais enzimas conduz a uma taxa de reação mais elevada do que a soma de suas ações individuais (MANSFIELD et al., 1999). A utilização de consórcios na deslignificação de materiais lignocelulósicos tem sido bastante estudada nas últimas décadas. Wang (2013) atingiu uma taxa de 60,9% de deslignificação em um consórcio composto por seis isolados bacterianos. A ação sinérgica das diferentes classes de enzimas envolvidas na degradação da celulose é essencial para a eficiência do processo de hidrólise.

Moléculas de tintas, por exemplo, podem ser atacadas por diferentes espécies de micro-organismos em diferentes posições, ou um metabólito secundário proveniente da primeira reação um organismo pode ser usado por outro em seu metabolismo. Ghanem et al. (2015) demonstrou que o consórcio dos fungos, *Alternaria alternata* e *Aspergillus ustus*, coletado em solo contaminado por diesel, na presença de elevadas doses de surfactante (Tween 80) e em condições otimizadas degradou diesel de maneira eficiente em apenas sete dias. Abraham (2014) mostrou ser possível a remoção de inseticidas, como o endosulfan, de solos contaminados com o uso de consórcio de bactérias e fungos. Efluentes da indústria têxtil são umas das principais fontes de contaminação de rios e lençóis freáticos. Junto com a tinta, esses dejetos também contêm metais pesados, sais e poluentes orgânicos. A alta diversidade desses poluentes

causa uma variedade de efeitos carcinogênicos, endócrinos e mutagênicos nos peixes e outros animais aquáticos em corpos d'água (ALI; SREEKRISHNAN, 2001; KARRASCH et al., 2006). Experimentos envolvendo consórcios de fungos de podridão branca mostraram ser possível a degradação desses efluentes tóxicos de maneira rápida e eficiente (MALAVIYA, 2007), transformando-os em compostos menos tóxicos.

2.6 Otimização do meio de cultura

O planejamento experimental é uma importante ferramenta para otimização das condições de cultivo. Consiste em um procedimento onde pequenas alterações nas variáveis de cultivo e processamento de um sistema são realizadas, podendo assim avaliar as alterações sofridas pela variável resposta, tendo como objetivo principal a redução do tempo do processo, redução do custo operacional e melhoria do rendimento. A medida que esses parâmetros são ajustados, é possível melhorar o desempenho da produção de determinados produtos, fabricá-los em menor tempo e melhorar o desempenho dos produtores (RODRIGUES, 2014). O planejamento experimental é amplamente utilizado, por exemplo, na indústria na otimização de formulações de alimentos (APICHARTSRANGKOON; LEDWARD, 2002), tintas (GUPTA, 2001), polímeros (WEN; CHEN, 2000), asfalto (ROBERTS et al., 2002), concreto (RIBEIRO; DE ALMEIDA, 2000) e vidro (PIEPEL; REDGATE, 1997). Experimentos empregando o planejamento experimental são muito mais satisfatórios que os métodos clássicos, que testam uma variável por vez, pois podem analisar simultaneamente muitas variáveis com um número baixo de observações (MONTGOMERY, 2001). De acordo com Oh et al. (1995) além de tempo e custo maior, os métodos clássicos podem levar a conclusões erradas.

Dentre os obstáculos nas pesquisas relacionadas a bioprocessos é possível incluir a falta de modelos matemáticos precisos para descrever determinado processo, erros estatísticos, interação entre as variáveis e reações bioquímicas complexas (GILMORE; LEE, 2003). A metodologia de superfície de resposta (RSM: response surface methodology) é um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas usadas para planejar experimentos, construir modelos, avaliar os efeitos dos diferentes parâmetros para otimizar processos (ANJUM et al., 1997; MYERS; MONTGOMERY, 1995). Atualmente é muito importante no planejamento, desenvolvimento e formulação de novos produtos, e também na melhoria de produtos e processos já existentes.

Graças ao desenvolvimento de softwares computacionais, essa metodologia é hoje usada com sucesso em muitas áreas da biotecnologia como a otimização de meios de cultivo (OOJIKAAAS et al., 1999), síntese de enzimas (ISMAIL et al. 1998), produção de ácido giberélico (ESCAMILLA et al., 2000), esterificação de ácido láctico (KIRAN et al., 1999), entre outros.

A eficiência dos processos e dos produtos são itens fundamentais para a sobrevivência no mercado competitivo e inovador das indústrias (PISANO, 1997). A indústria biotecnológica e as pesquisas acadêmicas criaram, nos últimos anos, uma enorme quantidade de conhecimento nas áreas de bioquímica e engenharia química. Desenhos experimentais estatísticos fornecem dados em uma linguagem universal acessível para pessoas de diferentes áreas, como engenheiros e cientistas por exemplo, que podem se comunicar melhor na hora de analisar os dados e desenvolver melhores processos e produtos (MYERS; MONTGOMERY, 2002). A otimização do meio de cultivo pelos métodos clássicos, que envolvem a variação de uma variável independente (e.g. nutriente, pH, temperatura) enquanto todos os outros parâmetros são fixados, demora muito tempo e são caros conforme o número de variáveis do sistema aumenta. O planejamento experimental estatístico visa diminuir os custos e tempo desses processos (KADINARAYANA et al., 2003). A otimização da produção de penicilina é um exemplo bem conhecido (SHULER; KARGI, 2002), pois apesar de ter sido descoberta em 1928 esta droga só foi vendida comercialmente após duas décadas, depois que os processos de produção foram otimizados.

O planejamento experimental ganhou mais destaque recentemente nas áreas de ciências biológicas devido ao surgimento de bioprocessos relacionados a biorremediação e biodegradação. A alta demanda e o alto custo das enzimas comerciais disponíveis impulsionam a pesquisa relacionada a descoberta e manipulação de micro-organismos para aumentar sua produtividade e para melhorar os processos que já existem (KHUSRO et al., 2016; KUMAR et al., 2016). Muitos estudos evidenciaram que a composição do meio de cultura pode melhorar consideravelmente a produção de enzimas fúngicas, como a LiP (MOREDO et al., 2003), com a suplementação de componentes estimulantes específicos como sais, compostos fenólicos e fontes nutricionais (ASINA et al. 2017).

A umidade e o tamanho da partícula de biomassa, aeração e o tempo de pré-tratamento, por exemplo, são críticos para o crescimento do fungo e seu metabolismo para atingir uma ótima performance. A estimulação do crescimento fúngico e síntese de enzimas pela adição de extrato

de levedura foi relatado para diferentes espécies de fungos de podridão branca (SANNIA et al., 1986; GARZILLO et al., 1992). Suplementação com indutores, como Mn^{2+} , H_2O_2 e compostos aromáticos, podem estimular a secreção de enzimas lignocelulósicas e a degradação de lignina da biomassa. A adição de nutrientes geralmente aumenta a formação de biomassa fúngica e também facilita a colonização do fungo nas áreas mais profundas da biomassa (MESSNER et al., 1998). A expressão de lignina peroxidase, por exemplo, pode ser afetada pelo tipo de fonte de nitrogênio e sua concentração (KAAL et al., 1993; Gold; ALIC, 1993; LI et al. 1994). Íons metálicos e mediadores, além de fontes adicionais de carbono e nitrogênio também podem ser utilizados como otimizadores na produção de LiP, conforme Batool et al. (2013) demonstrou em seus experimentos. Surfactantes, como o tween 80, também podem aumentar a biodisponibilidade de compostos com baixa solubilidade na água e assim aumentar a sua degradação (LIU, 1980; ARONSTEIN et al., 1991; ARONSTEIN, 1992; TIEHM, 1994; THIBAUT et al., 1996).

Tendo em vista a importância na otimização dos processos industriais, resultando em redução de matéria prima e de tempo envolvendo bioprocessos, o planejamento experimental se faz necessário e é um aliado na redução dos custos finais da produção de determinado produto.

3. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi aumentar a produção de lignina peroxidase a partir de desenho experimental visando a otimização do processo de produção enzimática e avaliar a capacidade de degradação da lignina pelo consórcio de fungos denominado C5 (*Tinctoporellus* sp., *Marasmiellus* sp. e *Aspergillus* sect. Flavi).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem dos fungos

Os isolados fúngicos foram coletados em diferentes localidades, sendo o G25 oriundo de solo de canavial, localizado na cidade de José Bonifácio, São Paulo, o 154 e o 155 de esponjas marinhas *Amphimedon viridis*, provenientes da costa norte de São Sebastião, estado de São Paulo. Todos os fungos utilizados neste 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.

4.2 Cultura e manutenção dos isolados

Os fungos foram cultivados em meio sólido malte ágar 2% (MEA), (7,0 g de extrato de malte, 5,25 g de ágar). As matrizes dos fungos 155 = LAMAI 84/ CRM 593, *Marasmiellus* sp., 154 = LAMAI 83/ CRM 592, *Tinctoporellus* sp., G25 = *Aspergillus* sect. *Flavi* foram repicadas, transferidas para placas separadas e incubadas por 7 dias a 28°C.

O consórcio fúngico utilizado para esse estudo foi previamente testado por Lopes (2016) através do teste de atividade inibitória para verificar a compatibilidade de crescimento entre os isolados. Foi verificado então a total capacidade de crescimento dos 3 fungos entre si. Além disso, este mesmo estudo constatou que o consórcio C5 teve o melhor desempenho de crescimento em bagaço de cana, produção de enzimas ligninolíticas e deslignificação dentre os outros consórcios testados.

4.3 Preparação do bagaço

O material lignocelulósico foi obtido por doação de um produtor de Minas Gerais (Pouso Alegre) que cultivava cana-de-açúcar, arroz e milho em uma mesma fazenda. 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 24 h. 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.

4.4 Biotratamento

O biotratamento foi realizado usando bagaço de cana anteriormente processado e destinado a etapa de fermentação semissólida. O estudo das condições de cultivo sobre o pré-tratamento biológico do bagaço de cana com o consórcio empregado, a fim de se obter as condições necessárias para uma eficiente produção de LiP e também de 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 do mar artificial (ASW: Artificial Seawater) (ANEXO 1). A partir dessa padronização é que foram adicionadas as quantidades das outras variáveis adotadas. Os diferentes ensaios foram submetidos a 7 dias de cultivo.

Parte I:

No primeiro estudo estatístico foram adotadas as seguintes variáveis independentes: fontes de C e N, pH, indutores enzimáticos e quantidades de inóculo fúngico, conforme matriz do planejamento apresentada na Tabela 1 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 1 - Níveis das variáveis estudadas no planejamento Plackett-Burman para deslignificação do bagaço de cana no PB1.

Variável	Nível inferior -1	Ponto central 0	Nível superior +1
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 ₄ (mM)	0	2,5	5
8. Tween 80 (%)	0	0,25	0,5
9. KH ₂ PO ₄ (g/L)	0	0,05	0,1
10. pH	5.0	6.0	7.0

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

Para a otimização da atividade enzimática da LiP, dez parâmetros foram empregados, dentre eles: cilindros de pré-inóculo (1 a 3), diferentes fontes orgânicas de nitrogênio (peptona e extrato de levedura), diferentes fontes de carbono (glicose e extrato de malte), Tween-80 (0 - 0,5%) e pH (5,0 - 7,0) além dos indutores de produção enzimática, o álcool veratrílico (mM) (0 - 0,4mM) e o KH₂PO₄ (g/mL) (0 - 2g/mL). Esses são fatores citados na literatura para a otimização da produção de ligninases (ALAM et al., 2009; LEVIN et al., 2002; KARP, 2014). 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 disponível em anexo (ANEXO 2) (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Para todos os PB desse trabalho foram acrescentados à matriz quatro ensaios no ponto central para a determinação do erro padrão durante a análise estatística dos resultados. A agitação e temperatura foram adotadas de um estudo prévio e fixados em 140 rpm e 28°C, respectivamente (LOPES, 2016).

Após a obtenção dos resultados gerados do primeiro planejamento do tipo PB (PB 1) foi realizado um segundo PB (PB 2) para avaliar 5 das mesmas variáveis, citadas na Tabela 2, totalizando 16 ensaios estruturados de acordo com a matriz PB12 em anexo (ANEXO 3) (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Na mesma sequência de experimentos, com os resultados

obtidos no PB 2, foi realizado um terceiro PB (PB 3) para avaliar 5 das mesmas variáveis citadas na Tabela 1, totalizando também 16 ensaios estruturados de acordo com a matriz PB12 em anexo (ANEXO 4) (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Parte II:

Ao final do PB 3 foi feito um último experimento para avaliar a capacidade de deslignificação e produção de ligninases utilizando somente o fungo *Marasmiellus sp.* (155) em 4 diferentes meios de cultivo, sendo eles:

Malte (MA2)	ASW + Malte (MA2)
Sem indutores	Sem indutores
Com indutores	Com indutores

O meio de cultivo ASW+Malte (condição salina) foi formulado diluindo extrato de malte (2%) ao meio ASW, cuja formulação é descrita no Anexo 1. Esses ensaios foram realizados a partir da melhor condição encontrada no PB3, onde somente a composição do meio líquido testado foi alterado. Os parâmetros fixados foram: 3 cilindros de inóculo, indutores CuSO_4 (250uL) e Tween 80 (3%). No total foram feitos 16 ensaios, onde 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 a montagem do experimento de acordo com cada condição previamente estipulada os Erlenmeyers foram identificados e incubados em shaker a 140 rpm, por 7 dias em temperatura fixa de 28°C. Ao final do biotratamento, o caldo enzimático bruto foi filtrado com o auxílio de um papel filtro para separar a parte sólida (bagaço), que foi armazenado a -20°C. O bagaço foi colocado em placas identificadas de acordo com cada amostra, e seco a 105°C por 24 horas.

4.5 Atividade enzimática

A partir do caldo enzimático extraído do processo de fermentação semissólida (140 rpm, 28 °C, 7 dias), foram realizados os ensaios para verificação da atividade enzimática de acordo com cada condição estipulada anteriormente para cada frasco. O caldo enzimático foi

centrifugado a 10.000 rpm, por 30 minutos a temperatura de 5°C. A partir do sobrenadante foram avaliadas as atividades das enzimas lignina peroxidase (EC: 1.11.1.14) (LiP), manganês peroxidase (EC: 1.11.1.13) e lacase (EC: 1.10.3.2).

- a) **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 foi 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 extrato 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 minutos de reação (ARORA; GILL, 2001).
- b) **Manganês Peroxidase:** A atividade da enzima manganês peroxidase foi quantificada pelo método modificado de Wariishi et al. (1992) com a adição de 50 μL de H_2O_2 (2 mM) em 0,8 mL de tampão malonato de sódio (60 mM; pH 4,5), 50 μL de MnSO_4 (10 mM), e 0,1 mL de extrato enzimático. A formação do complexo Mn^{+3} -malonato foi acompanhada a 270 nm ($\epsilon = 11590\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) após 5 min de reação.
- c) **Lacase:** A atividade enzimática de lacase foi determinada por espectrofotômetro pela oxidação do 2,2-azino-bis-etilbenthiiazolina (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 absorbância a 420 nm, após 10 minutos de incubação a 37°C.

Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato por minuto. A atividade enzimática é expressa em U/L do caldo enzimático e os cálculos realizados a partir da Equação 1, derivada da Lei de Lambert-Beer.

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

Onde,

ΔA diferença entre a absorbância final e inicial

V	volume da reação (0,001 L em todos os casos)
10⁶	converte os mols do ϵ para μmols
ϵ	coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
R	quantidade de caldo enzimático (L)
t	tempo de reação (min)

4.6 Caracterização do bagaço

Os substratos lignocelulósicos, na condição antes e após o biotratamento 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 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:

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

Onde, LR significa a eficiência da lignina removida, L_O é a quantidade de massa lignina na amostra original do substrato e L_T 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 nominado de Seletividade, onde adotou-se a razão:

$$\text{Seletividade} = \frac{\% Cf}{\% Lf}$$

Onde, C_f significa a porcentagem final de celulose contida na biomassa após o tratamento biológico, e L_f é a porcentagem final de lignina contida na biomassa após o tratamento biológico.

4.7 Análise dos resultados

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram feitos em trélicas e para a análise dos dados utilizou-se o Excel e o programa Statistica (8).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (PB) foi empregado para avaliar a influência de 10 variáveis (Tabela 1) no aumento da produção de LiP e na degradação da lignina. O principal parâmetro adotado para avaliação do processo de otimização foi o aumento na porcentagem de deslignificação do bagaço de cana. Após a incubação dos ensaios por 7 dias foi realizada a análise da atividade enzimática e da composição química do bagaço de cana de cada réplica dos ensaios. Os resultados do balanço de massa do bagaço de cana *in natura* nos planejamentos experimentais foram quantificados de acordo com Sluiter et al. (2008) (PB1: 86,02%, PB2: 70,05%, PB3: 84,65% e 80,31% no último experimento). No entanto, o valor da porcentagem de lignina encontrada no bagaço de cana *in natura* no PB2 estava abaixo do que normalmente é encontrado na literatura, e em razão disso, uma análise comparativa das relações entre celulose/lignina e xilose/lignina (seletividade) foi aplicada em todo o trabalho.

De acordo com os resultados das análises do primeiro PB, os ensaios que apresentaram maior deslignificação foram o 17 (36,83%), composto por 2 cilindros de inóculo, glicose (0,25g/50 mL), extrato de malte (0,5 g/mL), peptona (0,05 g/mL), extrato de levedura (0,05 g/mL), álcool veratrílico (10µL), CuSO₄ (125µL), Tween 80 (0,25%), KH₂PO₄ (0,05g) e pH 6.0, e o ensaio 9 (33, 61%) , composto por 3 cilindros de inóculo, glicose (0,50 g/mL), peptona (0,1g/50 mL), álcool veratrílico (20µL), CuSO₄ (250µL), Tween 80 (0,50%), KH₂PO₄ (0,1g) e pH 5.0.

Nos resultados de seletividade de celulose/lignina e xilana/lignina foram observados dois maiores valores referentes aos ensaios 9 e 17, em relação ao valor do controle *in natura*, conforme demonstrado na Tabela 2. Após o biotratamento o ensaio 9 apresentou valores de 2,57% de C/L e 1,37% para X/L, em concordância com os valores encontrados para deslignificação. No ensaio 17 também foram observados valores altos para celulose/lignina (1,81%) e para xilose/lignina (1,62%).

Tabela 2 - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do PB1.

Ensaio	% Lignina	% Celulose	% Xilana	% Deslignificação	Seletividade (C/L)	Seletividade (X/L)
<i>In natura</i>	23,50±2,4	37,30±0,49	25,22±0	-	1,59	1,07
1	20,13	34,10	17,78	14,32	1,69	0,88
2	16,06	32,05	13,53	31,63	1,99	0,84
3	19,22	36,28	15,73	18,20	1,89	0,82
4	21,41	38,55	14,86	8,88	1,80	0,69
5	21,04	35,32	20,86	10,44	1,68	0,99
6	22,78	34,04	16,33	3,02	1,49	0,72
7	18,76	36,13	14,74	20,14	1,93	0,79
8	18,74	36,19	15,45	20,23	1,93	0,82
9 ^a	15,60	40,02	21,35	33,61	2,57	1,37
10	21,07	30,70	18,09	10,30	1,46	0,86
11	24,60	33,85	19,76	0	1,38	0,80
12	24,66	31,99	25,44	0	1,30	1,03
13	22,63	38,82	11,20	3,68	1,72	0,49
14	21,80	32,78	17,83	7,23	1,50	0,82
15	17,87	31,56	15,09	23,92	1,77	0,84
16	22,95	22,65	13,66	2,31	0,99	0,60
17 ^{c a}	14,84	26,80	24,12	36,83	1,81	1,62
18 ^c	24,12	37,38	14,79	0	1,55	0,61
19 ^c	17,86	32,26	8,14	23,97	1,81	0,46
20 ^c	20,47	35,44	23,12	12,86	1,73	1,13

a = melhores valores obtidos; c = pontos centrais.

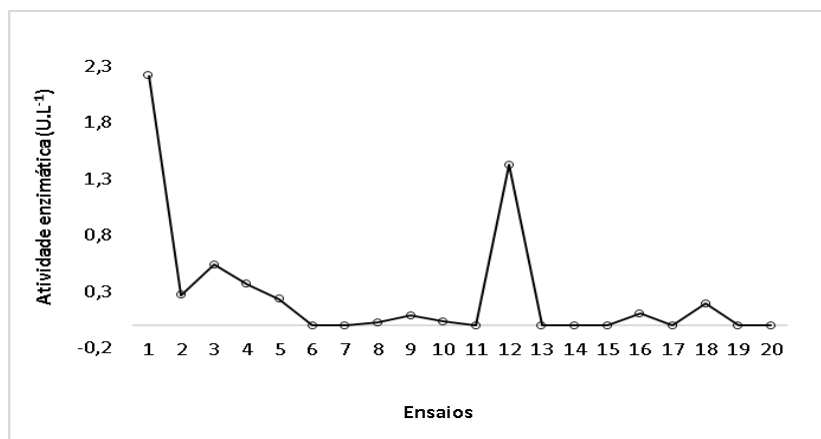
As análises estatísticas do PB1 mostraram que as variáveis que tiveram um efeito negativo na otimização do meio de cultura foram: extrato de malte, peptona, extrato de levedura e KH_2PO_4 , como mostra a Tabela 3. Nenhuma variável foi estatisticamente significativa na deslignificação do bagaço de cana ($p\text{-valor} \leq 0,1$), e o desvio padrão calculado para os ensaios dos pontos centrais do PB1 foi de 3,9. Apesar disso, por apresentarem resultados positivos na deslignificação durante o primeiro PB, as variáveis glicose, álcool veratrílico, CuSO_4 e Tween 80 foram utilizadas na estruturação do PB2. O sulfato de cobre é conhecido por apresentar efeito positivo para a produção de enzimas ligninolíticas (MAKELA et al., 2013, SHANKAR, 2012), como por exemplo indutor na produção de LiP (ALAM et al., 2009).

Tabela 3 – Análise estatística do PB1.

	Efeito	p-valor
Variáveis	13,83374	0,000021
1. Inóculo	1,31154	0,741269
2. Glicose	2,99301	0,457030
3. Extrato de malte	-3,89427	0,338368
4. Peptona	-4,95695	0,230194
5. Extrato de levedura	-2,92575	0,466894
6. Álcool Veratrílico	5,07802	0,219910
7. CuSO ₄	4,04224	0,321294
8. Tween 80	6,24832	0,139181
9. KH ₂ PO ₄	-2,06484	0,604870
10. pH	-4,97041	0,229032

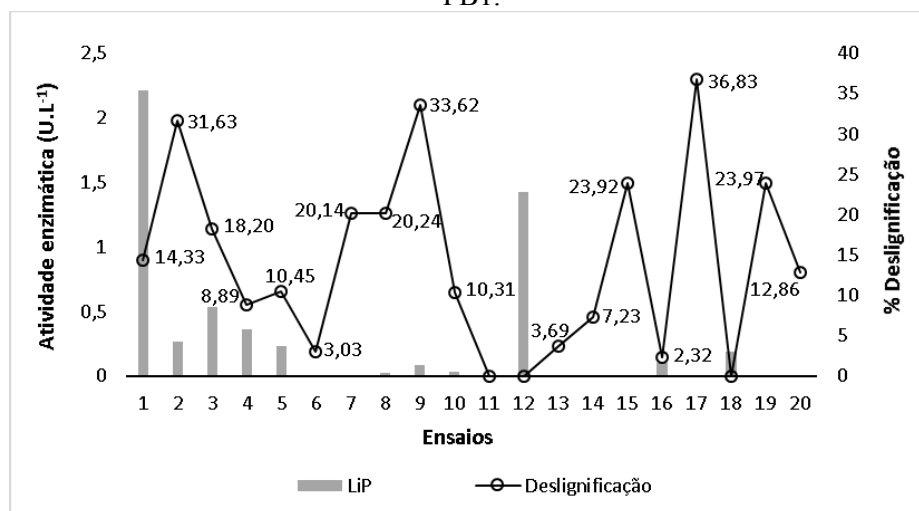
Em relação ao comportamento da produção de lignina peroxidase durante o primeiro desenho experimental, pode-se concluir que os ensaios 1 (2,21 U.L⁻¹) e 12 (1,42 U.L⁻¹) apresentaram maiores picos de atividade enzimática ainda que estes valores não sejam expressivos. O ensaio 1 foi composto de 3 cilindros de inóculo, extrato de levedura (0,1g/50mL), Tween 80 (0,5%), KH₂PO₄ (0,1g) e pH 5.0. O ensaio 12 foi composto de glicose (0,5g/50mL), peptona (0,1g/50mL), extrato de levedura (0,1g/50mL), Tween 80 (0,5%), KH₂PO₄ (0,1g) e pH 7.0. O terceiro melhor ensaio, para a produção de LiP, foi o ensaio 3, apresentando um valor de 0,53 U.L⁻¹. O restante dos ensaios apresentou baixa atividade enzimática, com valores inferiores a 0,3 U.L⁻¹, conforme apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Atividade enzimática no PB 1 (dados equivalentes a amostras em triplicata).



Conforme citado anteriormente, os ensaios que apresentaram maior taxa de deslignificação foram o 9 e o 17, apresentando 33,61% e 36,83% respectivamente, enquanto que os ensaios contendo maior atividade da LiP foram o 1 (2,21 U.L⁻¹) e o 12 (1,42 U.L⁻¹). Sendo assim, para esse desenho experimental não foi observado uma relação direta entre a produção de lignina peroxidase e a taxa de deslignificação, conforme demonstrado na Figura 9.

Figura 9 - Resposta da deslignificação e atividade enzimática da LiP no PB1.



Com base nos resultados encontrados do PB1, levando em consideração as variáveis com efeito positivo na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar, foi estruturado o PB2, contendo 5 variáveis, totalizando 16 ensaios montados de acordo com a matriz PB12 (ANEXO 2). No

segundo PB foram fixadas as seguintes variáveis: número de cilindros (3), peptona (0,1g/50ml) e KH_2PO_4 (0,1g). Por não estarem presentes nos ensaios com melhor resultado de deslignificação, as variáveis "extrato de levedura" e "extrato de malte" foram removidas no PB2. As variáveis utilizadas no 2º PB e suas respectivas alterações em suas concentrações estão representadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Níveis das variáveis estudadas no planejamento Plackett-Burman para deslignificação do bagaço de cana no 2º PB.

Variável	Nível inferior	Ponto central	Nível superior
	-1	0	+1
1. Glicose (g/L)	5	10	20
2. Álcool Veratrílico (μL)	10	20	30
3. CuSO_4 (mM)	2,5	5	7,5
4. Tween 80 (%)	0,25	0,5	0,75
5. pH	5.0	6.0	7.0

Os resultados do segundo PB mostraram que os ensaios com maior porcentagem de deslignificação ocorreram na condição 2 (38,58%), composto por: glicose (1g/50mL), álcool veratrílico (10 μL), CuSO_4 (350 μL), Tween 80 (125 μL) e pH 5.0, e na condição 3 (30,57%), composto por glicose (1g/50mL), álcool veratrílico (30 μL), CuSO_4 (125 μL), Tween 80 (375 μL) e pH 5.0. Os quatro pontos centrais do PB2 apresentaram desvio padrão de 2,54 dando credibilidade aos resultados obtidos. Apesar de altos, os maiores valores de seletividade não coincidiram com os maiores valores para deslignificação (Tabela 5), porém os ensaios 2 e 3 apresentaram valores de seletividade (celulose/lignina) maiores que os valores obtidos no bagaço de cana *in natura* (1,97 e 2,09), conforme demonstrado na Tabela 5.

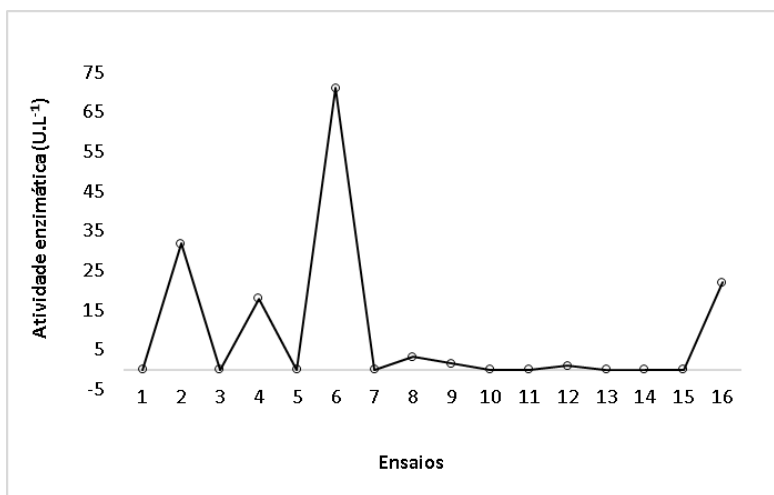
Tabela 5 - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do PB2.

Ensaio	% Lignina	% Celulose	% Xilana	% Deslignificação	Seletividade e	Seletividade (X/L)
<i>In natura</i>	18,59 ±4	34,56± 0,39	16,90 ±0,58	-	1,86	0,91
1	14,24	29,28	15,07	23,33	2,06	1,06
2^a	11,41	22,46	9,56	38,58	1,97	0,84
3^a	12,90	26,91	8,52	30,57	2,09	0,66
4	27,70	31,04	22,65	-	1,12	0,82
5	18,07	29,70	13,84	2,70	1,64	0,77
6	19,58	32,76	11,89	-	1,67	0,61
7	14,42	31,17	12,56	22,37	2,16	0,87
8	21,35	33,81	5,87	-	1,58	0,27
9	20,47	35,11	13,19	-	1,71	0,64
10	23,76	34,48	14,99	-	1,45	0,63
11	18,97	34,63	16,44	-	1,82	0,87
12	17,42	33,50	9,14	6,23	1,92	0,52
13^c	17,51	31,28	13,91	5,75	1,79	0,79
14^c	18,34	38,19	5,22	1,26	2,08	0,28
15^c	18,95	35,51	20,45	-	1,87	1,08
16^c	13,32	20,90	10,66	28,29	1,57	0,80

^a = melhores valores obtidos; ^c = pontos centrais.

Os ensaios que apresentaram maior atividade de lignina peroxidase no segundo planejamento experimental foram os ensaios 6 (71,11 U.L⁻¹) e 2 (31,79 U.L⁻¹), apresentados na Figura 10. O ensaio 2 foi composto de: glicose (1g/50ml), álcool veratrílico (30uL), CuSO₄ (125uL), Tween 80 (375uL), pH 5.0, peptona (0,1g/50ml), KH₂PO₄ (0,1g) e 3 cilindros de inóculo. O ensaio 6 foi o ensaio com maior produção de LiP presente nesse trabalho em todos os planejamentos experimentais, e foi composto de: glicose (1g/50ml), álcool veratrílico (30uL), CuSO₄ (350uL), Tween 80 (125uL), pH 7.0, peptona (0,1g/50ml), KH₂PO₄ (0,1g) e 3 cilindros de inóculo. O CuSO₄ apresentou efeito positivo na produção de enzimas ligninolíticas em outros trabalhos reportados em literatura (MAKELA et al., 2013, SHANKAR, 2012.), o que pode ter explicado o resultado expressivo de LiP no ensaio 6.

Figura 10 - Atividade enzimática no PB 2 (dados equivalentes a amostras em triplicata).



No PB2 nenhuma variável mostrou efeito estatisticamente significativo na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar, como mostra a Tabela 6. De acordo com os dados estatísticos, as variáveis 2 (álcool veratrílico) e 5 (pH) apresentaram efeito negativo na produção de LiP. Em relação a produção de lignina peroxidase, apenas a variável 1 (glicose) apresentou efeito estatisticamente significativo.

Tabela 6 – Análise estatística do PB2.

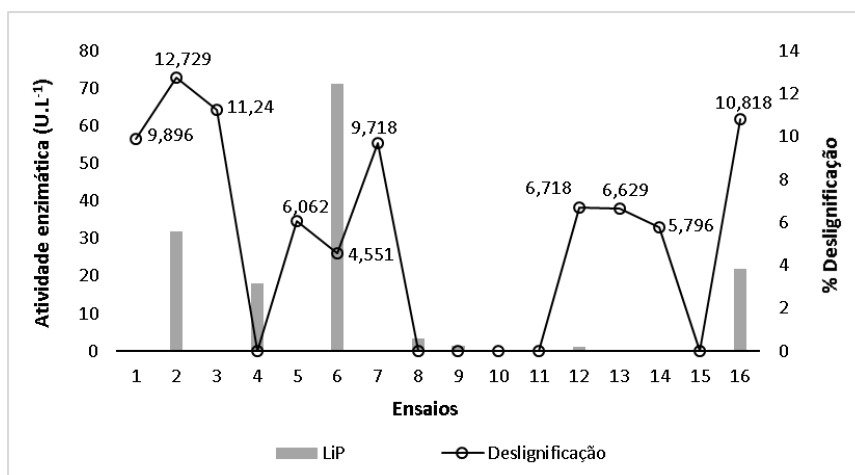
	% Deslignificação		LiP	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
Variáveis	9,77238	0,021252	0,531750	0,044387
1. Glicose	0,91037	0,914541	1,034167	0,081695 ^a
2. Álcool veratrílico	10,69414	0,225131	-0,16216	0,767733
3. CuSO4	4,81195	0,573623	0,618167	0,274202
4. Tween 80	0,59024	0,944521	0,635167	0,262014
5. pH	-9,45364	0,279709	-0,48716	0,383362

^a indica a variável de efeito significativo a $p < 0,1$.

As porcentagens de deslignificação mais expressivas foram correspondentes aos ensaios 2, 3 e 16, apresentando taxas de deslignificação de 38,58%, 30,57% e 28,29% respectivamente.

No PB2 não foi observado uma relação entre a produção de lignina peroxidase e a deslignificação após o biotratamento, conforme demonstra a Figura 11.

Figura 11 - Resposta da deslignificação e atividade enzimática da Lip no PB2.



A partir dos resultados obtidos no segundo PB, foi estruturado o PB3 contendo as mesmas variáveis do planejamento experimental anterior, sendo elas: glicose, álcool veratrílico, CuSO₄, tween80 e pH, conforme demonstrado na tabela 7. As variáveis álcool veratrílico, CuSO₄ e Tween 80 sofreram reajustes nas suas concentrações em relação ao PB3, e as variáveis fixadas foram: 3 cilindros, peptona (0,1g/50ml) e KH₂PO₄ (0,1g).

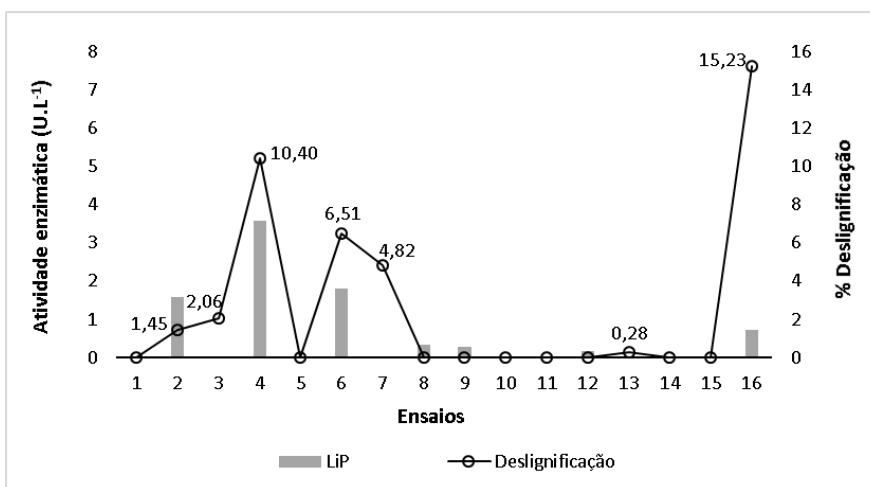
Tabela 7 - Níveis das variáveis estudadas no planejamento Plackett-Burman para deslignificação do bagaço de cana no 3º PB.

Variáveis	Nível inferior -1	Ponto central 0	Nível superior +1
1. Glicose (g/L)	20	30	40
2. Álcool Veratrílico (µL)	0	30	60
3. CuSO ₄ (mM)	0	2,5	5
4. Tween 80 (%)	1	2	3
5. pH	5.0	6.0	7.0

De acordo com as análises dos resultados do PB3, as condições que apresentaram maiores taxas de deslignificação ocorreram no ensaio 16 (15,22%), contendo glicose (1,5g/mL), álcool veratrílico (30uL), CuSO₄ (125uL), Tween 80 (2%), pH 6.0, peptona (0,1g/50mL), KH₂PO₄ (0,1g) e 3 cilindros, e no ensaio 4 (10,39%), contendo glicose (1g/50mL), CuSO₄ (250uL), Tween 80 (3%), pH 7.0, além das variáveis fixadas. Em relação a produção de LiP, o melhor resultado ocorreu no ensaio 4 (composição mencionada acima), com 3,58 U.L⁻¹ e no ensaio 6, com 1,81 U.L⁻¹, contendo glicose (1g/50mL), CuSO₄ (250uL), Tween 80 (3%) e pH 5.0, conforme mostra a Figura 12.

Apesar de não terem sido valores expressivos de atividade enzimática, tais como os encontrados em literatura, neste desenho experimental a atividade de LiP do ensaio 4 foi correspondente a um dos maiores valores de deslignificação do bagaço de cana, sugerindo que esta enzima pode ter dado início ao processo de oxidação/redução da parede celular vegetal do bagaço. Além disso, outras enzimas (oxidases e radical de cobre, celobiose, aril-álcool desidrogenases, glucose-metanol-colina oxidoreductases e quinona redutases) que também fazem parte do complexo sistema de quebra da molécula de lignina e que não foram estudadas neste trabalho, podem ter atuado durante o período de incubação e contribuído com o resultado alcançado. Além das enzimas citadas, alguns fungos podem produzir hidroxilas reativas pelo processo químico de oxidação de Fenton, o que proporciona a esses radicais a capacidade de oxidar compostos presentes na cadeia da lignina. Isso torna a lignina mais acessível a degradação por outras enzimas (ARANTES et al., 2011; ABDELAZIZ et al., 2016).

Figura 12 - Resposta da deslignificação e atividade enzimática da Lip no PB3.



Os resultados de seletividade para celulose/lignina foram maiores nas condições dos ensaios 16 e 4 do que a seletividade do bagaço de cana *in natura*, como mostra a tabela 8, o que confirma os dados obtidos para deslignificação. Foram observados valores altos para a seletividade de xilana/lignina nos ensaios 16 e 4, porém valores altos também foram obtidos nos ensaios 9 e 12. O desvio padrão dos ensaios dos pontos centrais do PB3 foi de 2,1.

Tabela 8 - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do PB3.

Ensaio	% Lignina	% Celulose	% Xilana	% Deslignificação	Seletividade (C/L)	Seletividade (X/L)
<i>In natura</i>	23,71 ±7	38,33± 0,61	22.61 ± 0,37	-	1,62	0,95
1	26,11	37,01	13,20	0	1,42	0,51
2	23,36	26,33	15,82	1,44	1,13	0,68
3	23,22	30,07	14,36	2,05	1,29	0,62
4 ^a	21,24	34,92	18,32	10,398	1,64	0,86
5	24,36	36,14	15,45	0	1,48	0,63
6	22,16	30,77	12,63	6,50	1,39	0,57
7	22,56	31,10	11,35	4,82	1,38	0,50
8	25,03	35,90	15,33	0	1,43	0,61
9	24,76	37,82	21,45	0	1,53	0,87
10	25,51	33,74	19,77	0	1,32	0,77
11	25,05	33,19	11,32	0	1,32	0,45
12	26,58	40,05	23,12	0	1,51	0,87
13 ^c	23,64	31,23	8,37	0,27	1,32	0,35
14 ^c	24,60	34,16	13,54	0	1,39	0,55
15 ^c	24,44	33,11	17,39	0	1,35	0,71
16 ^{c a}	20,10	34,78	16,09	15,22	1,73	0,80

^a = melhores valores obtidos; ^c = pontos centrais.

No PB3 nenhuma das variáveis se mostrou estatisticamente significativa na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar, conforme mostra a Tabela 9. Em relação a produção de LiP, a variável 1 (glicose) apresentou efeito estatisticamente significativo, enquanto que a variável 2 (álcool veratrílico) apresentou efeito negativo.

Tabela 9 – Análise estatística do PB3.

Variáveis	% Deslignificação		LiP	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
Variáveis	2,54610	0,065776	0,532051	0,044350
1. Glicose	1,91277	0,516856	1,034188	0,081783 ^a
2. Álcool veratrílico	0,73965	0,800271	-0,162393	0,767499
3. CuSO4	3,72323	0,220174	0,618234	0,274313
4. Tween 80	1,35042	0,645419	0,635328	0,262060
5. pH	-1,35042	0,645419	-0,487179	0,383512

^a indica a variável de efeito significativo a p<0,1.

Com o objetivo de estudar a influência da água do mar associada a indutores de produção de enzimas em um cultivo específico, um último experimento foi montado utilizando 4 diferentes meios de cultivo aplicando somente o fungo marinho *Marasmiellus* sp. (155). A intenção desse experimento teste foi avaliar o desempenho desse isolado marinho na produção de enzimas do complexo ligninolítico (LiP, MnP e lacase) para atuar sobre a quebra/diminuição da quantidade de lignina (deslignificação) presente na parede celular do bagaço de cana. Neste experimento, somente a composição do meio líquido testado foi alterado. Usando como base os resultados do terceiro PB, alguns parâmetros continuaram fixos tais como: 3 cilindros de inóculo, os indutores CuSO_4 (250uL) e Tween 80 (3%).

O meio contendo água do mar artificial e malte sem indutores, identificado como ASW, apresentou maior porcentagem de deslignificação 48% (Tabela 10), seguido pelo meio contendo água do mar artificial e malte com indutores CuSO_4 (250uL) e Tween80 (3%) (ASW+), apresentando um valor de 38%, (Tabela 10 e Figura 15). Os basidiomicetos de ambientes marinhos, como o *Marasmiellus* sp. (155), combinam a habilidade de sobreviver em ambientes aquosos salinos com o repertório enzimático necessário para degradar compostos recalcitrantes, fator este que pode explicar a alta taxa de deslignificação pelo *Marasmiellus* sp. (155) nos ensaios contendo água do mar artificial.

Os resultados de seletividade (celulose/lignina) foram maiores nos ensaios ASW e ASW+, apresentando valores superiores ao da lignina *in natura*.

Tabela 10 - Resultados de deslignificação e de seletividade (relação de celulose/lignina e xilana/lignina) em todos os ensaios do último experimento.

Ensaio	% Lignina	% Celulose	% Xilana	% Deslignificaçã	Seletividade	Seletividade
<i>In natura</i>	24,37 ± 0,8	35,33 ± 0,34	20,61 ± 0,42	-	1,45	0,84
MA2	20,3	33,49	8,06	16,7	1,65	0,39
MA2+	19,9	28,31	5,62	18,3	1,42	0,28
ASW	12,67	22,13	3,19	48	1,74	0,25
ASW+	14,93	25,84	6,2	38	1,73	0,41

Fungos de origem marinha, como o *Marasmiellus* sp. (155), são originalmente adaptados a meios contendo alta salinidade. Dessa maneira, a atividade ligninolítica em condições salinas pode ser considerada uma estratégia valiosa, ressaltando a importância das

pesquisas realizadas com fungos marinhos e seu potencial biotecnológico (BONUGLI-SANTOS et al., 2011). O isolado 155 demonstrou habilidade para deslignificar o bagaço de cana quando cultivado de forma isolada, apresentando altas porcentagens de deslignificação no experimento utilizando água do mar artificial. Apesar do teste de inibição realizado por Lopes (2016) indicar compatibilidade no crescimento dos fungos do consórcio utilizado nos experimentos anteriores, eles podem ter competido pelos nutrientes do meio de cultivo, o que pode ter influenciado na produção de enzimas e favorecido a deslignificação pelo fungo *Marasmiellus* sp. (155).

A produção de LiP teve o melhor resultado observado no ensaio ASW+, apresentando valor de $0,49 \text{ U.L}^{-1}$ e no ensaio MA2+, apresentando $0,46 \text{ U.L}^{-1}$. Em experimentos conduzidos por Lopes (2016), foi detectado maior presença de LiP nos ensaios usando o fungo *Marasmiellus* sp. (155) em meios de cultivo contendo sulfato de cobre. A produção de MnP foi detectada apenas no ensaio MA2, apresentando um valor de $0,29 \text{ U.L}^{-1}$, conforme mostra a Figura 14. Não foi possível identificar atividade enzimática para lacase.

Figura 13 - Atividade enzimática no 4 experimento (dados equivalentes a amostras em triplicata).

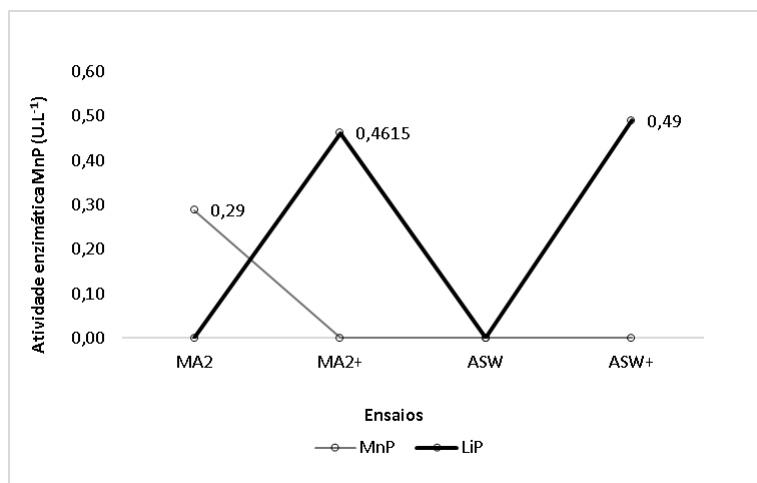
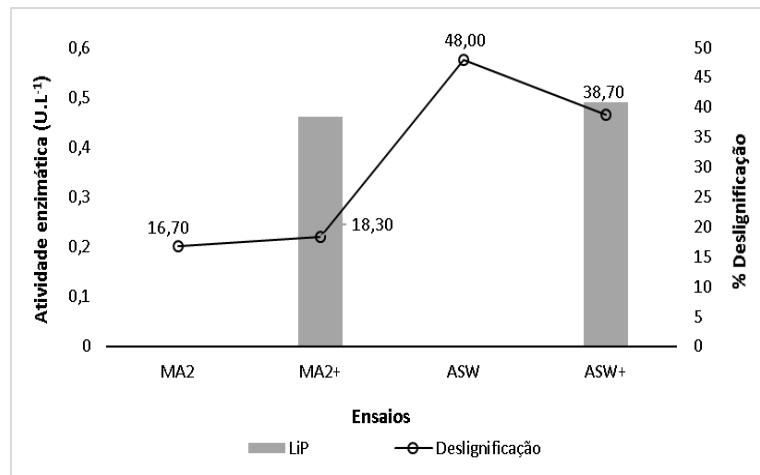


Figura 14 – Resposta da deslignificação e atividade enzimática da LiP no experimento final.



6. CONCLUSÕES

Dada a importância das ligninases na degradação de compostos recalcitrantes, como o bagaço de cana-de-açúcar, torna-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas de produção dessas enzimas e aprimoramento das técnicas já existentes. No presente estudo, o planejamento experimental do tipo Plackett-Burnman (PB) foi utilizado para investigar o efeito das variáveis no meio de cultivo e avaliar a porcentagem de deslignificação do bagaço após o processo de biotratamento.

A atividade da LiP mais expressiva foi de 71,11 U.L⁻¹ e ocorreu no ensaio 6 do segundo PB. A maior porcentagem de deslignificação deste trabalho ocorreu no ensaio ASW durante o último experimento, formulado com água do mar artificial e extrato de malte, onde foi utilizado apenas o fungo *Marasmiellus* sp. (155), e teve como resultado um valor de deslignificação de 48%. Neste trabalho não foi possível estabelecer uma correlação entre a deslignificação e a produção de LiP durante os experimentos. Com exceção do PB3, os picos de atividade enzimática da lignina peroxidase não coincidiram com as maiores taxas de deslignificação.

Levando em consideração alguns dados positivos obtidos neste trabalho, o planejamento experimental demonstrou potencial na otimização da produção de enzimas ligninolíticas e na deslignificação de materiais lignocelulósicos pelo consórcio fúngico, além de evidenciar a habilidade de fungos marinhos como o *Marasmiellus* sp. (155) na degradação de materiais compostos por lignina em meios aquosos salinos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ABDEL-HAMID, A. M., SOLBAITI, J. O., & CANN, I. K. O. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. **Advanced in Applied Microbiology**. Ed. by Sariaslani, S. & Gadd, G. M. Vol. 82, pp. 128, 2013.

ABRAHAM J, L; SILAMBARASAN, S. Biomineralization and formulation of endosulfan degrading bacterial and fungal consortiums. **Biochemistry and Physiology**. 2014

ADINARAYANA, K.; ELLAIAH, P.; SRINIVASULU, B.; DEVI, R.; ADINARAYANA, G. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinusensis* under solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1565-1572. 2003

ADLER, E. Lignin chemistry - past, present and future. **Wood science and Technology**. Volume 11, 69-218. 1977

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, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 118p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ, Paraná, 2010.

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.

ALONSO PIPPO, W.; LUENGO, C.A.; ALONSOAMADOR MORALES ALBERTERIS, L.; GARZONE, P.; CORNACCHIA, G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 2: Socio-economic aspects and techno-economic Analysis. **Waste Biomass Valorization** 2, 257–266, <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-011-9069-3>. 2011

ALONSO, P.; LUENGO, C.A.; GARZONE, P.; CORNACCHIA, G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current situation and environmental aspects. **Waste Biomass Valorization** 2, 1–16, 2011 and hardwoods. **Bioresour Technol.** 100:5170–5, 2009

ANEEL - **Agência Nacional de Energia Elétrica**. Disponível em: www.aneel.gov.br. 2017

ANJUM, M.F.; TASADDUQ, I.; AL-SULTAN, K.. Response surface methodology: A neural network approach. **European Journal of Operational Research**, 101 pp. 65-73, 1997

APICHARTSRANGKOON, A.; LEDWARD, D. A.; Dynamic viscoelastic behaviour of high pressure treated gluten-soy mixtures. **Food Chem** 77(3), 317–323, 2002

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, 2001

ARONSTEIN, B.N.; ALEXANDER, M. Surfactants at low concentrations stimulate biodegradation of sorbed hydrocarbons in samples of aquifer sands and soil slurries. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 11, 1227 1233, 1992

ARONSTEIN, B.N.; CALVILLO, Y.M.; ALEXANDER, M. Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. **Environmental Science and Technology**, 25, 1728 1731, 1991.

ARONSTEIN, B.N.; ALEXANDER, M. Surfactants at low concentrations stimulate biodegradation of sorbed hydrocarbons in samples of aquifer sands and soil slurries. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 11, 1227 1233, 1992

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.

ASHTER, M.; CORRIEU, G. Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. **Enzyme Microb Technol** 9:245–249, 1986

AZUMA, J; ASAI, T; IKASA, M. Effects of microwave irradiation on enzymatic susceptibility of crystalline cellulose. **J. Ferment. Technol.**, 63:529-536, 1985.

BAJPAI, P. Biological bleaching of chemical pulps. **Critical Reviews in Biotechnology**, vol. 24, no. 1, p. 1-58. 2004.

BAK, J. S.; KO, J. K.; CHOI, I. G.; PARK, Y. C.; SEO, J. H.; KIM, K. H. Fungal pretreatment of lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ethanol from rice straw. **Biotechnology Bioengineering**. 104:471–82, 2009.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Convers Manage**. 52:858 e75, 2010.

BALAT, M.; BALAT, H.; Öz, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, 34: 551–573, 2008.

BAO, W. L.; FUKUSHIMA, Y.; JENSEN, K.A.; MOEN, M.A.; HAMMEL, K.E. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. **FEBS Lett**.354:297–300. 1994

BAO, W.L.; FUKUSHIMA, Y.; JENSEN, K.A.; MOEN, M.A.; HAMMEL, K.E. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. **FEBS Lett** 354:297-300. 1994

BATOOL, S.; ASGHER, M.; SHEIKH, A.; RAHMAN, U. Optimization of physical and nutritional factors for enhanced production of lignin peroxidase by *Ganoderma lucidum* IBL-05 in solid state culture of wheat straw. **Department of Chemistry and Biochemistry, University of Agriculture**, Faisalabad. 2013.

- BATOOL, S.; ASGHER, M.; SHEIKH, M. Optimization of physical and nutritional factors for enhanced production of lignin peroxidase by *Ganoderma lucidum* IBL-05 in solid state culture of wheat straw. 2013
- BES, R. S.; GAS, G.; MOLINIER, J. Enhancement of poplar cellulose susceptibility to cellulase enzyme hydrolysis by ozonation. **Ozone Science Eng.**, 11:217-226, 1989.
- BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S.; NAGALAKSHMI, S. Bioethanol production from rice straw: an overview. **Bioresour Technol.** 101:4767–74, 2010.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Palo Alto, v. 54, p. 519-546, 2003.
- 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.; 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.
- BRADSHAW, M.J. Global energy dilemmas: a geographical perspective. **Geographical Journal**. Vol. 176. 176:275, 2010.
- BREEN, A.; SINGLETON, F. L. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Current Opinion in Biotechnology**, 10, 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.
- BURNS R. G.; DEFOREST J. L.; MARXSEN J.; SINSABAUGH R. L.; STRONBERGER M. E.; WALLENSTEIN M. D. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biol. Biochem.* 58, 216–234 10.1016/j.soilbio.2012.11.009.2013
- 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.
- CABANA, H.; JIWAN J. L.; ROZENBERG, R; ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; AGATHOS, S. N.; JONES, J.P. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. **Chemosphere**. 2007.
- CABANÉ, M. et. al. Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. **Plant Physiol.**, v. 134, n. 2, p. 586-594, 2004.
- CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D. L., STAMBUK, B. U.; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a Dxylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, 9, 1338-1342, 2009.

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.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G. J. M.; ALMEIDA, E.; SILVA, J. B.; GIULIETTI, M. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol. In: ABQ – RN, 2007, Natal. **Anais eletrônicos**. Natal: ABQ – RN, 2007.

CARAMELO, L.; MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A.T. A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving alpha-keto-gamma- thiomethylbutyric acid and lignin model dimmers. **Applied and Environmental Microbiology**. 65: 916–22, 1999.

CENBIO (Centro Nacional de Referência em Biomassa). Disponível em: www.cenbio.org.br. 2003

CHAIRIN, T.; NITHERANONT, T.; WATANABE, A.; ASADA, Y.; KHANONGNUCH, C.; & LUMYONG, S. Biodegradation of bisphenol A and decolorization of synthetic dyes by laccase from white-rot fungus, *Trametes polyzona*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 169, 539–545. 2013.

CHARLTON, A; ELIAS, R.; FISH, S.; FOWLER, P.; GALLAGHER, J. The biorefining opportunities in Wales: Understanding the scope for building a sustainable, biorenewable economy using plant biomass. **Chem Eng Res Des**. 2009

CHEN, C. L.; CHANG, H.M. Chemistry of biodegradation. (T. Higuchi, ed.), **Biosynthesis and Biodegradation of Wood** pp. 535-556 San Diego., California Academic press, pp. 679, 1985

CLAUS, H.; FABER, G.; KONIG, H.; Redox mediated decolonization of synthetic dyes by fungal laccases. **Applied microbiology and biotechnology** 59, 672-678, 2002

CORTEZ, L.A.B; LORA, E.E.S.; AYARZA, J.A.C. Biomassa no Brasil e no mundo. **Biomassa para energia**, Editora da UNICAMP. Campinas, 2008.

CRAWFORD, R. L. **Lignin biodegradation and transformation**. Vol. 7, p. 118, 1981

D'SOUZA, D. T.; TIWARI, R.; SAH, A. K.; RAGHUKUMARA, C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. **Enzyme Microb Technol** v.38, p.504–511, 2006.

D'SOUZA, T. M.; MERRIT, C. S.; REDDY, C. A. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied and Environmental Microbiology** 65: 5307-5313, 1999

DASHTBAN, M.; SCRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. **Int J Biol Sci**, 5, pp. 578–595, 2009.

DEL RÍO J.C.; MARQUES G.; RENCORET J.; MARTÍNEZ A.T.; GUTIÉRREZ A. Occurrence of naturally acetylated lignin units. **J Agric Food Chem**.55:5461–5468. 2007

DEMIRBAS, A. Global Renewable Energy Projections, 2009. **Energy sources**, part B 4:212-224, 2009

DIAS, A. A.; FREITAS, G. S.; MARQUES, G. S. M.; SAMPAIO, A.; FRAGA, I. S.; RODRIGUES, M. ET AL. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. **Bioresour Technol.** 101:6045–50, 2010.

DIAS, A.; FREITAS, G.; MARQUES, G.; SAMPAIO, A.; FRAGA I.; RODRIGUES M. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. **Bioresour Technol.** 101:6045–50, 2010.

DIAS, M. O. S.; ENSINAS, A. V.; NEBRA, S. A.; MACIEL, R.; ROSELL, C. E. V. E.; MACIEL, M. R. W. Production of bioethanol and other bio-base materials from sugarcane bagasse: integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research & Design**, 87, 1206-1216, 2009

DIAS, M.O.S.; ENSINAS, A.V.; NEBRA, S.A.; MACIEL FILHO, R.; ROSSELL, C.E.V., MACIEL, DURÁN, N.; ROSA, M. A., D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidas) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology** 3: 907–931, 2002.

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 phenoloxidade-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B-Environmental**, v. 28, p. 83–99, 2000

EIA (**Annual Energy Review**), disponível em U.S. Energy Information Administration (EIA): <http://www.eia.gov/totalenergy/data/annual/pdf/aer.pdf>, 2011.

ERIKSSON, K.-E.L.; BLANCHETTE, R.A.; ANDER, P. **Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components**. Springer, Berlin, Germany, 1990

ESCAMILLA, E.M.S.; DENDOOVEN, L.; MAGAÑA, I.P.; PARRA, R.S.; DE LA TORRE, M. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. **J. Biotechnol.**, 76, pp. 147-155, 2000

FARID, M. A.; SHAKER, H. M; EL-DIWANY, A. I. Effect of peracetic acid, sodium hydroxide and phosphoric acid on cellulosic materials as pretreatment for enzymatic hydrolysis. **Enzyme Microb. Technol.**, 5:421-424, 1983.

FENGEL, D., WEGENER, G. Wood, chemistry, ultrastructure, reactions. **Waster & Grugter**, 613p. New York, 1984.

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.

FERREIRA, L. F. R. **Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial da cana por fungos**. 134 f. Tese (Doutorado) - ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ, Piracicaba, 2009.

- FLINT, S.; MARKLE, T.; THOMPSON, S.; WALLACE, E. Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. **J Environ Manage.** 104:19–34, 2012
- FONSECA, B. G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis*.** 2009. 110p, Dissertação (mestrado em microbiologia aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, Lorena, 2009.
- FUKUDA T.; UCHIDA, H.; TAKASHIMA, Y.; ET, A. L. Degradation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 284:704–6. 2001
- GÁRDONYI, M.; ÖSTERBERG, M.; RODRIGUES, C., SPENCER-MARTINS, I.; HÄHN-HÄGERDAL, B. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Research**, 3, 45-52, 2003.
- GARZILLO, A.M.V.; DIPADO, S.; BURLA, G.; BUONOCORE, V. Differently induced extracellular phenol oxidases from *Pleurotus ostreatus*. **Phytochemistry** **31**, 3685–3690, 1992.
- GARZILLO, A.M.V.; DIPADO, S.; BURLA, G.; BUONOCORE, V. Differently induced extracellular phenol oxidases from *Pleurotus ostreatus*. **Phytochemistry** **31**: 3685–3690, 1992
- GHANEM, K.; AL-GARNI, S.; AL-ZAHRANI, M. Bioremediation of Diesel Fuel by Fungal Consortium Using Statistical Experimental Designs. **Botany and Microbiology Department**, Faculty of Science, Alexandria UNIV. ALEXANDRIA, Egypt. 2016.
- GIBSON, L. J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 9, p. 2749–2766, 2012.
- GOLD, M. H.; ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** **57**: 605e622. 1993.
- GOLD, M. H.; ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiol Rev.** Sep;57(3):605–622, 1993
- GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 808-810, 2007.
- GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, p 2086-2097, 2008.
- GOLDEMBERG, J.; MACEDO, I. C. The brazilian alcohol program – An overview. **Energy for Sustainable Development**, v. 1, n.1, p. 17-22, 1994.
- GOLDENBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, 315: 808–810, 2007
- GOMES, E.; AGUIAR, A.P.; CARVALHO, C.C.; BONFÁ, M.R.B.; DA SILVA, R. and BOSCOLO, M. Ligninases production by Basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 40, no. 1, p. 31-39, 2009.

GOODWIN, D. C.; AUST, S. D.; GROVER, T. A. Evidence for veratryl alcohol as a redox mediator in lignin peroxidase-catalyzed oxidation. **Biochemistry** 34:5060–5065, 1995

GUARDABASSI, P. Sustentabilidade da biomassa como fonte de energia perspectivas para países em desenvolvimento. UNIVERSIDADE DE SAO PAULO. **Programa Interunidades de Pós-Graduação em Energia**, 2006

GUPTA, A. Optimization of product performance of a paint formulation using a mixture experiment; **J. Appl. Stat.**, 28 (2), pp. 199-213, 2001

GUPTA, R.; MEHTA, G.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of celluloses. **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.

HÄHN-HÄGERDAL, B.; JEPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, 16, 933-943, 1994.

HAMMAN, S. Bioremediation capabilities of white rot fungi. **Spring**; p. 1-12, 2004.

HAMMEL, K. E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological lignolysis. **Current. Opinion of Biotechnology**, v.11, p.349, 2008.

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

HARVEY, P. J.; SCHOEMAKER, H.E.; PALMER, J. M. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters** 195,242-246, 1986

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews** 13: 125-135, 1994.

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.

HILDÉN, K.; MARTINEZ, A.; HATAKKA, A.; LUNDELL, T. The two manganese peroxidases Pr-MnP2 and Pr-MnP3 of *Phlebia radiata*, a lignin-degrading basidiomycete, are phylogenetically and structurally divergent. **Fungal Genet Biol.** ;42: 403–419, 2005

HIRANO, T.; HONDA, Y.; WATANABE, T.; KUWAHARA, M. Degradation of BPA by the lignin-degrading enzyme manganese peroxidase produced by the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Biosci Biotechnol Biochem** 64:1958–1962, 2000

ISMAIL, A.; SOULTANI, S.; GHOUL, M. Optimization of the enzymatic synthesis of butyl glucoside using response surface methodology. **Biotechnol. Prog.**, 14, pp. 874-87,1998

- JÄGER, A.; CROAN, C.; KIRK, T.K. Production of ligninases and degradation of lignin in agitated submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 50, 1274–1278.1985
- JANUSZ, G.; KUCHARZYKB, K.; PAWLIKA, A.; STASZCZAKA, M.; PASZCZYNSKIC, A. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. **Enzyme Microb. Technol.** 521–12. 2013.
- JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology**, 25, 319-326, 2007.
- JORGENSEN, H.; OLSSON, L.; Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 381-390, 2006
- KAAL, E.; JONG, E.; FIELD, J. Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. **Applied and Environmental Microbiology** 59: 4031e4036. 1993.
- KAAL, E.E.J.; JONG, D.E.; FIELD, J.A. Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera* spp. strain BOS55. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 4031-4036,1993
- KAPICH, A.N., PRIOR, B.A., BOTHA, A., GALKIN, S., LUNDELL, T.; HATAKKA, A. Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. **Enzyme Microb Technol** 34, 187–195. 2004
- KARHUNEN, P.; RUMMAKKO, P.; SIPILA, J.; BRUNOW, G; KILPELAINEN, I. Dibenzodioxocins: a novel type of linkage in softwood lignins. **Tetrahedron Lett** 36 169–170. 1995
- KARP, S. G. **Development of a biotreatment for delignification of sugarcane bagasse and production of laccases.** 148 p. Tese (Doutorado em engenharia de bioprocessos e biotecnologia), UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Curitiba, 2012.
- KELLER, F; HAMILTON, J; NGUYEN, Q. Microbial pretreatment of biomass. **Appl Biochem Biotechnol.** 105:27–41, 2003.
- KHUSRO, A; KALIYAN BK, A. L-DHABI NA; ARASU, M.V.; AGASTIAN, P. Statistical optimization of thermo-alkali stable xylanase production from *Bacillus tequilensis* strain ARMATI. **Electron J Biotechnol.** 2016
- KIRAN, K. R.; KARANTH, N.G.; DIVAKAR, S. Preparation of stearyl lactic acid ester catalyzed by lipases from *Rhizomuco miehei* and porcine pancreas optimization using response surface methodology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 52, pp. 579-584, 1999
- KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. **Annual Revision Microbiology**, v.41, p.465-505, 1987.

KIRK, T. K.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W. J.; LORENZ, L. F.; ZEIKUS, J. G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**, 117, 277- 285.1978

KÖLLER, G.; MÖEDER, M. and CZIHAL, K. Peroxidative degradation of selected PCB: A mechanistic study. **Chemosphere**, vol. 41, no. 12, p. 1827-1834, 2000.

KOULLAS, D. P.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D. Correlating the effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of straw. **Biotechnol. Bioeng.**, 39:113-116, 1992.

KUNZ, A., ET AL. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**. v. 25, n.01, p. 78-82, 2002.

KUO, C.H.; LEE, C.K. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by N-methylmorpholine-N-oxide pretreatment. **Bioresource Technology**, 100: 866–871, 2009.

LADHARI, N.; SAYAHIA, E.; MECHICHI, T.; FAOUZI, S. Azo dyes decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. P. 1478-1482. Jan, 2016

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24.

LEE, K. M.; GILMORE, D. F. Statistical experimental design for bioprocess modeling and optimization analysis: repeated-measures method for dynamic biotechnology process. *Appl Biochem Biotechnol*. 1999

LEE, Y.Y.; LADISCH, M.; HOLTZAPPLE, M.; ELANDER, R.; DALE, B. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresour Technol** 96:1959–1966, 2005.

LEISOLA, M.S.A.; FIECHTER, A. Ligninase production in agitated conditions by *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiol Lett** 29:33–36, 1985

LESAGE-MEESSEN, L.; DELATTRE, M.; HAON, M.; THIBAUT, J. F.; CECCALDI, B. C.; BRUNERIE, P.; ASTHER, M. A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. **Journal of Biotechnology**, Bielefeld, v. 50, p. 107- 113, 1996

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, D.; ALIC, M.; GOLD, M.H. Nitrogen regulation of lignin peroxidase gene transcription. **Applied and Environmental Microbiology** 60: 3447e3449. 1994.

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

LIU, D. Enhancement of PCBs biodegradation by sodium ligninsulfate. **Water Research**, 14, 1467-1475, 1980.

LIU, D. Enhancement of PCBs biodegradation by sodium ligninsulfate. **Water Research**, 14, 1467-1475. 1980

LOPES, V. C. P. **Recursos Microbianos Lignocelulíticos: Potencial para Deslignificação e Produção de Ligninases**. 2017. Tese (Doutorado). Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017

LORA, E. S. Tecnologia e Aplicação Racional de Energia Elétrica e de Fontes Renováveis na Agricultura. **XXVI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola**, p.97-128, Campina Grande, 1997.

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

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.

MALAVIYA, P.; RATHORE, V. **Bioremediation of Pulp and Paper Mill Effluent by a Novel Fungal Consortium Isolated from Polluted Soil**. 2008

MALAVIYA, P.; RATHORE, V.S. Bioremediation of pulp and paper mill effluent by a novel fungal consortium isolated from polluted soil. **Department of Environmental Sciences, G.B. Pant University of Agriculture, and Technology**, Pantnagar, India. 2006.

MANSFIELD, S. D.; MOODEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnol. Prog.** 15:804-816, 1999.

MARGOT, J.; MAILLARD, J.; ROSSI, L.; HOLLIGER, C. Influence of treatment conditions on the oxidation of micropollutants by *Trametes versicolor* laccase. **New Biotechnology**, vol. 30, no. 6, p. 803-813. 2013.

MARTÍNEZ A.T.; CAMARERO S.; GUILLÉN F.; GUTIÉRREZ A.; MUÑOZ C.; VARELA, E. Progress in biopulping of non-woody materials: chemical, enzymatic, and ultrastructural aspects of wheat-straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. **FEMS Microbiol Rev.** 1994;13:265–274. *et al.*

MARTINEZ D.; CHALLACOMBE J.; MORGENSTERN I.; HIBBETT D.S.; SCHMOLL M.; KUBICEK C.P. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2009

MARTÍNEZ, A.T. Review: Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 30, no. 4, p. 425-444, 2002.

MARTINEZ, A.T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUENAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLEN, F.; MARTINEZ, M. J.; GUTIERREZ, A.; DEL RIO, J.C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **Int Microbiol.** 8:195–204. 2005

MARTINEZ, D. et. Al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nature Biotechnol.** 22, 695–700. 2004.

MATÉ, D.; GARCÍA-BURGOS, C.; GARCÍA-RUIZ, E.; BALLESTEROS, A. O.; CAMARERO, S.; ALCALDE, M. Laboratory evolution of high-redox potential laccases. **Chem Bio.** 17:1030–1041. 2010

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Review: Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry** 60: 551–565, 2002.

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.

MES-HARTREE, M.; YU, E. K. C.; REID, I. D.; Suitability of aspenwood biologically delignified with *Phlebia rremellosus* for fermentation to ethanol or butanediol. **Appl. Microbial. Biotechnol.**, 26:120-125, 1987.

MOHAPATRA, D. P.; BRAR, K. S.; TYAGI, D. R.; SURAMPALLI, R. Y. Occurrence of bisphenol A in wastewater and wastewater sludge of CUQ treatment plant. **Journal of Xenobiotics.** 2011

MOHAPATRA, D. P.; BRAR, S. K.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y. Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of waste-water and wastewater sludge-Fate of bisphenol A. **Chemosphere.** 78:923- 41, 2010.

MOREDO, N.; LORENZO, M.; DOMINGUEZ, A.; MOLDES, D.; CAMESELLE, C.; SANROMAN, A. Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 19, 665–669, 2003.

MOREDO, N.; LORENZO, M.; DOMÍNGUEZ, A.; MOLDES, D.; CAMESELLE, C.; SANROMAN, A. Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 665-669, 2003.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R; HOLTZAPPLE, M; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 96:673-686, 2005.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. **John Wiley & Sons, Inc**, New York ,1995

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. 2nd ed. New York, NY: **John Wiley & Sons**, 2002.

NAGAI, M.; SAKAMOTO, Y.; NAKADE, K.; SATO, T. Isolation and characterization of the gene encoding a manganese peroxidase from *Lentinula edodes*, **Mycoscience** 48(2), 125-130, 2007

NAIK, S.N.; GOUD, V.V.; ROUT, P.K.; DALAI, A.K. Production of first and second-generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 14(2), 578–597, 2010.

NAIM, K.; ZDRAVKO, D.; ADALBERT, F.; HERMANN, S.; STEPHANIE, B.M.; OTTO, G.; Ethanol, Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Weinheim: Wiley- **VCH Verlag GmbH & Co.**, KGaA; 2011.

NARAIAN, R.; PANDEY, R.; PATEL, Y.; SINGH, V. Variable expression and regulation of genes encoding peroxidase: Multiple applications. **Applications of Microbial Genes in Enzyme Technology**, ed. 1. School of Natural Sciences, Noida. India. 2013

NARDI, J. V.; ACCHAR, W.; HOTZA, D. Enhancing the Properties of Ceramic Products Through Mixture Design and Response Surface Analysis. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 24, p. 375-379. 2004

NGUYEN, N. H.; SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycol Res.** 110:1232–1241. 2006.

NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science** 37(1), 52–68, 2011.

NIMZ, H. K. Beech lignin - proposal of a constitutional scheme, **Angew Chem int Ed. Engl.** 13, 313-321.1974

NITHERANONT et. al. Extracellular Laccase Produced by an Edible Basidiomycetous Mushroom, *Grifola frondosa*: Purification and Characterization. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 75(3):538, 2011

OH, S.; RHEEM, S.; SIM, J.; KIM, S.; BAEK, Y. Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-glucose medium by using response surface methodology. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61 pp. 3809-3814,1995

OHTSUBO, Y.; KUDO, T.; TSUDA, M. and NAGATA, Y. Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 65, no. 3, p. 250-258,2004.

OOIJKAAS, L.P.; WILKINSON, E.C.; TRAMPER, J.; BUITELAAR, R.M.. Medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* using statistically-based experimental designs. **Biotechnol. Bioeng.**, 64 pp. 92-10, 1999

- PALMIERI, G.; CENNAMO, G.; SANNIA, G.; Remazol brilliant blue R decolourisation by *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme Microb Technol.** 36:17–24, 2005
- PANDEY, A. Handbook of plant-based biofuels. **Boca Raton: CRC Press.** ISBN, 1560221755, 2009
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, 74: 69-80, 2000.
- 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
- PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. **In Series on Biotechnology**. Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45 p, 2008.
- PEREIRA, J. DE CASSIA; PAGANINI, N.; RODRIGUES, A.; BRITO DE OLIVEIRA, T.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; BOCCHINI, D.A. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, 1-12, 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.
- PIEPEL, G.; REDGATE, T.. Mixture experiment techniques for reducing the number of components applied for modeling waste glass sodium release. **J. Am. Ceram. Society**, 80 (12), pp. 3038-3044, 1997
- 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
- POINTING, S. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Appl Microbiol Biotechnol.** 57:20–33. 2001
- RAES. J.; ROHDE, A.; CHRISTENSEN, J.H.; VAN DE PEER, Y.; BOERJAN, W. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. **Plant Physiol** 133:1051-1071. 2003
- RAGHUKUMAR, C.; D’SOUZA, T.M.; THORN, R.G. Lignin – modifying enzymes of *Flavodon flavus*, a basidiomycete isolated from a coastal marine environment. **Applied and Environmental Microbiology** 6555: 2103-2111, 1999.
- RAYES, D. J. Mass and compositional changes, relevant to biorefining, in *Miscanthus x giganteus* plants over the harvest window. **Bioresour Technol.** 2013
- RAYMOND, E.K.; DONALD, F.O.; JACQUELINE, I.K.; MARY. H.G. **Ethanol. Encyclopedia of chemical technology**. New York: Wiley, 1991.

- RIBEIRO, A.C.B.; DE ALMEIDA, I.R. Study on high performance roller compacted concrete. **Mater. & Struct**, 33 (230), pp. 398-402, 2000
- ROBERTS, F.L.; MOHAMMAD, L.N.; WANG, L.B. History of hot mix asphalt mixture design in the United States. **J. Mater. Civ. Eng.**, 14 (4), pp. 279-293, 2002
- ROBERTS, J. D.; CASERIO, M. C. **Basic principles of organic chemistry**. 2nd ed. Menlo Park, CA: W. A. Benjamin, Inc.; 1977.
- ROBLES-HERNÁNDEZ, L.; GONZALES-FRANCO, A.C.; CRAWFORD, D.L. and CHUN, W.W.C. Review of environmental organopollutants degradation by white-rot basidiomycete mushrooms. **Tecnociencia Chihuahua**, vol. 2, no. 1, p. 32-39. 2008.
- ROBLES-HERNÁNDEZ, L.; GONZALES-FRANCO, A.C.; CRAWFORD, D.L. and CHUN, W.W.C. Review of environmental organopollutants degradation by white-rot basidiomycete mushrooms. **Tecnociencia Chihuahua**, vol. 2, no. 1, p. 32-39, 2008.
- ROCHA, M. et al. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Undistrial crops and products**, v.64, p.52-58, 2015
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de experimentos. 2 ° ed., **Editora Casa do Pão**, Campinas-SP, 2014.
- RODRIGUES, R. S. **Produção de enzimas e avaliação do pré-tratamento ácido de biomassas para produção de bioetanol**. Viçosa. 95 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, 2009.
- ROLZ, C.; LEON, R.; ARRIOLA, M. C. Biodelignification of lemon grass and citronela bagasse by white-rot fungi. **Appl. Environ. Microbial.**, 52:607-611, 1986.
- ROSILLO-CALLE, F. ; BAJAY, S. V.; ROTHMAN, H. **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. UNICAMP. 447 p. Campinas, 2005.
- RYABOVA, O. B.; CHMIL, O. M.; SIBIRNY, A. A. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **FEMS Yeast Research**, 4, 157-164, 2003.
- RYU K.; HWANG S.Y.; KIM K.H.; KANG J.H.; LEE E.K. Functionality improvement of fungal lignin peroxidase by DNA shuffling for 2,4-dichlorophenol degradability and H₂O₂ stability. **J Biotechnol**. 2008; 133:110–115.
- SANNIA, G., GIARDINA, P., LUNA, M., ROSSI, M.; BUONOCORE, V. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnol Lett** 8, 797-800. 1986.
- SANNIA, G.; GIARDINA, P.; LUNA, M.; RUSA, M.; BUONOCORE, V. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters** 8, 797–800, 1986
- SANTOS, V. T. O. **Composição e digestibilidade enzimática do bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico em reator estático**. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2010.

SAWADA, T.; NAKAMURA, Y.; KOBAYASHI, F.; KUWAHARA, M.; WATANABE, T. Effects of fungal pretreatment and steam explosion pretreatment on enzymatic saccharification of plant biomass. **Biotechnol Bioeng.** 48:719–24, 1995.

SAXENA, R.C.; ADHIKARI, D.K.; Goyal, H.B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 13: 167–178. 2009.

SEABRA, J.E.A.; TAO, L.; CHUM, H.L.; MACEDO, I.C. A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering. **Biomass Bioenerg.** 34, 1065–1078, 2010.

SHAH, V.; NERUD, F. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. **Canadian Journal of Microbiology.** 48: 857-870, 2002.

SHAHEEN, R. et al. Immobilized Lignin Peroxidase From *Ganoderma Lucidum* IBL-05 With Improved Dye Decolorization and Cytotoxicity Reduction Properties. **Int J Biol Macromol.** 103, 57-64. 2017.

SHI, J.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; CHIMM, M.; HOWELL, N. Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production. **Biomass Bioenerg.** 33:88–96, 2009.

SHULER, M.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering Basic Concepts** (2nd ed.. Saddle River, NJ: Prentice Hall. 2002.

SHULER, M.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering Basic Concepts** 2nd ed. Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2002.

SIGOILLOT, C.; CAMARERO, S.; VIDAL, T.; RECORD, E.; ASTHER, M.; PÉREZ-BOADA, M.; MARTÍNEZ, M.J.; SIGOILLOT, J.-C.; ASTHER, M.; COLOM, J.F. and MARTÍNEZ, Á.T. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. **Journal of Biotechnology**, vol. 115, no. 4, p. 333-343. 2005

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose.** Dissertação (mestrado). Pós graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. UFRJ, 2010.

SILVANIA, A. L. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulasas e xilanas 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.

SINSABAUGH, R.L. Enzymatic analysis of microbial pattern and process. **Biol. Fertil. Soils** 17:69–74, 1994.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Laboratory Analytical Procedure (LAP): Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Technical Report: NREL/TP-510-42618. **National Renewable Energy Laboratory**, Golden, Co, USA, 2008.

- 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
- 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.
- STAMBUK, B. U.; FRANDEN, M. A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-Xylose Transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 105-108, 255-263, 2003.
- 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.
- SUN, J. X.; SUN, X.F.; ZHAO, H.; SUN, R. C. Isolation, and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v.84, 331-339, 2004
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, 83:1-11, 2002.
- SUN, Y.; CHENG, J.J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1599-1606, 1997.
- SZCZERBOWSKI, D.; PITARELO, A. P.; FILHO, A. Z.; RAMOS, L. P. Sugarcane biomass for biorefineries: Comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydr Polym.**, 114, 95-101. 2004
- SZCZODRAK, J.; ILCZUK, Z.; ROGALSKI, J. Intensification of oak sawdust enzymatic hydrolysis by chemical or hydrothermal pretreatment. **Biotechnol. Bioeng.**, 28:504-510, 1986.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 819p.2009.
- TAVARES, J. M.; DUARTE, L. C., AAMARAL-COLLAÇO, M. T.; GÍRIO, F. M. The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, 26, 743-747, 2000.
- THIBAULT, S. L.; ANDERSON, M.; FRANKENBERGER, W.T. JR. Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, 62, 283-287. 1996
- THIBAULT, S.L.; ANDERSON, M.; FRANKENBERGER, W.T. Jr. Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, 62, 283-287, 1996.
- TIEHM, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. **Applied and Environmental Microbiology**, 60, 258-263, 1994.

TIEHM, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. **Applied and Environmental Microbiology**, 60, 258-263, 1994

TIEN M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. **Science**, v.221, p.661–663, 1983.

USDE (**United States Department of Energy**). Alternative fuels data center. Disponível em: http://www.afdc.energy.gov/data/tab/fuels-infrastructure/data_set/10331, acesso em: 2013.

VAN KUIJK, S. J. et al. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. **Biotechnol Adv.** 2015

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

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 subvermispota* on different biomass feed stocks. **Bioresource Technology**, v.102, p. 7507–7512, 2011.

WANG, C., SUN, H., LI, J., LI, Y.; ZHANG, Q. Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils. **Botany and Microbiology Department**, Faculty of Science, Alexandria Univ., Alexandria. 2009

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.

WEN, T.C.; CHEN, W. C. Blending thermoplastic polyurethanes and poly (ethylene oxide) for composite electrolytes via a mixture design approach , **J. Appl. Pol. Sci.**, 77 (3) pp. 680-692, 2000

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnol. Adv.**, 22 (1), pp. 161–187, 2003.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances** 22: 161–187, 2003.

WIKIPEDIA. **Structure of cellulose**. Disponível em: www.wikipedia.org/wiki/Celulose. Acesso em: 2017

WIKIPEDIA. **Structure of hemicellulose**. Disponível em: www.wikipedia.org/wiki/Hemicelulose. Acesso em: 2017

WIKIPEDIA. **Structure of lignin**. Disponível em: www.wikipedia.org/wiki/Lignina. Acesso em: 2017

WINQUIST, E.; MOILANEN, U.; METTÄLÄ, A.; LEISOLA, M.; HATAKKA, A. Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. **Biochem. Eng. J.** 42, 128–132. 2008.

WONGWILAIWALIN et. al. Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. **Enzyme Microb Technol**, 47, pp. 283–290, 2010.

XU, C; MA, F; ZHANG, X; CHEN, S. Biological pretreatment of corn stover by *Irpex lacteus* for enzymatic hydrolysis. **J Agric Food Chem**, 58:10893–8, 2010.

YAGHOUBI, K.; PAZOUKI, M.; SHOJAOSADATI, S. A. Variable optimization for biopulping of agricultural residues by *Ceriporiopsis subvermispota*, **Bioresource Technology** 99, 4321–4328. 2008

YU, H.; GUO, G.; ZHANG, X; YAN, K.; XU, C. The effect of biological pretreatment with the selective white-rot fungus *Echinodontium taxodii* on enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresour Technol**. 2009.

ZHANG, X.; KURABI, A.; GILKES, N.; MABEE, W.E.; SADDLER, J.N. Immobilization of b-glucosidase on Eupergit C for ligno-cellulose hydrolysis. **Biotechnol. Lett.** 28 (3), 151–156, 2006.

8 ANEXOS

ANEXO 1 – FORMULAÇÃO DA ÁGUA DO MAR ARTIFICIAL (ASW)

P/ 1 litro de ASW:

MgCl ₂ .5H ₂ O.....	10,827g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	1,509g
SrCl ₂ .6H ₂ O.....	0,02g
NaCl.....	23,926g
Na ₂ SO ₄	4,008g
KCl.....	0,677g
NaHCO ₃	0,196g
KBr.....	0,098g
H ₃ BO ₃	0,003g

ANEXO 3 – MATRIZ PB12 CORRESPONDENTE AOS ENSAIOS DO PB2

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

ANEXO 4 – MATRIZ PB12 CORRESPONDENTE AOS ENSAIOS DO PB3

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

Profª. Drª. Lara Durães Sette

Drª. Viviane Cristina Padilha Lopes

Rafael Dieguez Fernandes