

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**LINHAGENS FÚNGICAS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

ALINE CRISTINA RABONATO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus
de Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia (Energia na Agricultura)

BOTUCATU - SP

Setembro - 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**LINHAGENS FÚNGICAS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

ALINE CRISTINA RABONATO

Orientadora: Marli Teixeira de Almeida Minhoni

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus
de Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia (Energia na Agricultura)

BOTUCATU - SP

Setembro – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

R116L Rabonato, Aline Cristina, 1985-
Linhagens fúngicas na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar / Aline Cristina Rabonato.-Botucatu:[s.n.], 2013
xiii, 69 f.: il., color., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2013
Orientador: Marli Teixeira de Almeida Minhoni
Inclui bibliografia

1. Bagaço de cana. 2. Hidrólise. 3. Enzimas de fungos. 4. Manganês. I. Minhoni, Marli Teixeira de Almeida. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

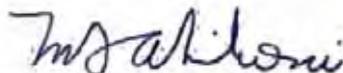
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "LINHAGENS FÚNGICAS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR"

ALUNA: ALINE CRISTINA RABONATO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

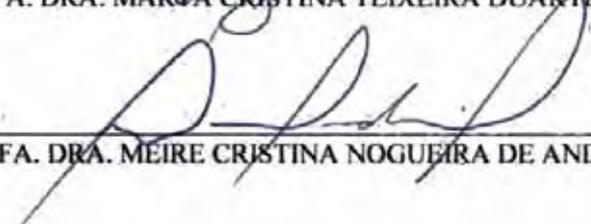
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



PROFA. DRA. MARIZA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE



PROFA. DRA. MEIRE CRISTINA NOGUEIRA DE ANDRADE

Data da Realização: 29 de julho de 2013

DEDICO

A Deus, por estar sempre a frente na minha vida, me guiando, me fortalecendo e me protegendo.

Aos meu pais, Mariana Rabonato e Laercio Rabonato, por serem os meus exemplos de luta e superação.

A minha irmã Luana Rabonato, por estar sempre ao meu lado me apoiando e incentivando.

A minha família, por serem a minha fortaleza e minha estrutura.

Aos meus avós, Regina Rabonato e Sebastião Rabonato por serem os meus exemplos de vida; os pilares da minha vida.

In memoriam.

"Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro, promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar inovações no seu próprio interior".

Dalai Lama

"Confia no Deus eterno de todo o seu coração e não se apoie na sua própria inteligência.

Lembre-se de Deus em tudo o que fizer, e ele lhe mostrará o caminho certo."

Provérbios (36:5)

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa concedida.

A minha orientadora Prof^ª Dra. Marli Teixeira de Almeida Minhoni, pela oportunidade, ensinamentos, conselhos e amizade, além da paciência e cuidados para a elaboração deste trabalho.

Ao Módulo de Cogumelos, da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNEP, por ceder o laboratório para o desenvolvimento das linhagens fúngicas. Agradeço, em especial, a Ivando Roberto Fogaça pelo apoio técnico e as amigas Djanira Rodrigues Negrão e Stephany Viana pelas cepas de cogumelos fornecidas.

A prof^ª Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, da Divisão de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP, por ceder gentilmente o seu laboratório para a concretização do projeto desenvolvido e pelos ensinamentos.

A minha eterna professora/orientadora Prof^ª Dra. Glyn Mara Figueira, da Divisão de Agrotecnologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA/ UNICAMP, pelo apoio, incentivo, amizade e confiança.

A Divisão de Agrotecnologia do CPQBA/UNICAMP em especial, ao Coordenador Dr. Marcos Nopper Alves, por ter permitido o uso das dependências laboratoriais para a execução de algumas atividades enzimáticas.

A Fazenda Lageado, da FCA/UNESP, pelo fornecimento de farelo de arroz para o cultivo das linhagens fúngicas.

A Fazenda de São Manoel, em especial Flavio Eduardo Gobbo, pelo fornecimento do bagaço de cana-de-açúcar.

Ao Prof^º Dr. Alcides Lopes Leão do Laboratório de Ciências Ambientais da FCA/UNESP pelos conhecimentos e por permitir a utilização do laboratório para secagem e moagem do bagaço de cana-de-açúcar.

A minha inseparável amiga Thalita Cristina Marques Cervezan, por ter me aguentado durante os meus períodos mais turbulentos. Agradeço imensamente por estar

sempre ao meu lado durante esses 5 anos de amizade, cumplicidade, confiança e companheirismo.

A Valéria de Lima Jardim, por toda a amizade, conhecimento e apoio durante a realização do experimento e principalmente pelo fornecimento de reagentes, sem os quais, não seria possível à concretização do trabalho.

Aos meus amigos: Danila Monte Conceição, pelo apoio e incentivo para a realização deste trabalho; Luciana Trevisan Brunelli e Juliano Toniato pela amizade, carinho, confiança e apoio em um dos momentos mais difíceis da minha vida.

A Camila Moreira Batista Belini pela colaboração durante as coletas enzimáticas, mas agradeço principalmente por todo o apoio psicológico, pela amizade, confiança, cumplicidade e compreensão.

Aos meus amigos Felipe Vitório Farias, Mariana da Silva Caldeira e Maysa Areas, por serem a minha família durante a estadia em Botucatu. Obrigada pelo carinho, pelas risadas, pelas guloseimas no final de tarde, enfim, por todo o apoio durante essa jornada.

Ao professor Filipe Pereira Giardini Bonfim, pela amizade, confiança e por todo auxílio destinado à estatística.

A banca Dra. Marli Teixeira de Almeida Minhoni, Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte e Dra. Meire Cristina Nogueira de Andrade. Agradeço sinceramente a Dra. Marli Gerenutti e a Dra. Renata Duarte pela colaboração.

Aos meus pais e minha irmã, agradeço pela paciência, pelo apoio, incentivo e amor incondicional.

A minha família e aos meus amigos que de alguma forma contribuíram para a concretização desta jornada.

Obrigada!

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
RESUMO	14
SUMMARY	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	18
2.2. BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	19
2.2.1. Características do bagaço de cana-de-açúcar	20
2.2.1.1. Celulose.....	21
2.2.1.2. Hemicelulose.....	21
2.2.1.3. Lignina	22
2.3. PROCESSOS HIDROLÍTICOS.....	22
2.3.1. Hidrólise Física.....	23
2.3.1.1. Explosão a Vapor	23
2.3.1.2. Explosão de Fibra por Amônia (AFEX)	23
2.3.1.3. Explosão de CO ₂	23
2.3.1.4. Água Quente Pressurizada	24
2.3.2. Hidrólise química	24
2.3.2.1. Hidrólise ácida.....	24
2.3.2.2. Hidrólise alcalina.....	26
2.3.2.3. Hidrólise enzimática.....	26
2.3.2.4. Lacase.....	29
2.3.2.5. Manganês Peroxidase.....	30
2.3.2.6. Lignina Peroxidase.....	32
2.4. COGUMELOS BASIDIOMICETOS COM POTENCIAL ENZIMÁTICO.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. MATERIAIS.....	34

3.1.1. Biomassa agroindustrial	34
3.1.1.1. Redução granulométrica.....	35
3.1.1.2. Remoção de açúcares residuais no bagaço de cana.....	35
3.1.2. Linhagens fúngicas	35
3.1.2.1. Multiplicação das Linhagens.....	35
3.1.2.1.1 Cultivo em meio de cultura sólida	35
3.1.2.1.2 Cultivo em meio de cultura líquido.....	36
3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS	37
3.2.1. Hidrólise ácida.....	37
3.2.2. Concentração de açúcares redutores (AR).....	37
3.2.3. Determinação dos constituintes do bagaço.....	38
3.2.4. Obtenção das enzimas	40
3.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	40
3.3.1. Atividade enzimática	41
3.3.1.1. Lacase.....	41
3.3.1.2. Manganês peroxidase	41
3.3.1.3. Lignina peroxidase	41
3.3.2. Delineamento experimental	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES FIBROSOS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	43
4.1.1. Tratamento do bagaço de cana para hidrólise enzimática	44
4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	45
4.2.1. Atividade enzimática de lacase.....	45
4.2.2. Determinação da Lignina Peroxidase	46
4.2.3. Determinação da Manganês Peroxidase	47
4.2.4. Dados acumulativos.....	48
4.3. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	49
4.3.1. Hidrólise enzimática do bagaço de cana.....	49
4.3.1.1. Quantificação do teor de glicose ao longo do tempo	49
4.3.1.2. Dosagem de glicose em função do tratamento após 15 de incubação.....	51
4.4. ESTIMATIVA DE ETANOL SEGUNDO A LEI GAY-LUSSAC	53

5. CONCLUSÕES	54
6. ANEXOS	56
6.1. PRODUÇÃO DE GLICOSE POR DIA DE INCUBAÇÃO	56
7. REFERÊNCIAS	62

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Composição média da fibra do bagaço de cana-de-açúcar conforme descrito por Rosa; Garcia, (2009).....	20
Tabela 2. Rendimento porcentual de glicose após combinação de processos químico, físico e biológico.	25
Tabela 3. Atividade enzimática (U mL^{-1}) das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase após 27 dias.	48

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Principais constituintes do bagaço de cana-de-açúcar (MURPHY; MCCARTHY, 2009).....	20
Figura 2. Representação da cadeia linear de celulose (TIMAR-BALÁZSY, 1998).....	21
Figura 3. Representação da hemicelulose (MCDOUGALL, 1993).....	21
Figura 4. Representação da lignina (FENGEL; WEGNER, 1991).....	22
Figura 5. Ilustração de hidrólise da celulose catalisada por ácidos (OGEDA; PETRI, 2010).....	25
Figura 6. Esquema da ação da celulase sobre a molécula de celulose (TÉBÉKA et al., 2009).....	26
Figura 7. Esquema para a biodegradação de lignina, incluindo reações enzimáticas e ativação de oxigênio (MARTINEZ et al, 2005).....	28
Figura 8. Local de armazenamento de bagaço de cana-de-açúcar na Usina São Manuel.....	34
Figura 9. Incubação das linhagens fúngicas em meio de cultura líquido enriquecido de bagaço de cana.....	37
Figura 10. Fluxograma do processo de hidrólise no bagaço de cana sem tratamento e tratado com H ₂ SO ₄ 7%.....	37
Figura 11. Bagaço de cana sem tratamento e tratado com H ₂ SO ₄ 7%.....	38
Figura 12. Saquinhos de tecido TNT contendo amostras de bagaço de cana com e sem tratamento ácido H ₂ SO ₄ 7%.....	39
Figura 13. Amostras submersas em banho termostátil.....	39
Figura 14. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar com e sem tratamento ácido (H ₂ SO ₄ 7,0%).....	43
Figura 15. Dosagem de glicose na água de lavagem do bagaço da cana submetido a diferentes tratamentos.....	44
Figura 16. Cinética de produção da enzima lacase para os cogumelos <i>Lentinula edodes</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pycnoporus sanguineus</i> cultivados em meio líquido de bagaço de cana.....	45

Figura 17. Cinética de produção da enzima lignina peroxidase para os cogumelos <i>Lentinula edodes</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pycnoporus sanguineus</i> cultivados em meio líquido de bagaço de cana.....	46
Figura 18. Cinética de produção da enzima manganês peroxidase para os cogumelos <i>Lentinula edodes</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pycnoporus sanguineus</i> cultivados em meio líquido de bagaço de cana.....	47
Figura 19. Variação da dosagem de glicose durante o período hidrolítico.....	50
Figura 20. Teores de glicose obtidos em função do tratamento após 15 dias de incubação.....	51
Figura 21. Estimativa dos teores de etanol a partir dos valores de glicose obtidos.....	53

RESUMO

A produção de bioetanol e de açúcares a partir do caldo de cana gera como um dos subprodutos, o bagaço. Atualmente, esse último, uma biomassa industrial lignocelulósica, pode ser aproveitado para produção de etanol de segunda geração, desde que previamente submetido a processos hidrolíticos para gerar açúcares fermentescíveis. O objetivo deste trabalho foi estimar a produção de bioetanol a partir desta biomassa agroindustrial. Para tanto, foram utilizados os cogumelos *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Pycnoporus sanguineus* como potenciais fontes produtoras das enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, capazes de hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar. As maiores atividades enzimática observadas para *L. edodes*, *P. ostreatus*, *P. sanguineus* e *P. eryngii* para lacase foram de 39,23 U^{mL} ao 25º dia de incubação, 2,5 U^{mL} e 80 U^{mL} ao 27º dia de incubação, e 16,45 U^{mL} ao 15º dia, respectivamente. As enzimas MnP e LiP não apresentaram resultados expressivos. A hidrólise enzimática do bagaço de cana *in natura* (32,17% de hemicelulose, 52,45% de celulose e 10,62% de lignina) e o bagaço de cana hidrolisado com H₂SO₄ 7,0% (0,20% de hemicelulose, 68,82% de celulose e 25,33% de lignina) foram avaliados para cada conjunto enzimático obtido. Comparado aos demais, as enzimas produzidas pelo *P. sanguineus* incubado em bagaço *in natura* apresentaram uma melhor eficiência na conversão dos açúcares, com teor médio de 0,14 g^{-L} de glicose. Embora os baixos teores de glicose determinada nesse trabalho, em relação com a literatura, pode-se afirmar que as enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, demonstraram ter potencial hidrolítico, principalmente para as produzidas pelo fungo *P. sanguineus*.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise enzimática, lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase, fungos basidiomicetos.

SUMMARY

The production of ethanol and sugar from sugarcane juice bagasse is generate byproduct. Currently, the bagasse, an industrial lignocellulosic biomass can be used for production of second generation ethanol, since when submitted to hydrolytic processes generate fermentable sugars. The objective of this study was to estimate the production of bioethanol from this agro biomass. *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* and *Pycnoporus sanguineus* were used as potential sources producing enzymes laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase, capable of hydrolyzing the sugarcane bagasse. The highest activity of enzymes, observed for *L. edodes*, *P. ostreatus*, *P. sanguineus* and *P. eryngii* were to 39.23 U^{mL} laccase after 25 days of incubation, 2,5 U^{mL} and 80 U^{mL} after 27 days of incubation, and 16,45 U^{mL} on 15 day, respectively. MnP and LiP showed no significant results. The enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse in natura (32,17% hemicellulose, cellulose 52,45% and 10,62% lignin) and bagasse hydrolyzate with 7,0% H₂SO₄ (0,20% hemicellulose, 68,82% to 25,33% cellulose and lignin) were evaluated for each enzymatic obtained. Compared to others, the enzymes produced by *P. sanguineus* incubated in sugarcane bagasse showed better efficiency in getting glucose with an average grade of 0,14 g^{-L}. Although low levels of glucose determined in this work, in relation to the literature, it can be stated that the enzymes laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase, demonstrated good hydrolytic potential, especially for those produced by the fungus *P. sanguineus*.

Keywords: sugar cane bagasse, enzymatic hydrolysis, laccase, manganese peroxidase, lignin peroxidase, basidiomycetous fungi

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa por energias renováveis cresce a cada dia, o que torna grande o investimento financeiro nessa área. O Brasil tem potencial para a implantação de novas alternativas e, entre elas, destaca-se o aproveitamento de biomassa agroindustrial, tal como o bagaço de cana-de-açúcar. Essa biomassa é rica em compostos lignocelulósicos (lignina, celulose e hemicelulose), os quais representam mais de 90% da massa seca total (CANILHA et al., 2010). A celulose e a hemicelulose compõe a maioria deste, representando cerca de 60-70% (McCARTHY; TIEMANN, 1998). Além da queima para a geração de calor, o bagaço de cana pode ser utilizado para obtenção de etanol de segunda geração.

Para a produção de etanol lignocelulósico, é necessário realizar um pré-tratamento ácido ou alcalino no bagaço, seguido de hidrólise enzimática. Na hidrólise ácida, o catalisador tem sido o ácido sulfúrico H_2SO_4 diluído (1% - 9%). Na sequência, a hidrólise enzimática consiste na degradação biológica do material por enzimas produzidas por fungos e/ou bactérias (CHANDRASHEKHAR et al., 2011).

As enzimas celulasas são eficientes na degradação de celulose, sendo as mais comuns no processo (BARRICHELO; BRITO, 1985). Diversos tipos de

microrganismos são potencialmente produtores de celulase, mas, para isso, precisam ser submetidos a condições adequadas.

Sabe-se que os fungos degradam vários compostos orgânicos obtendo, entre outros elementos, carbono e nitrogênio, necessários para o seu crescimento. Tal capacidade credencia estes fungos como ferramentas na reciclagem de subprodutos energéticos, oriundos de diferentes atividades agroindustriais (GRIFFIN, 1994). Desde modo, o emprego de fungos para a conversão de biomassa de derivação agrícola torna-se altamente recomendável.

A fim de viabilizar o processo e torná-lo altamente econômico, tem sido utilizados fungos de fácil disponibilidade e baixo valor comercial, como *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Pycnoporus sanguineus*, como potenciais fontes enzimáticas das enzimas lacase, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP). Esses cogumelos, expostos a biomassas lignocelulósicas, representam o principal exemplo da conversão direta de resíduos de baixo grau, em um artigo com valor agregado elevado com benefício para o homem e uma fonte produtora de metabólitos comercialmente importantes (BUSWELL; CHANG,1993). Deste modo, o presente trabalho visou cultivar as espécies *L. edodes*, *P. ostreatus*, *P. eryngii* e *P. sanguineus* a fim de obter as enzimas lacase, MnP e LiP para posterior ensaios hidrolíticos. A partir da obtenção destas enzimas pelos microrganismos, cada conjunto enzimático foi utilizado para hidrolisar amostras de bagaço de cana-de-açúcar e, posteriormente, para a dosagem da quantidade de açúcares fermentescíveis formados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biomassa Lignocelulósica

A produção do bioetanol pode ser realizada de forma primária, ou seja, pela fermentação de açúcares presentes no caldo da cana, beterraba, milho, entre outros, e de forma secundária, proveniente de biomassas oriundas de agroindústrias.

A obtenção de bioetanol secundário tem sido mundialmente atrativa, visto que, a busca por um mercado autossustentável tem motivado a pesquisa científica e o avanço tecnológico na área de novos combustíveis ecológicos. Segundo Aguiar (2011), a utilização e reciclagem de biomassa agroindustrial podem minimizar os problemas ambientais ligados ao acúmulo de gás carbônico e redução de combustíveis fósseis.

Dentre as biomassas agroindustriais, destacam-se as de composição lignocelulósica oriundas de vários processos agrícolas e incluem palhas, cascas, cavacos, madeiras duras, madeiras moles, resíduos das indústrias de papel, bagaços diversos, entre outros. São fontes renováveis e disponíveis em grandes quantidades. As características físicas, químicas e biológicas destes resíduos são variáveis em função do tipo e idade do vegetal, manejo de cultivo, características do solo e clima e processo industrial. A biomassa

lignocelulósica é composta, em média, de 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 10-25% de lignina, além de pequenas quantidades de outros componentes, tais como extrativos, cerca de 5-20% (AGUIAR, 2011).

As frações de hemicelulose presentes no colmo e as folhas da cana-de-açúcar apresentam teores elevados de açúcares por se tratar de um composto complexo formado por pentoses (OLIVEIRA, 2012). Além dos açúcares arabinoxilanos, betaglucanos e xiloglucanos, a hemicelulose contém pectinas, que juntas perfazem um total de 70% dos açúcares presentes na parede celular da cana, o que pode aumentar significativamente a produção de etanol de segunda geração.

As hemiceluloses e as pectinas possuem muitos aglomerados de açúcares de cinco carbonos (pentoses) que são indigestos à levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual utiliza a glicose e a frutose derivada da molécula de celulose. Em concordância com Oliveira (2012), pode-se afirmar que, um melhor aproveitamento das pentoses pode aumentar a produção de etanol em mais 5 bilhões de litros/ano, o que, atualmente, é de 25 bilhões de litros por ano no Brasil.

2.2. Bagaço de cana-de-açúcar

Entre as biomassas agroindustriais de maior importância no Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ocupa uma posição destaque. Pandey e Soccol (2000) enfatizam que este resíduo tem concentração elevada de carboidratos, é de baixo custo de colheita, de transporte e de armazenagem e de fácil utilização, o que torna este resíduo matéria-prima de muitos processos e produtos.

Por ser uma biomassa composta majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, o uso do bagaço na produção de inúmeros produtos de interesse industrial confere a estes um valor agregado muito maior. Dentre esses produtos, estão polímeros, ácidos (acético, succínico, urônico, entre outros), monossacarídeos, fenol, xilitol, sorbitol e produtos químicos em geral. Ainda, esta biomassa é altamente considerada para a produção de etanol de segunda geração.

Estima-se que a conversão do bagaço a etanol resulta num aumento de 30% na produção de álcool, sem a necessidade de se aumentar a área agrícola de plantio da

cana. Esta prática evitaria assim a grande polêmica sobre a substituição de terras agrícolas destinadas ao plantio de alimentos pela lavoura de cana-de-açúcar (GONÇALVES, 2007).

2.2.1. Características do bagaço de cana-de-açúcar

Do ponto de vista físico, o bagaço de cana-de-açúcar é constituído por quatro frações distintas, cuja percentagem média é 45% de fibra ou bagaço, 2-3% de sólidos insolúveis, 2-3% de sólidos solúveis e 50% de água (TAUPIER; RODRIGUES, 1999).

De acordo com Escobar (2010), a composição fibrosa média do bagaço (Figura 1) tem 40% de celulose, 25% de hemicelulose, 25% de lignina e 10% de outros constituintes (Tabela 1). Estas concentrações podem variar de acordo com a idade da planta e do bagaço propriamente dito, condições edafoclimáticas, processamento industrial, entre outros.

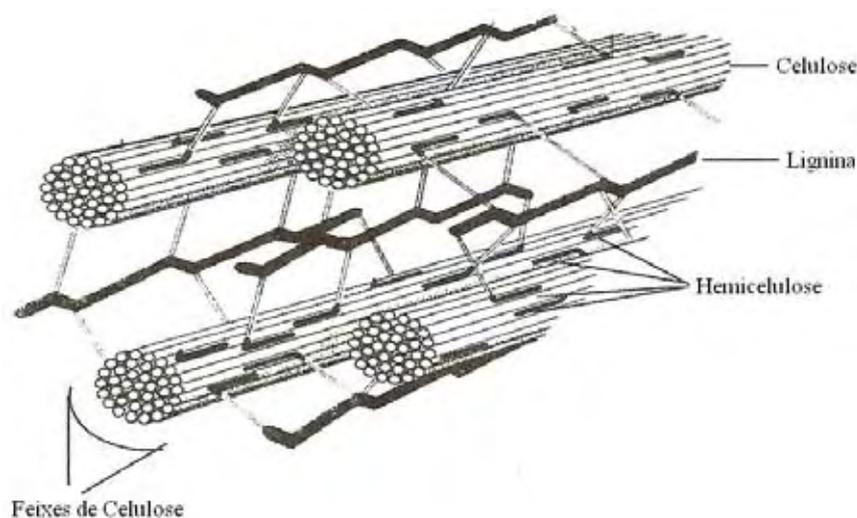


Figura 1. Principais constituintes do bagaço de cana-de-açúcar (MURPHY; McCARTHY, 2009).

Tabela 1. Composição média da fibra do bagaço de cana-de-açúcar conforme descrito por Rosa e Garcia (2009).

Composição média da fibra do bagaço de cana-de-açúcar (%)	
Celulose	26,6 - 54,3
Hemicelulose	14,3 - 24,4
Lignina	22,7 - 29,7

2.2.1.1. Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear não ramificado que consiste em unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Na figura 2 tem-se a representação da cadeia linear da celulose, formada de várias unidades consecutivas de celobiose, um dissacarídeo de D-glicose. As longas cadeias de glicose combinadas formam microfibrilas que tornam a celulose resistente. O conjunto de microfibrilas são organizadas em lamelas, para formar a estrutura fibrosa das várias camadas da parede celular vegetal. As microfibrilas de celulose são revestidas com hemicelulose e embebidas em lignina, formando os materiais lignocelulósicos (JOHN et al., 2002).

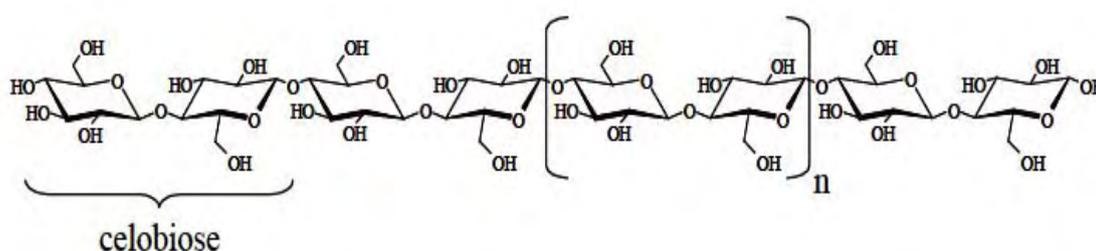


Figura 2. Representação da cadeia linear de celulose (TIMAR-BALÁZSY, 1998).

2.2.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo formado por uma mistura complexa de açúcares altamente ramificados (Figura 3). A xilose constitui o maior componente da hemicelulose, fazendo parte de um complexo de carboidratos poliméricos cuja estrutura corresponde a um polímero de D-xiloses unidas por ligações β -1,4 (BALAT et al., 2008). Os xilanos, arabinoxilanos, galactomananos, glucomananos e xiloglucanos são as classes mais frequentes de hemicelulose.

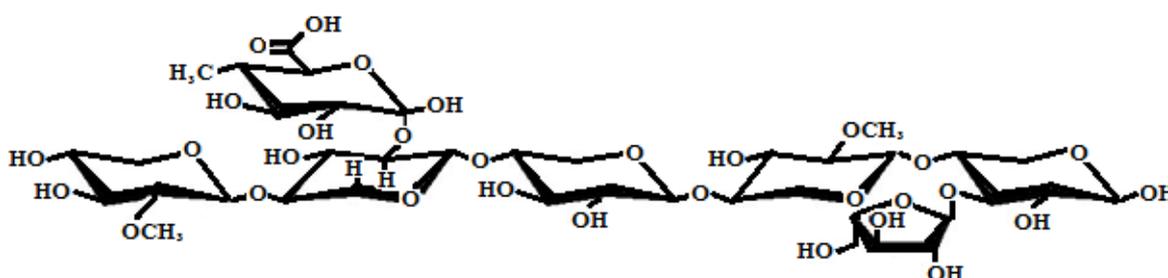


Figura 3. Representação da hemicelulose (McDOUGALL, 1993).

2.2.1.3. Lignina

A lignina (Figura 4) é um polímero derivado de grupos fenilpropanóides, repetidos de forma irregular, que têm sua origem na polimerização desidrogenada dos álcoois coniferílico, *p*-cumarílico e sinapílico (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Os polímeros fenilpropanóides da lignina são altamente condensados e muito resistentes à degradação. A lignina é o mais importante componente não-carboidrato da biomassa lignocelulósica. Ela é depositada na rede de carboidratos da parede celular secundária das plantas, durante o seu crescimento.

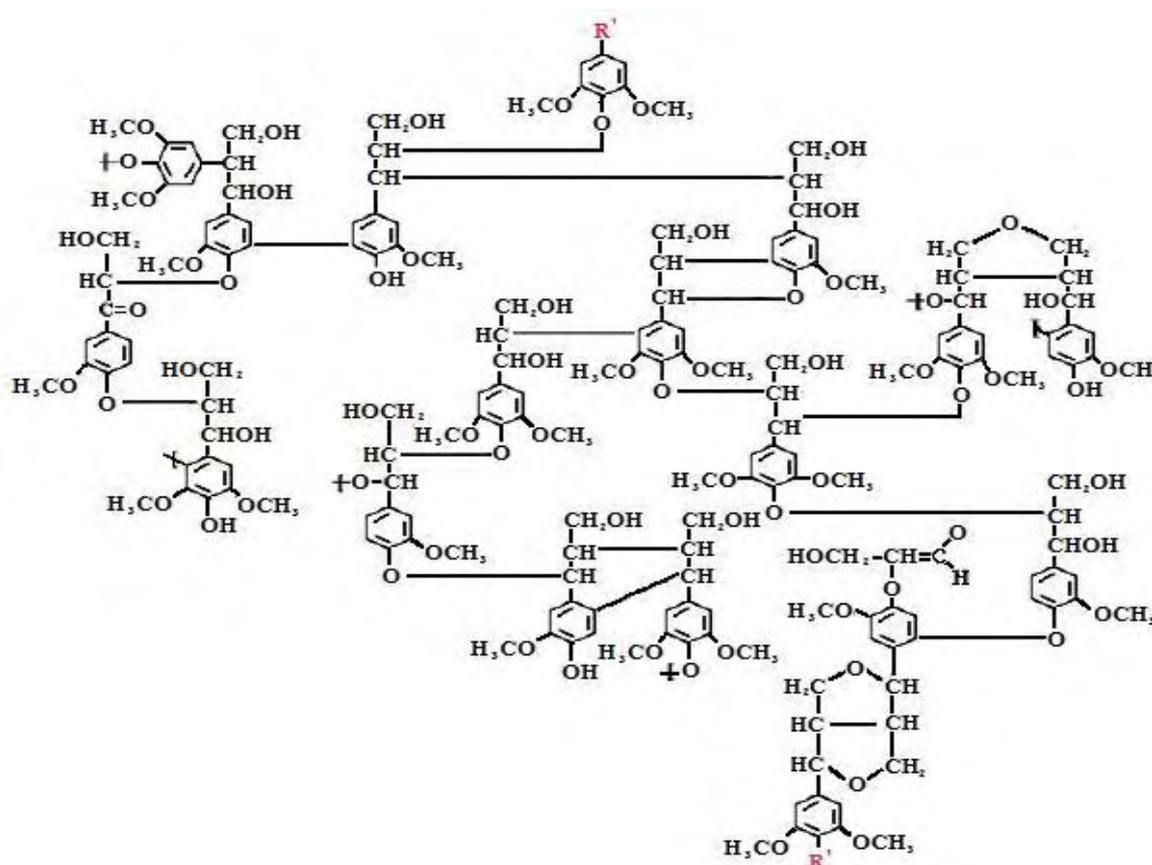


Figura 4. Representação da lignina (FENGEL; WEGNER, 1991)

2.3. Processos hidrolíticos

A hidrólise de celulose permite a conversão desta em glicose $[(C_6H_{10}O_5)_n + H_2O \rightarrow n C_6H_{12}O_6]$. O processo pode ser físico, químico ou biológico, sendo catalisado por temperaturas e pressões elevadas, ácidos (ou bases), e enzimas, respectivamente, ou combinações destes.

2.3.1. Hidrólise Física

2.3.1.1. Explosão a Vapor

A explosão a vapor consiste em submeter a biomassa celulósica à temperaturas e pressões elevadas. Estas condições severas causam um rearranjo estrutural da parede celular da biomassa, expondo assim a lignina, a celulose e a hemicelulose à subsequente conversão em açúcares (RAMOS, 2000).

As condições ótimas de temperatura e tempo de exposição podem variar de 160 °C a 270 °C, por períodos de 1 a 20 minutos, sendo que, em condições severas, ocorre perda considerável de açúcar (SUN et al., 2002). Além de degradar frações de açúcares, esse processo pode afetar a formação de outros subprodutos. Nesse caso, alguns compostos podem ser utilizados para melhorar esse processo tais como ácido sulfúrico, dióxido de enxofre ou gás carbônico.

2.3.1.2. Explosão de Fibra por Amônia (AFEX)

Esse método utiliza amônia líquida na dose de 1 a 2 Kg por Kg de biomassa celulósica. As temperaturas utilizadas nesse processo são de 90 a 100 °C e os tempos de exposição variam entre 10 a 60 minutos.

Por ser um tratamento alcalino, as taxas de solubilização de hemicelulose e lignina são pequenas. Sua eficiência diminui com o teor elevado de lignina na biomassa. Este tratamento tem as vantagens de não produzir compostos inibidores aos tratamentos biológicos, fermentação e digestão.

2.3.1.3. Explosão de CO₂

Os gases também podem ser utilizados na explosão de biomassa lignocelulósica ocasionando a exposição da lignina, celulose e hemicelulose à subsequente conversão em açúcares. O dióxido de carbono submetido à temperatura de 31 °C e pressão elevada (72,9 atm/7,39 MPa), comporta-se como um fluido supercrítico. Nesta condição, o CO₂ expande-se como um gás, preenchendo os espaços da biomassa; mas, a sua densidade é semelhante a de um líquido. A utilização de CO₂ supercrítico oferece várias vantagens, uma vez que não é tóxico, não inflamável, de fácil recuperação após extração e não poluidor.

As moléculas de CO₂ são pequenas, de fácil penetração na biomassa lignocelulósica, assim como acontece com a água e amônia. O CO₂ age na deslignificação e aumenta a área de superfície acessível ao ataque enzimático subsequente. Isto é em parte devido à formação de ácido carbônico, quando CO₂ é dissolvido em água, o que irá atuar na hidrólise da hemicelulose. A eficiência pode melhorar com o uso de co-solventes tais como etanol-água ou ácido acético-água.

2.3.1.4. Água Quente Pressurizada

Consiste em cozinhar os materiais lignocelulósicos em água quente sob pressão, com temperaturas entre 180 °C e 270 °C. Esse processo expõe as fibras de celulose, tornando a superfície destas, acessíveis e mais susceptíveis ao ataque enzimático.

2.3.2. Hidrólise química

2.3.2.1. Hidrólise ácida

Esse método utiliza soluções diluídas ou concentradas de ácidos comumente utilizados nas indústrias, tais como ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido carbônico, com grande destaque para o ácido sulfúrico, ao qual apresenta uma maior eficiência no processo.

O processo com ácidos diluídos utiliza temperaturas e pressões elevadas variando de 180-230 °C, com tempos de reação de segundos a minutos, o que facilita o uso de processos contínuos. Já os processos com ácido concentrado são conduzidos em baixa temperatura (cerca de 30 °C), com tempos de reação tipicamente curtos.

De acordo com Hamelink et al. (2005), a combinação de alguns processos, sejam eles físicos, químicos e/ou biológicos, podem aumentar significativamente o rendimento da glicose, após a hidrólise (Tabela 2). O uso de um método físico é essencial para a viabilização do processo hidrolítico.

Tabela 2. Rendimento porcentual de glicose após combinação de processos químico, físico e biológico.

Métodos	Consumo	Temperatura, °C	Tempo	Rendimento de glicose, %
Ácido diluído ^(q)	<1% H ₂ SO ₄	215 ^(f)	3 min	50 a 70
Ácido concentrado ^(q)	30 a 70 % H ₂ SO ₄	40 ^(f)	2 a 6 h	90
Enzimático ^(b)	Celulase	70 ^(f)	36 h	75 a 95

^(q) = método químicos; ^(f) = método físico; ^(b) = método biológico.

A hidrólise ácida inicia-se com a protonação do oxigênio glicosídico com posterior quebra da ligação. O carbocátion gerado é liberado pela deslocalização do par de elétrons existente sobre o oxigênio do anel glicosídico, adjacente ao carbono. O ataque nucleofídico da água sobre o carbono com regeneração do ácido, encerra a etapa de despolimerização ou de produção da glicose (Figura 5).

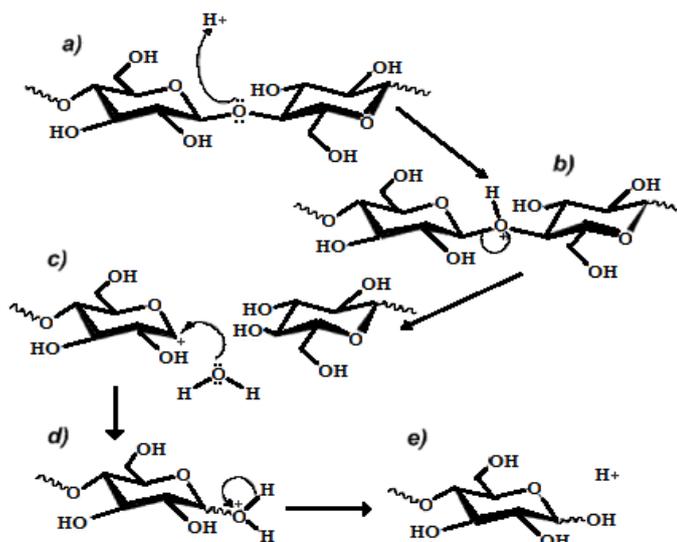


Figura 5. Ilustração de hidrólise da celulose catalisada por ácidos (OGEDA; PETRI, 2010).

Durante o processo de hidrólise, há liberação de xilose que é rapidamente degradada a furfural e outros co-produtos de condensação, os quais são inibitórios a microrganismos (RAO et al., 2006). Além de formar compostos inibidores para subsequente fermentação, a hidrólise ácida apresenta outros problemas, tais como, condições de manuseio severas (pH e temperatura) e custo de manutenção elevado, devido a problemas de corrosão.

2.3.2.2. Hidrólise alcalina

Esse método utiliza compostos alcalinos para hidrolisar resíduos agrícolas de baixo valor nutritivo. O Hidróxido de Sódio, NaOH, é o reagente mais utilizado nesse processo, embora muitos outros compostos importantes também são empregados como o hidróxido de cálcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$, a amônia anidra NH_3 e o cal virgem (Óxido de Cálcio, CaO).

Esses agentes atuam solubilizando parcialmente a hemicelulose além de proporcionar o aumento na digestão da celulose. Embora a literatura apresente resultados positivos ao uso do NaOH, Mari e Nussio (2004) relatam que a utilização do tratamento de cana-de-açúcar com NaOH não demonstrou diferenças entre o produto tratado quando comparado ao sem tratamento. Uma das justificativas para essa observação seria o tamanho de partícula da cana-de-açúcar após o corte.

2.3.2.3. Hidrólise enzimática

O processo de conversão da celulose à glicose, catalisada pela enzima celulase, possui baixa eficiência quando comparada aos demais processos hidrolíticos. A celulase tem dificuldade de interação com os sítios ativos do substrato, face à estrutura altamente cristalina da celulose. De acordo com Ogeda e Petri (2010), o rendimento de açúcar é menor que 20%, enquanto que, se uma etapa de pré-tratamento for utilizada, pode alcançar níveis de até 90%. Isso ocorre devido à estrutura cristalina da celulose, cuja dificuldade de acesso aumenta ainda mais devido à presença de lignina sobre a superfície celulósica, a qual impede o intumescimento das fibras. Deste modo, torna-se necessário remover a lignina, expondo assim, as moléculas de glicose e hemicelulose à ação hidrolítica.

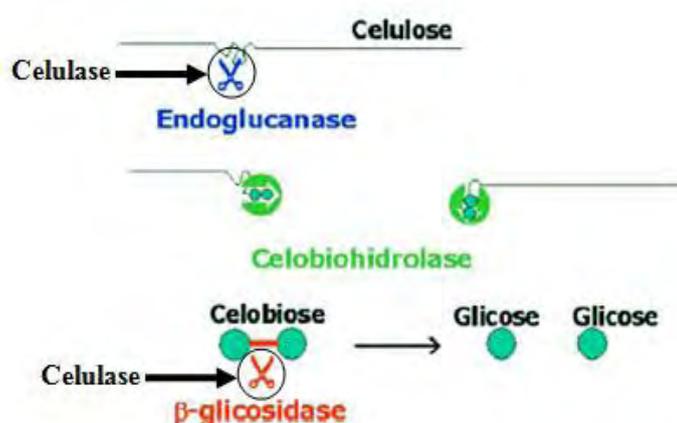


Figura 6. Esquema da ação da celulase sobre a molécula de celulose (TÉBÉKA et al., 2009).

A lignocelulose é altamente resistente ao ataque enzimático tornando necessária uma etapa de pré-tratamento, tanto a fim de quebrar a estrutura cristalina da lignocelulose quanto a fim de remover a lignina, expondo as moléculas de celulose e hemicelulose à ação enzimática. A remoção da lignina é iniciada justamente através de pré-tratamentos químicos, os quais incluem ácidos e/ou bases, ou oxidativos. Em pré-tratamentos com ácidos, a hemicelulose é hidrolisada, enquanto que nos pré-tratamentos com bases, a hemicelulose é degradada pelo uso de enzimas hemicelulolíticas.

Na sequência dos tratamentos químicos têm-se os tratamentos biológicos, com utilização de fungos e algumas bactérias (actinobactérias). Nestes processos, os microrganismos secretam enzimas extracelulares como lignina peroxidase e lacase que removem uma quantidade considerável de lignina da biomassa celulósica (OGEDA; PETRI, 2010). A atividade enzimática varia conforme os pré-tratamentos utilizados pois a maior parte difere nos tipos de mecanismos responsáveis pelas modificações estruturais e químicas da parede celular, que resultam numa acessibilidade melhorada da enzima, além de rendimentos maiores.

As enzimas comerciais celulases e xilanases tem se destacado no processo de hidrólise enzimática por possuírem eficiência elevada na hidrólise da celulose. No entanto, a utilização dessas enzimas tem inviabilizado o processo industrial por terem valor agregado elevado. Uma das alternativas para viabilizar o uso do processo enzimático é otimizar métodos para produção de enzimas potencialmente conversoras de celulose em glicose.

Regina et al. (2009) relata a importância de cultivar fungos potencialmente produtores das enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, as quais degradam moléculas de celulose, hemicelulose e lignina. Entre as principais espécies estudadas, tem-se destacado os cogumelos *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Pycnoporus sanguineus*.

Dentre as enzimas peroxidases secretadas por alguns basidiomicetos destacam-se a lignina peroxidase e manganês peroxidase. Na figura 7 é apresentado um esquema da degradação da lignina através da rota metabólica de síntese de enzimas hidrolíticas por basidiomicetos.

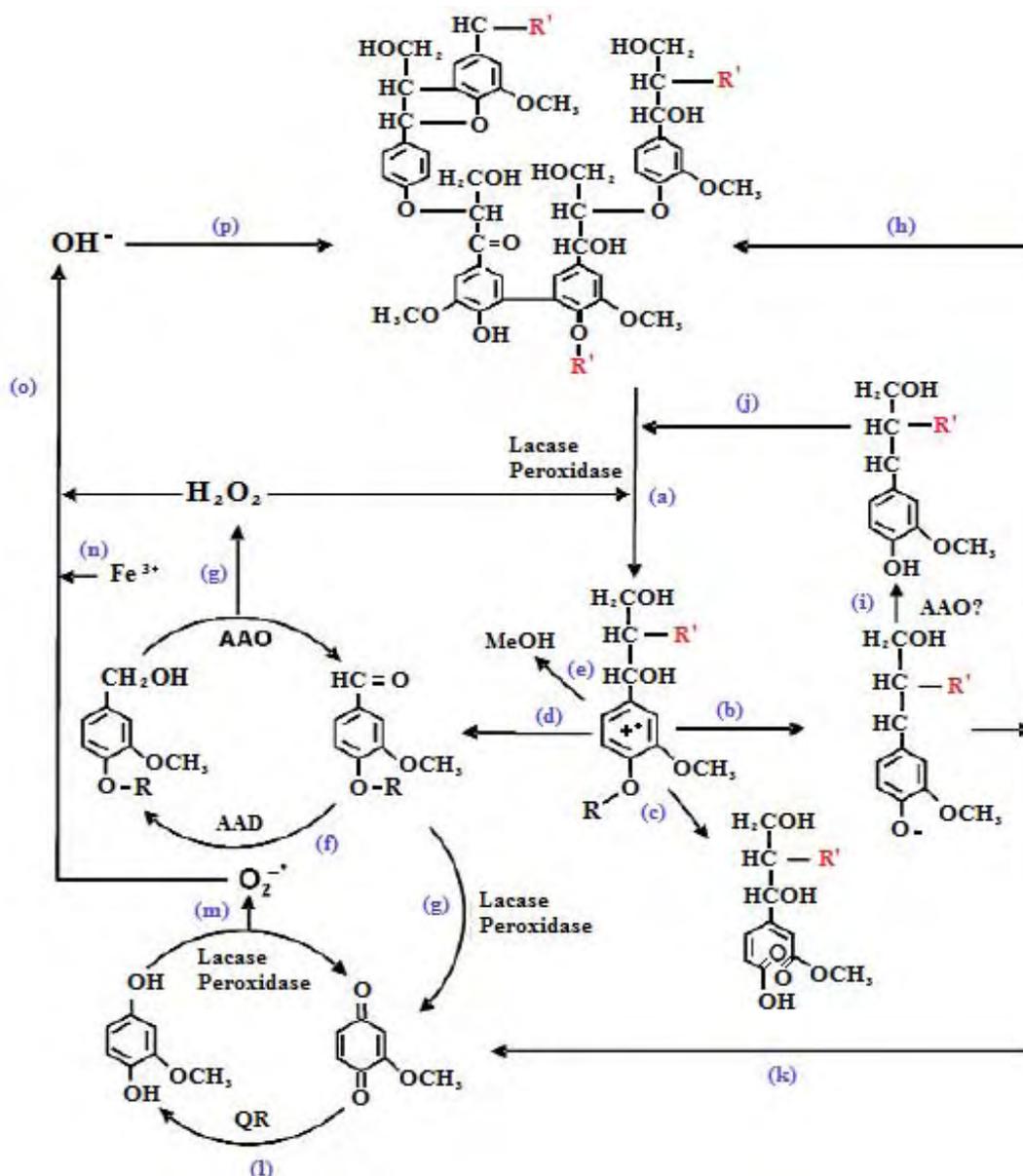


Figura 7. Esquema para a biodegradação de lignina, incluindo reações enzimáticas e ativação de oxigênio (MARTINEZ et al., 2005). R' = lignina; AAD = aril-álcool desidrogenase; AAO = aril-álcool oxidase; MeOH = desmetoxilação; QR = quinona redutases.

Como demonstrado na figura 7, as enzimas lacases, lignina peroxidase e manganês peroxidase, oxidam o polímero de lignina liberando radicais aromáticos (a). Durante essa ação enzimática estão envolvidas também reações não enzimáticas, como a hidrólise do éter (b), clivagem do anel aromático (c), quebra das ligações $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ da lignina (d) e desmetoxilação (e). Os aldeídos aromáticos formados da quebra do $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ da lignina

podem ser novamente sintetizados pelo fungo (**f**, **g**), sendo substrato para geração de H_2O_2 por AAO (Aril-álcool oxidase) em uma reação de oxiredução envolvendo também AAD (aril-álcool dehidrogenase) (MARTINEZ, 2005).

Os radicais fenólicos resultantes da quebra do C4-eter (**b**) podem ser repolimerizados em polímero de lignina (**h**), caso não forem primeiramente reduzidos por oxidases em compostos fenólicos (**i**) por AAO. Esses compostos fenólicos formados podem ser novamente reoxidados por lacases e peroxidases. Os radicais fenólicos podem ainda sofrer a quebra dos $C\alpha-C\beta$ (**k**), produzindo quinonas. Quinonas provenientes de **g** e/ou **k** contribuem para ativação do oxigênio nas reações cíclicas de oxiredução envolvendo QR (quinona redutases) lacases e peroxidases (**l**, **m**). Essas reações resultam na redução do íon férrico presente na madeira (**n**), onde ocorre a reoxidação com concomitante redução de H_2O_2 para a radical hidroxila livre (OH^\cdot) (**o**). O resultado é uma forte reação oxidante que pode iniciar novamente o ataque a lignina (**p**) nos estágios iniciais de decomposição da madeira (MARTINEZ, 2005).

2.3.2.4. Lacase

A lacase é uma polifenol oxidase caracterizada como multicobre-oxidases por conter, em seu sítio ativo, 4 átomos de cobre. O mecanismo geral de atuação da lacase é a oxidação do substrato através da abstração de um elétron de um composto fenólico, gerando um radical fenoxila, agindo na clivagem das cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina. As lacases não são dependentes de H_2O_2 para sua atividade. O íon cobre (Cu^{+2}) presente em seu sítio ativo remove o fenilpropano mais externo à cadeia, gerando radicais fenoloxila. Esses radicais atuam em reações catalíticas, como acoplamento radical-radical, desprotonação a ataques nucleofílicos pela água, levando as reações de polimerização, quebras e oxidações nos centros ativos e desmetilações. Alguns intermediários aromáticos de baixo peso molecular acabam também liberandos resultando na despolimerização da lignina. Esta enzima atua na destoxificação de compostos e também pode oxidar grupos fenólicos, agindo como enzima inicial na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina.

A lacase tem sido encontrada em diferentes gêneros de ascomicetos, alguns deuteromicetos e principalmente basidiomicetos. Os melhores produtores de lacase são

basidiomicetos pertencentes ao grupo de decomposição branca, sendo eficientes degradadores de madeira e sua especificidade depende do fungo, podendo oxidar diferentes substratos (SZKLARZ et al., 1989). O pH ótimo de atividade pode variar de 2,5 a 3,5 (pH ácido) ou de 6 a 7 (pH neutro).

A participação de lacase na degradação da lignina foi considerada, por muitos anos, limitada a oxidação de unidades fenólicas, que compreendem de 10 a 20% do polímero. Entretanto, foi demonstrado que esta enzima também pode oxidar unidades não fenólicas de lignina na presença de certos compostos, conhecidos como mediadores, que incluem substratos artificiais e metabólitos fúngicos (EGGERT et al., 1996).

Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, as lacases de origem fúngicas tem recebido atenção em diversas aplicações industriais como deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes em processos têxteis, síntese de produtos químicos/medicinais e remediação de solos e águas contaminadas (FERREIRA, 2009).

Com base nessas informações, Aguiar et al. (2010) selecionaram quatro espécies de fungos, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus ostreatoroseus*, *P. ostreatus* e *Trichoderma reesei*, e incubaram em vinhaça por trinta dias a 30 °C. As atividades enzimáticas da lacase variaram, sendo encontrada em maior quantidade em *P. ostreatus* com 298,46 e 325,23 UI^L, após o 18º e 21º dia de incubação, respectivamente. O fungo *P. sajor-caju* obteve maior atividade no 6º dia de cultivo com 10,53 UI^L, diminuindo para 1,09 UI^L. Para os fungos *P. ostreatoroseus* e *T. reesei* não foi detectada atividade de lacase.

2.3.2.5. Manganês Peroxidase

Kuwahara et al., (1984) foi o primeiro autor a descrever a peroxidase como dependente do manganês. Esta peroxidase necessita de peróxido de hidrogênio como co-substrato, atuando como catalisar na oxidação de Mn²⁺ a Mn³⁺. O íon Mn³⁺ complexado com um ácido orgânico atua como agente primário na hidrólise da lignina. Dessa forma, a MnP é considerada uma enzima chave na ligninólise por fungos da podridão branca.

A enzima manganês peroxidase é uma glicoproteína, dependente de peróxido de hidrogênio para sua atividade. A oxidação de lignina por MnP é dependente da disponibilidade de íons de manganês. Seu ciclo catalítico é semelhante ao da LiP mas, no

entanto, o Mn^{2+} atua como doador de elétrons para gerar o composto II. A enzima possui a capacidade de oxidar uma vasta gama de compostos de lignina aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. A MnP age principalmente em compostos fenólicos, embora a oxidação de substratos não fenólicos tenha sido verificada durante o processo conhecido como peroxidação lipídica (BAO et al., 1994).

Essa enzima é encontrada em fungos ligninolíticos, agindo conjuntamente com LiP e a lacase na biodegradação da lignina ou de compostos relacionados a ela (HAWARI et al., 2000). A MnP de fungos causadores da podridão branca vêm sendo empregadas em estudos de biodegradação da lignina, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, ácidos húmicos, corantes sintéticos, poluentes clorados (HAAS et al., 2004).

O notável potencial degradativo da MnP faz dela uma enzima atrativa para aplicações biotecnológicas, como o branqueamento de polpa kraft e celulose e a remoção de resíduos poluentes, na descoloração de corantes sintéticos utilizados nas indústrias têxteis. Além disso, vem sendo empregada em estudos de biodegradação da lignina fazendo desta uma enzima atrativa para aplicações biotecnológicas, como a sua utilização na produção de etanol de segunda geração.

Aguiar et al. (2010), também avaliaram a atividade de MnP nos fungos *P. sajor-caju*, *P. ostreatoroseus*, *P. ostreatus* e *T. reesei* cultivados em vinhaça. A espécie *P. sajor-caju* mostrou maior atividade no 12º dia de incubação, atingindo um pico de 17,93 UI^L. Para o *P. ostreatus* foi detectado o valor máximo de 27,69 UI^L (21º dia) enquanto que o *T. reesei* obteve uma atividade elevada entre os 15º e 18º dia, com 19,02 UI^L e 18,08 UI^L, respectivamente. A atividade em *P. ostreatoroseus* não foi detectada para esta enzima.

Oliveira et al. (2009), avaliaram a produção de MnP em *Bacillus pumilus* e *Paenibacillus sp* quando submetidos à presença e ausência de cinco indutores: indulina AT, guaiacol, álcool veratrílico, ácido lignocelulósico e ácido lignocelulósico dissulfonado. A indulina AT aumentou a atividade de MnP em *B. pumilus* para 31,66 U^L após 8 horas; não foi observada melhora para *Paenibacillus sp.*, o qual atingiu uma máxima atividade de 12,22 U^L, depois de 20 h. A atividade de MnP também foi detectada em diferentes testes de pH (5,0 a 10,0) e de temperaturas (30º a 60ºC); a atividade máxima para *B. pumilus* e *Paenibacillus sp.* foi de 4,3 U^L (a pH 8,0 e 25ºC) e 11,74 U^L (a pH 9,0 e 35ºC), respectivamente.

Fujihara et al. (2010) avaliaram a produção de MnP por fungos de podridão branca em meio basal e em meio de águas residuais de processamento de batata. A atividade dessa enzima em meio basal foi de 2,3 U^{-L} (13° dia) e em meio de águas residuais de processamento de batata foi de 5,75 U^{-L} (12° e 14° dia).

2.3.2.6. Lignina Peroxidase

A enzima lignina peroxidase é uma glicoproteína, dependente de peróxido de hidrogênio para sua atividade. No processo de degradação da lignina, a LiP é inicialmente oxidada pelo peróxido de hidrogênio H₂O₂ e a seguir, esta enzima oxida núcleos aromáticos da molécula de lignina (fenólicos e não fenólicos), gerando radicais catiônicos. Estes últimos reagem espontaneamente com nucleófilos (primariamente H₂O) e com oxigênio molecular, gerando uma “combustão enzimática“, despolimerizando a lignina e abrindo os anéis aromáticos. A LiP oxida a lignina por retirada de elétron de um núcleo aromático, criando radical instável que passa por diversas transformações levando a decomposição do substrato. A ação da enzima LiP resulta em oxidação de alcoóis benzílicos, quebra de cadeias aromáticas, desmetilação, rearranjos intramoleculares e quebra de anéis em compostos não fenólicos relacionados a lignina. A lignina peroxidase geralmente é produzida na fase exponencial de crescimento dos fungos, subsequentemente a ação das enzimas celulolíticas.

A ação das enzimas ligninolíticas extracelulares na degradação de materiais lignocelulósicos tem sido observada também na descoloração de efluente têxteis e papelero, da degradação de compostos poluentes como fenóis, pesticidas e explosivos e também na descoloração de subprodutos resultantes da produção de álcool, como a vinhaça e o melaço (FERREIRA et al., 2010).

A atividade da enzima LiP foi determinada por Aguiar et al. (2010), em quatro fungos cultivados em vinhaça. A atividade em *P. sajor-caju* foi elevada nos primeiros seis dias de incubação com 7,5 UI^{-L} e depois, diminui gradativamente. Para *P. ostreatus* foi encontrado o valor de 19,84 UI^{-L} (15° dia), sendo o maior entre as culturas estudadas. O *P. ostreatoroseus* não mostrou qualquer atividade para essa enzima, enquanto que *T. reesei* teve baixa detecção, 4,64 UI^{-L} no 21° dia.

2.4. Cogumelos basidiomicetos com potencial enzimático

A procura por microrganismos capazes de converter biomassa lignocelulósica tem se destacado devido à facilidade de cultivo e metabolismo elevado destes. Diversas literaturas ressaltam a utilização de fungos basidiomicetos como excelentes degradadores de moléculas de lignina, celulose e hemicelulose, destacando-se *L. edodes*, *P. ostreatus*, *P. eryngii* e *P. sanguineus*.

A grande capacidade de reprodução de *L. edodes* está ligada às enzimas extracelulares que atuam sobre a lignina, celulose e hemicelulose que compõem a estrutura da parede celular da biomassa vegetal e que resulta em um artigo com alto valor agregado, o etanol (REGINA et al., 2009). A degradação da celulose varia de 35,4 a 74,0%, a de hemicelulose, de 8,4 a 63,4% e a de lignina entre 5,3 e 62,1% (SMITH, 1977; HAARS; HUTTERMANN, 1980; LEATHAM; STAHMANN, 1981; LEATHAM, 1985). Entre as enzimas extracelulares do sistema enzimático do *L. edodes* estão a lacase e a manganês peroxidase (MnP).

O *P. ostreatus* também tem sido estudado intensivamente em muitas partes do mundo por ser grande degradador de diferentes tipos de substratos lignocelulósicos (SALES-CAMPOS et al., 2010). Esse potencial degradador é devido às enzimas celulase, ligninase, celobiase, lacase e hemicelulase, encontradas em seu metabolismo (DONINI et al., 2006). Consequentemente, o fato de produzir diversas enzimas lignocelulolíticas, principalmente lacase e MnP, possibilita a utilização desse fungo em numerosas aplicações industriais (ALEXANDRINO et al., 2007).

O *P. eryngii* produz enzimas hidrolíticas e oxidativas extracelulares que degradam os componentes de biomassa lignocelulósica para compostos de baixo peso molecular, assimilados pelo fungo (CARAMELO et al., 1999).

Dados da literatura mostram que o *P. sanguineus* é capaz de hidrolisar os polissacarídeos da parede celular e também a lignina de materiais celulósicos. Esse fungo é excelente produtor de lacase, além de lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), quando cultivados em meio com extrato de malte.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Biomassa agroindustrial

O bagaço de cana-de-açúcar foi fornecido pela Usina São Manuel, localizada no Município de São Manuel, São Paulo.



Figura 8. Local de armazenamento de bagaço de cana-de-açúcar na Usina São Manuel

3.1.1.1. Redução granulométrica

O bagaço foi submetido a moagem para redução de sua granulometria para 1,1mm para proporcionar maior superfície de contato com o ácido utilizado na hidrólise e, conseqüentemente, aumentar a eficiência do processo.

3.1.1.2. Remoção de açúcares residuais no bagaço de cana

Devido à presença de açúcares residuais e considerável teor de água no bagaço de cana-de-açúcar, o mesmo foi submetido à lavagem com água quente para remoção destes açúcares residuais. O procedimento consistiu em misturar 50g de bagaço em 1L de água destilada em recipiente de vidro, submetendo-o a aquecimento em banho-maria, a 70 °C constante por 1 h, procedendo-se a homogeneização a cada 10 minutos. Em seguida, o material foi filtrado em tela de nylon e lavado com 250 mL de água destilada. Este procedimento de aquecimento e posterior lavagem foram repetidos por duas vezes com o mesmo bagaço. Em seguida, o material foi seco em estufa com circulação de ar 60 °C por 72 h, e armazenado em saco de papel e local seco.

3.1.2. Linhagens fúngicas

Os fungos utilizados foram o *Pycnoporus sanguineus* linhagem JAÚ-30 (depositada na Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica sob número CCIBt 3817), o *Lentinula edodes* linhagem CH, o *Pleurotus eryngii* PSP 02/07 e o *Pleurotus ostreatus* 98/38 (todos cultivados na Micoteca do Módulo de Cogumelo do Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Campus de Botucatu, SP).

3.1.2.1. Multiplicação das Linhagens

3.1.2.1.1 Cultivo em meio de cultura sólida

Foi realizada a inoculação das linhagens em meio de cultura à base de extrato contendo uma mistura de 158g do bagaço de cana, 40g de farelo arroz, 2g de CaCO₃ e água destilada para obtenção da umidade a 60%. Inicialmente, a mistura foi autoclavada por 30 minutos a 120 °C (1atm). A seguir, o extrato foi preparado por adição de 1 L de água destilada à mistura e fervido por 20 minutos. O extrato foi filtrado à vácuo com funil de

buckner com placa porosa e papel de filtro e, ao extrato obtido foi adicionado 15g L^{-1} de ágar. O volume foi completado para 1 L e novamente autoclavado a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 atm), por 30 minutos. O meio de cultura foi então vertido em placas de petri e inoculado com as linhagens de *L. edodes*, *P. ostreatus*, *P. sanguineus* e *P. eryngii*. A incubação foi realizada na Micoteca do Módulo de Cogumelos do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, São Paulo, em câmara de crescimento, a temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, no escuro, por sete dias.

3.1.2.1.2 Cultivo em meio de cultura líquido

Após o crescimento das linhagens em meio sólido, foi realizado o preparo do meio de cultura líquido à base de extrato contendo uma mistura de 158g do bagaço de cana, 40g de farelo arroz, 2g de CaCO_3 e água destilada para obtenção da umidade a 60%. Inicialmente, a mistura foi autoclavada por 30 minutos a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1atm). A seguir, o extrato foi preparado por adição de 1 L de água destilada à mistura e fervido por 20 minutos. O extrato foi filtrado à vácuo com funil de buckner com placa porosa e papel de filtro, obtendo-se um caldo enriquecido do bagaço de cana. Posteriormente, foram transferidos 400 mL desse caldo para frascos de Erlenmeyers de 500 mL, os quais foram autoclavados a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 atm), por 30 minutos. A inoculação foi feita, em triplicata, recortando um disco com 1mm de diâmetro do meio de cultura sólido com as linhagens e introduzindo no caldo à base do bagaço. Os frascos foram mantidos em agitador orbital com rotação (Figura 9) de 150 rpm e temperatura controlada a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura 9. Incubação das linhagens fúngicas em meio de cultura líquido enriquecido de bagaço de cana.

3.2. Métodos analíticos

3.2.1. Hidrólise ácida

A hidrólise ácida foi realizada utilizando H_2SO_4 diluído na concentração de 7,0% na proporção de 1 g de biomassa: 40 g de ácido (m/m). A mistura foi submetida ao calor úmido sob pressão em autoclave 121 °C a 1 atm, por 60 minutos. Após a hidrólise, a mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo, seguido por lavagem com 230 mL de água destilada. Uma fração da biomassa foi separada para as determinações físico-químicas da fibra (item 3.1.5.) pelo método proposto por Van Soest (1965) e descrito por Silva e Queiroz (2002). A fração líquida foi submetida à determinação de percentual de açúcares redutores (AR) pelo método enzimático de glicose oxidativa (item 3.1.4.).

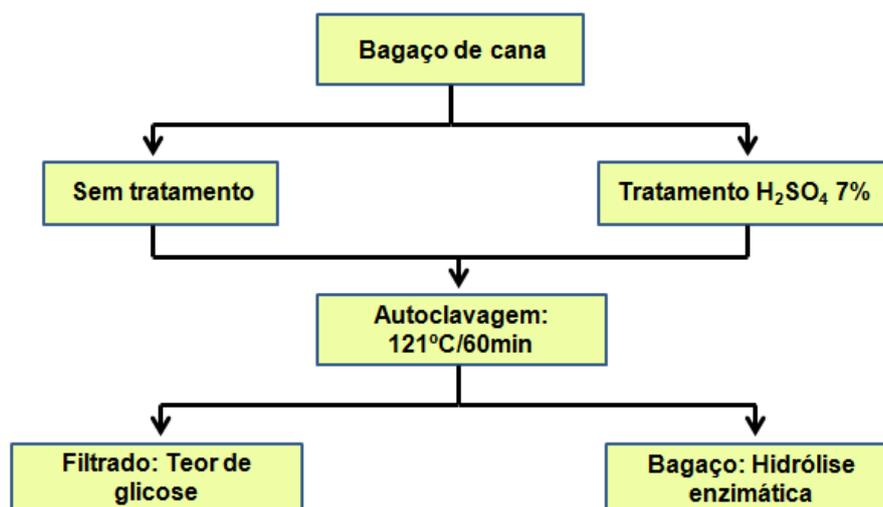


Figura 10. Fluxograma do processo de hidrólise no bagaço de cana sem tratamento e tratado com H_2SO_4 7%.

3.2.2. Concentração de açúcares redutores (AR)

Os açúcares redutores foram determinados conforme método kit enzimático glicose oxidativa. A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorbância medida em 505 nm, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.

Antes de iniciar o experimento da hidrólise enzimática, o bagaço da cana-de-açúcar foi avaliado quando a dosagem de glicose. Para isso, foi realizado três pré-tratamentos para comparação. O primeiro tratamento é caracterizado por uma lavagem de 2 horas com água quente para remoção de açúcar residual proveniente do processamento da cana (item 3.1.2.). O segundo tratamento constitui na submersão do bagaço de cana em água destinada e explosão a vapor, em autoclave, a temperatura de 120°C sob pressão de 1 atm por 1 hora. O terceiro tratamento é a submersão do bagaço de cana em solução diluída de H₂SO₄ 7%, submetidos a explosão a vapor em autoclave como dito anteriormente (item 3.1.3.).

3.2.3. Determinação dos constituintes do bagaço

Foram determinados os fibrosos do bagaço de cana percentuais de hemicelulose, celulose e lignina antes e após o tratamento ácido (Figura 11). A metodologia utilizada no processo foi a proposta por Van Soest (1965), descrita por Silva e Queiroz (2002).

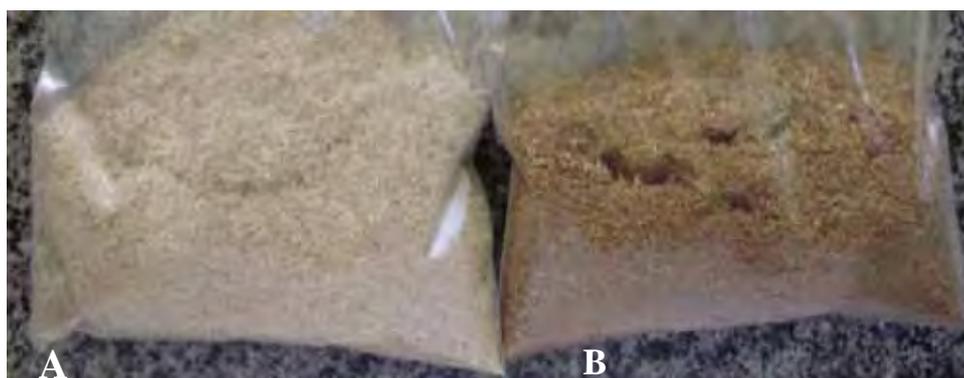


Figura 11. Bagaço de cana sem tratamento e tratado com H₂SO₄ 7%. (A) = bagaço de cana sem tratamento; (B) = bagaço de cana tratado com H₂SO₄ 7%.

Inicialmente, o bagaço foi triturado em moinho de faca para ter sua granulometria reduzida a 0,5 mm. Em seguida, foram pesados cerca de 0,35g da amostra em saquinhos de tecido TNT (Figura 12), sendo posteriormente lacrados em seladora. Os saquinhos foram submetidos ao processo de lavagem com detergente neutro (FDN) para a remoção de gorduras, ácidos graxos e outros componentes da parede celular. As amostras permaneceram em banho termostatilizado por 70 min à 97 °C. Ao final do tempo, ocorreu a lavagem das mesmas com água deionizada fervente por 5 minutos, em três vezes. Após essa etapa, as amostras foram lavadas com acetona a fim de retirar a água das mesmas e,

posteriormente, seguiram para secagem em estufa a 105 °C por 3h. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em dessecador, pesadas e submetidas ao cálculo por diferença de massas.



Figura 12. Saquinhos de tecido TNT contendo amostras de bagaço de cana com e sem tratamento ácido H_2SO_4 7%.

A próxima etapa foi submeter as mesmas amostras à lavagem com detergente ácido (FDA) para quantificar o teor de hemicelulose. Para isso, foi necessário submeter as amostras no banho termostátil por 60 minutos a 97 °C (Figura 13), seguido de lavagem com água e acetona. As amostras foram submetidas novamente à secagem em estufa por 3h a 105°C e novamente pesadas. O cálculo para o teor de hemicelulose consiste na diferença entre as massas finais e iniciais desse processo.



Figura 13. Amostras submersas em banho termostátil

Para a determinação da celulose, foi necessário submeter os saquinhos com as amostras dentro de um Becker contendo solução de ácido sulfúrico 72%. Após o embebedimento das amostras, foi observado o tempo de 3h. Ao término, os saquinhos foram retirados e lavados com água deionizada fervente por 5 min, em três vezes. Em seguida, foi realizada uma nova lavagem das amostras com etanol P.A. e submetidas a secagem, pesagem e cálculos. Para o cálculo, é feita a diferença das massas antes e depois desse processo.

Após o cálculo, as amostras foram levadas para calcinação em mufla por 3h e, posteriormente pesadas. A diferença entre a massa final calcinada e a massa inicial desse processo é o teor de lignina nas amostras.

3.2.4. Obtenção das enzimas

As enzimas foram obtidas cultivando-se as linhagens fúngicas em meio de cultura líquido (item 3.2.1.2.) à base do mesmo extrato utilizado para o meio de cultura sólido (item 3.2.1.1.). Após o início do desenvolvimento micelial, realizaram-se dez coletas para análise enzimática, sendo realizadas aos 3, 5, 7, 9, 11, 13, 16, 18, 20, 24 e 27 dias após a inoculação em meio de cultura líquido. Cada amostra fúngica contendo a mistura micélio e enzima coletada anteriormente foi acondicionada em eppendorf e centrifugadas (10.000 rpm) por 5 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para as análises enzimáticas. O procedimento foi realizado na Divisão de Agrotecnologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA da Unicamp.

3.3. Hidrólise enzimática

Nessa etapa, o conjunto enzimático da lacase, MnP e LiP obtido do cultivo dos fungos *L. edodes*, *P. ostreatus*, *P. sanguineus* e *P. eryngii* foram misturados ao bagaço tratado com H₂SO₄, 7%. Em vista de obter uma maior eficiência na hidrólise, foi realizado mais um tratamento chamado de Misto. Para a composição do tratamento Misto, foi utilizado 1 mL de cada uma das frações com maior atividade enzimática dos fungos, de acordo com a cinética enzimática, sendo eles *L. edodes*, *P. sanguineus* e *P. eryngii*, totalizando 3 mL de conjunto enzimático. A adição das enzimas nesse processo teve a finalidade de quebrar as moléculas constituintes no hidrolisado fazendo com que ocorresse formação de açúcares fermentescíveis no meio. Para isso, as hidrólises enzimáticas foram realizadas em frascos de

Erlenmeyer de 500 mL, contendo 150 mL de tampão citrato 50 mM, 2 mL de enzima fúngica obtida nos processos anteriores e 10 g de substrato pré-tratado. Os frascos foram mantidos em mesa incubadora rotativa Shaker, à 25 °C e 150 rpm. Ao final desse processo, foi calculada a cinética de açúcar fermentescível pelo kit de glicose oxidativa.

3.3.1. Atividade enzimática

3.3.1.1. Lacase

A atividade das enzimas lacase e manganês peroxidase foram determinadas a partir do cálculo da diferença de absorbância. Todas as atividades foram expressas em $U = \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$. A atividade da lacase foi determinada utilizando-se seringaldazina como substrato enzimático (SZKLARZ et al., 1989). A oxidação de seringaldazina até sua forma quinona foi acompanhada por 5 minutos a 525 nm, a temperatura ambiente. A mistura da reação foi constituída por 0,6 mL de caldo enzimático, 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), e 0,1 mL de seringaldazina 1,0mM preparada em etanol.

3.3.1.2. Manganês peroxidase

A atividade de peroxidase foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol (KUWAHARA et al., 1984). A mistura de reação (1,0 mL) foi constituída por 0,5 mL de caldo enzimático, 0,1mL de lactato de sódio 0,25M, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,05 mL de MnSO_4 2,0 mM, 0,05 mL de uma solução de H_2O_2 2,0 mM preparada em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura foi incubada durante 5 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 40 μL de NaOH 2,0 N, com a leitura em absorbância de 610 nm.

3.3.1.3. Lignina peroxidase

Quanto à determinação da lignina peroxidase, a mesma foi medida através da formação de veratrilaldeído (3,4 dimetoxibenzaldeído). O volume de reação (1 mL) foi composto por 0,4 mM de álcool veratril em tampão tartarato 0,1 M pH 3,0; 0,2 mM de

peróxido de hidrogênio e volume necessário de amostra. A atividade foi seguida em cinética a 30°C, medindo absorção a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.3.2. Delineamento experimental

Para a atividade enzimática, o delineamento foi inteiramente casualizado, fatorial 4 x 3 (4 linhagens fúngicas x 3 tipos de enzimas); 3 repetições. Para o processo de hidrólise enzimática, o delineamento foi casualizado, fatorial 5 x 1 x 2 (5 linhagens x 1 misto de enzimas x 2 tratamentos de biomassa); 3 repetições. Os dados foram analisados pelo programa SAEG (Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas) para análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 % de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos constituintes fibrosos do bagaço de cana-de-açúcar

A composição química dos constituintes fibrosos do bagaço (Figura 14) foi determinada para a biomassa com e sem tratamento ácido (H_2SO_4 7,0%).

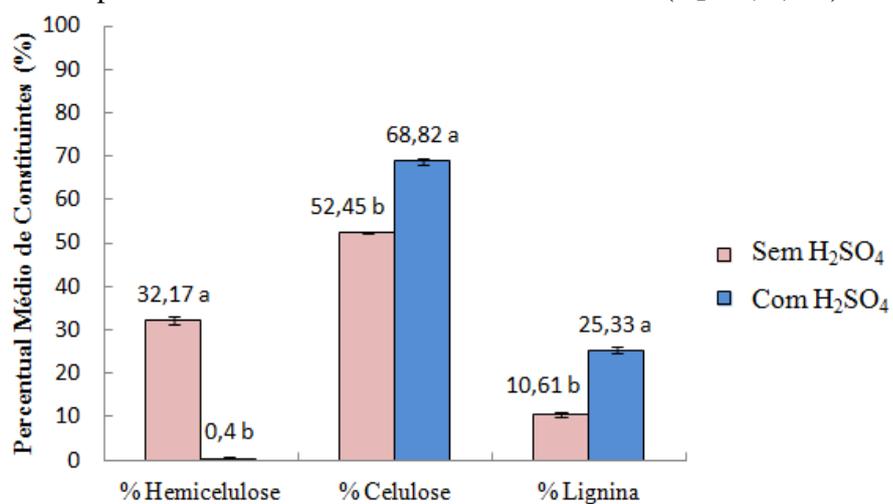


Figura 14. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar com e sem tratamento ácido (H_2SO_4 7,0%). Para cada constituinte, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

A hemicelulose foi quase totalmente degradada no processo de hidrólise ácida, o que proporciona uma maior exposição da celulose e da lignina. O tratamento ácido também possibilitou obter um elevado teor de lignina, provavelmente devido a formação do complexo hemicelulose e proteína com a lignina (SILVA; QUEIROZ, 2002). A exposição ácida do bagaço também resultou em uma maior quantidade de celulose, o que, originará maior teor de glicose, ocasionando consequentemente, maior rendimento em etanol.

4.1.1. Tratamento do bagaço de cana para hidrólise enzimática

Os resultados da dosagem de glicose para a água quente utilizada para remoção de açúcar residual proveniente do processamento da cana (item 3.1.2.), para a solução resultante do processo de autoclavagem do bagaço de cana submerso em água destilada e para a solução resultante do processo de autoclavagem do bagaço de cana submerso em solução diluída de H_2SO_4 7% (item 3.1.3.) encontram-se expressos na Figura 15.

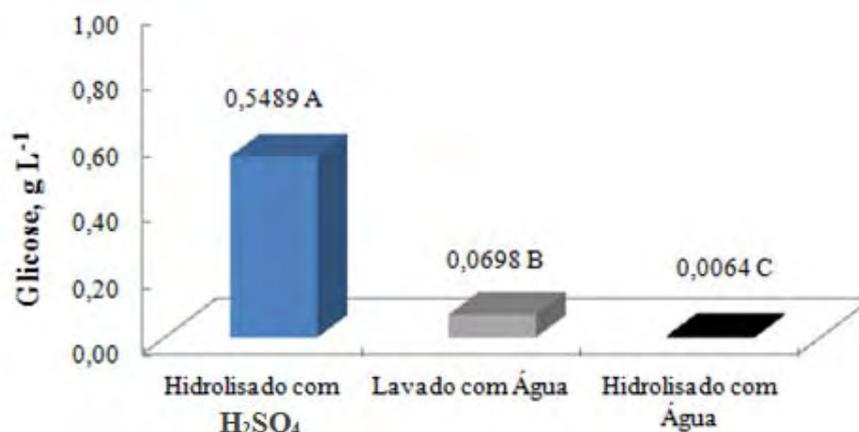


Figura 15. Dosagem de glicose na água de lavagem do bagaço de cana submetido a diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%). DMS = 0,0212; Coeficiente de Variação = 4,058.

Esses resultados se assemelham com os da literatura, comprovando que a ação de ácido forte em interação com o sistema de explosão a vapor consegue hidrolisar a hemicelulose, convertendo-a em açúcares redutores incluindo a glicose Hamelink et al. (2005).

4.2. Determinação da atividade enzimática

As amostras coletadas conforme descrito no item 3.2.1, foram analisadas quanto a atividade enzimática de lacase, LiP e MnP. A partir dos resultados obtidos nos diferentes tempos foi calculada a cinética enzimática.

4.2.1. Atividade enzimática de lacase

Entre as enzimas produzidas por fungos basidiomicetos, a lacase possui maior atividade enzimática. No presente trabalho, a lacase foi produzida por todas as linhagens cultivadas, destacando-se o *P. sanguineus* que obteve maior produção, com atividade de $85,07 \text{ U mL}^{-1}$, após 27 dias (Figura 16). O *L. edodes* também apresentou resultados satisfatórios, com atividade enzimática de lacase de $39,23 \text{ U mL}^{-1}$, no 25º dia.

As linhagens de *P. eryngii* e *P. ostreatus* apresentaram respectivamente, $16,45 \text{ U mL}^{-1}$ (no 14º dia) e $6,21 \text{ U mL}^{-1}$ (27º dia) como os melhores resultados de produção para a lacase. A literatura também apresenta diversas linhagens de *Pleurotus* com resultados baixos para a lacase, inferiores a 10 U mL^{-1} .

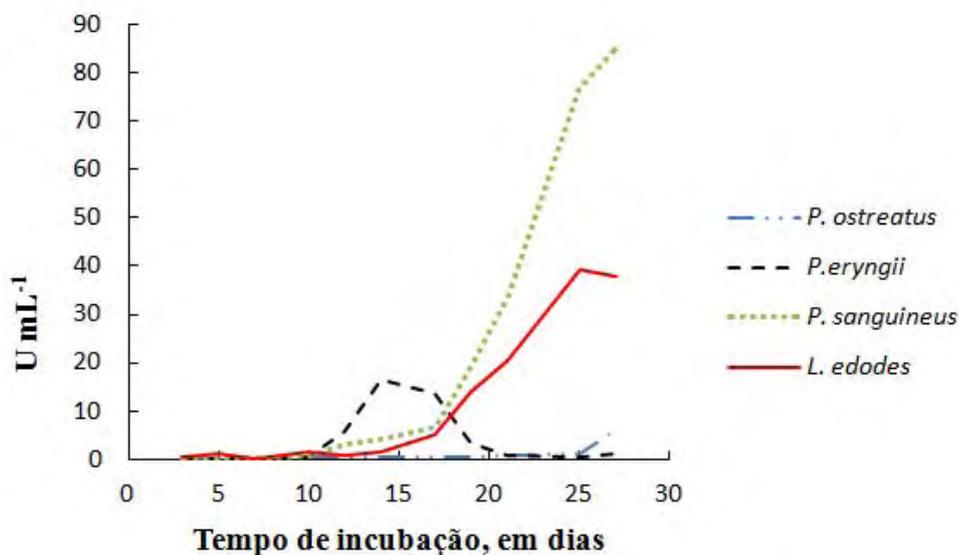


Figura 16. Cinética de produção da enzima lacase para os cogumelos *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* e *Pycnoporus sanguineus* cultivados em meio líquido em bagaço de cana.

Menezes et al. (2009) incubaram linhagens de *Pleurotus* em meios de cultura à base de bagaço de cana por 30 dias. Os autores observaram a presença de lacase em

todas as linhagens estudadas, destacando-se a *Pleurotus sp* BCCB068 com as atividades de $6,23 \text{ U mL}^{-1}$ no 15º dia e $4,68 \text{ U mL}^{-1}$ no 20º dia, respectivamente. As demais linhagens não obtiveram resultados expressivos, tendo o fungo *P. sajor-caju* produzido uma atividade máxima de $3,52 \text{ U mL}^{-1}$ no 10º dia e a *Pleurotus tailandia* $1,63 \text{ U mL}^{-1}$ no 10º dia.

Regina et al. (2009) também utilizou bagaço de cana como substrato para o cultivo de *L. edodes* e produção de lacase. Para as três linhagens de estudadas (LE 95/17, LE 96/22 e Leax), todas apresentaram atividade para a lacase, atingindo máxima produção em torno do 14º dia com 0,25 a $0,30 \text{ UI g}^{-1}$.

4.2.2. Determinação da Lignina Peroxidase

A enzima lignina peroxidase foi produzida por todas as linhagens cultivadas; no entanto, com baixa atividade. As linhagens de *L. edodes* e *P. sanguineus* demonstraram ter, novamente, maior atividade enzimática, $1,90 \text{ U mL}^{-1}$ no 27º dia e $0,9677 \text{ U mL}^{-1}$ no 25º dia, respectivamente. O *P. eryngii* e o *P. ostreatus* apresentaram atividade enzimática de LiP mais baixa, obtendo $0,8961 \text{ U mL}^{-1}$ no 25º dia e $0,3106 \text{ U mL}^{-1}$ no 14º dia, respectivamente.

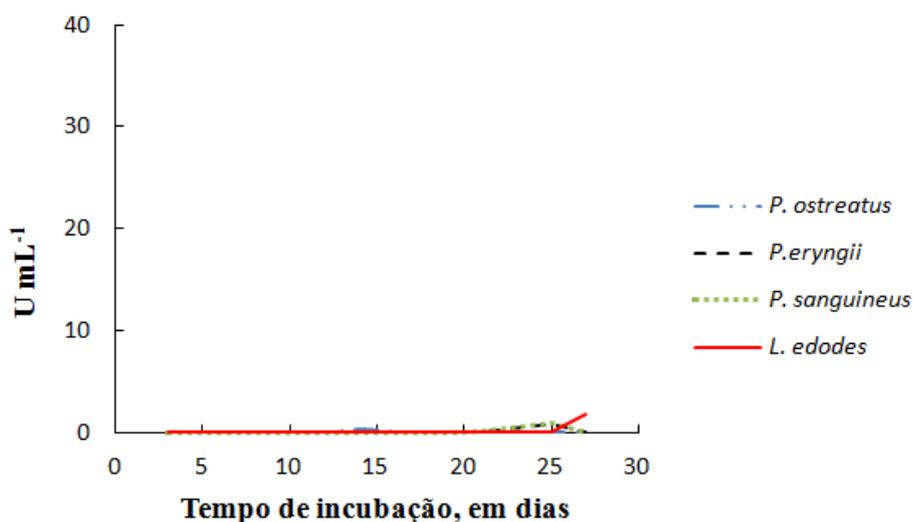


Figura 17. Cinética de produção da enzima lignina peroxidase para os cogumelos *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* e *Pycnoporus sanguineus* cultivados em meio líquido de bagaço de cana.

Sales et al. (2012) desenvolveram um trabalho para tratamentos de efluentes oriundos da área de produção de medicamentos de uma indústria farmacêutica da

região de Goiânia com linhagens de *Schizophyllum commune* e *P. sanguineus*. Não foi detectada atividade de LiP, fato que os autores correlacionaram com a concentração baixa de oxigênio durante o processo foi um fator inibitório para o crescimento dos fungos e síntese da enzima.

Regina et al. (2009) também não detectaram atividade enzimática para a lignina peroxidase para *L. edodes*. Os autores justificaram que a atividade de LiP não foi induzida pelos substratos utilizados para a produção enzimática, sendo eles a casca de arroz, a serragem de eucalipto, o bagaço de mandioca e o bagaço de cana-de-açúcar.

4.2.3. Determinação da Manganês Peroxidase

A atividade de MnP foi detectada para todas as espécies em estudo, destacando-se o *P. eryngii* que produziu $12,87 \text{ U mL}^{-1}$ (25º dia) e o *P. sanguineus*, $11,27 \text{ U mL}^{-1}$ (21º dia). O *L. edodes* apresentou maior atividade de MnP no 10º dia de incubação com $7,89 \text{ U mL}^{-1}$ e $5,50 \text{ U mL}^{-1}$ no 19º dia. Apenas a espécie *P. ostreatus* demonstrou ter baixa atividade com máximo de $3,00 \text{ U mL}^{-1}$ (7º dia) e $4,25 \text{ U mL}^{-1}$ (27º dia).

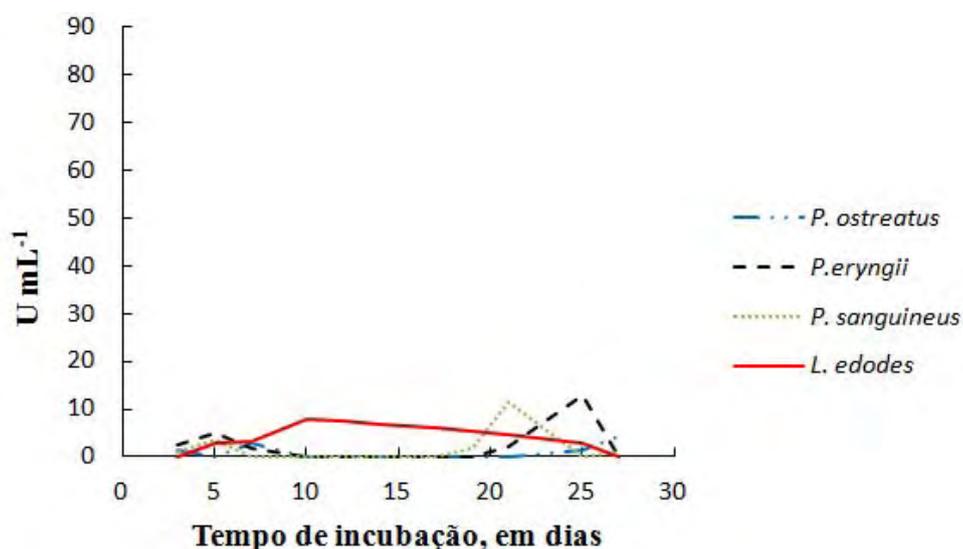


Figura 18. Cinética de produção da enzima manganês peroxidase para os cogumelos *L. edodes*, *P. eryngii*, *P. edodes* e *P. sanguineus* cultivados em meio líquido de bagaço de cana.

Regina et al. (2009) detectaram atividade de MnP para todas as linhagens de *L. edodes* produzidas em substrato a base de bagaço de cana-de-açúcar, com máximo de $0,20 \text{ UI g}^{-1}$.

Menezes et al. (2009) também encontraram a atividade de MnP em três linhagens de *Pleurotus* avaliadas, com a atividade máxima detectada de 32,0 U/L após o 5º dia.

4.2.4. Dados acumulativos

Após o período de 27 dias de incubação, foi determinada a atividade enzimática total das enzimas lacase, LiP e MnP produzidas (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade enzimática (U mL⁻¹) das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase após 27 dias.

	Linhagens	Valores Médios
Lacase	<i>P. eryngii</i>	37,04 c
	<i>P. ostreatus</i>	14,06 d
	<i>P. sanguineus</i>	314,59 a
	<i>L. edodes</i>	125,10 d
Manganês Peroxidase	<i>P. eryngii</i>	25,53*
	<i>P. ostreatus</i>	14,74*
	<i>P. sanguineus</i>	34,08*
	<i>L. edodes</i>	20,69*
Lignina Peroxidase	<i>P. eryngii</i>	1,02*
	<i>P. ostreatus</i>	0,91*
	<i>P. sanguineus</i>	1,25*
	<i>L. edodes</i>	1,27*

Médias seguidas por diferentes letras nas linhas diferem estatisticamente, entre si pelo teste de Tukey (5%). *Não diferem estatisticamente.

Estatisticamente, entre a produção de atividade enzimática dos diferentes fungos, não houve diferença significativa para as enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase, mas é possível perceber que o *P. sanguineus* produziu duas vezes mais que o *P. ostreatus*. Já para a lacase, houve diferença significativa entre todos os tratamentos.

A espécie de *P. sanguineus* produziu maior quantidade de lacase (314,59 U mL⁻¹) em relação às demais espécies, seguida por *L. edodes* (125,10 U mL⁻¹), *P. eryngii* (37,04 U mL⁻¹) e *P. ostreatus* (14,06 U mL⁻¹).

Muitos autores ressaltam as espécies do gênero *Pycnoporus sp.* e *Lentinula sp.* como grandes produtores de lacase. Abreu et al. (2007) avaliaram a degradação *in vitro* e em condições de campo de *Eucalyptus sp.* inoculados com *Pleurotus ostreatus*,

Pycnoporus cinnabarinus e *Schizophyllum commune*. Os resultados comprovam que apenas o *P. cinnabarinus* se destacou nos experimentos de biodegradação.

Silva et al. (2012), no entanto, obtiveram resultados bem diferentes dos determinados no presente trabalho. Os autores avaliaram a capacidade de produção de lacase de *L. edodes*, *P. ostreatus* e *P. florida* por fermentação submersa utilizando cascas de café. Os resultados demonstraram que o substrato foi eficaz para a produção de lacase por todas as linhagens analisadas, sendo *P. ostreatus* a linhagem mais produtiva nas condições testadas ($22,5 \text{ U mL}^{-1}$), muito abaixo do que os valores obtidos com o *P. sanguineus* e *L. edodes* nesse trabalho.

4.3. Determinação de açúcares redutores

Após determinação da atividade enzimática, as enzimas foram adicionadas ao bagaço de cana sem e com tratamento com H_2SO_4 7% para o processo de hidrólise. A formação de açúcar foi monitorada periodicamente conforme descrito no item 3.4.2.

4.3.1. Hidrólise enzimática do bagaço de cana

O processo de hidrólise foi caracterizado através da quantificação de glicose formada por cada tratamento. Esse processo será melhor discutido no item 4.3.1.1.

4.3.1.1. Quantificação do teor de glicose ao longo do tempo

Foi realizada análise de regressão para esses atributos. Foi possível averiguar a quantidade de glicose libera ao meio e o comportamento das enzimas conforme os dez tratamentos propostos pelo tempo de 15 dias de incubação (Figura 19).

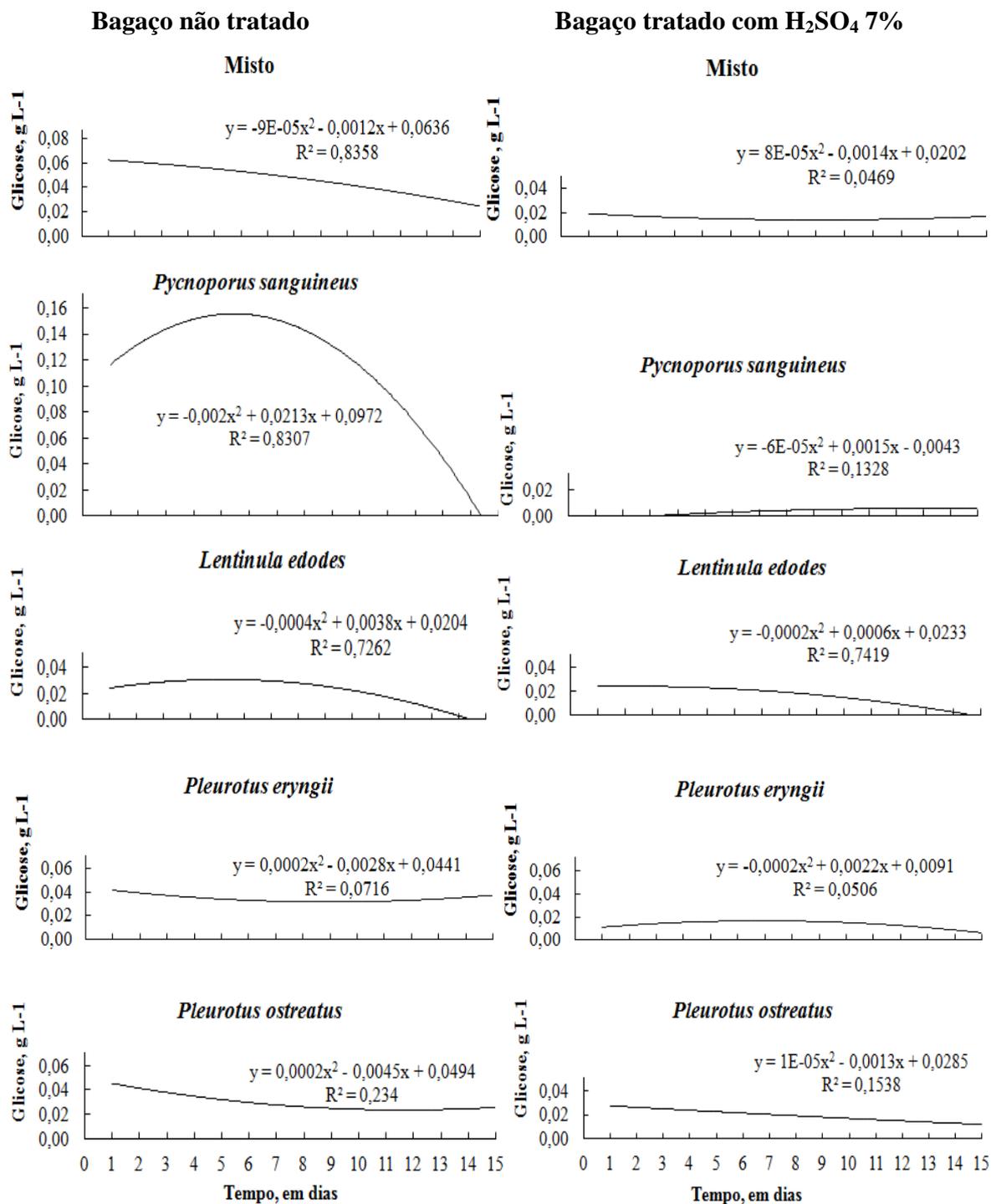


Figura 19. Variação da dosagem de glicose durante o período hidrolítico. Misto = conjunto enzimático de *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus eryngii*.

De um modo geral, o teor de glicose formada em cada tratamento foi diminuindo ao decorrer do período de incubação. Isso é explicado pelo fato que as enzimas vão perdendo sua atividade e eficiência quando expostas a temperaturas altas e períodos de tempos longos, mas é claro que há exceções.

O tratamento que melhor manteve uma estabilidade ao decorrer dos 15 dias foi o misto em bagaço sem tratamento.

4.3.1.2. Dosagem de glicose em função do tratamento após 15 de incubação

A avaliação da quantidade de glicose em função do tratamento foi realizada no período de 15 dias de incubação (Figura 20). De um modo geral, as enzimas submetidas ao meio contendo o substrato não tratado com ácido apresentaram os maiores teores de glicose e os melhores índices de estabilidade por tempo. Esses resultados são controversos aos encontrados na literatura uma vez que, o bagaço de cana-de-açúcar tratado com ácido apresenta maiores teores de glicose em relação ao bagaço sem tratamento (HAMELINK et al., 2005).

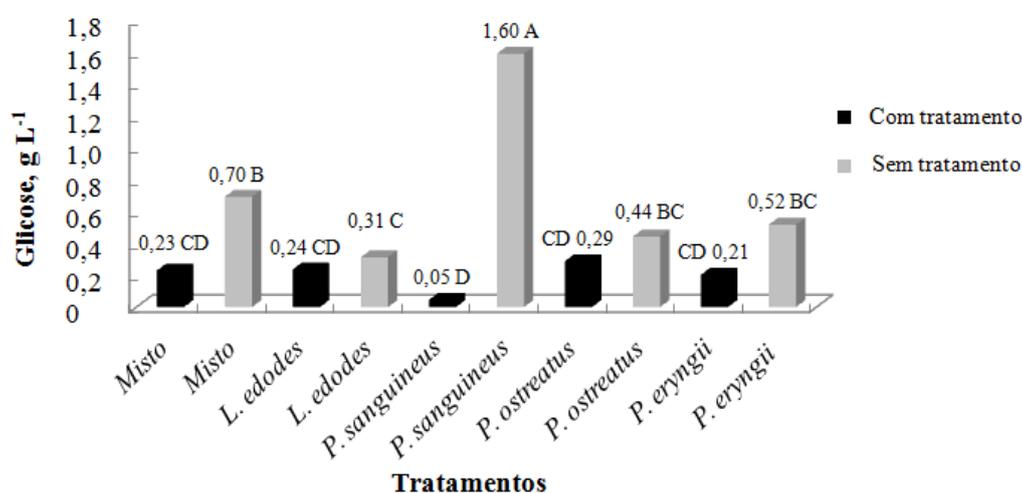


Figura 20. Teores de glicose obtidos em função do tratamento após 15 dias de incubação. Médias seguidas por letra iguais não diferem entre si (Tukey, 5%). Coeficiente de Variação = 36,038; DMS = 0,0447.

Outros autores avaliaram a dosagem de glicose conforme os tratamentos fornecidos ao bagaço de cana-de-açúcar. Diferente desse trabalho, Santos et al., (2010) avaliaram o processo de hidrólise enzimática de duas enzimas comerciais, celulasas e

β -glucosidases, quando postas em contato com bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio, NaOH, e sem tratamento. Eles determinaram que as enzimas comerciais foram mais eficientes no bagaço tratado, que produziram 50 g/L de glicose, do que em relação ao sem tratamento, 20 g/L, ambos em 70 horas de incubação. É possível notar que os valores de glicose encontrados pelos autores foram extremamente superiores aos resultados obtidos pelo presente trabalho.

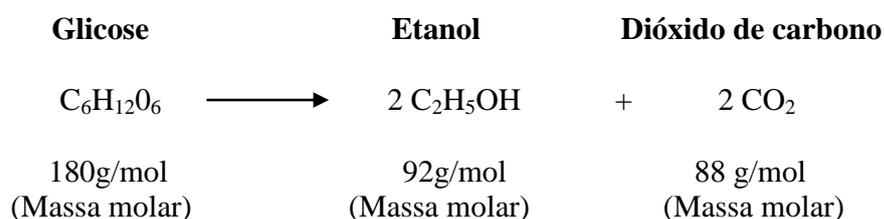
Os teores de glicose apresentados por Santos et al., (2011) também foram maiores. Os autores utilizaram enzimas comerciais de exoglucanases/endoglucanases e beta glucosidase para o processo de hidrólise enzimática quando adicionadas em bagaço de cana-de-açúcar tratada com cal ativa, CaO, e sem tratamento. Os autores determinaram que em 280 minutos, o bagaço tratado teve 80% de conversão de glicose e o sem tratamento obteve 60%.

De acordo com os estudos enzimáticos realizados, o bagaço de cana mostra-se uma excelente fonte potencial para a produção de enzimas lignocelulolíticas, o que proporciona uma melhor alternativa para o aproveitamento dessa biomassa. Com base nessas informações e com os resultados obtidos nesse processo, é possível que as enzimas avaliadas atuem com mais eficiência na hemicelulose, visto que, os melhores valores foram obtidos no bagaço sem tratamento ácido, já que o emprego do H_2SO_4 hidrolisa quase completamente o constituinte em questão.

Apesar dos resultados positivos de produção enzimática para os fungos *L. edodes* e *P. sanguineus*, muitos estudos ainda precisam ser realizados para a obtenção máxima de produtividade. Uma das alternativas proposta por esse trabalho é a aplicação desse conjunto enzimático em substratos lignocelulósicos para hidrólise de macromoléculas complexas de polissacarídeos em monossacarídeos e, possivelmente, conversão em etanol. Embora os resultados de obtenção da glicose terem sido mais baixos do que as enzimas comerciais, as enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, demonstraram potencial hidrolítico, principalmente para as produzidas pelo fungo *P. sanguineus*. Entretanto, existe a necessidade de melhorar a eficiência de processo de hidrólise para conseguir obter produtos de valores agregados.

4.4. Estimativa de etanol segundo a lei Gay-Lussac

Na fermentação alcoólica de açúcares, por ação de leveduras, os principais produtos obtidos em proporções molares são o etanol e o dióxido de carbono. Esse mecanismo foi quantificado pela primeira vez por Gay-Lussac, onde 100 kg de glicose rendem 51,1 kg de etanol e 48,9 kg de dióxido de carbono. O rendimento teórico de 51,1% em massa é conhecido como coeficiente de Gay-Lussac e é o dado básico na eficiência de conversão (JACKMAN, 1991).



Com base nessas informações e a partir dos teores de glicose obtidos nesse trabalho, pôde-se estimar a quantidade de etanol teórico (Figura 21).

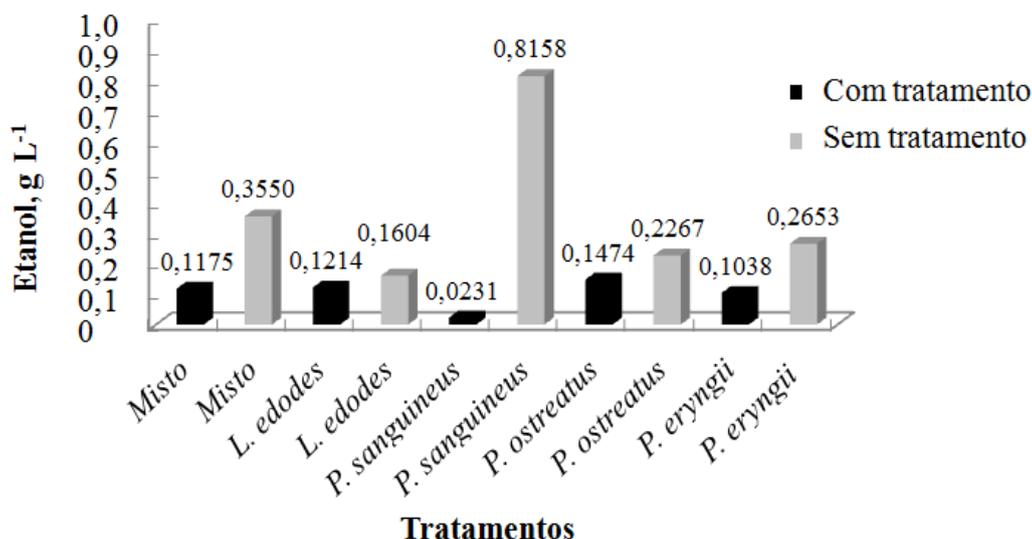


Figura 21. Estimativa dos teores de etanol a partir dos valores de glicose obtidos.

Teoricamente, o valor máximo de etanol seria produzido pela glicose formada no processo de hidrólise com as enzimas de *P. sanguineus*, o que resultaria no valor de aproximadamente 0,8 g L⁻¹. De acordo com esse valor encontrado, pode-se afirmar que o processo para obtenção de etanol a partir das enzimas produzidas nesse trabalho não é viável, principalmente em escala industrial.

5. CONCLUSÕES

- ✓ O tratamento ácido possibilitou obter maior quantidade de celulose.
- ✓ A hemicelulose, no entanto, foi quase totalmente removida no processo com a hidrólise ácida.
- ✓ O tratamento ácido possibilitou obter elevado teor aparente da lignina, devido à formação do complexo hemicelulose e proteína com a lignina, concordando com as observações de SILVA e QUEIROZ (2002).
- ✓ O tratamento ácido converteu a hemicelulose em açúcares fermentescíveis (glicose).
- ✓ O *Lentinula edodes* e o *Pycnoporus sanguineus* foram os melhores produtores de enzimas, em destaque a Lacase.
- ✓ As enzimas produzidas por *Pycnoporus sanguineus* obtiveram as melhores conversões enzimáticas para o teor de glicose.
- ✓ As enzimas foram mais eficientes para o bagaço de cana sem tratamento.
- ✓ Embora os resultados de obtenção da glicose tenham sido mais baixos do que as enzimas comerciais, as enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase,

demonstraram potencial hidrolítico, principalmente para as produzidas pelo fungo *P. sanguineus*.

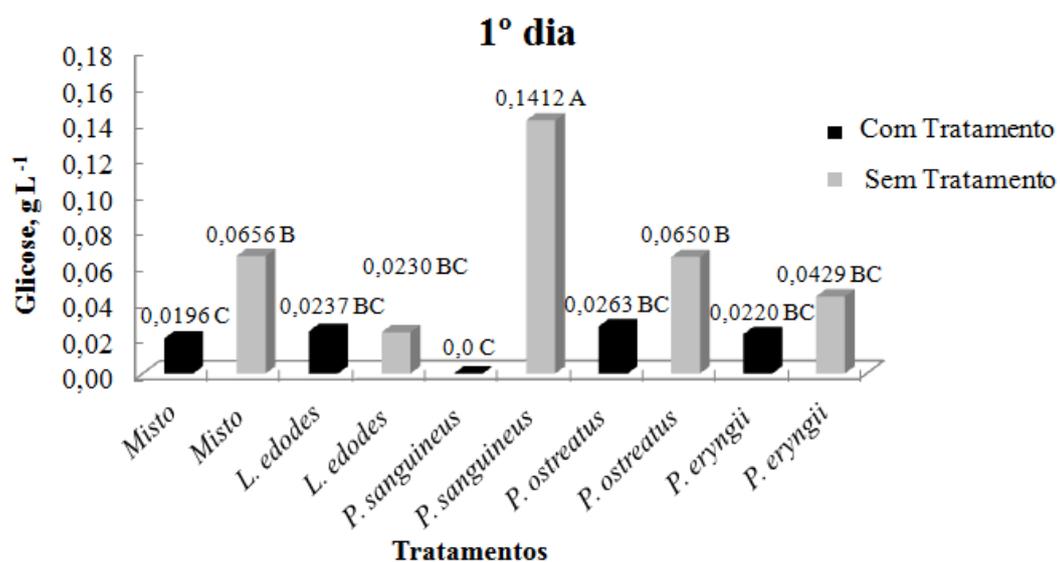
✓ Apesar dos resultados positivos de produção enzimática para os fungos *Lentinula edodes* e *Pycnoporus sanguineus*, muitos estudos ainda precisam ser realizados para a obtenção máxima de produtividade.

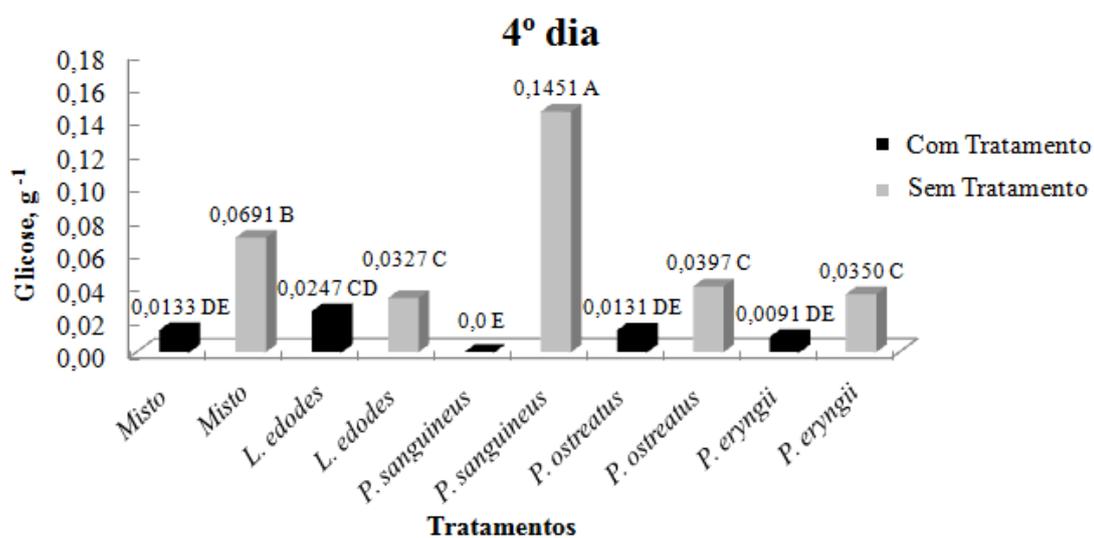
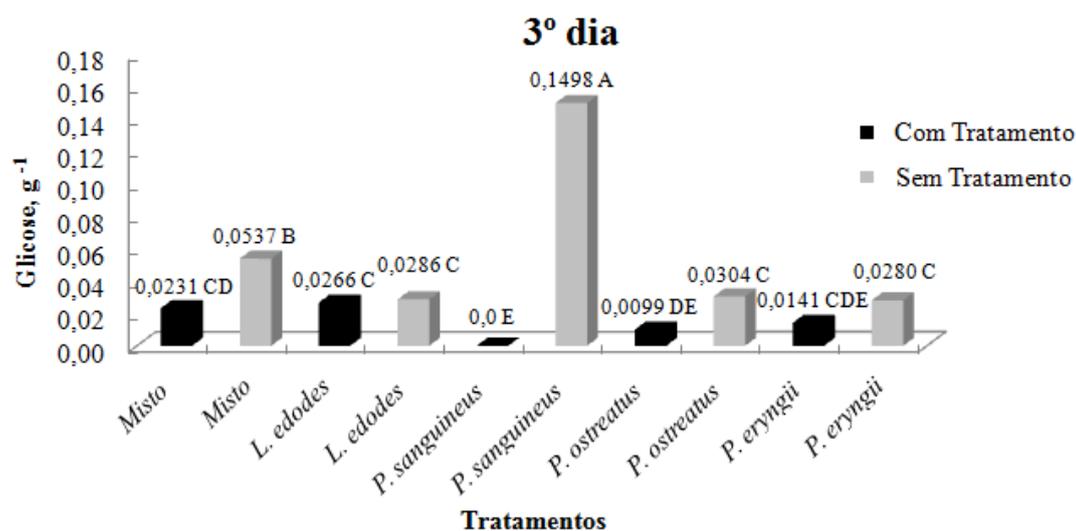
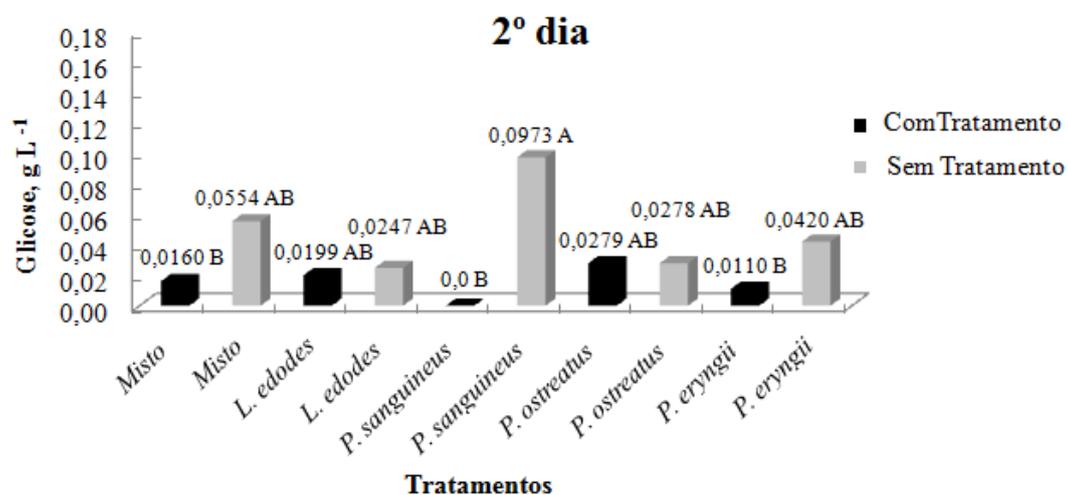
✓ Isolar, purificar e estudar as enzimas Lacase, MnP e LiP individualmente, torna-se fundamental para determinar a eficiência enzimática sobre um produto, visto que, mantê-las juntas, pode haver inibições.

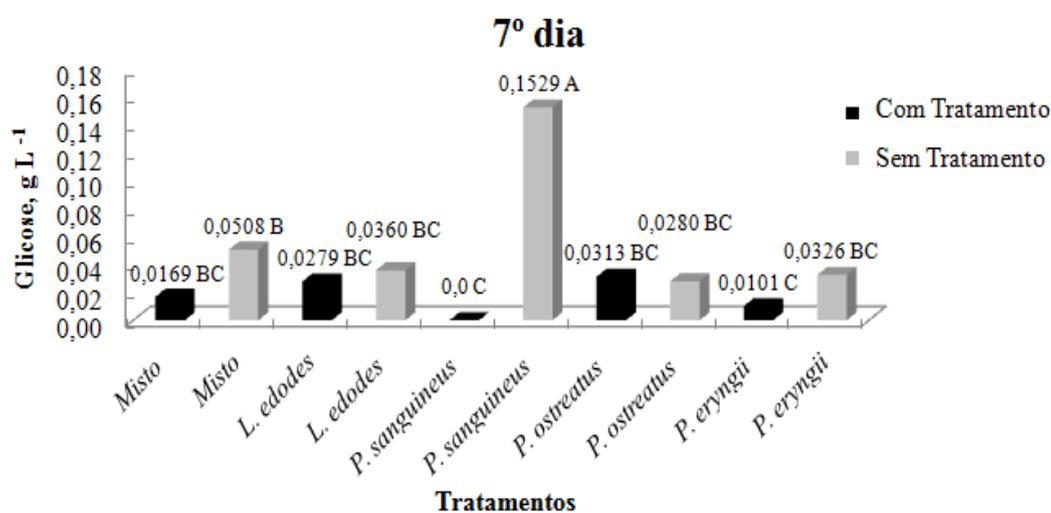
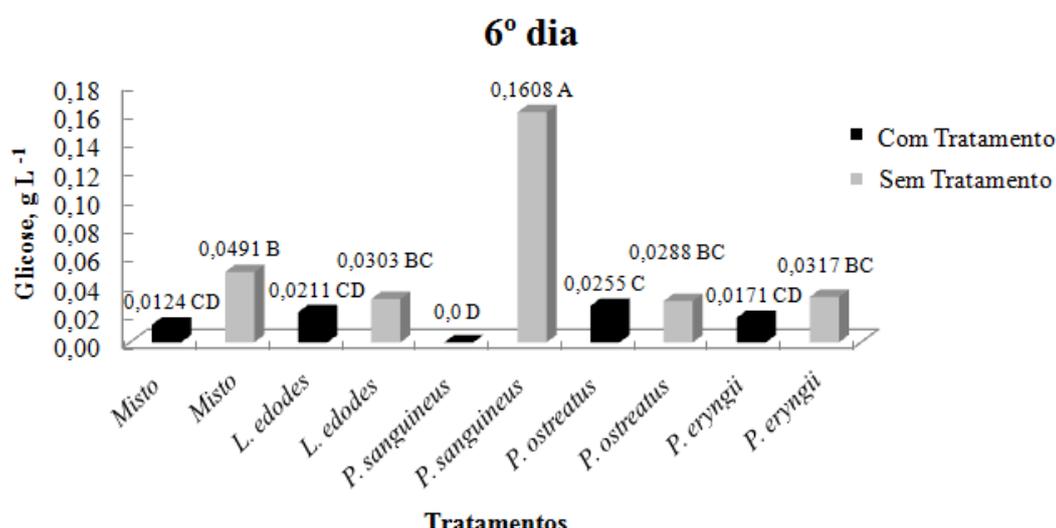
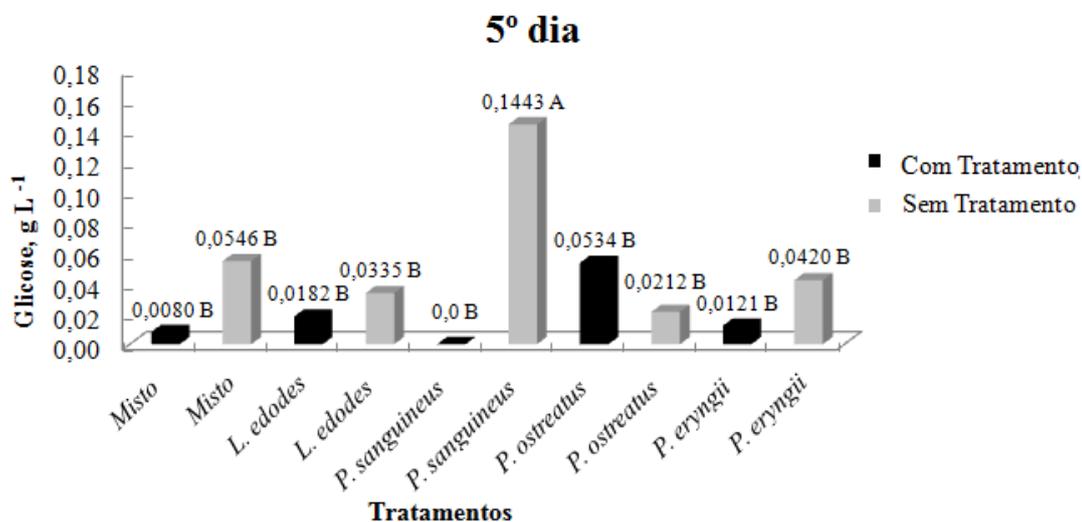
6. ANEXOS

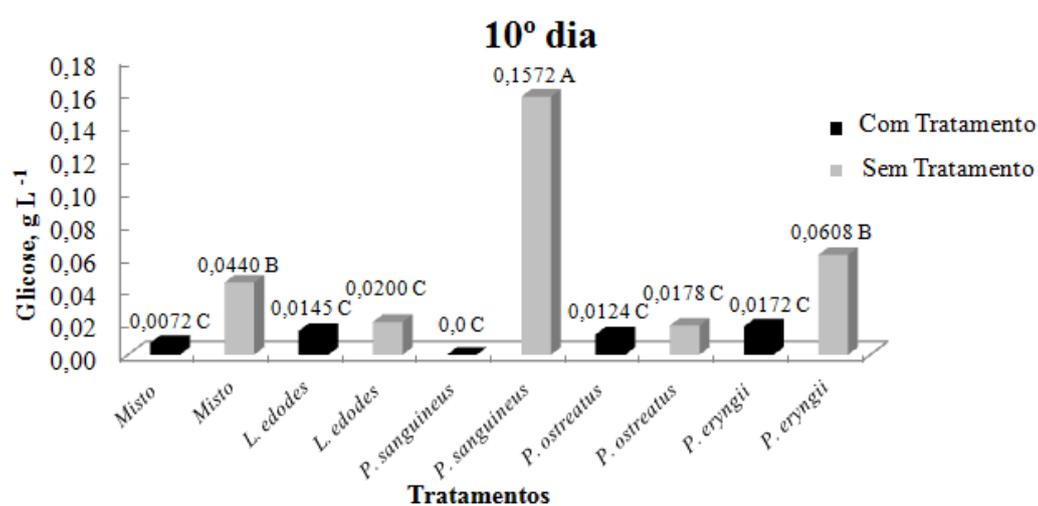
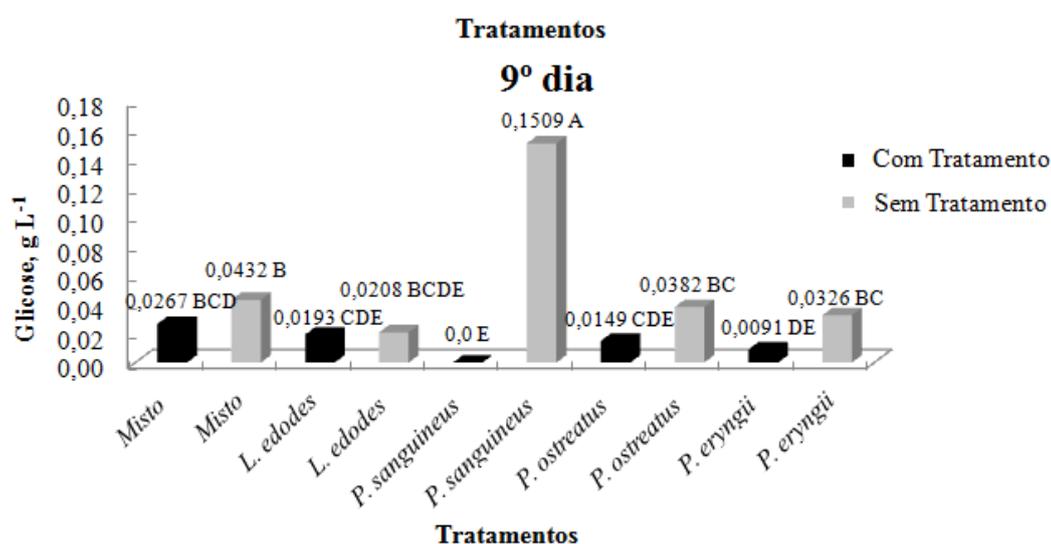
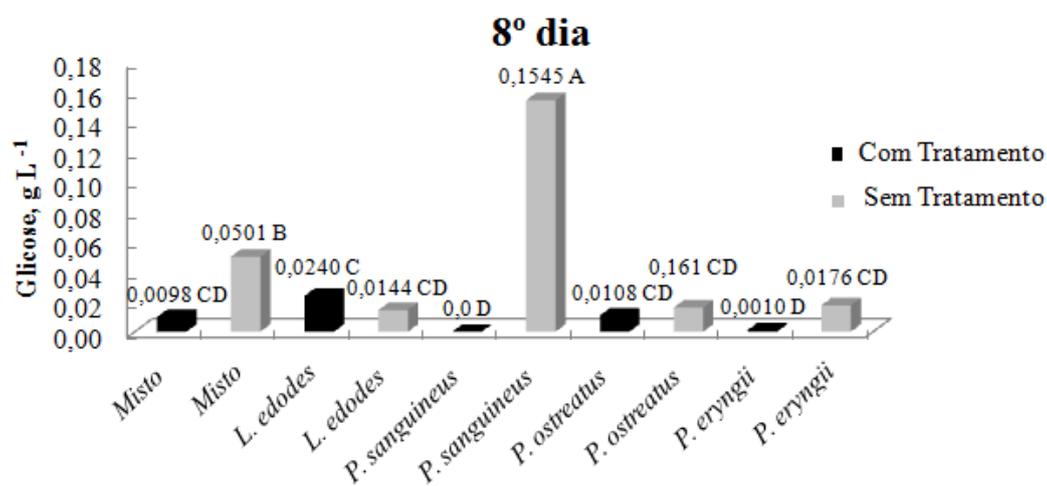
6.1. Produção de glicose por dia de incubação

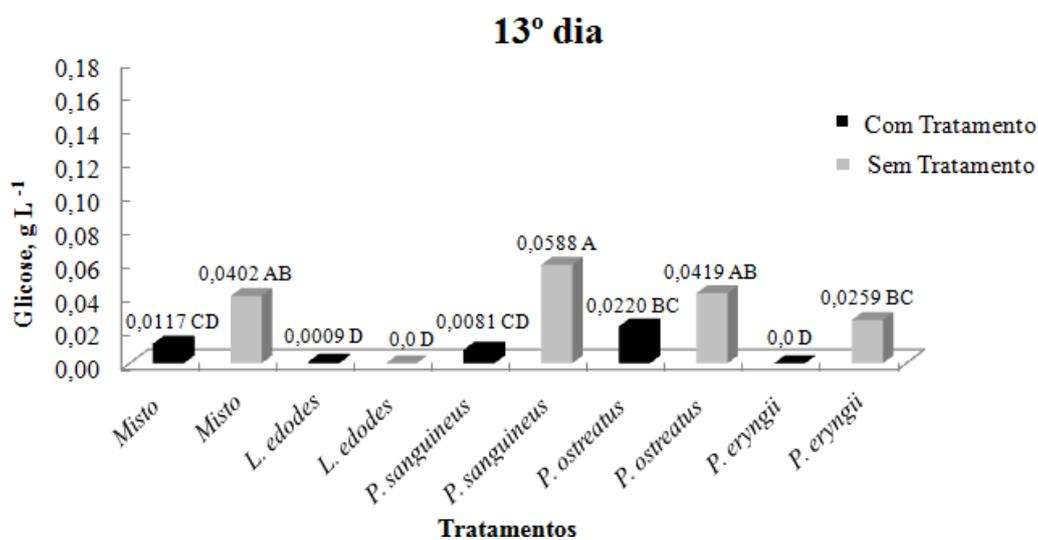
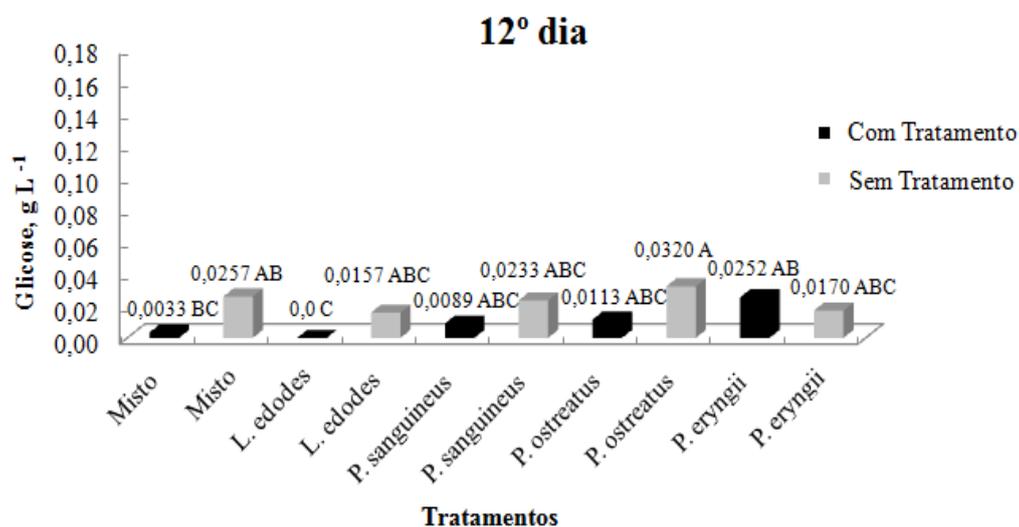
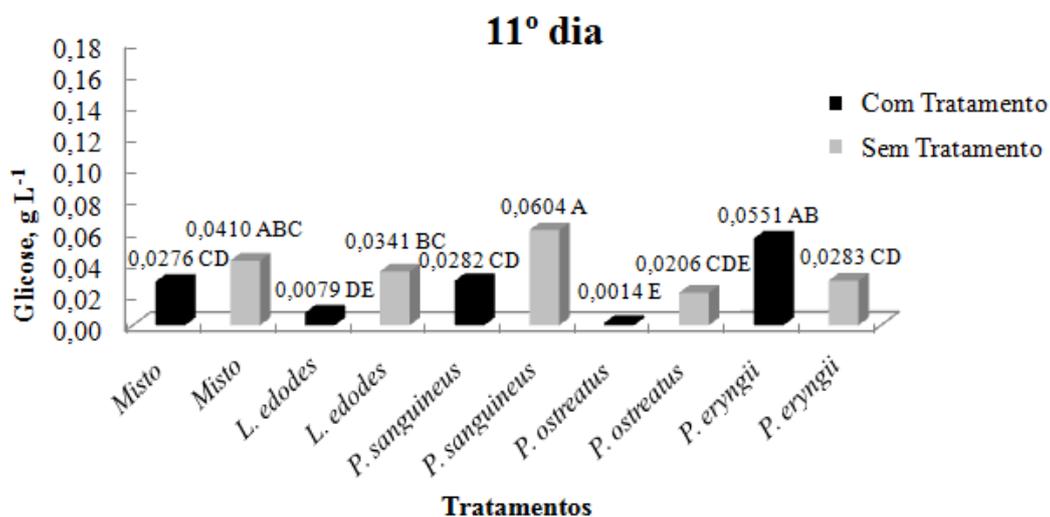
Os teores de glicose formados em cada tratamento foram quantificados diariamente e os valores determinados foram expressos nos gráficos a seguir.

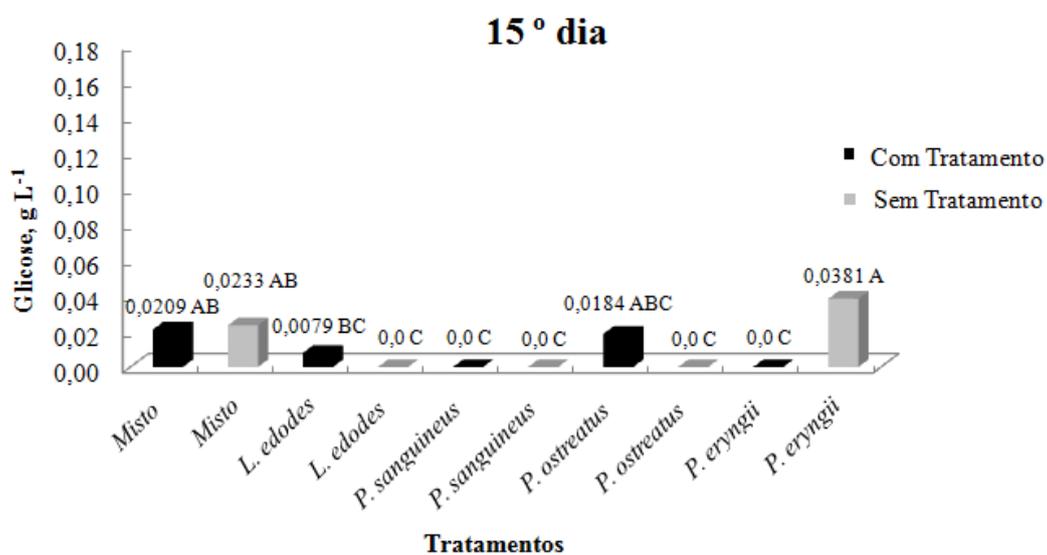
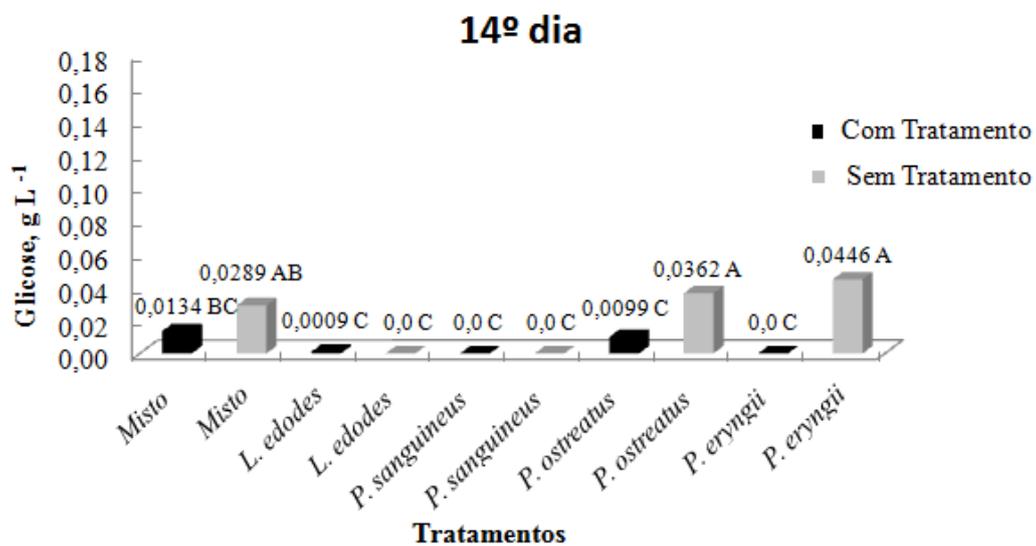












7. REFERÊNCIAS

ABREU, L. D. et al., Degradação da madeira de *Eucalyptus sp.* por basidiomicetos de podridão branca. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.74, n.4, p.321-328, out./dez, 2007.

AGUIAR, Caroline Mariana de; LOCENA, Sérgio Luiz de. Produção de celulases por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulásica. **Acta Scientiarum Technology**, Toledo - PR, v. 33, n. 4, p. 385-391, 2011.

AGUIAR, Mario Mamede et al., Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Brazilian Archives Biology And Technology**, v.53, n. 5, p. 1245-1254, September-October, 2010.

ALEXANDRINO, Ana Maria et al. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas - SP, v. 27, n. 2, p.364-368, abril/maio 2007.

BARRICHELO, Luiz Ernesto George; BRITO, José Otávio. Química da Madeira. **Centro Acadêmico**: Luiz de Queiroz, Piracicaba - SP, p.126, 1985.

BALAT, Mustafa; BALAT, Havva; ÖZ, Cahide. Progress in bioethanol processing. **Progress In Energy And Combustion Science**, v. 34, n. 25, p.551-573, jan. 2008.

BAO, W., FUKUSHIMA, Y. & JENSEN, K.A.. Oxidative degradation of non phenolic lignin durin lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. **Federation of European Biochemical Societies**. p. 297-300, 1994.

BUSWELL, Jhon A.; CHANG, Shu-ting. Edible mushrooms: Attributes and applications. In: CHANG, Shu-ting; BUSWELL, Jhon A., MILES, Philip G.. **Genetics and breeding of edible mushrooms**. Gordon and Breach Scientific Publishers, Philadelphia, p. 297-324, 1993

CANILHA, Larissa et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra. **Revista Analytica**, Lorena - SP, v. 44, p.48-54, dez. 2009/jan. 2010.

CARAMELO, Lucília; MARTÍNEZ, María Jesús; MARTÍNEZ, Ángel T.. A Search for Ligninolytic Peroxidases in the Fungus *Pleurotus eryngii* Involving a-Keto-g-Thiomethylbutyric Acid and Lignin Model Dimers. **Applied And Environmental Microbiology**, Madrid - Spain, v. 65, n. 3, p.916-922, mar. 1999.

CHANDRASHEKHAR, Bhagwath et al. Bio-Ethanol Production from Textile Cotton Waste via Dilute Acid Hydrolysis and Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Of Ecobiotechnology**, Raipur - Índia, v. 3, n. 4, p.06-09, 2011.

DONINI, Lorena Pastorini; BERNARDI, Eduardo; NASCIMENTO, José Soares do. Colonização do substrato capim-elefante suplementado com farelos por *Pleurotus ostreatus*. **Revista De Biologia E Ciências Da Terra**, Pelotas - RS, v. 6, n. 2, p.185-193, 2006.

EGGERT, C ET al., The ligninolytic system of the white rot fungus *P. cinnabarinus*: purification and characterization of laccase. **Applied Environmental and Microbiology**, New York, v. 62, p. 1151-1158, 1996.

ESCOBAR, Herton. Na busca por mais etanol, ciência tenta reinventar a cana. **O Estado de S. Paulo (Vida&)**, São Paulo - SP, p.26-27, 18 abr. 2010.

FENGEL, D. & WEGENER, G. **Wood and cellulosic chemistry**. New York, p. 189-200, 1991.

FERREIRA, L. F. R. **Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos**. 2009. 134 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FERREIRA, L. F. R. et al., Seletion of vinasse degrading microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 1613-1621, 2010.

FUJIHARA, Shinya et al., Production of manganese peroxidase by white rot fungi from potato-processing wastewater: Role of amino acids on biosynthesis. **African Journal of Biotechnology** Vol. 9(5), pp. 725-731, 18 January, 2010.

GONÇALVES, Adilson Roberto. Aproveitando a visibilidade do etanol. **Jornal da USP**, ano XXII, n. 799, p. 2, 23-29 abril. 2007.

GRIFFIN, David H. Growth. In: **Fungal Physiology**. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, p. 458, 1994.

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

HAARS, Annegret.; HUTTERMANN, Aloys. Function of laccase in white-rot fungus. **Archive of Microbiology**, Berlin, v. 125, p. 233-237, 1980.

HAMELINCK, C.N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v.28, p. 384-410, 2005.

HAWARI, J.; BEAUDET, S.; HALASZ, A.; THIBOUTOT, S.; AMPLEMAN, G. Microbial degradation versus mineralization. **Appl. Microbiol Biotechnol.** v.54, p. 605-618, 2000.

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

JACKMAN, E.A. Alcohol industrial. In: BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Biología básica**. Zaragoza: Acríbia, 577p.1991.

JOHN, Carlile Michael; WATKINSON, Sarah C.; GOODAY, Graham W.. **The Fungi**. Elsevier Academic Press, London, 2nd ed, p.588, 2002.

KUWAHARA, M.; et al. **Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium***. FEBS Letters, v.169, p. 247-250, 1984.

LEATHAM, Gary F.; STAHMANN, Mark A. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specify, localization and association with development of fruiting bodies. **Journal Genetic Microbiology**, v. 50, p. 859-867, 1981.

LEATHAM, Gary F. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, p. 859-867, 1985.

MARI, L. J; NUSSIO, L. G. Opções para hidrólise de cana-de-açúcar. Acessado em 04/07/2013. Disponível em <http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/conservacao-de-forragens/opcoes-para-hidrolise-de-canadeacucar-18992n.aspx>, 2004.

MARTÍNEZ, A. T.; et al, Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **Int. Microbiol.** v. 8. 2005.

MCCARTHY, J.E.; TIEMANN, M. **MTBE in gasoline: clean air and drinking water issues.** CRS report for congress. Disponível em: <http://www.epa.gov/otaq/consumer/fuels/mtbe/crs-mtbe.pdf>. McCarthy e Tiemann (1998)

McDOUGALL, G. J., et al. Plant fibre: botany, chemistry and processing for industrial use. **Jornal Science Food Agriculture**, n. 62, p. 1-20, 1993.

MENEZES, Cristiano Ragagnin de; SILVA, Isis Serrano; DURRANT, Lucia Regina. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, Campinas - SP, v. 5, n. 1, p.68-78, jan./abr. 2009.

MURPHY, Jerry D., MCCARTHY, Kelvin. Ethanol production from energy crops and wastes for use as transport fuel in Irland. **Applied Energy**, n. 82, p. 148-166, 2009.

OLIVEIRA, Marcos de. Entre açúcares e genes: Aplicação do conhecimento científico da cana deverá servir ao desenvolvimento de novas ferramentas para a produção de etanol. Revista Pesquisa FAPESP, São Paulo - SP, p.86-91, out. 2012.

OLIVEIRA, Patrícia Lopes de et al., Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology** v.40, p. 818-826, 2009.

OGEDA, Thais Lucy; PETRI, Denise F.Siqueira. Hidrólise enzimática de biomassa. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP. **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

PANDEY, Ashok; SOCCOL, Carlos Ricardo. Economic utilization of crop residues for value addition: a futuristic approach. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 59, p. 12–22, 2000.

RAMOS, Luiz Pereira. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. CEPESQ/UFPR, RRSI, SMA/FIESP, Agosto de 2000. Acessado em 13/02/2013 às 17h e 29 min. Disponível em http://blog.cca.ufscar.br/lamam/files/2010/07/artigo_pretratamento.pdf.

RAO, R. Sreenivas et al. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. **Bioresour. Technol.**, v. 97, p. 1974- 1978, 2006.

REGINA, Magali et al. Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em substratos agroindustriais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina - PR, v. 30, n. 4, p.881-888, out./dez. 2009.

ROSA, Sergio Eduardo Silveira da; GARCIA, José Luiz Faria. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, n. 32, p. 119-150, dez. 2009.

SALES, Paulo de Tarso Ferreira et al. Estudo da tratabilidade de efluente da indústria farmacêutica por meio dos fungos *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* e fotocatalise. **Revista Eletrônica de Engenharia**, v. 5, n. 1, p. 56-74, out. 2012.

SALES-CAMPOS, Ceci; MINHONI, Marli Teixeira de Almeida; ANDRADE, Meire Cristina Nogueira. Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. **Revista Interciência**, v. 35, nº3, março, 2010.

SANTOS, et al., Comparação entre processos em shf e em ssf de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 4, 904-908, 2010.

SANTOS, M.E.X. dos; BENACHOUR, M. **Oxidação catalítica de glicose de hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar em reator batelada para produção de ácido glucônico** UFPE, 2011.

SILVA, Dirceu Jorge; QUEIROZ, Augusto César. **Análise de alimentos**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2002.

SILVA, J.J., et al., Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com casca de café. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v.15, n.2, supl.1, p.191-196, jul./dez. 2012.

SMITH, R.E. Rapid tube test for detecting fungal cellulase production, **Applied Environmental Microbiology**, v. 33, p. 380-91, 1977.

SUN, Ye; CHENG, Jiayang. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

SZKLARZ, Grazyna D.; et al. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, v. 81, p. 234-240, 1989.

TAUPIER, L. O. G.; RODRIGUES, G. G. A cana-de-açúcar. In: Instituto Cubano de Pesquisa dos Derivados da Cana-de-açúcar (ICIDCA). Manual dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília: ABIPTI, cap.2.1, p.21-27. 1999.

TÉBÉKA, I. R. M.; Silva, A. G. L.; Petri, D. F. S.; Hydrolytic Activity of Free and Immobilized Cellulase. **Langmuir**, v. 25, p. 1582, 2009.

TÍMAR-BALÁZSY, Ágnes; EASTOP, Dinah. **Chemical Principles of textile Conservation.** Butterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth-Heimann, 1998.

VAN SOEST, P.J. – Symposium on factors influencing the voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. **J. Anim. Sci.**, v.24, 1965.