

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço
de cana-de-açúcar**

José Mário Mamede Aguiar Filho

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre
em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

José Mário Mamede Aguiar Filho
Microbiólogo

Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

Orientadora:
Prof^ª. Dra. **REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Aguiar Filho, José Mário Mamede

Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar / José Mário Mamede Aguiar Filho. - - Piracicaba, 2008.
79 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Bagaços - Tratamento químico 2. Cana-de-açúcar 3. Celulose 4. Enzimas 5. Fungos
6. Lignina 7. Vinhaça I. Título

CDD 576.11925
A282a

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

A Deus por estar sempre presente em minha vida.

*Aos meus pais José Mário e Alessandra, aos meus irmãos Marcos e Eléa, pelo amor e alegrias
durante toda essa luta.*

Dedico.

*"O pessimista queixa-se do vento,
o otimista espera que ele mude
e o realista ajusta as velas."*

William George Ward

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e a Universidade de São Paulo, pela oportunidade de participar do curso de pós-graduação em Agronomia.

À coordenação do programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola.

À querida Prof^ª. Dra. Regina Monteiro, pela orientação, amizade, acolhimento, oportunidade e incentivo ao longo desses anos de trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Usina Sucroalcooleira COSAN, pelo fornecimento do material para a realização desse trabalho.

À Prof^ª. Dra. Varalakshmi Vissa, pelas primeiras lições de pesquisa em Microbiologia.

Aos meus colegas de pós-graduação do curso de Microbiologia Agrícola, pelas alegrias.

A todos os Professores e funcionários do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA).

À técnica Rosângela Aparecida pelo auxílio, carinho e amizade.

Aos meus amigos de laboratório: Luiz Fernando, Laise, Tâmara, Vivian, Cristiane, Geórgia, Maria Júlia, Milena, Maria Alice, Nuno, Gabriela, Ana e Rosângela pela ajuda em todo o projeto.

A todos os meus amigos de Fortaleza, pela amizade incondicional.

Aos meus pais, José Mário e Alessandra, e aos meus queridos avós e irmãos, pelo amor e carinho nessa jornada.

Ao meu querido tio Estácio e família, pelo conhecimento, e momentos de descontração.

Aos meus pais americanos Roger e Donna Williams, pela paciência, carinho e ensinamento.

À República Copacabana, pela oportunidade de fazer parte dessa família, amizades e boêmia desgovernada.

E meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas e instituições que tornaram de alguma forma possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 8 |
| ABSTRACT | 9 |
| ABREVIATURAS | 10 |
| LISTA DE FIGURAS | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 16 |
| 2.1 Materiais lignocelulolíticos | 16 |
| 2.2 Fungos lignocelulolíticos..... | 18 |
| 2.2.1 Fungos de degradação branca | 19 |
| 2.2.2 Fungos de degradação marrom | 19 |
| 2.2.3 Fungos de degradação branda | 20 |
| 2.3 Bagaço de cana-de-açúcar | 20 |
| 2.4 Vinhaça | 22 |
| 2.5 Celulose | 23 |
| 2.5.1 Hidrólise da celulose..... | 25 |
| 2.5.2 Sinergismo entre celulases | 27 |
| 2.6 Lignina | 28 |
| 2.6.1 Hidrólise da lignina..... | 30 |
| 2.7 Enzimas lignocelulolíticas..... | 31 |
| 2.7.1 Endoglicanases..... | 32 |
| 2.7.2 Exoglicanases..... | 33 |
| 2.7.3 β -glicosidases | 33 |
| 2.7.4 Peroxidases | 33 |
| 2.7.5 Lacases | 34 |
| 2.7.6 Manganês Peroxidase | 35 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 36 |
| 3.1 Microrganismos..... | 36 |
| 3.2 Produção do inóculo “spawn” ou “semente-inóculo” | 36 |
| 3.3 Condições de cultivo da linhagem | 36 |
| 3.4 Produção de celulases e ligninases | 37 |

| | |
|--|----|
| 3.5 Bagaço e vinhaça de cana-de-açúcar | 37 |
| 3.6 Análise do bagaço de cana-de-açúcar | 38 |
| 3.7 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar | 38 |
| 3.8 Preparo do meio de bagaço moído (MBM) | 39 |
| 3.9 Preparo do meio bagaço-vinhaça (MBV) | 39 |
| 3.10 Condições de cultivo para produção de enzimas | 40 |
| 3.11 Coleta das amostras | 40 |
| 3.12 Quantificação do micélio | 40 |
| 3.13 Determinação da atividade de enzimas celulolíticas | 40 |
| 3.13.1 Reagentes | 40 |
| 3.13.2 Atividade da Exo-1,4- β -D-glicanase | 41 |
| 3.13.3 Atividade da Endo-1,4- β -D-glicanase | 43 |
| 3.14 Determinação da atividade de enzimas lignolíticas | 44 |
| 3.14.1 Reagentes | 44 |
| 3.14.2 Atividade da Lacase | 45 |
| 3.14.3 Atividade da Peroxidase | 45 |
| 3.14.4 Atividade da Manganês Peroxidase (MnP) | 46 |
| 3.14.5 Cálculo das atividades lignolíticas | 46 |
| 3.15 Análise Estatística | 46 |
| 4 RESULTADO E DISCUSSÃO | 47 |
| 4.1 Produção de celulasas e ligninases | 47 |
| 4.2 Análise do bagaço de cana-de-açúcar | 48 |
| 4.3 Quantificação do micélio | 49 |
| 4.4 Tratamento do bagaço de cana de açúcar | 51 |
| 4.5 Análise da atividade celulolítica (Exo-1,4- β -D-glicanase e Endo-1,4- β -D-glicanase) | 56 |
| 4.6 Análise da atividade lignolítica (Lacase, Peroxidase e MnP) | 60 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 65 |
| 6 CONCLUSÃO | 66 |
| REFERÊNCIAS | 67 |
| ANEXOS | 78 |

RESUMO

Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar

O setor sucroalcooleiro é uma importante representação do potencial bioenergético do Brasil. A estimativa da produção de cana-de-açúcar para a safra de 2007/2008, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), será de mais de 11% que na safra passada. A cana-de-açúcar constitui uma fonte de energia abundante e renovável. Além do aproveitamento de seu caldo para a produção de etanol e do emprego do bagaço para fins energéticos em processos de combustão e gaseificação, seus polissacarídeos constituintes (celulose e polioses) podem ser liberados por hidrólises enzimáticas para serem fermentados a etanol e outros produtos químicos de maior valor agregado. Porém os resíduos gerados a partir desse processamento, como o bagaço e a vinhaça, podem ser reaproveitados para outros fins. A ecologia da degradação da celulose e lignina é lenta e muito complexa, envolvendo inúmeras e variadas interações metabólicas entre diferentes microrganismos que também são afetados por vários fatores ambientais. Partindo de nove linhagens de fungos, foram selecionados quatro quanto à produção de biomassa e produção de celulasas e ligninases em meios específicos. Estas linhagens, três espécies e *Pleurotus*: *P. sajor-caju*, *P. ostreatoroseus* e *P. ostreatus*, e *Trichoderma reesei* foram cultivadas em bagaço pré-tratado com 2% H₂SO₄, 1,5% NaOH, 2% H₂O₂ e combinação 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH. Foram determinados o teor de celulose, lignina e hemicelulose resultante de cada tratamento e a atividade lignolíticas: lacase, peroxidase e manganês peroxidase e a atividade das enzimas celulolíticas: exoglicanase e endoglicanase, comparando com um controle sem tratamento químico. A atividade celulolítica foi avaliada com os quatro fungos cultivados em meio bagaço-moído umedecido com vinhaça e bagaço-moído umedecido com meio mineral. Em relação ao controle foi observado que o pré-tratamento conjunto 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH + autoclave proporcionou maior quebra nas fibras aumentando 1,4 vezes o teor de celulose e diminuindo em 8,5 vezes o da hemicelulose. Esse mesmo tratamento também proporcionou uma maior atividade lignolítica para as quatro linhagens. O ascomiceto *T. reesei* produziu lacase, peroxidase e manganês peroxidase em todos os tratamentos inclusive no controle, sendo a atividade de manganês peroxidase de 1,9 a 4,8 vezes maior que os basidiomicetos.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar; Vinhaça; Hidrólise enzimática; Lignocelulose; Fungos

ABSTRACT

Enzymatic analysis of lignocellulolytic fungi cultivated in vinasse and sugarcane bagasse

The sugar-alcohol industry is an important representation of the bioenergy potential of Brazil. The estimative for the 2007/2008 sugarcane production, according to the National Supply Company (Conab), will be of about 11% more than the last season. Sugarcane constitutes a large and renewable energy source. Besides the exploitation of its juice for ethanol production and the use of bagasse for energetic means in processes of combustion and gasification, its polysaccharides constituents (cellulose and cellobiose) can be released by enzymatic hydrolyses for alcohol fermentation and other chemical of higher aggregate value. However the residues generated from this process, like bagasse and vinasse, which can be reutilized for other means. To obtain an effective conversion of these residues, chemical and biological pre-treatments are necessary for an improved hydrolysis. The ecology of the cellulose and lignin degradation is slow and very complex, involving innumerable and different metabolic interactions among microorganism that are also affected by many environmental factors. From nine lineages of fungi, were selected four relating to the production of biomass and cellulases and ligninases in specific media. These lineages, three species of *Pleurotus*: *P. sajor-caju*, *P. ostreatoroseus* and *P. ostreatus*, and the ascomycete *Trichoderma reesei* were cultivated in pre-treated bagasse with 2% H₂SO₄, 1,5% NaOH, 2% H₂O₂ and a combination of 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH. It was determined the levels of cellulose, lignin and hemicellulose from each treatment and the lignolytic activity: laccase, peroxidase and manganese peroxidase and the activity of the cellulolytic enzymes: exoglucanase and endoglucanase, comparing to a control without chemical treatment. The cellulolytic activity was evaluated with the four cultivated fungi in two media: a grounded bagasse + vinasse and grounded bagasse + mineral media. Relating to the control was observed that the pre-treatment in conjunction with 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH + autoclave promoted more breakage in the fiber increasing to 1,4 times the level of cellulose and decreasing the levels of hemicellulose to 8,5 times. This same treatment promoted a higher lignolytic activity for the four lineages. The ascomycete *T. reesei* produced laccase, peroxidase and manganese peroxidase in all treatments including the control, having the manganese peroxidase activity ranging from 1,9 to 4,8 times higher than the basidiomycetes.

Keywords: Sugarcane bagasse; Vinasse; Enzymatic hydrolysis; Lignocellulose; Fungi

ABREVIATURAS

E.C. = *Enzyme Committee* (classificação bioquímica de enzimas)

MBM = Meio Bagaço Moído

MBV = Meio Bagaço Vinhaça

CCB = Coleção de Cultura de Basidiomicetos (Instituto de Botânica (IBt) de São Paulo)

rpm = rotações por minuto

DNS = ácido 3,5-dinitrosalicílico

FPU = Filter Paper Unit (Unidade Internacional)

CMC = Carboximetilcelulose

UI = Unidade Internacional

°C = Graus Celsius

UI = Unidade internacional

μ = micro (10^{-6})

S= condutância elétrica

cm = centímetro

mm = milímetro

mL = mililitro

L = litro

Ø = diâmetro

atm = pressão atmosférica

mbar = pressão em milibar

v/p = volume por peso

M = molaridade

kDa = Kilo Daltons

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Modelo da parede celular elucidando o complexo lignocelulolítico | 16 |
| Figura 2 - A) unidade de β -D-glicose B) celobiose, polímero linear de D-glicose ligado por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4)..... | 24 |
| Figura 3 - Estrutura esquemática de uma fibrila de celulose, mostrando regiões cristalinas e amorfas | 24 |
| Figura 4 - Unidade de fenilpropano e monômeros de lignina | 28 |
| Figura 5 - Meio de bagaço contendo guaiacol (A_x) e meio contendo CMC (B_x) corado com Lugol | 47 |
| Figura 6 - Peso seco ($g L^{-1}$) dos fungos selecionados em relação à temperatura em $^{\circ}C$ em meio mineral (MBM)..... | 50 |
| Figura 7 - Peso seco ($g L^{-1}$) dos fungos selecionados em relação a temperatura em $^{\circ}C$ em meio vinhaça (MBV) | 51 |
| Figura 8 - Atividade da exoglicanase dos fungos cultivados em bagaço em diversos tratamentos, coletado após 15 dias de cultivo a $30^{\circ}C$ | 52 |
| Figura 9 - Atividade da endoglicanase dos fungos cultivados em bagaço em diversos tratamentos, coletado após 15 dias de cultivo a $30^{\circ}C$ | 53 |
| Figura 10 - Atividade celulolítica do fungo <i>Pleurotus sajor-caju</i> CCB020 cultivado durante 30 dias, a $30^{\circ}C$ em meio: A) MBV e B) MBM | 56 |

- Figura 11 - Atividade celulolítica do fungo *Pleurotus ostreatoroseus* CCB440 cultivado durante 30 dias, a 30°C em meio: A) MBV e B) MBM 57
- Figura 12 - Atividade celulolítica do fungo *Pleurotus ostreatus* cultivado durante 30 dias, a 30°C em meio: A) MBV e B) MBM..... 58
- Figura 13 - Atividade celulolítica do fungo *Trichoderma reesei* cultivado durante 30 dias, a 30°C em meio: A) MBV e B) MBM..... 59
- Figura 14 - Atividade lignolítica do fungo *Pleurotus sajor-caju* CCB020 cultivado durante 30 dias em meio MBV a 30°C 62
- Figura 15 - Atividade lignolítica do fungo *Pleurotus ostreatoroseus* CCB440 cultivado durante 30 dias em meio MBM a 30°C 62
- Figura 16 - Atividade lignolítica do fungo *Pleurotus ostreatus* cultivado durante 30 dias em meio MBV a 30°C 62
- Figura 17 - Atividade lignolítica do fungo *Pleurotus ostreatus* cultivado durante 30 dias em meio MBM a 30°C 62
- Figura 18 - Atividade lignolítica do fungo *Trichoderma reesei* cultivado durante 30 dias em meio MBV a 30°C 63
- Figura 19 - Atividade lignolítica do fungo *Trichoderma reesei* cultivado durante 30 dias em meio MBM a 30°C 63

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Componentes do bagaço de cana-de-açúcar | 21 |
| Tabela 2 - Meio mineral usado na produção de celulases | 39 |
| Tabela 3 - Caracterização em termos de porcentagem de lignina, celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar tratado e não-tratado | 49 |
| Tabela 4 - Atividade lignolítica (UI L ⁻¹) do fungo <i>Pleurotus sajor-caju</i> CCB020 em diferentes tratamentos no bagaço + vinhaça após 15 dias de cultivo | 54 |
| Tabela 5 - Atividade lignolítica (UI L ⁻¹) do fungo <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> CCB440 em diferentes tratamentos no bagaço + vinhaça após 15 dias de cultivo | 54 |
| Tabela 6 - Atividade lignolítica (UI L ⁻¹) do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> em diferentes tratamentos no bagaço + vinhaça após 15 dias de cultivo | 55 |
| Tabela 7 - Atividade lignolítica (UI L ⁻¹) do fungo <i>Trichoderma reesei</i> em diferentes tratamentos no bagaço + vinhaça após 15 dias de cultivo | 55 |

1 INTRODUÇÃO

A indústria sucroalcooleira é uma excelente representação do processo de desenvolvimento do Brasil, tendo a cana-de-açúcar como uma das maiores monoculturas de acordo com o Serviço Brasileira de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE, 2006). A previsão da produção de cana-de-açúcar, para a safra atual, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2008), é que o total deverá atingir aproximadamente 558,72 milhões de toneladas que serão processadas no setor sucroalcooleiro, correspondendo a 11,4% a mais que a safra passada (2006/2007). Com isso, gera-se uma altíssima quantidade de resíduos, entre eles o bagaço e a vinhaça. A estimativa é de para cada tonelada de cana-de-açúcar, aproximadamente 250 a 280 kg de bagaço é produzido e entre 700 e 900 litros de vinhaça. Esses produtos residuais possuem capacidade de agregar valor a produção dependendo do setor em que são empregados. O bagaço de cana-de-açúcar é queimado para co-gerar energia a usina e é um subproduto rico em celulose e que pode ser re-utilizado na obtenção de álcool, gás combustível e enzimas microbianas. A vinhaça é vastamente utilizada na agricultura em fertirrigação, por conter um alto teor de DBO e DQO e outros componentes orgânicos e inorgânicos tóxicos, a torna um resíduo de potencial poluente.

Existe um interesse mundial no potencial de comercialização do uso de celulasas em meios alimentícios e também na conversão química e biológica de materiais lignocelulolíticos. A celulose é o carboidrato mais abundante atualmente, proveniente da biomassa terrestre e marítima, com uma taxa de síntese aproximadamente 4×10^{10} toneladas por ano, por isso tem atraído interesse de pesquisadores na sua utilização para o desenvolvimento de uma nova fonte de renovável (BÉGUIN, 1990). Recentemente tem aumentado as pesquisas voltadas para os mecanismos enzimáticos da celulose e os problemas envolvidos na conversão direta da biomassa em produtos úteis por meio de enzimas isoladas ou de microrganismos lignocelulolíticos. Uma formulação artificial de lignocelulasas capazes de trabalharem efetivamente, em concentrações baixas, é um objetivo ainda não alcançado (SCHWARZ, 2001).

A degradação biológica do bagaço da cana-de-açúcar envolve a hidrólise enzimática das ligações glicosídicas das cadeias de celulose. A celulose na natureza quase nunca ocorre em sua forma pura, sendo geralmente encontrado na forma de complexos. Esses complexos usualmente afetam sua degradação natural tanto quanto a atividade microbiana (LESCHINE, 1995). As fibras da celulose estão geralmente fixadas com outros polímeros, principalmente hemicelulose, lignina e pectina (ENARI, 1983; LESCHINE, 1995). Em forma nativa, a celulose, devido a sua

heterogeneidade e insolubilidade, tornam-se um substrato recalcitrante para hidrólise. Os microrganismos capazes de realizar essa difícil tarefa desenvolveram um complexo sistema de várias enzimas. Tais complexos aderem no envelope celular e no próprio substrato, mediando assim uma maior proximidade necessária para ações enzimáticas (SCHWARZ, 2001). Diferentes microrganismos atuam em cooperação em diversas etapas da degradação da celulose. A degradação da celulose em glicose ocorre tanto em ambientes aeróbios como anaeróbios. Por exemplo, bactérias aeróbias produzem inúmeras enzimas extracelulares com diferentes módulos de aderência necessária para as diversas conformações da celulose. Em comparação, as bactérias anaeróbias possuem um complexo de enzimas único, com 11 enzimas alinhadas conseguindo uma alta concentração de proteína com os corretos níveis e ordem dos componentes necessários (LESCHINE, 1995).

A lignina é um constituinte da parede celular de todas as plantas vasculares, sendo considerada uma macromolécula constituída de unidades de fenilpropano, apresentando uma conformação tridimensional e amorfa, representando de 20% a 30% do total dos lignocelulósicos. É um dos biopolímeros mais abundante na biosfera, sendo uma parte considerável do carbono fixado por fotossíntese. Devido à estreita associação entre celulose, hemicelulose e lignina, esses compostos não estão uniformemente distribuídos na parede celular das plantas. A parede secundária contém alta quantidade de celulose, enquanto a lamela média possui maior quantidade de lignina. Entretanto, todos estes três compostos podem ser encontrados em todas as camadas da parede celular vegetal.

Este trabalho trata da seleção e estudo da ação de microrganismos lignocelulolíticos de origem fúngica sobre as fibras de lignina e celulose oriundas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas quimicamente; visando o aproveitamento desse resíduo após a hidrólise enzimática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Materiais lignocelulolíticos

Devido o aumento da demanda energética no mundo, pesquisas por fontes renováveis de energia, principalmente etanol, têm atraído a atenção de todos. Por esse motivo, os materiais de origem lignocelulolítica provenientes de atividades agrícolas como o bagaço de cana-de-açúcar, palha, madeira, restos de culturas de grãos e frutíferas, têm sido aproveitados visando à utilização nos processos para renovação energética. Devido esses materiais serem ricos em sacarídeos, alguns muito complexos, a conversão dessas moléculas é vista como a alternativa mais viável na substituição dos combustíveis fósseis. Com isso intensos estudos estão sendo realizados para entender o complicado processo de degradação desses compostos a fim de serem utilizados para fins práticos.

Os componentes principais dos materiais lignocelulolíticos são a celulose, hemicelulose e lignina. As paredes das células das plantas são compostas por diferentes camadas, que diferem uma da outra em respeito à estrutura e a composição química. Basicamente, a celulose forma um esqueleto que é formado por substâncias estruturais (hemiceluloses) e envoltórias (lignina). Essas substâncias estão fortemente associadas e ligadas covalentemente (FENGEL; WEGENER, 1989). É entendido que as moléculas de hemicelulose estão quase paralelas as fibrilas de celulose, enquanto a lignina apresenta-se em uma forma aleatória, conferindo maior estabilidade à parede, como mostra a Figura 1:

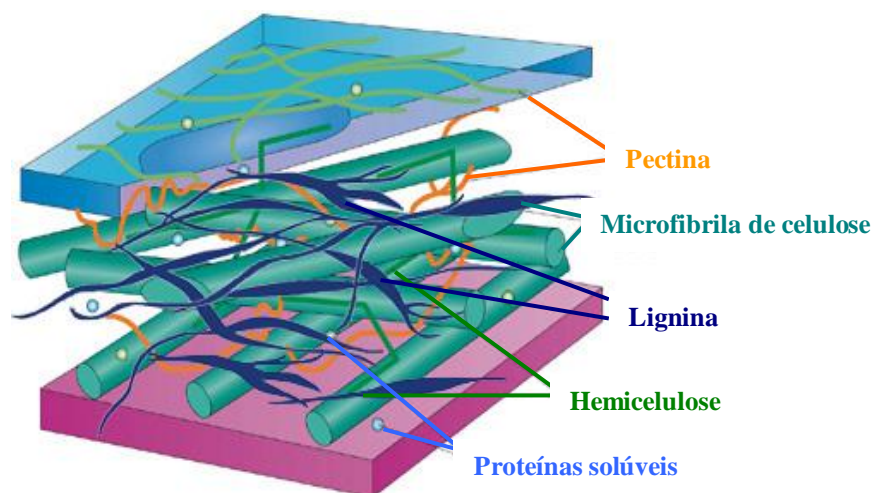


Figura 1- Modelo da parede celular elucidando o complexo lignocelulolítico. Fonte: Sticklen (2008)

Uma grande variedade de fungos e bactérias consegue degradar esse material lignocelulósico usando uma bateria de enzimas hidrolíticas e oxidativas (VITTI, 1988). A celulose e a hemicelulose podem ser hidrolizadas formando açúcares que são posteriormente convertidos quimicamente ou por microrganismos, em etanol ou butanol, ou também em vários outros produtos como acetona, ácidos orgânicos, ou glicerol (WYMAN, 2003).

Nas duas últimas décadas, o custo de conversão de biomassa celulósica em etanol tem reduzido ao ponto de ser economicamente viável (WRIGHT, 1988). O etanol combustível reduz a emissão dos gases do efeito estufa, promove a melhoria da qualidade do ar entre outras vantagens ambientais e econômicas.

Segundo a União da Indústria da Cana-de-Açúcar (UNICA), a safra de 2007/2008 produziu até essa data, aproximadamente 22,5 bilhões de litros de etanol. Com a tecnologia de hoje, todos os automóveis equipados com catalisadores, podem funcionar com uma mistura de 90% gasolina e 10% álcool sem precisar modificações no motor. No Brasil, o etanol puro é utilizado como alternativa ao combustível fóssil. E qualquer país com uma economia baseada na agricultura pode usufruir da tecnologia para a fermentação de etanol. Segundo levantamento feito pela União dos produtores de Bioenergia (UDOP, 2008), os Estados Unidos registrou um aumento na produção de etanol de milho alcançando 614 mil barris diários enquanto a Europa produz aproximadamente 2 bilhões de litros de etanol a partir de beterraba.

Segundo Tanaka (1986), a produção global de biomassa lignocelulósica é cerca de 200×10^9 toneladas por ano, dentre esse montante, apenas de 8 a 20×10^9 toneladas da biomassa disponível é acessível. No entanto, a utilização do material lignocelulósico não é sempre prático devido à disponibilidade das safras, clima alterado, e o alto custo de transporte e armazenamento de grande quantidade de material orgânico. E também a utilização da tecnologia em escala industrial (TANAKA, 2006; PALONEN, 2004).

O processo biológico em converter a lignocelulose em álcool combustível requer a deslignificação do material para liberar celulose e hemicelose, que em seguida com a despolimerização dos polímeros de carboidratos libera os açúcares que são utilizados na fermentação (PALONEN, 2004). Entre esses processos, a deslignificação do material lignocelulolítico é o mais limitante e mais difícil de ser alcançado.

Basicamente, dois grupos de enzimas são responsáveis pela degradação da lignocelulose, as enzimas oxidativas e as hidrolíticas. As enzimas oxidativas, como lacase, manganês-peroxidase e

lignina-peroxidase, atuam na degradação da lignina e detoxificam o meio de crescimento dos metabólitos gerados durante a degradação. A degradação e/ou biotransformação da lignina permite que as enzimas hidrolíticas como a celulase e a xilanase entre outras, atuem nas fontes de carbono, possibilitando a absorção de polissacarídeos pelo micélio, os quais constituem fonte de carbono principalmente para formação das frutificações (KAMIDA, 2005).

2.2 Fungos lignocelulolíticos

Em geral, os fungos que decompõem substâncias lignocelulósicas ocorrem no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes. Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases, entretanto apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, diversos substratos são utilizados com o objetivo de se induzir e/ou medir a atividade do complexo lignocelulolítico total, tais como: algodão, papel de filtro, carboximetil celulose (CMC) e resíduos agrícolas (AGUIAR; MENEZES, 2000). Os resíduos agrícolas podem ser devidamente moídos ou triturados para servir de fonte de nutrientes ou ainda enriquecidos com fontes extras de nitrogênio, minerais e/ou vitaminas tornando-se fonte de produção elevada de atividade enzimática (BISARIA; GOSE, 1984; ELISASHVILI, 1993). Os indutores da síntese lignocelulolítica dos fungos variam dependendo da concentração em que se encontram, ou pela presença de glicose ou outros açúcares no meio de crescimento. Os indutores ou são fontes de carbono para o crescimento celular ou indutores da síntese enzimática (GONG; TSAO, 1975).

As reações catalisadas por enzimas oxidativas têm um papel significativo na completa degradação da biomassa lignocelulolítica. Contudo, apenas alguns microrganismos na natureza, pertencentes a classe dos fungos de degradação branca, possuem sistemas capazes de degradar a lignina com eficiência (HATAKKA, 1994).

Os fungos degradadores de madeira se dividem em três grupos distintos: fungos de degradação branca, degradação marrom e degradação branda ou macia, de acordo com a morfologia da degradação. Esses fungos degradadores são taxonomicamente variados e pertencem principalmente a divisão Basidiomycotina (MELO, 2008).

2.2.1 Fungos de degradação branca

Os basidiomicetos responsáveis pela degradação branca da madeira selecionam a lignina presente na parede celular, deixando a celulose praticamente intacta, mas variam consideravelmente com o tipo de ataque à lignina, com os polissacarídeos da madeira e a velocidade com o qual atuam na remoção da lignina (KIRK, 1998).

Esses fungos são classificados, dessa maneira, por características morfológicas e fisiológicas das hifas. A maioria tem hifas dicarióticas com conexões específicas entre os septos do micélio (MELO, 2008). Esses basidiomicetos oxidam compostos fenólicos, relacionados à lignina, que está principalmente associada a enzimas extracelulares lignocelulolíticas (KIRK, 1986; JØRGENSEN, 2005).

Basidiomicetos de degradação branca como *Pleurotus* spp, são caracterizados pela habilidade de degradar os polímeros da lignina em tecidos vegetais. A lignina é um polímero aromático da parede celular vegetal que proporciona a célula rigidez, impermeabilidade, resistência microbiana e possuem uma biodegradabilidade restrita. Com isso o ataque inicial do fungo precisa ser extracelular, não-específico e oxidativo (KIRK, 1986; KLYOSOV, 1990). Essa biodegradação lignolítica envolve a ação de enzimas como lignina peroxidase, manganês-peroxidase, peroxidases e lacases (ERIKSSON, 1990; KIRK, 1986; HATAKKA, 1994; LEE, 2003; FERRAZ, 2004; JØRGENSEN, 2005). Os fungos do gênero *Pleurotus* produzem MnP, peroxidases, lacases, mas não produzem ligninas peroxidases (COHEN, 2002). Nos anos mais recentes análises mais enfáticas estão sendo na MnP, porque essa enzima é produzida pela maioria dos fungos de degradação branca,.

Os fungos desse gênero são também são biologicamente versáteis quando a biodegradação de materiais contaminantes. Foi descoberto que o fungo *P. ostreatus* é capaz de degradar e mineralizar compostos xenobióticos, como PAHs, corantes industriais e outros poluentes de solo, como a atrazina (MENEZES , 1997; DELLAMATRICE *et al*, 2005).

2.2.2 Fungos de degradação marrom

Os fungos de degradação marrom promovem a degradação dos polissacarídeos celulose e hemicelulose, e deixam a lignina intacta. Com essa característica, o material restante desse

processo tem uma coloração amarronzada e de aparência frágil (LEE, 2003). Esses fungos representam somente 6% da classe Basidiomicotina degradadores de madeira (DURÁN; ESPOSITO, 1997).

O mecanismo no qual esses fungos modificam a lignina ainda é desconhecido, já que enzimas lignolíticas não são produzidas (LEE, 2003; FUJIAN, 2001; TIEN, 1984). Esses fungos são capazes de realizar modificações na lignina, resultando em decréscimo dos grupos metoxilas, fazendo com que os grupos fenólicos aumentem significativamente. Esse processo altera a lignina para uma biodegradação subsequente. Acredita-se que a ação de glicoprotéínas contendo ferro participe na transformação da lignina por via da produção de radicais hidroxila (AZEVEDO, 2008).

As células da parede da madeira são atacadas por esses fungos formando poros e erosões, devido à quebra das microfibrilas da celulose. Devido a esse mecanismo, as hifas dos fungos de degradação marrom pode se dividir em duas categorias: as que degradam os componentes da parede celular da madeira, incluindo a lignina e as que somente modificam a lignina enquanto degradam a celulose e/ou hemicelulose (LEE, 2003; AZEVEDO, 2008).

2.2.3 Fungos de degradação branda

Geralmente pertencentes às classes Ascomicotina e Deuteromicotina, esses fungos podem causar degradação na madeira em uma forma suave, de aparência úmida (JØRGENSEN, 2005). Essa degradação ocorre pela penetração fina das hifas fúngicas nas camadas da parede celular.

Os fungos de degradação branda colonizam e degradam madeiras duras, de alta umidade, mas também degradam madeiras moles porem com uma taxa de hidrólise mais lenta quando comparada com fungos de degradação branca e marrom. Esses fungos são mais eficientes na despolimerização de compostos sintéticos de lignina (AZEVEDO, 2008).

2.3 Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea pertencente ao gênero *Saccharum*. É proveniente da Nova-Guiné e foi levada para o sul da Ásia, onde foi amplamente usada na forma de xarope, sendo que a primeira evidência da utilização do açúcar sólido foi no ano 500, na Pérsia. (UNICA, 2008). Atualmente, a cana é a principal matéria-prima para a fabricação do açúcar e etanol.

Aproximadamente metade da produção mundial de cana-de-açúcar é garantida atualmente por quatro países das Américas: Brasil, Cuba, México e EUA (SEGATO, 2008). Mas a expansão do plantio da cana-de-açúcar para 6,62 milhões de hectares vai levar o Brasil a bater um novo recorde de produção na safra 2007/08 (UNICA, 2008). A colheita será de 528 milhões de toneladas, de acordo com o primeiro levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) em 2008. As regiões de cultivo são o Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste, permitindo duas safras por ano.

O bagaço da cana-de-açúcar é resultante do processo de moagem do colmo extraído para a obtenção do caldo que passa por processos até a obtenção de açúcar e álcool. Para cada tonelada de cana-de-açúcar colhida, aproximadamente 250 kg de bagaço é produzido, correspondendo a 30% do total de cana moída (SILVA, 2007). O bagaço é um subproduto do qual ficam apenas alguns constituintes do material original e, no caso da cana-de-açúcar, resta à fibra e alguma quantidade de açúcar. Na maioria das usinas, o bagaço resultante é queimado para co-gerar energia para a própria usina, entretanto cerca de 40 a 50 kg (MACHADO, 2000) por tonelada de cana-de-açúcar moída não é utilizada sendo preocupando em termos de espaço e material poluente. A composição química do bagaço varia de acordo com vários fatores, dentre eles, a variedade da cana, o tipo de solo de plantio, as técnicas de colheita e de manuseio. A Tabela 1 abaixo mostra a composição média característica do bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 1 - Componentes do bagaço de cana-de-açúcar

| Componentes | Bagaço de cana-de-açúcar (<i>in natura</i>) | |
|--------------------|---|---|
| | % | Observações |
| Fibra ou bagaço | 45 | Fração sólida orgânica insolúvel |
| Sólidos insolúveis | 2-3 | Fração sólida orgânica (terra, pedras e materiais estranhos) oriundos da colheita e do solo |
| Sólidos solúveis | 2-3 | Fração que se dissolve na água, composta por sacarose, não extraída na usina |
| Água | 50 | Retirada do bagaço (retirada por mecanismos de adsorção ou capilaridade) |

Fonte: SEBRAE, 2006

2.4 Vinhaça

Todos os líquidos susceptíveis a sofrer uma fermentação são denominados mostos. Uma vez fermentado o mosto de cana, passa a chamar-se vinho, ou vinhoto, no qual pode ser destilado possibilitando a recuperação de álcool, restando um resíduo que é a vinhaça. É um resíduo ácido (pH 4,0 a 4,8), de cor escura com alta DBO (42,000-100,000 mg L⁻¹) e DQO (10,000-210,000 mg L⁻¹) e emite um cheiro forte característico.

A vinhaça é considerada um resíduo da indústria sucroalcooleira. Aproximadamente de 10 a 18 litros de vinhaça é obtido por 1 litro de álcool produzido e sua composição varia de acordo com a matéria prima e dos equipamentos utilizados no processo de obtenção do álcool (WADT, 2008).

A vinhaça é empregada no setor agrícola como fertilizante principalmente nos cultivos de cana-de-açúcar. A vinhaça pode promover melhoria na fertilidade do solo, no entanto as quantidades não devem ultrapassar sua capacidade de retenção de íons, ou seja, as dosagens dependem de acordo com as características do solo. Quando usada em proporções desbalanceadas, acarreta na lixiviação de vários desses íons, sobretudo nitrato e potássio (SILVA, 2007).

Sua aplicação é realizada de diversas formas: por caminhões tanques, por sulcos de infiltração, por aspersão e atualmente existe a possibilidade da dispersão da vinhaça diluída por meio de pivôs centrais (UNICA, 2008).

Segundo Silva (2006), alguns efeitos da vinhaça no solo são: elevação do pH, aumento da disponibilidade de alguns íons, aumento da troca catiônica, promove o aumento da retenção de água e melhora a estrutura física do solo. Esse resíduo também deve ser visto como um agente de aumento na população e na atividade microbiana do solo. Enquanto a matéria orgânica contida na vinhaça é introduzida no solo, ela é metabolizada por fungos, que assim neutralizam a acidez, permitindo a proliferação bacteriana, responsável pela mineralização e imobilização do nitrogênio, nitrificação, desnitrificação e fixação biológica. A neutralização da acidez do solo também proporciona o aumento de outros microrganismos participantes de ciclos biogeoquímicos de outros elementos.

A grande preocupação da vinhaça advém basicamente de sua decomposição química, da quantidade na qual é gerada, na qual a torna um grande poluidor (MACHADO, 2004). É caracterizada por ser um resíduo com um alto conteúdo de matéria orgânica, elementos minerais (K, Ca e Mg), baixo pH, cor marrom-escura devido a presença de polímeros chamados

melanoidinas, que são formados pela reação de Maillard e compostos fenólicos (ácido tânico e húmico). Esses compostos são altamente recalcitrantes, ou seja, persistem no solo, e possuem propriedades antioxidantes (NAIK, 2008).

Até o final da década de 70, volumes crescentes de vinhaça eram lançados nos mananciais superficiais, principalmente nos cursos d' água como rios e ribeirões nas proximidades das usinas. Quando essa prática foi proibida, os efeitos decorrentes já eram grandes (VIANA, 2006). A carga orgânica da vinhaça causa a proliferação de microrganismos que esgotam o oxigênio dissolvido na água, assim impedindo a sobrevivência da flora e fauna aquática e dificultando o aproveitamento desses mananciais.

Com o aumento substancial da produção de etanol no Brasil, existe também um aumento na necessidade do controle desse resíduo. Diversas tecnologias estão surgindo para o reaproveitamento e/ou tratamento da vinhaça uma vez que esse composto apresenta um grande potencial poluidor na natureza (SILVA, 2007; MANE, 2006).

2.5 Celulose

A celulose é o biopolímero mais abundante em ambiente terrestre. Acreditava-se que essa celulose produzida por plantas e algas eram as fontes mais importantes na produção de celulose, mas foi documentado que organismos não fotossintéticos como algumas bactérias, invertebrados marinhos, fungos e amebas produzem uma grande quantidade dessa celulose na biosfera. A cada ano mais de 10^{11} toneladas de CO_2 são fixados por meio da fotossíntese derivada de material vegetal, e metade desse material consiste em celulose (LESCHINE, 1995).

É o maior componente da madeira, sendo um polímero linear formado exclusivamente por unidades de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). O polímero é linear, insolúvel em água e de massa molecular que varia entre 50 mil e 2,5 milhões de Dalton dependente da origem da amostra. A celulose é composta por unidades monoméricas de celobiose, a qual é formada pela junção de duas moléculas de glicose seguida da eliminação da água através das hidroxilas ligadas ao carbono 1 e 4 (FENGEL; WEGENER, 1989). Estritamente a celulose é composta por monômeros de celobiose repetindo-se e apresentando o oxigênio que liga os anéis glicosídicos na posição equatorial (ESPOSITO, 2004) como mostra a Figura 2.

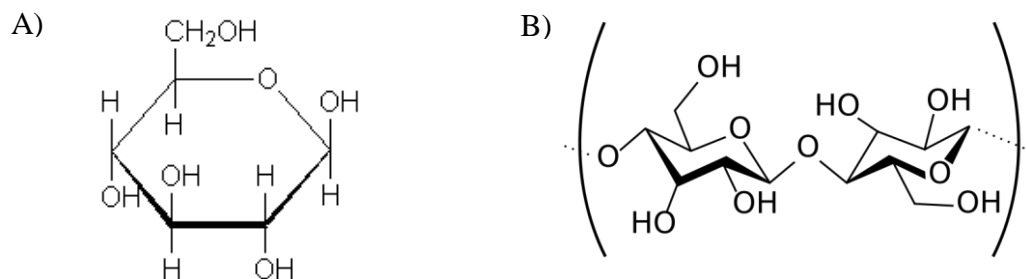


Figura 2 - A) unidade de β -D-glicose B) celobiose, polímero linear de D-glicose ligado por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$

As cadeias de celulose são longas, paralelas e as fibrilas estão densamente empacotadas. No estado sólido, existem pontes de hidrogênio entre as moléculas de celulose que levam a formação de estruturas supramoleculares arranjadas em um sistema ordenado parecidas às de cristais. No entanto, certa porção de celulose apresenta-se em forma de cadeias interligadas de maneira caótica formando a celulose amorfa. A porcentagem de cristalinidade da celulose em forma nativa é de 60-90%, podendo apresentar formas diferentes, numeradas de I à IV, sendo a forma nativa denominada “celulose I”. A porcentagem e a forma cristalina da celulose na parede celular variam de acordo com o estágio de desenvolvimento e o tipo da célula em questão. (FENGEL; WEGENER 1989; LESCHINE, 1995).

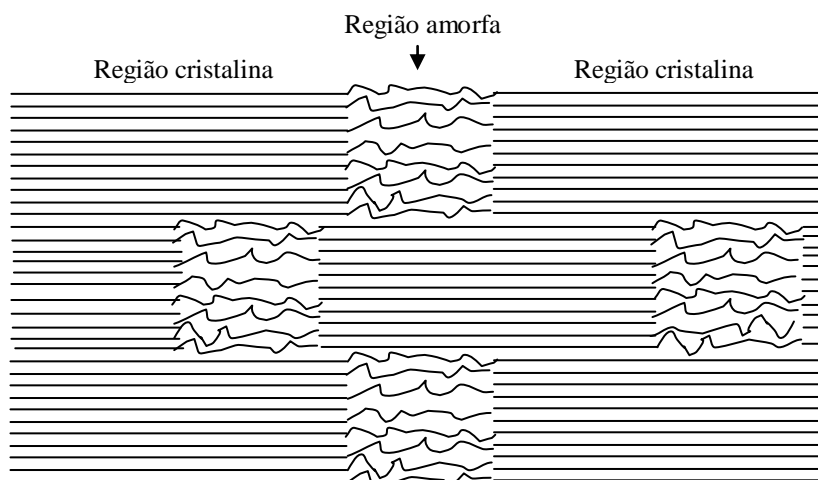


Figura 3 - Estrutura esquemática de uma fibrila de celulose, mostrando regiões cristalinas e amorfas

A característica semicristalina da celulose faz com que sua degradação seja considerada um problema. Na natureza, o ciclo do carbono ocorre por meio de microrganismos celulolíticos,

incluindo fungos, levedos e bactérias provenientes de uma variedade de habitats. A quebra da celulose raramente ocorre por meio de um processo isolado, mas é, em vez disso, parte de um ataque conjunto que ocorre sobre um composto complexo de celulose unida à lignina e hemicelulose. A ação combinada de enzimas extracelulares com especificidade complementar é essencial (BERGUIN; AUBERT, 1994).

As principais enzimas responsáveis pela quebra das ligações 1,4- β da celulose são encontradas em fungos: as endoglicanases (1,4- β -D-glicanohidrolase), as exoglicanases (1,4- β -D-glicanocelobiohidrolase) e as β -glicosídes. As endoglicanases são responsáveis pela quebra das ligações 1,4- β da celulose, deixando assim as pontas das regiões amorfas abertas para hidrólise pelas celobiohidrolases, formando fragmentos menores. Finalmente as β -glicosídes hidrolisam celobiose e celodextrinas de baixo peso molecular resultando em glicose (LESCHINE, 1995, BOISSET *et al.*, 2000).

O sistema celulose-celulase é muito heterogêneo e que a reação de hidrólise da celulose requer vários passos. Um dos mais importantes consiste em um pré-requisito para as reações catalíticas subsequentes: a adsorção das moléculas de celulase sob os pertinentes sítios da superfície da celulose (LEE *et al.*, 1982). A adsorvibilidade da endoglicanase é um fator catalítico na hidrólise da celulose amorfa e cristalina (KLYOSOV, 1990). Algumas celulases difundem muito lentamente dentro dos pequenos espaços entre as microfibras, adsorvem especificamente sobre a superfície interna dos feixes de microfibras e apresentam baixa ação catalítica, diferentemente das proteínas adsorvidas sob a superfície das fibras (TANAKA *et al.*, 1986). O mecanismo de adsorção da celulase depende da ação sinérgica entre: 1) o componente da celulase e sua relativa adsorvibilidade; 2) a cristalinidade, heterogeneidade e volume do poro do substrato, e 3) temperatura e transferência de massa característica (NIDETZKY; STEINER, 1994).

2.5.1 Hidrólise da celulose

A hidrólise enzimática da celulose é comumente um processo incompleto e lento. Embora em intervalos de 48 horas, temos exemplos de consumação satisfatória, como a da flora microbiana do rúmen bovino, hidrolisando de 60-65% da celulose disponível e também de cupins capazes de assimilar até 90% de celulose da madeira (BREZNAK; BRUNE, 1994). Enquanto isso, em sistemas mais complexos, como o apodrecimento de uma árvore no solo, essa degradação pode

levar meses para ser completada. Ainda mais, uma pequena porcentagem da celulose é inacessível, principalmente se coberta por lignina, que é convertida em ácidos húmicos (SCHWARZ, 2001).

A fisibilidade da hidrólise enzimática é bastante dependente da natureza do material celulolítico. A principal vantagem da hidrólise enzimática é que a reação pode ser realizada em condições favoráveis não sendo necessárias altas temperaturas e pressões ou pHs extremo. (ENARI, 1983).

De acordo com Ferraz *et al.* (2000) essa hidrólise das pontes glicosídicas ocorre através de catálise ácida, onde são necessários dois aminoácidos críticos: um doador de próton e um nucleófilo/base. A catálise ácida é usualmente promovida pelos resíduos aspartato ou glutamato, ou ambos. Resíduos encontrados em sítios ativos são, usualmente, altamente conservados durante a evolução. Nesta catálise, ocorre uma reação de remoção simples ou dupla, resultando em inversão ou retenção, respectivamente, da configuração anomérica do átomo de carbono do glicosídeo hidrolisado (KLYOSOV, 1990; NIDETZKY; STEINER, 1994; LESCHINE, 1995).

Segundo estudos de Zhang e Lynd (2006), as características amorfas e de cristalinidade da celulose interferem no complexo enzimático. Esses estudos demonstram que as hidrólises de celulasas fúngicas são de 3 a 30 vezes mais eficazes na forma amorfa. Com isso a acessibilidade a essa parte da celulose torna-se um fator de grande importância na eficiência da hidrólise da celulose. Isso também é demonstrado por pré-tratamentos realizados nos substratos para disponibilizar o acesso a essas regiões.

O fator limitante para o desenvolvimento de um processo enzimático de hidrólise é o custo monetário. O maior fator é a produção das enzimas celulolíticas e é necessária uma otimização no processo para o baixo custo, como o desenvolvimento de cepas microbianas de alta produtividade, melhoramento da produção e hidrólise das enzimas tanto quanto a reciclagem das enzimas para um maior aproveitamento (ENARI, 1983; TANAKA, 1981).

Celulasas de uma variedade de microrganismos têm sido isoladas, clonadas e caracterizadas bioquimicamente. Todas essas enzimas hidrolisam ligações β -1,4-glicosídicas por meio de catálise acídica simples, com a doação de um próton e uma base nucleofílica. Liberando produtos pela inversão ou pela retenção das configurações anoméricas no carbono 1 (SCHWARZ, 2001). Essa degradação da celulase pelos fungos se diferencia das bactérias. As bactérias não produzem celobiohidrolase e adiante, com exceções, não formam β -glucosidases extracelulares. As endoglicanases endocelulares bacterianas, quebram as celulosas em cadeias menores de

oligosacarídeos. Estas são hidrolisadas em glicose por uma β -glicosidase periplasmática (ENARI, 1983).

Em estudos de hidrólise por Jørgensen *et al.*, 2005, a atividade da β -glucosidase é crítica quanto à acumulação de celobiose, que inibe fortemente a atividade das celulases. Esse problema é resolvido pelo acréscimo de β -glicosidase, mais resistentes, derivadas de diferentes organismos (ENARI, 1983; JØRGENSEN, 2005). Tradicionalmente a hidrólise da celulose cristalina, por parte dos fungos requer a cooperação da ação das endoglicanases e celobiohidrolases ou exocelulases. Cada componente tem seu papel na hidrólise dos componentes insolúveis. Dois tipos de sinergismo têm sido esclarecidos (NIDETZKY, 1994). O sinergismo entre as endo- e exocelulases é interpretada como um mecanismo seqüencial da ação enzimática. As endoglicanases atacam inicialmente as regiões amorfas da celulose liberando-as para a ação das exoglicanases (NIDETZKY, 1994).

2.5.2 Sinergismo entre celulases

Sinergismo é dito quando a atividade exibida por misturas de componentes é maior que a soma das atividades desses componentes avaliadas separadamente (WOOD *et al.* 1979). Tradicionalmente a hidrólise da celulose cristalina por parte dos fungos requer a cooperação da ação das endoglicanases e celobiohidrolases ou exocelulases. Cada componente tem seu papel na hidrólise dos componentes insolúveis.

Dois tipos de sinergismo têm sido esclarecidos (NIDETZKY, 1994). O sinergismo exo-endo é interpretado como um mecanismo seqüencial da ação enzimática. As endoglicanases atacam inicialmente as regiões amorfas da celulose liberando-as para a ação das exoglicanases. Outro modelo assume a competição entre as celulases individuais em regiões para adsorção de celulose (NIDETZKY, 1994), mas esse sinergismo se mantém não esclarecido. Outros sinergismos também são propostos para no processo de hidrólise da celulose: 1) exoglicanase-exoglicanase (FAGERSTAM; PETTERSSON, 1980; WOOD; MCCRAE, 1979), 2) endoglicanase e endoglicanase 3) endoglicanase ou exoglicanase com glicosidade, que reduz inibição por celobiose (WOODWARD, 1991), 4) sinergismo de aproximação devido à formação de complexos de celulose (SCHWARZ, 2001).

2.6 Lignina

A lignina, depois da celulose, é o segundo biopolímero terrestre mais abundante. Nas plantas, é encontrada como parte integral da parede celular, emaranhada em uma complexa matrix de celulose e hemicelulose. O isolamento de lignina nativa é muito complicado, quando é possível (FENGEL; WEGENER, 1983). É uma complexa macromolécula fenólica, hidrofóbica, constituída por unidades de fenilpropano, de característica tridimensional e amorfa, representando de 20% a 30% do total dos lignocelulósicos. A biossíntese da lignina é um campo de pesquisa muito ativo, principalmente por causa de sua relevância econômica (FENGEL; WEGENER, 1983; PALONEN, 2004). Para a produção de papel de alta qualidade, a lignina precisa ser extraída da polpa por processos caros e com alto potencial de poluição, assim requerendo grandes quantidades de energia e produtos químicos.

A lignina é formada pela remoção da água para constituir a estrutura aromática de açúcar existindo vários tipos de monômeros para a formação desta, e esses tipos e proporções dependem da sua natureza. Os grupos hidroxilas reagem mutuamente ou com os grupos acetona ou com o aldeído. Quando a hidroxila reage com outra, forma-se uma ligação do tipo éter, quando ligada a um aldeído, forma-se um hemiacetal e quando se liga a uma acetona, forma-se o cetal (PALONEN, 2004).

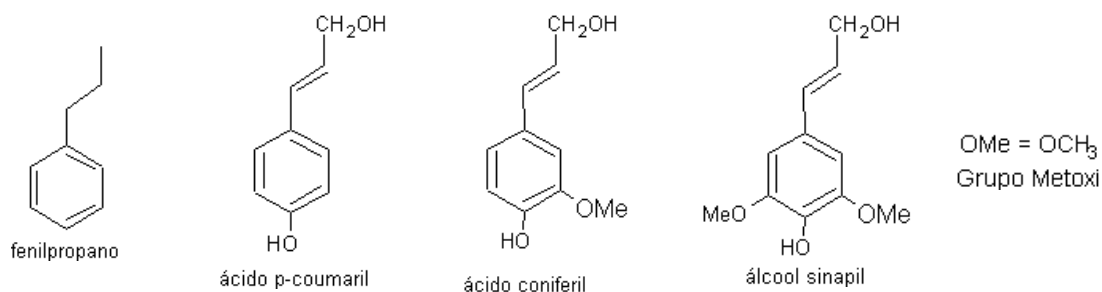


Figura 4 - Unidade de fenilpropano e monômeros de lignina

De acordo com Novikova (2002), a lignina parece consistir de regiões amorfas e forma partículas e glóbulos estruturais. Os anéis fenólicos da lignina se alinham preferencialmente no plano da parede celular, e como citado por Palonen (2004), estudos indicam que a estrutura

química, e tridimensional da molécula está fortemente relacionada com sua estrutura polissacarídica.

Essa complexa molécula resiste ao maior ataque de microrganismos, e o processo anaeróbico tende a não atacar o anel aromático (JARVIS, 2003). Segundo Azevedo (2004) o acoplamento das unidades de fenilpropano ocorre de maneira irregular e não repetitiva. Vários tipos de ligação entre as unidades de fenilpropano são observados como: β -O-4 e α -O-4 (50-65%), β -5 (6-15%), β -1 (9-15%), 5-5 (2-9%) e β - β (2-5%).

As funções biológicas da lignina são: (1) fornecer suporte estrutural à parede secundária de plantas vasculares. A parede celular lignificada pode ser vista como um complexo, com microfibrilas de celulose e hemicelulose, e a lignina como uma “matriz plástica” conferindo resistência ao material lignocelulósico; (2) tornar a parede celular vegetal hidrofóbica, permitindo o desenvolvimento eficiente dos tecidos para transporte de água em plantas vasculares; (3) conferir resistência contra ataques microbianos (KUHAD, 1997; LEE, 2003).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar porque a lignina apresenta uma ação inibitória na digestibilidade dos carboidratos estruturais da parede celular. Jarvis (2003) propôs algumas possíveis maneiras: a) por ligações químicas, formando compostos indisponíveis, b) pela incrustação, c) por inibição local das enzimas, devido à ação tóxica dos grupos fenólicos oriundos da degradação parcial da lignina. No entanto, a lignina também poderia agir, possivelmente, como uma barreira física entre os carboidratos estruturais e as enzimas microbianas.

Agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio, em meio alcalino, tem mostrado resultados positivos na digestibilidade de alguns resíduos agro-industriais, provavelmente devido à dissociação da lignina (AMJED, 1992). Estudos revelam que a parede celular de plantas gramíneas tratadas com hidróxido de sódio, revela índices mais elevados de digestibilidade do que a parede celular de plantas leguminosas (AZZAM, 1987; BISARIA, 1984), o que pode estar atribuído a ruptura das ligações éster entre os ácidos fenólicos e os carboidratos presentes nas gramíneas. Isso ajuda a reforçar que a teoria do efeito inibitório da lignina está associada às ligações covalentes entre si e os carboidratos presentes na parede celular, particularmente hemicelulose.

Segundo Ferreira (2006), o tratamento com NaOH, além de remover impurezas e tornar a superfície da fibra mais rugosa retira parcialmente a lignina da fibra e solubiliza a hemicelulose deixando a celulose mais expostas ao ataque enzimático. A hemicelulose solubilizada em meio alcalino é comprovado na literatura pelo autor Caraschi (1997). A extração de hemiceluloses e

lignina por soluções alcalinas provocam modificações na composição química das fibras e como conseqüência a parede celular parece estratificada, ou seja, com várias camadas. As mudanças químicas começam a ser significativas quando se realiza tratamento com soluções mais concentradas e desta forma a parede celular sofre severas alterações estruturais (TRIANA *et al.*, 1990).

2.6.1 Hidrólise da lignina

Apesar de vários dos seus aspectos necessitarem ainda serem investigados, a degradação da lignina pode ser entendida como um processo multienzimático por reação não específica, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas ligninolíticas intra e extracelulares (grupo das oxidoreduções - representadas por peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular) as quais, desestabilizam as ligações da macromolécula, causando assim seu colapso (WRIGHT, 1988; SZKLARZ, 1989; KUHAD, 1997; LEE, 2003; MANE, 2007). Cameron *et al.* (2000) relatou que o melhor mecanismo estudado de degradação de lignina é o do basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* consistindo de peroxidases, produção de enzimas H_2O_2 , álcool veratrílico, manganês e oxalato. Kuhad *et al.* (1997), através de estudos puderam verificar que as enzimas relacionadas à degradação da lignina são agrupadas em duas classes distintas: fenoxidases e enzimas que produzem peróxido de hidrogênio.

A biodegradação da lignina a CO_2 e H_2O depende de um efetivo processo de despolimerização dessa macromolécula que origina compostos de baixa massa molar susceptíveis ao metabolismo intracelular dos fungos. Grande parte da abordagem experimental realizada até hoje, visa elucidar os mecanismos de biodegradação da lignina, tomando como base, que o polímero é constituído de ligações etéreas aril-aquil e que poucos grupos fenólicos estão disponíveis (FENGEL; WEGENER, 1989; FUJIAN, 2001; AZEVEDO, 2004). Azevedo (2004) relata que em estudos realizados com *P. chrysosporium* e *Trametes versicolor* permitiram verificar os três principais modos de degradação da lignina (KIRK *et al.*, 1998): ruptura oxidativa de cadeias laterais envolvendo os carbonos α e β , levando à formação de ácidos carboxílicos; ruptura de ligações β -aril-éter e a conseqüente modificação das cadeias laterais; e a degradação de núcleos aromáticos a partir da abertura oxidativa dos anéis.

As transformações oxidativas de várias moléculas na natureza requerem uma cooperação de um número de enzimas e coenzimas, que transferem átomos de hidrogênio de um doador a um receptor final. Essas oxidases são atualmente usadas com grande potencial industrial. Com essas enzimas possuindo essa eficiência na transferência de elétrons capazes de oxidar diversas ligações na lignina, aumenta o número de tipos de substratos a serem oxidados. As aplicações mais estudadas dessas enzimas, especialmente as lacases, incluem na deslignificação de polpas na indústria de papel e celulose, branqueamento de corantes têxteis, degradação de efluentes, modificações de biopolímeros e o uso dessas enzimas como um componente na fabricação de detergentes.

2.7 Enzimas lignocelulolíticas

Fungos filamentosos, tipicamente espécies de *Trichoderma*, são as fontes preferidas para obtenção de celulasas em função de sua capacidade de produção de proteínas extracelular, em comparação com as bactérias celulolíticas. São produzidas basicamente endoglicanases e exoglicanases, ambas envolvidas na hidrólise da celulose, além disso, é incluída uma série de enzimas complementares, como β -glicosidase, hemicelulasas e pectinases (BERLIN *et al.*, 2005).

Em *Trichoderma reesei*, foram reportados de cinco a oito endoglicanases com diferentes especificidades de substrato, duas celobiohidrolases imunologicamente distintas e três β -glicosidases também diferindo com relação à especificidade de substrato (CHENG *et al.*, 1990; FLACHNER, 2004). Segundo Eriksson e Pettersson (1988), tanto o sistema celulolítico do *Phanerochaete chrysosporium* quanto o do *Trichoderma reesei*, é induzido por celulose e seus derivados, e é reprimido catabolicamente por glicose.

Flachner e Réczey (2004) examinaram a produção de β -glicosidase em quatro espécies de *Aspergillus* onde algumas condições de fermentação foram examinadas e comparadas com as produzidas por *Trichoderma reesei*. Foi observado que espécies de *Aspergillus* podem produzir β -glicosidase com melhor produtividade e capacidade de hidrolisar a celobiose do que as produzidas por *Trichoderma reesei* sendo, assim, importantes para a obtenção de glicose.

As vias de degradação de lignina e celulose estão provavelmente interligadas e podem existir aspectos comuns na regulação das atividades lignolíticas, celulolíticas e hemicelulolíticas (ERIKSSON, 1990).

O *Phanerochaete chrysosporium* é amplamente estudado por sua habilidade em produzir lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP). Na presença de H₂O₂, a manganês peroxidase é capaz de degradar a lignina e vários outros substratos fenólicos, entretanto, lignina peroxidase é capaz de degradar não só a lignina, mas também vários compostos aromáticos não fenólicos (GRGIC; PERDIH, 2003). O álcool veratrílico (3,4 dimetoxibenzil), um metabólico secundário, é sintetizado e acumulado no meio extracelular, apresenta no processo de biodegradação da lignina algumas funções, ou seja, induz o sistema lignolítico do *Phanerochaete chrysosporium* aumentando a produção de H₂O₂ e o nível de lignina peroxidase extracelular, sendo ele mesmo oxidado (LEE; MOON, 2003).

A importância das enzimas ligninolíticas extracelulares (lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacases e outras peroxidases) na degradação/descoloração de efluentes têxteis e papelero têm sido estudadas por vários autores e por não serem específicas promovem a degradação de uma variedade de compostos poluentes como fenóis, pesticidas, explosivos além da lignina presentes nos efluentes municipais (DELLAMATRICE *et al.*, 2005; DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2006), efluentes têxteis (KAMIDA, 2005) e papelero (DURAN; ESPOSITO, 1997).

2.7.1 Endoglicanases

Essa celulase hidrolisa as ligações β -1,4-glicosídicas aleatoriamente. As endoglicanases (CMCase, Endo-1,4- β -D-glicanase, E.C. 3.2.1.4) não atacam as celobioses, mas hidrolisam as celodextrinas, combinações de celulose e ácido fosfórico e outros substitutos de celulose, por isso sua especificidade não pode ser definida perfeitamente. As ligações glicosídicas são quebradas nas regiões amorfas da celulose, assim abrindo espaço para as celobiohidrolases (ENARI, 1983; ZHANG, 2006). O sítio ativo das endoglicanases possui a forma de uma chave, possibilitando a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e reduzindo o grau de polimerização de maneira considerável. As regiões de menor organização estrutural são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, levando conseqüentemente, a uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose (ELISASHVILI, 1993).

2.7.2 Exoglicanases

O grupo das exoglicanases (FPase; Exo-1,4- β -D-glicanase, E.C.3.2.1.91) atacam unidades de celobiose nas terminações deixadas pelas endoglicanases. A enzima não ataca outros substitutos de celulose, refletindo numa alta especificidade da molécula em comparação com as endogluconases, tornando as celobiohidrolases enzimas de maior afinidade com a celulose. Essa enzima também é capaz de hidrolisar moléculas cristalinas de celulose com, aproximadamente 80% de degradação, em um meio contendo celobiohidrolase pura (ENARI, 1983, ZHANG, 2006).

As exogluconases atuam sobre celulose cristalina produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. O sítio ativo das celobiohidrolases possui a forma de um túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre hidrólise de suas ligações glicosídicas terminais, liberando principalmente celobiose. O domínio de ligação do substrato é constituído por aproximadamente 40 aminoácidos e possui a importante função de promover a adsorção da proteína ao substrato, conferindo estabilidade ao agregado e permitindo a melhor aproximação da cadeia de celulose ao sítio ativo. A adsorção ocorre através da interação de resíduos de tirosina presentes no domínio de ligação com as unidades de glucopiranosose presentes na superfície da celulose (OYANG, 2006; JUHA´SZ, 2005; ERIKSSON, 1990).

2.7.3 β -glicosidases

Finalmente as β -glicosidases (β -D-glucoside glicohidrolase, E.C. 3.2.1.21) hidrolisam a celobiose, prevenindo o acúmulo desse dissacarídeo que é inibidor da atividade das exoglicanases. Acredita-se também que essas hidrolisam celo-oligossacarídeos em glicose. A secreção de β -glicosidases é altamente dependente do meio de cultivo, sendo que um pH relativamente alto pode aumentar a produção da mesma (JUHA´SZ, 2005; ZHANG, 2006).

2.7.4 Peroxidases

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7) são um grupo de enzimas oxi-redutases que catalisam a redução do peróxido (peróxido de hidrogênio) e a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos (IKEHATA, 2004). Duas isoenzimas de peroxidase foram encontradas capazes de oxidar ambos íons de Mn^{2+} e substratos aromáticos não-fenólicos. Essas peroxidases

foram capazes de realizar reações oxidativas características das ligninas peroxidases em *Pleurotus chrysosporium*; como a oxidação de substâncias não-fenólicas aromáticas por meio de radicais aromáticos e MnP, e também a oxidação de Mn^{2+} a Mn^{3+} . As peroxidases catalisam reações envolvendo a transferência de hidrogênio de moléculas orgânicas para peróxidos formando água. A sua ação enzimática provem da redução cíclica do átomo de ferro no grupo hematina, na presença de H_2O_2 , a enzima se combina com a molécula de H_2O_2 , formando um complexo que pode oxidar uma variedade de doadores de elétrons formando água no final. Por causa da baixa especificidade do complexo enzimático peroxidase- H_2O_2 , este pode promover a oxidação de uma grande variedade de poluentes orgânicos (DELLAMATRICE, 2005).

2.7.5 Lacases

As lacases (E.C. 1.10.3.2) são polifenóis oxidases (fenoloxidas) produzidas por fungos como também por plantas. São produzidas pela maioria dos Basidiomicetos e suas massas molares estão entre 60 e 100 kDa. As lacases catalisam oxidações por extração de um elétron de substratos fenólicos gerando radicais fenoxilas (AZEVEDO, 2004; LANGH, 1997). Esses radicais formados atuam nas reações não catalíticas como o acoplamento radical-radical, desproporção, desprotonação e ataques nucleofílicos pela água. Essas reações levam a polimerização, quebras alqui-arílicas, oxidações no C α e desmetilizações.

Uma lacase artificial, ABTS (2,2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)), foi estudada e demonstraram que agia como um mediador, promovendo a oxidação de modelos de compostos de lignina não-fenólicos. A atividade da lacase em cultivos de fungos pode ser aumentada com a adição de diferentes compostos no meio. Diferentes fungos produtores de lacase secretam diferentes formas de lacase devido à suplementação de compostos aromáticos, como toluidina, ácido vanílico, ácido *p*-hidrobenzóico e anilina (FÄHREUS, 1962). O fungo *P. ostreatus* produz diversas lacases extracelulares, incluindo POXA1b, POXA1w, POXA2 e POXC. POXC é a isoenzima mais abundante produzida sob todas as condições de crescimento estudadas (PALMIERI, 1997). POXA1w exibe diferenças peculiares quanto a seu conteúdo metálico. Essa enzima contém dois átomos de zinco, um de ferro e apenas um de cobre por molécula (PALMIERI, 1997). Enquanto a adição de $CuSO_4$ em uma cultura de *P. ostreatus* causou forte aumento na atividade total de lacase e uma produção da isoenzima POXA1b, enquanto POXA1w não é afetada com a adição do suplemento de $CuSO_4$. A principal característica estrutural da

enzima POXA1b são similares a enzima POXA1w, porém POXA1b produz uma lacase visível num espectro UV e contém quatro átomos de cobre por molécula e também ambas são muito mais estáveis que POXA2 e POXC. (PALMIERI, 1997; TANAKA, 1986).

2.7.6 Manganês Peroxidase

A manganês peroxidase (MnP; E.C. 1.11.1.13) é uma enzima extracelular, glicosilada, de massa molecular de 45-47 kDa e possui um grupo prostético heme. É dependente de peróxido de hidrogênio e do íon Mn^{2+} e α -cetoácidos como lactato são responsáveis por estabilizar sua atividade (AZEVEDO, 2004; KUHAD, 1997). A manganês peroxidase pode ser encontrada em diferentes formas e estão presentes em diversos fungos (LANGH, 1997).

Normalmente a mineralização efetiva de ligninas sintéticas está relacionado com um baixo teor de Mn e baixos MnP, mostrando que a possibilidade de que MnP participe na degradação da lignina é mínima (AZEVEDO, 2004), porém outros relatos correlacionam a MnP na degradação de lignina em processos de desmetilação e deslignificação em polpas Kraft (ERIKSSON, 1990; GRGIC, 2003).

A MnP cataliza a oxidação da lignina na presença de H_2O_2 (KUWARA, 1984). A oxidação de lignina é dependente dos íons livres de Mn^{2+} . Em vários fungos, MnP realiza uma tarefa importante no ataque a lignina, porque gera Mn^{3+} , um poderoso e difundido oxidante. Ácidos orgânicos como oxalato e malonato, secretados por fungos de degradação branca, estimulam a reação de MnP estabilizando Mn^{3+} , para ser capaz de se difundir da superfície da enzima e oxidar o substrato insolúvel, lignina (LANGH, 1997; COHEN, 2002). Embora a manganês-peroxidase não oxide compostos não-fenólicos da estrutura da lignina, essas estruturas são vagarosamente co-oxidadas quando as MnP peroxidam ácidos graxos. A peroxidação de lipídios também tem sido sugerida na participação no processo de degradação de lignina por MnP (NOVIKOVA, 2002; SZKLARZ, 1989; TIEN, 1984).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foram utilizados os fungos lignocelulolíticos presentes no estoque de culturas do Laboratório de Ecologia Aplicada do CENA/USP – Piracicaba. Os microrganismos estocados estavam mantidos em culturas desenvolvidas em extrato de malte ágar (EMD Chemicals) ou em sementes de trigo (item 3.2), refrigeradas a 4°C.

Os fungos pré-selecionados para este estudo foram: *Trichoderma reesei*, *Pleurotus sajor-caju* CCB020, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ostreatoroseus* CCB440, *Rhizopus orizae*, *Pleurotus shimeji*, *Mucor pusilus*, *Phanaerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*.

Esses microrganismos foram então analisados quanto à produção de celulasas e ligninases por método de coloração por Lugol e guaiacol, e analisados também quanto à produção de biomassa em diferentes temperaturas, com as metodologias descritas abaixo (itens 3.4 e 3.12) sendo selecionados fungos lignocelulolíticos com maior produção de biomassa para o desenvolvimento deste estudo.

3.2 Produção do inóculo “spawn” ou “semente-inóculo”

Os fungos foram repicados com inóculos “spawn” ou “semente-inóculo”. Esse inóculo foi desenvolvido para manter a atividade enzimática natural dos fungos, já que a constante repicagem dos fungos em diferentes meios pode resultar em uma alteração genética e/ou enzimática (STANBURY, 2003; SAID, 2002; BURDEN, 1995). Esse inóculo foi feito com grãos de trigo sem processamento, 0,8% de gesso e 0,2% carbonato de cálcio em relação ao peso do seco dos grãos para a manutenção do pH. Foram mantidos em sacos de polipropileno de 20 x 25 cm e espessura média de 0,60 mm, com um orifício de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro para a passagem de ar que foi vedado com filtro tampão de algodão. Os sacos foram então autoclavados a 1 atm e 121°C durante 30 minutos e inoculados depois de resfriados.

3.3 Condições de cultivo da linhagem

A transferência de duas o mais sementes-inóculo dos fungos pré-selecionados do estoque para placas Petri com meio desenvolvido extrato de malte ágar (EMD Chemicals®) realizada com

a utilização de pinças esterilizadas em câmara de fluxo laminar horizontal e incubadas a 30° C (\pm 1 °C) de 6 a 7 dias.

Essas linhagens foram então repicadas a cada 3 meses e usadas nos experimentos.

3.4 Produção de celulases e ligninases

Os fungos acima citados foram testados quanto à capacidade de produção de celulases e ligninases utilizando a metodologia de Hankin e Anagnostakis (1975), com modificações quanto à utilização dos meios testados.

Foi elaborado um meio de verificação da produção de lignina contendo: 2 g de bagaço de cana-de-açúcar peneirado a 1,19 mm, 100 μ L de guaiacol, 16 g de ágar e 1000 mL de água destilada.

Para a verificação da produção de celulase foi elaborado um meio contendo: 10 g de CMC, 10 g de ágar (DIFCO®) e 1000 mL de água destilada. Ambos os meios foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

O meio foi vertido em placas de Petri e pellets de 10 mm do estoque de fungos foram aplicados no centro das placas, lacrados e incubados a uma temperatura de 28 °C por aproximadamente 7 dias para verificar a produção de celulases e ligninases.

Após o período de incubação foi verificado a existência de halo de crescimento avermelhado no meio contendo guaiacol (bagaço). No meio contendo celulose (CMC), 10 mL de uma solução de 5 g de iodo + 10 g de iodeto de potássio (Lugol) foi adicionado à placa de Petri contendo os fungos para observar a formação de uma coloração azul.

3.5 Bagaço e vinhaça de cana-de-açúcar

O bagaço e a vinhaça foram doados gentilmente pela usina sucroalcooleira COSAN (Unidade Costa Pinto), localizada na cidade de Piracicaba, SP, durante a safra de 2006/2007. A vinhaça, foi recolhida em galões de 2 litros e mantida em câmara fria a 4 °C. Para sua utilização foi medido o pH, que variou nas diferentes coletas entre 3,95 e 4,5, essa foi então filtrada em peneira de 0,50 mm (tyler 32).

O bagaço foi peneirado na fração de 1,19 mm (tyler 14) e mantido seco em sacos plásticos e temperatura ambiente.

3.6 Análise do bagaço de cana-de-açúcar

Para verificar a eficiência da hidrólise do bagaço nos diferentes tratamentos, o bagaço foi enviado para análise qualitativa e quantitativa de celulose, hemicelulose e lignina no Laboratório de Bromotologia e Minerais do Instituto de Zootecnia em Nova Odessa, São Paulo, de acordo com as metodologias descritas por Goering e Van Soest (1970), Silva (1998) e Van Soest (1963).

O bagaço foi analisado nas seguintes amostras tratadas:

- Bagaço *in natura* (controle);
- Bagaço + 2% H₂SO₄ (pH=5,0);
- Bagaço + 1,5% NaOH (pH=5,0);
- Bagaço + 2% H₂O₂ (pH=5,0);
- Bagaço + 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH (pH=5,0)

3.7 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço foi tratado quimicamente com reagentes em diferentes concentrações, para selecionar um pré-tratamento no substrato em que a atividade lignocelulolítica fosse máxima.

O bagaço seco e peneirado foi tratado com os seguintes reagentes: 2% H₂SO₄, 1,5% NaOH, 2% H₂O₂ e 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH na proporção de 1:10 (v/p) em autoclave a 121 °C por 15 minutos. O controle consistiu no bagaço adicionado a água destilada.

Esse bagaço foi então lavado com água destilada para neutralizar os efeitos dos tratamentos, e seco em forno a 60 °C por aproximadamente 18 horas.

Os diversos tratamentos no bagaço foram analisados quanto à atividade enzimática das celulases (endo- e exo- glicanases) e lignases (lacase, peroxidase e manganês-peroxidase) para encontrar um tratamento que melhor induza atividade enzimática para cada fungo. Para a atividade das enzimas oxidativas do bagaço (lacase, peroxidase e manganês peroxidase) foi composto um meio com vinhaça.

O tratamento escolhido foi então utilizado no preparo do meio de bagaço moído e do meio bagaço-vinhaça para serem inoculados com os fungos selecionados por durante 30 dias e então obtidas as atividades enzimáticas.

3.8 Preparo do meio de bagaço moído (MBM)

Foram pesados 20 g de bagaço seco em frascos Erlenmeyer de 250 mL e adicionado 60 mL de meio mineral descrito abaixo na Tabela 1. Esse meio foi autoclavado a 1 atm, 121 °C durante 15 minutos.

Tabela 2 - Meio mineral usado na produção de celulases (Fonte: HAQ, 2006)

| Minerais | Quantidade em g/L |
|---|-------------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 1,4 |
| KH_2PO_4 | 2 |
| Uréia | 0,3 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,3 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,0014 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,005 |
| MnSO_4 | 0,0016 |
| CoCl_2 | 0,002 |
| CaCl_2 | 0,002 |
| Tween-80 | 2,0 (mL) |
| Peptona | 1,0 |

3.9 Preparo do meio bagaço-vinhaça (MBV)

Foram pesados 20 g de bagaço seco e acrescentado 60 mL de vinhaça em frascos Erlenmeyer de 250 mL. O pH do meio foi ajustado para 6.0. Esse meio foi autoclavado a 1 atm e 121 °C durante 15 minutos.

3.10 Condições de cultivo para produção de enzimas

Após o resfriamento dos meios MBM e MBV, foram adicionados 3 pellets de 10 mm de cada fungo em câmara de fluxo. Essas amostras foram então incubadas em shaker de rotação orbital a 180 rpm na temperatura de 28 °C (± 2 °C) durante 30 dias.

Foram incubadas 3 replicas de cada fungo, em cada respectivo meio.

3.11 Coleta das amostras

As amostras foram recolhidas a cada três dias num período de 30 dias. Essas amostras foram filtradas a vácuo em papel de filtro Whatman No. 1 (85mm Ø). O sobrenadante foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e a biomassa acomodada em placas de Petri e congelada para verificação de peso seco.

3.12 Quantificação do micélio

A biomassa foi quantificada por meio de gravimetria. A biomassa filtrada foi liofilizada (Thermo Savant, modelo modulyod 115) por 72 horas a - 48 °C e -1,2 mbar, sendo pesada periodicamente. Os fungos pré-selecionados foram cultivados em meio contendo 20 g bagaço como fonte de carbono e 60 mL de meio mineral (Tabela 2) em rotação a 180 rpm em temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C para avaliar a melhor temperatura de cultivo também foi avaliado a biomassa micelial em meio suplementado de vinhaça (MBV). Foram realizadas 3 replicas de cada fungo, coletadas a cada 3 dias durante um período de 30 dias.

3.13 Determinação da atividade de enzimas celulolíticas

3.13.1 Reagentes

Reagente DNS: foi dissolvido 10,6 g de 3,5-ácido dinitrosalicílico, 19,8 g de NaOH em 1416 mL de água destilada. Então foi adicionado 306 g de tartarato de sódio-potássio e 8,3 g de metabissulfito de sódio.

Tampão citrato de sódio: foi dissolvido 210 g de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) em 750 mL de água destilada. Adicionou-se aproximadamente de 50 a 60 g de NaOH para ajuste de pH em 4.8. Para os ensaios de medicação de celulase foi usado 0,05 M de tampão citrato em pH 4.8.

Substrato Papel de Filtro: foi utilizado papel de filtro Whatman N°. 1 cortado em tiras de 1 x 6 cm (~50 mg).

Substrato 2 % CMC: foi dissolvido 2% (p/v) de carboximetilcelulose (Synth®) em 0.05 M tampão citrato de sódio, pH 4.8.

Padrões de glicose: uma solução estoque de 10mg/mL de glicose foi feita. As diluições foram feitos da seguinte maneira:

1.0mL + 0.5mL tampão = **1:1.5** = 6.7 mg/mL (3.35 mg/0.5 mL)

1.0mL + 1.0mL tampão = **1:2** = 5 mg/mL (2.5 mg/0.5 mL)

1.0mL + 2.0mL tampão = **1:3** = 3.3 mg/mL (1.65 mg/0.5 mL)

1.0mL + 4.0mL tampão = **1:5** = 2 mg/mL (1.0 mg/0.5 mL)

3.13.2 Atividade da Exo-1,4- β -D-glicanase

Através deste ensaio foi determinada a atividade celulolítica da exoglicanase (exo-1,4- β -D-glicanase) pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) em papel de filtro de acordo com a metodologia de Miller (1959).

O substrato utilizado foi o papel de filtro Whatman No. 1 cortado em tiras. O substrato foi colocado em tubos de ensaio de 13 x 100 mm e adicionado 1.0 mL de 0,05 M de tampão citrato e 0.5 mL da amostra filtrada (sobrenadante) e incubado em banho-maria a 50 °C por 60 minutos. Após o período de incubação, foi adicionado 3.0 mL de DNS para parar a reação. Para a produção de cor, as amostras foram fervidas por 5 minutos e depois os tubos removidos e colocados em banho frio. Os tubos foram retirados e postos para descansar, após 20 minutos, 200 μ L da amostra foi diluída e misturada em 2.5 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Femto-432) a 540 nanômetros. Para o branco foi utilizado 1,5 mL de tampão citrato. Para o branco e diluições da curva padrão de glicose foram realizados os mesmos procedimentos das amostras, sendo que não foi adicionado substrato.

Com auxílio da curva padrão de glicose, determinou-se a quantidade de açúcar liberado (mg/0,5 mL) para cada amostra. Segundo o protocolo de Miller (1959), foi necessário selecionar duas diluições de cada amostra, uma que liberou acima de 2,0 mg de açúcar por 0,5 mL e outra que libera abaixo de 2,0 mg de açúcar por 0,5 mL. Ao identificar as diluições necessárias, foi construído um gráfico de glicose liberada (mg de açúcar / 0,5 mL de solução) versus a diluição da amostra em g/mL, que permitiu estimar a diluição da amostra que libera 2 mg de açúcar por 0,5 mL de solução para realizar os cálculos de determinação da atividade enzimática de acordo com as equações abaixo:

Uma unidade de atividade em papel de filtro (FPU) corresponde a 1 μmol de açúcares redutores, expresso como glicose, liberados por minuto.

- A unidade de FPU é baseada na “International Unit” (UI, Unidade Internacional) e seu cálculo é:

$$\begin{aligned} 1 \text{ UI} &= 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ de substrato convertido} \\ &= 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ de “glicose” formada durante a hidrólise} \\ &= 0,18 \text{ mg min}^{-1} \text{ quando o produto é glicose} \end{aligned}$$

O valor absoluto de glicose no ensaio de FPU na diluição é de 2,0 mg:

$$2,0 \text{ mg glicose} = 2 / 0,18 \mu\text{mol}$$

- A quantidade de glicose que foi produzida por 0,5 mL da amostra em 60 minutos (Equação 1) é:

$$\frac{(2,0 \text{ mg de glicose} / 0,1806 \text{ mg glicose} / \mu\text{mol})}{(0,5 \text{ mL amostra diluída} \times 60 \text{ min})} = 0,37 \mu\text{mol} / \text{minuto mL}^{-1} \quad (1)$$

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{concentração da amostra que libera 2,0 mg de glicose}} \text{ unidades mL}^{-1} \quad (2)$$

3.13.3 Atividade da Endo-1,4-β-D-glicanase

Através deste ensaio foi determinada a atividade celulolítica da endoglicanase (endo-1,4-β-D-glicanase) pelo método do carboximetilcelulose (CMC) de acordo com a metodologia de Miller (1959).

Foi obtido 0,5 mL de cada amostra diluída em tampão citrato em tubos de ensaio de 13 x 100 mm. Esses tubos foram então aquecidos em banho-maria a 50 °C por 5 minutos. Depois do período de incubação 0,5 mL do substrato 2% CMC foi acrescentando aos tubos e misturado. Então colocados novamente em banho-maria a 50 °C por 30 minutos. Após a incubação, 3,0 mL de DNS foi adicionado aos tubos e misturado. Para a produção de cor, os tubos foram adicionados em água fervente por 5 minutos e então transferidos para banho frio. Após o banho frio, adicionou-se 20 mL de água destilada. As amostras foram então misturadas bem e a coloração formada foi medida contra espectro zero a 540 nanômetros. Para o branco foi utilizado 1,5 mL de tampão citrato. Para o branco e diluições da curva padrão de glicose foram realizados os mesmo procedimentos das amostras, sendo que não foi adicionado substrato.

Segundo a metodologia de Miller (1959), também foi necessário utilizar uma curva padrão de glicose para a obtenção de duas diluições que liberassem acima e abaixo de 2,0 mg de açúcar por 0,5 mL para encontrar a concentração que liberasse 2,0 mg de açúcar de acordo com as equações abaixo para o método de CMC:

- A unidade de CMC é baseada na “International Unit” (UI, Unidade Internacional) e seu cálculo é:

$$1 \text{ UI} = 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ de produto liberado por hidrólise} \\ = 0,18 \text{ mg min}^{-1} \text{ quando o produto é glicose}$$

- A quantidade crítica de glicose no meio de CMC é 0,5 mg, então:
0,5 mg glicose = 0,5 / 18 μmol

Esse valor foi produzido em 0,5 mL em 30 minutos (Equação 3).

$$0,5 \text{ mg de glicose} = \frac{(0,5)}{(0,18 \times 0,5 \times 30)} = 0,185 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ (IU mL}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

$$CMC = \frac{0,185}{\text{concentração crítica da amostra}} \quad \text{unidades mL}^{-1} \quad (4)$$

3.14 Determinação da atividade de enzimas lignolíticas

3.14.1 Reagentes

Álcool veratrílico em tampão tartarato: em 50 mL de H₂O destilada adicionou-se 4,6 g de tartarato de sódio. O pH foi ajustado para 3,0 e adicionou-se 14 µL de álcool veratrílico.

Peróxido de hidrogênio: em 50 mL de H₂O destilada, adicionou-se 33 µL de H₂O₂.

Lactato de sódio: em 50 mL de H₂O destilada adicionou-se 1,2 mL de lactato de sódio.

Sulfato de Manganês: em 50 mL de H₂O destilada adicionou-se 0,017g de MnSO₄.

Albumina bovina: em 50 mL de H₂O destilada adicionou-se 0,25 g de albumina bovina (Albumin Bovine Fraction V, MP Biomedicals®)

Vermelho de fenol: em 50 mL de H₂O destilada adicionou-se 0,05g de vermelho de fenol

Peróxido de hidrogênio em tampão succinato: em 50 mL de H₂O destilada adicionou-se 2,7 g de succinato de sódio, então o pH foi ajustado para 4,5 e acrescentou-se 33,3 µL de 30% H₂O₂.

Hidróxido de sódio: em 50 mL de H₂O destilada adicionou-se 4,0 g de NaOH.

Tampão Citrato-Fostato: 1,05 g de ácido cítrico foi adicionado em 50 mL de H₂O destilada (solução A), separadamente 1,41 g de fosfato de sódio foi adicional em 50 mL de H₂O destilada. Então a solução A foi adicionada na solução B e o pH foi ajustado para 5,0.

Siringadazine: foi adicionado 0,05 g de siringadazine (SIGMA®) em 50 mL de etanol.

Todos os reagentes foram estocados em refrigerador a 4 °C.

3.14.2 Atividade da Lacase

A atividade da lacase foi realizada segundo o protocolo de Szklarz (1989). Foram utilizados dois tubos de ensaio de 10 x 100 mm, um para amostra não fervida e outro para amostra fervida. Foi adicionado em cada tubo 0,6 mL da amostra a ser analisada e 0,3 mL do tampão citrato-fosfato. Um tubo foi fervido por 10 minutos (controle) e depois retirado e resfriado.

O tempo inicial (zero) foi determinado como a medição da absorbância no momento em que se adiciona 0,1 mL de siringadazine. Depois foi feita outra medição no tempo final depois de 10 minutos. 1,0 mL de cada tubo contendo as amostras fervidas e não fervidas foram medidas contra espectro zero a 525 nanômetros.

3.14.3 Atividade da Peroxidase

A atividade da peroxidase foi realizada segundo o protocolo de Archibald (1992). Foram utilizados dois tubos de ensaio de 10 x 100 mm, um para amostra não fervida e outro para amostra fervida. Foi adicionado em cada tubo 0,6 mL da amostra a ser analisada, 0,2 mL do tampão citrato-fosfato, 0,1 mL de H₂O₂. Um tubo foi fervido por 10 minutos (controle) e depois retirado e resfriado.

O tempo inicial (zero) foi determinado como a medição da absorbância no momento em que se adiciona 0,1 mL de siringadazine. Depois foi feita outra medição no tempo final após 10 minutos. De cada tubo foram retirados alíquotas de 1,0 mL de cada tubo contendo as amostras fervidas e não fervidas foram medidas contra espectro zero a 460 nanômetros.

3.14.4 Atividade da Manganês Peroxidase (MnP)

A atividade da MnP foi realizada segundo o protocolo de Lundell (1990). Foram utilizados dois tubos de ensaio de 10 x 100 mm, um para amostra não fervida e outro para amostra fervida. Foi adicionado em cada tubo 50 μL MnSO_4 , 50 μL H_2O_2 em tampão succinato, 100 μL de lactato de sódio, 200 μL de albumina bovina e 600 μL de sobrenadante (amostra).

Um tubo foi fervido por 10 minutos (controle) e depois retirado e resfriado.

O tempo inicial (zero) foi determinado como a medição da absorbância no momento em que se adiciona 0,1 mL de vermelho fenol. Depois de 10 minutos, o tempo final foi determinado com a medição após adicionar 40 μL de NaOH para parar a reação. 1,0 mL de cada tubo contendo as amostras fervidas e não fervidas foram medidas contra espectro zero a 610 nanômetros.

3.14.5 Cálculo das atividades lignolíticas

$$UI / L = \frac{\Delta Abs}{\varepsilon \times R \times t} \times 10^6 \quad (5)$$

Onde,

ΔAbs = absorbância ($Abs_{\text{final}} - Abs_{\text{inicial}}$)

ε = coeficiente de absorção molar

R = quantidade de solução da amostra

t = tempo de reação em minutos

UI/L = Unidade Internacional, onde internacional significa $\mu\text{mol min}^{-1}$

- Coeficientes de absorção molar:

$$\varepsilon_{460\text{nm}} = 29400 \text{ L. M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{525\text{nm}} = 65000 \text{ L. M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{610\text{nm}} = 44600 \text{ L. M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

3.15 Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa Microsoft Office Excel e por teste de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$ (5%), utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS).

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Produção de celulases e ligninases

Após o período de incubação dos fungos nos meios seletivos verificou-se a existência do halo de crescimento avermelhado (âmbar) no meio de bagaço moído (Figura 5), essa coloração deve-se a oxidação do guaiacol, presente no meio, em tetraguaiacol (DOERGE, 1997). Isso confirma a capacidade de atividade lignolítica dos fungos, já que a oxidação do guaiacol ocorre por meio de peroxidase. Podemos também observar que não há formação de halo avermelhado nos seguintes fungos cultivados: *Aspergillus niger*, *Rhizopus orizae* e *Mucor pusilus* (Figura 5, A₂, A₅, A₇).

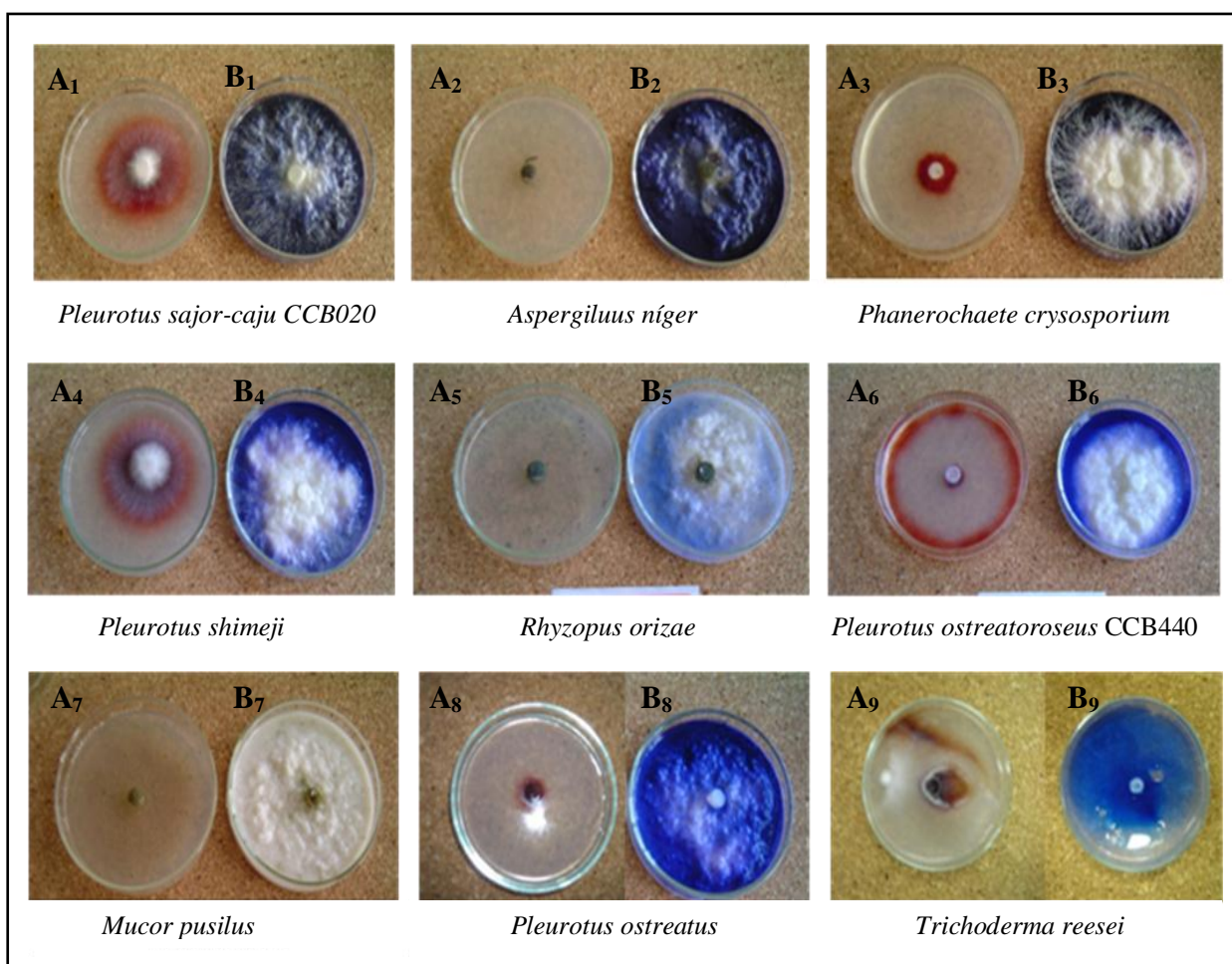


Figura 5 - Meio de bagaço contendo guaiacol (A_x) e meio contendo CMC (B_x) corado com Lugol

Quanto à produção de celulases, no meio contendo celulose (CMC), após a adição de 10 mL de Lugol, os positivos apresentaram uma coloração azulada. O reagente Lugol reage com alguns polissacarídeos, como amido, glicogênio e algumas dextrinas (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). O amido, um composto formado por dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, ligados por pontes glicosídicas α -1,4 e essa coloração azulada resulta do aprisionamento do iodo no interior da hélice formada pela amilose. O amido presente no meio é resultante da degradação do substrato carboximetilcelulose em polímeros de menor peso molecular a serem utilizados no metabolismo. Isso confirma a presença de celulases em todos os fungos onde se observa a coloração azulada, com exceção do fungo *Mucor pusillus* (Figura 5, B₇).

4.2 Análise do bagaço de cana-de-açúcar

Após a análise dos teores de celulose, lignina e hemicelulose do bagaço tratado e não-tratado com soluções alcalinas e ácidas, mostra que todos os tratamentos, com exceção do 1,5% NaOH, tiveram um aumento no teor de celulose em relação ao controle. No tratamento com 2% H₂SO₄ o teor de celulose aumentou 1,2 bem como para o tratamento com 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH (Tabela 3). Quanto à proporção de lignina, o tratamento ácido (2% H₂SO₄) aumentou em 1,09 vezes a porcentagem de lignina, enquanto para o tratamento com 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH aumentou em 1,4 vezes. Esses valores são devidos aos tratamentos promoverem o rompimento das fibras de lignina e celulose presentes na parte interna do bagaço, assim sendo liberadas ou solubilizadas e não fazem mais parte das fibras do bagaço. Na Tabela 3 o teor de hemicelulose no tratamento com 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH diminuiu 8,5 vezes enquanto para o tratamento com 2% H₂SO₄ diminuiu em apenas 4,4 vezes, quando comparado com o controle (bagaço *in natura*). A alteração no teor de hemicelulose ocorre pelo fato dos tratamentos com ácidos (ou ácidos fracos) romperem as fibras de hemicelulose gerando outros tipos de açúcares, como a xilose e arabinose, em quantidades variáveis (HATTAKKA, 1994; MANE, 2006; PIETROBON, 2008; WADT, 2008). O tratamento alcalino solubiliza a hemicelulose, já que os processos físico-químicos de pré-tratamento utilizando ácido diluído, vapor de alta pressão ou água quente possibilitam a remoção seletiva das hemiceluloses, produzindo soluções sacarídeas (pré-hidrolisados) com elevado teor de pentoses e reduzido teor de lignina. Os processos alcalinos tendem a promover

maior dissolução da lignina e menor solubilização/fragmentação das hemiceluloses (FASANELLA, 2008).

Tabela 3 - Caracterização em termos de porcentagem de lignina, celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar tratado e não-tratado

| Tratamento | Celulose (%) | Lignina (%) | Hemicelulose (%) |
|--|--------------|-------------|------------------|
| Bagaço <i>in natura</i> (Controle) | 55,34 | 11,21 | 25,87 |
| 2% H ₂ SO ₄ | 70,08 | 12,22 | 5,87 |
| 1,5% NaOH | 53,44 | 9,75 | 11,98 |
| 2% H ₂ O ₂ | 59,50 | 13,37 | 8,46 |
| 2% H ₂ O ₂ + 1,5% NaOH | 67,31 | 15,87 | 2,98 |

4.3 Quantificação do micélio

A quantidade da biomassa produzida após 30 dias de cultivo (Figura 6) não apresentou variação significativa quando as linhagens foram cultivados a 25°C, ao contrário de quando cultivados a temperatura de 30°C, onde se observou uma maior quantidade de micélio produzido pelos fungos: *T. reesei* (110,43 g L⁻¹); *P. sajor-caju* (109,10 g L⁻¹); *P. ostreatus* (103,62 g L⁻¹); *P. ostreatotoroseus* (88,67 g L⁻¹); e *P. chrysosporium* (89,70 g L⁻¹). Também quando cultivados a 35°C observou-se que a produção de biomassa manteve-se alta para os mesmos fungos citados acima: *T. reesei* (105,49 g L⁻¹); *P. sajor-caju* (101,78 g L⁻¹); *P. ostreatotoroseus* (85,80 g L⁻¹); *P. ostreatus* (98,27 g L⁻¹); e *P. chrysosporium* (94,53 g L⁻¹).

Com essas características foi possível desde então selecionar entre os nove fungos, fungos produtores de ligninas e celulasas que produzissem uma quantidade maior de biomassa entre 30°C e 35°C. Os fungos selecionados foram: *P. sajor-caju*, *P. ostreatotoroseus*, *P. ostreatus*, *T. reesei* e *P. chrysosporium*.

Nesse estudo o fungo *T. reesei* foi utilizado como modelo, pois o mesmo e seus mutantes têm sido amplamente estudados e empregados na produção comercial de hemicelulases e celulases (JØRGENSEN, 2005). Isso se deve parcialmente por esse fungo ter sido um dos primeiros microrganismos celulolíticos a ser isolado na década de 1950 e também porque diversas cepas têm sido melhoradas tanto nos processos de produção de celulases industriais como na redução dos custos de produção, porém o ascomiceto *T. reesei* segundo Higuchi (1990), é incapaz de degradar lignina. Como os fungos de degradação branca pertencentes aos basidiomicetos são os mais eficientes e extensivos degradadores de lignina, o fungo *P. chrysosporium* já foi estudado extensivamente em diversos ensaios (BISALIA, 1984; KIRK, 1986; BERGUIN, 1994; DURÁN, 1997; CAMERON, 2000; FUJIAN, 2001; GRGIC, 2003) foi decidido trabalhar com os basidiomicetos do gênero *Pleurotus*.

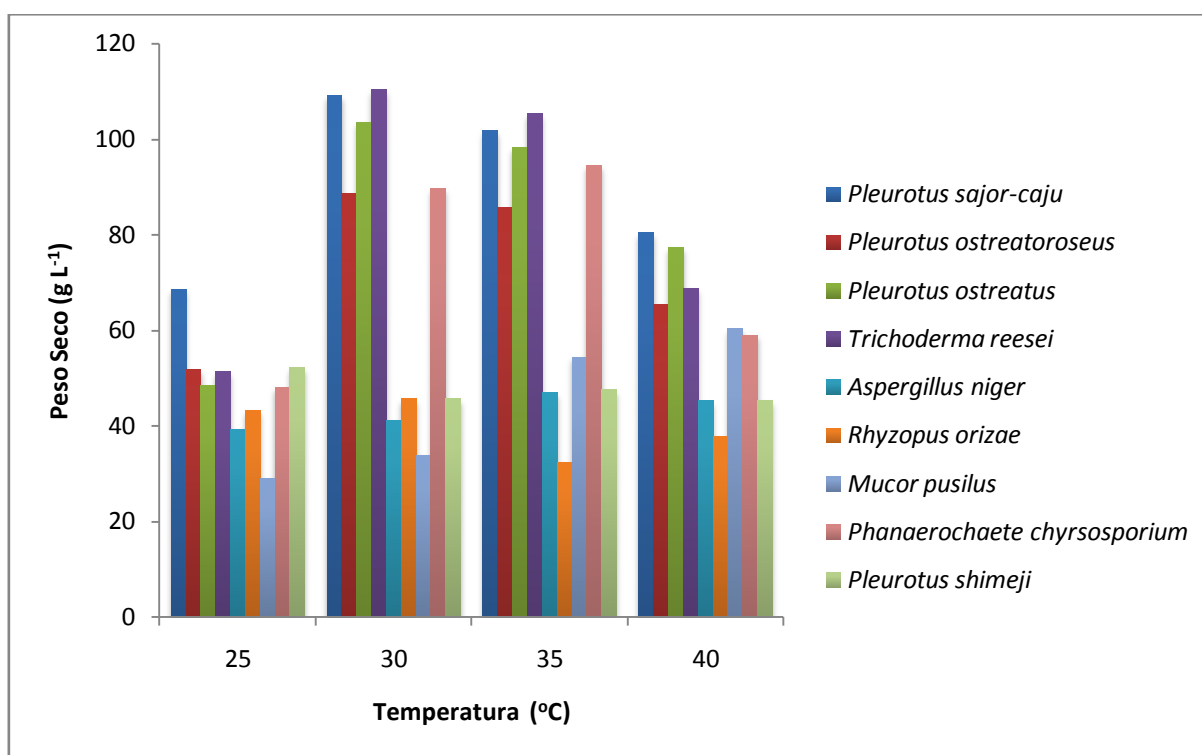


Figura 6 - Peso seco (g L^{-1}) dos fungos selecionados em relação à temperatura em $^{\circ}\text{C}$ em meio mineral (MBM)

A Figura 7 mostra que a biomassa micelial foi maior no meio suplementado com vinhaça, mostrando uma quantidade maior de micélio (g L^{-1}). Os fungos que obtiveram maior biomassa quando cultivados a 30°C foram: *P. sajor-caju* ($117,87 \text{ g L}^{-1}$); *P. ostreatotoroseus* ($94,52 \text{ g L}^{-1}$);

P. ostreatus (112,31 g L⁻¹); *T. reesei* (120,04 g L⁻¹). Também quando cultivados a 35°C observou-se que a produção de biomassa manteve-se alta para os mesmos fungos citados acima: *P. sajor-caju* (109,33 g L⁻¹); *P. ostreatotoroseus* (93,04 g L⁻¹); *P. ostreatus* (110,32 g L⁻¹); *T. reesei* (116,23 g L⁻¹). Isso confirma que o meio suplementado com vinhaça é melhor para uma produção de biomassa micelial a um cultivo de 30°C.

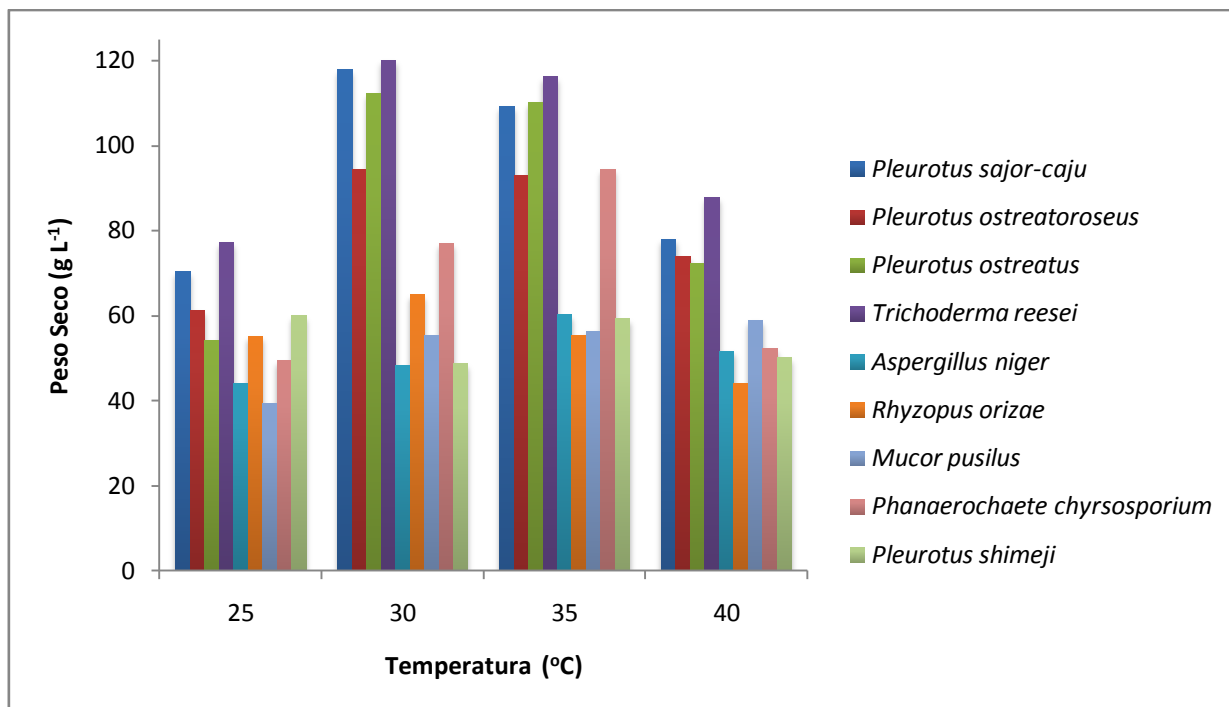


Figura 7 - Peso seco (g L⁻¹) dos fungos selecionados em relação à temperatura em °C em meio vinhaça (MBV)

4.4 Tratamento do bagaço de cana de açúcar

O bagaço tratado foi inoculado com os quatro fungos e foi verificado as atividades das enzimas exoglicanase (FPase, UI mL⁻¹) e endoglicanase (CMCase, UI mL⁻¹). Segundo o trabalho de Lynd (1996), pré-requisitos para um pré-tratamento ideal de lignocelulose consistem em: (a) produzir fibras reativas; (b) produzir pentoses em formas não degradáveis; (c) não produzir compostos que inibem significativamente a fermentação; (d) capaz de funcionar em reatores de tamanho razoável com custos moderados; (e) produzir resíduos sólidos; (f) ter um alto grau de simplicidade e (g) ser efetivo em umidade baixa. Com isso diversos tratamentos podem acarretar esses requisitos. No presente trabalho foram selecionados quatro tratamentos: um tratamento

ácido com 2% H₂SO₄; um tratamento alcalino com 1,5% NaOH, um tratamento com um ácido fraco (2% H₂O₂) e uma mistura de 1,5% NaOH e 2% H₂O₂.

Como mostra a Figura 8, atividade da exoglicanase foi maior quando o bagaço foi tratado com 2% H₂O₂ e com 1,5% NaOH em relação ao controle. Esta figura mostra que a mistura dos tratamentos que resultaram na maior atividade da exoglicanase (1,5% NaOH e 2% H₂O₂) não foi tão efetiva como se esperava, porém foi o tratamento em que a atividade para o fungo *Trichoderma reesei* foi maior, de 16,2 U mL⁻¹.

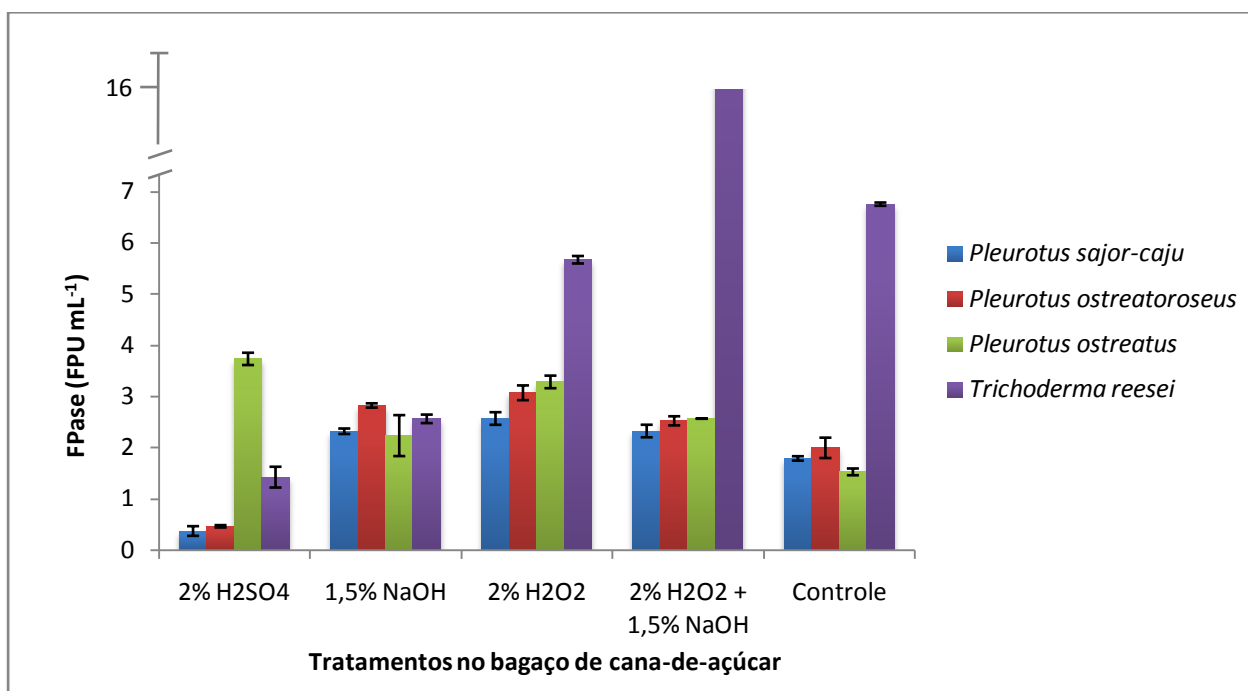


Figura 8 - Atividade da exoglicanase dos fungos cultivados em bagaço em diversos tratamentos, após 15 dias de cultivo a 30°C

De acordo com a atividade da endoglicanase entre os quatro tratamentos (Figura 9), o tratamento em que mais houve atividade da enzima foi no tratamento em conjunto de 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH; com 3,17 U mL⁻¹ para o fungo *P. sajor-caju*, 2,87 U mL⁻¹ para *P. ostreatoroseus*, 6,71 U mL⁻¹ para *P. ostreatus* e 5,58 U mL⁻¹ para *T. reesei*. Esse resultado deu-se provavelmente ao aumento da cristalinidade do substrato devido ao tratamento realizado com o peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio, fazendo com que ele seja mais aceitável as cepas de fungos usadas, pois segundo o trabalho realizado por Pietrobon (2008), em que se avaliou a identificação de açúcares em amostras de bagaço tratadas com ácidos e bases, verificou-se a predominância de

pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose e galactose). Porém segundo Aiello (1996), um intenso tratamento alcalino no substrato foi capaz de diminuir a eficiência das enzimas na hidrólise do bagaço, quando é tratado com NaOH ou H₂O₂ por 30 minutos a 121°C.

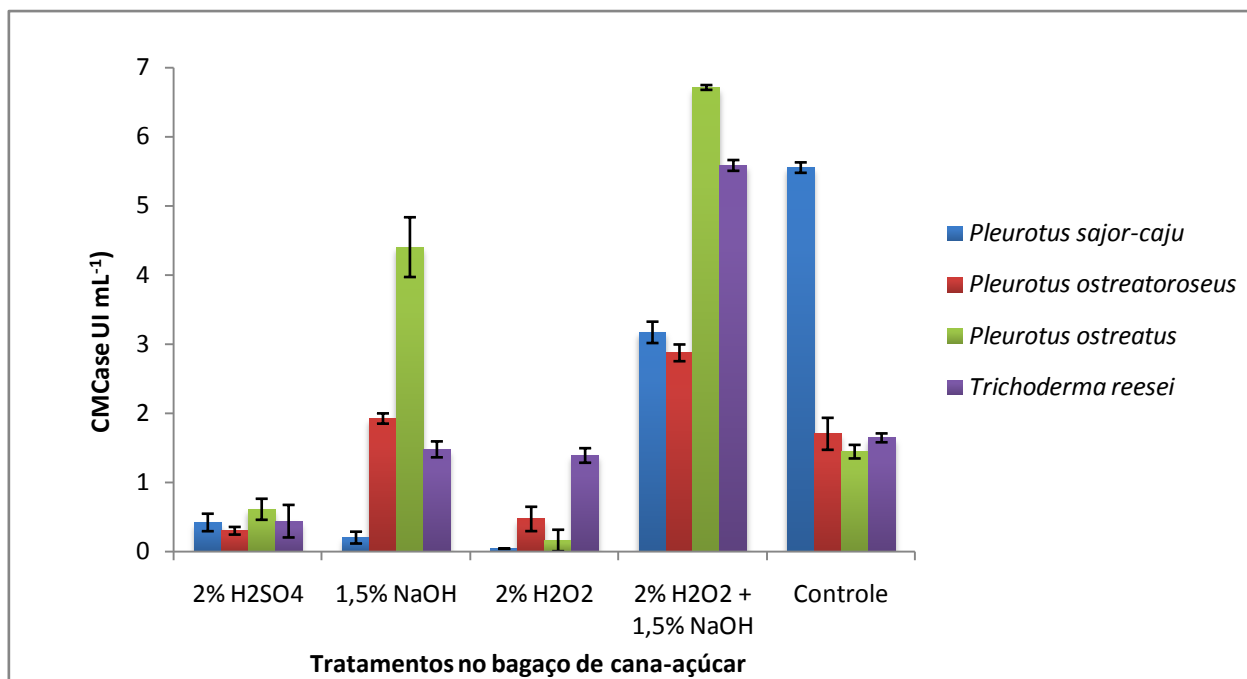


Figura 9 - Atividade da endoglicanase dos fungos cultivados em bagaço em diversos tratamentos, após 15 dias de cultivo a 30°C

Quanto às atividades lignolíticas de cada fungo, também foi avaliado o tratamento em que melhor apresentou melhores condições para atividade enzimática para cada fungo estudado. Conforme a Tabela 4 abaixo, as atividades enzimáticas de *P. sajor-caju* nos tratamentos com 2% H₂O₂ e 1,5% NaOH + 2% H₂O₂ foram onde apresentaram as maiores atividades enzimáticas, tanto para lacase, peroxidase e MnP.

Nos tratamentos realizados com o fungo *P. ostreatoroseus* não houve atividade de manganês-peroxidase em nenhum tratamento, como mostra a Tabela 5 abaixo. A atividade de lacase foi menor estatisticamente no tratamento ácido (2% H₂SO₄). Para a peroxidase, a atividade foi de 0,670 UI L⁻¹ no tratamento com 1,5% NaOH + 2% H₂O₂ sendo a maior entre os outros tratamentos Entretanto cinco vezes menor que a de *P. sajor-caju* e 2 vezes menor que *P. ostreatus*.

Tabela 4 - Atividade lignolítica (UI L⁻¹) do fungo *Pleurotus sajor-caju* CCB020 em diferentes tratamentos no bagaço + vinhaça após 15 dias de cultivo a 30°C

| Enzima | Tratamento no bagaço | | | | |
|------------|-----------------------------------|---------------------|----------------------------------|--|--------------------|
| | 2% H ₂ SO ₄ | 1,5% NaOH | 2% H ₂ O ₂ | 1,5% NaOH + 2% H ₂ O ₂ | CONTROLE |
| Lacase | 0,934 ^c | 0,998 ^c | 2,374 ^b | 3,567 ^a | 2,301 ^b |
| Peroxidase | 0,324 ^d | 0,788 ^{dc} | 2,171 ^b | 3,474 ^a | 1,223 ^c |
| MnP | 0,322 ^b | 0,312 ^b | 0,832 ^b | 2,344 ^a | 0,923 ^b |

Valores das médias de 3 repetições. Médias assinaladas com a mesma letra na mesma linha não diferem significativamente ($p < 0,05$), segundo teste de Tukey.

Tabela 5 - Atividade lignolítica (UI L⁻¹) do fungo *Pleurotus ostreatoroseus* CCB440 em diferentes tratamentos no bagaço + vinhaça após 15 dias de cultivo a 30°C

| Enzima | Tratamento no bagaço | | | | |
|------------|-----------------------------------|--------------------|----------------------------------|--|--------------------|
| | 2% H ₂ SO ₄ | 1,5% NaOH | 2% H ₂ O ₂ | 1,5% NaOH + 2% H ₂ O ₂ | CONTROLE |
| Lacase | 0,013 ^b | 0,144 ^a | 0,173 ^a | 0,201 ^a | 0,199 ^a |
| Peroxidase | 0,011 ^c | 0,313 ^b | 0,123 ^b | 0,670 ^a | 0,521 ^a |
| MnP | 0,000 ^a | 0,000 ^a | 0,000 ^a | 0,000 ^a | 0,000 ^a |

Valores das médias de 3 repetições. Médias assinaladas com a mesma letra na mesma linha não diferem significativamente ($p < 0,05$), segundo teste de Tukey.

Ao analisar as atividades do fungo *P. ostreatus* (Tabela 6) cultivado no bagaço tratado com 1,5% NaOH + 2% H₂O₂ e 1,5% NaOH, há uma atividade significativamente diferente de peroxidase quanto aos outros tratamentos feito no bagaço, entretanto não ocorreu atividade da lacase em nenhum dos tratamentos e a atividades da MnP nos diferentes tratamento não diferenciou estatisticamente.

Tabela 6 - Atividade lignolítica (UI L⁻¹) do fungo *Pleurotus ostreatus* em diferentes tratamentos no bagaço + vinhaça após 15 dias de cultivo a 30°C

| Enzima | Tratamento no bagaço | | | | |
|------------|-----------------------------------|---------------------|----------------------------------|--|--------------------|
| | 2% H ₂ SO ₄ | 1,5% NaOH | 2% H ₂ O ₂ | 1,5% NaOH + 2% H ₂ O ₂ | CONTROLE |
| Lacase | 0,000 ^a | 0,002 ^a | 0,001 ^a | 0,000 ^a | 0,000 ^a |
| Peroxidase | 0,551 ^b | 0,983 ^{ab} | 0,775 ^b | 1,393 ^a | 0,873 ^b |
| MnP | 0,923 ^a | 0,884 ^a | 1,233 ^a | 0,942 ^a | 0,983 ^a |

Valores das médias de 3 repetições. Médias assinaladas com a mesma letra na mesma linha não diferem significativamente ($p < 0,05$), segundo teste de Tukey.

Tabela 7 - Atividade lignolítica (UI L⁻¹) do fungo *Trichoderma reesei* em diferentes tratamentos no bagaço + vinhaça após 15 dias de cultivo a 30°C

| Enzima | Tratamento no bagaço | | | | |
|------------|-----------------------------------|--------------------|----------------------------------|--|--------------------|
| | 2% H ₂ SO ₄ | 1,5% NaOH | 2% H ₂ O ₂ | 1,5% NaOH + 2% H ₂ O ₂ | CONTROLE |
| Lacase | 0,765 ^b | 1,34 ^{ab} | 0,842 ^b | 1,890 ^a | 1,455 ^a |
| Peroxidase | 0,982 ^a | 1,133 ^a | 0,9883 ^a | 1,773 ^a | 1,243 ^a |
| MnP | 3,501 ^a | 2,544 ^b | 3,5452 ^a | 4,563 ^a | 2,323 ^c |

Valores das médias de 3 repetições. Médias assinaladas com a mesma letra na mesma linha não diferem significativamente ($p < 0,05$), segundo teste de Tukey.

O ascomiceto *T. reesei* cultivado no bagaço tratado, apresentou maior atividade da lacase no tratamento com 1,5% NaOH, 1,5% NaOH + 2% H₂O₂ (Tabela 7). A atividade da peroxidase foi maior no tratamento com 1,5% NaOH + 2% H₂O₂, comparando com os *Pleurotus* foi 1,3 vezes maior e 2,6 vezes maior que *P. ostreatus* e *P. ostreatoroseus*, respectivamente e 2 vezes menos que *P. sajor-caju*. A atividade da MnP foi maior que a atividade apresentada pelos *Pleurotus* (de 1,9 a 4,8 vezes mais), sendo que a maior atividade foi conseguida no tratamento com a mistura de 1,5% NaOH + 2% H₂O₂ (4,563 UI L⁻¹). Nesse ensaio, verificou-se a atividade de enzimas oxidativas por parte do fungo *Trichoderma reesei*, diferente de Higuchi, (1990) que concluiu que este fungo foi incapaz de hidrolisar componentes lignocelulolíticos.

4.5 Análise da atividade celulolítica (Exo-1,4-β-D-glicanase e Endo-1,4-β-D-glicanase)

Nesse ensaio, os fungos *P. sajor-caju*, *P. ostreatoroseus*, *P. ostreatus* e *T. reesei*, foram cultivados em meio de bagaço-moído + vinhaça (MBV) e em meio bagaço-moído + meio líquido mineral (MBM). O ensaio permitiu o estudo da atividade celulolítica nos diferentes meios no decorrer de 30 dias, avaliar o período de maior atividade enzimática e a relação entre as exoglicanase e endoglicanases entre fungos do mesmo gênero.

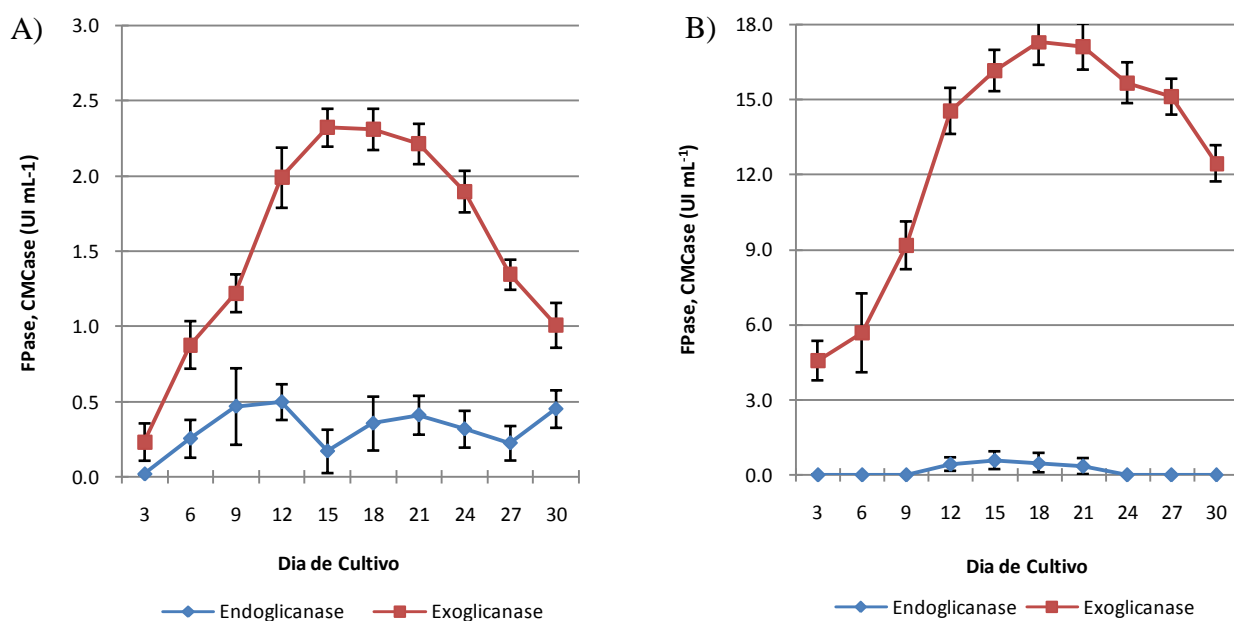


Figura 10 - Atividade celulolítica do fungo *Pleurotus sajor-caju* CCB020 cultivado durante 30 dias, a 30°C em meio: A) MBV e B) MBM

A atividade da exoglicanase do fungo *P. sajor-caju* cultivado em meio MBV (Figura 10-A), teve um aumento a partir do 9º dia de incubação atingindo um pico de 2,32 e 2,31 UI mL⁻¹ durante os 15º e 18º dia, respectivamente. A partir do 24º dia, a atividade começa a cair chegando a 1,00 UI mL⁻¹ no 30º dia, provavelmente decorrente da escassez de fontes de alimento necessárias ao metabolismo e também decorrente ao acúmulo de metabólitos secundários que geram a inibição da enzima, principalmente no acúmulo de glicose e celobiose (FLACHNER *et al.*, 2004; LESCHINE *et al.*, 1995). Porém a atividade da endo-1,4-β-D-glicanase manteve-se praticamente constante durante os trinta dias não atingindo mais do que 0,49 UI mL⁻¹ (Figura 10-A).

Quando comparando as atividades celulolíticas no meio MBV e MBM (Figura 10) podemos notar que quase não foi detectável a atividade para endoglicanase, porém para a exoglicanase a partir do 9º dia, a atividade enzimática já chega a quase oito vezes mais que no tratamento com o meio de vinhaça atingindo 16,15 e 17,33 UI mL⁻¹ nos 15º e 18º dia, respectivamente. Pode-se afirmar que a atividade enzimática das exoglicanase são maiores no tratamento em que não se utiliza a vinhaça. Como a vinhaça é um composto altamente rico em nutrientes e com alto teor de fenóis, acredita-se que esses compostos estão inibindo a atividade enzimática do fungo.

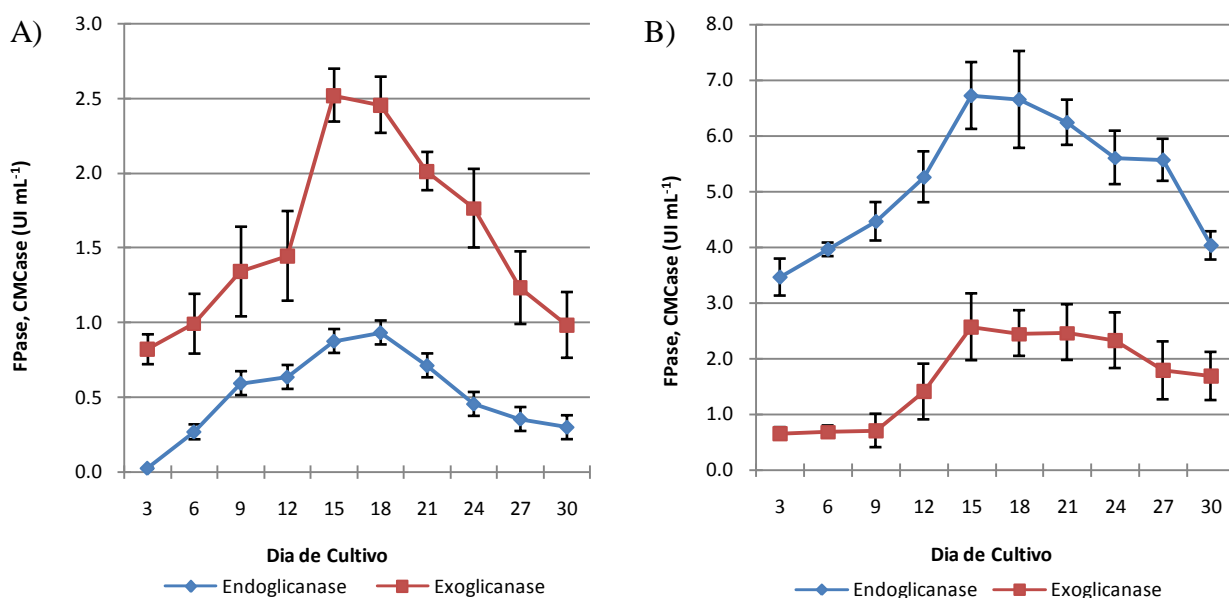


Figura 11 - Atividade celulolítica do fungo *Pleurotus ostreatoroseus* CCB440 cultivado durante 30 dias, a 30°C em meio: A) MBV e B) MBM

Para o fungo *P. ostreatoroseus* cultivado em meio MBV (Figura 11-A), a atividade da exoglicanase foi maior que a atividade da endoglicanase, mas mantiveram-se em aumento constante com picos entre os 12º e 18º dia. As atividades máximas foram de 2,52 UI mL⁻¹ para a exoglicanase no 15º dia, já a endoglicanase apresentou 0,93 UI mL⁻¹ no 18º dia.

A atividade da endoglicanase (Figura 11-B) foi bem maior que no meio com vinhaça representado na Figura 11-B, com atividade sendo maior no 15º dia (6,71 UI mL⁻¹). Isso indica que a vinhaça ativa a endoglicanase do fungo, porém não interfere na atividade da exoglicanase, que mantém um padrão de atividade. A atividade da exoglicanase obteve um pico máximo no 15º dia de 2,56 UI mL⁻¹.

Não houve atividade enzimática significante da endoglicanase pelo fungo *P. ostreatus* quando cultivado no meio MBV (Figura 12-A). A atividade da exoglicanase manteve-se relativamente alta, atingindo um pico de 4,25 UI mL⁻¹ no 15º dia, contudo começou a decair a partir desse dia, chegando a 0,14 UI mL⁻¹ no 24º dia.

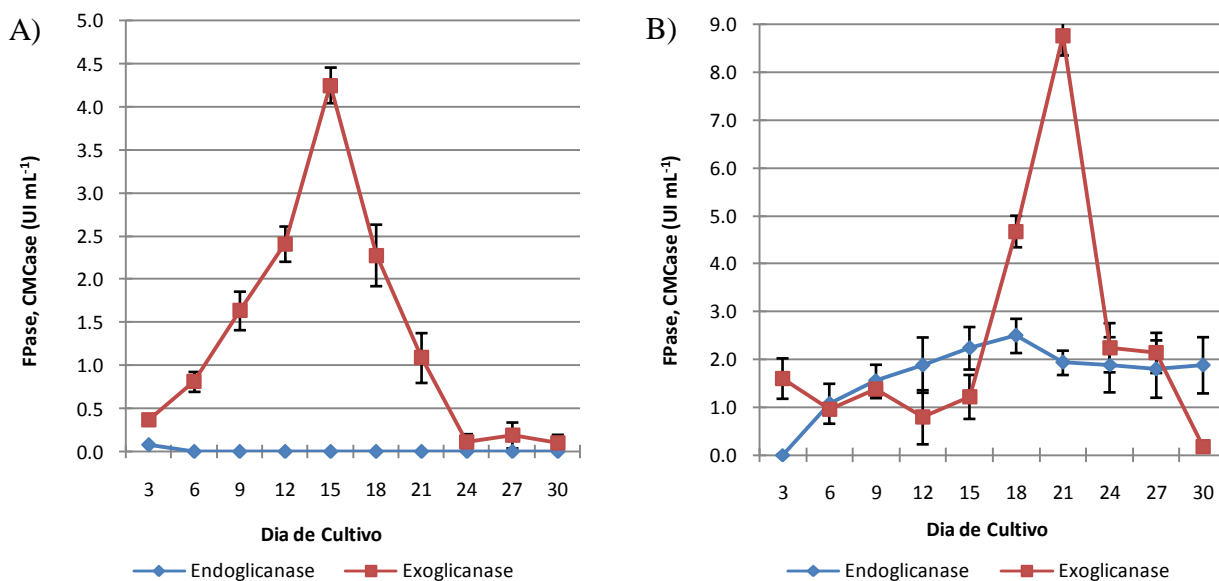


Figura 12 - Atividade celulolítica do fungo *Pleurotus ostreatus* cultivado durante 30 dias, a 30°C em meio: A) MBV e B) MBM

A atividade da exoglicanase (Figura 12-B) ocorreu mais tarde que no outro tratamento com vinhaça contida no meio, atingindo uma atividade de $8,76 \text{ UI mL}^{-1}$ no 21º dia, enquanto a endoglicanase variou pouco, mantendo uma atividade entre $1,07$ e $1,87 \text{ UI mL}^{-1}$ ao decorrer dos 30 dias.

O fungo filamentososo *T. reesei* é conhecido provavelmente como o organismo que melhor atua na degradação de sistemas celulósicos. É também conhecido por produzir uma quantidade razoável de celulases extracelular e esse sistema celulósico demonstra um sinergismo com celulose cristalina (ELISASHVILI, 1993). Na Figura 13-A, observa-se que a atividade da exoglicanase do *T. reesei* é mais alta em comparação com outros fungos.

Também foi observado um aumento da endoglicanase, a partir do 18º dia, logo após o declínio da atividade da exoglicanase. Neste caso, conclui-se que a presença da endoglicanase pode estar afetando na atividade da exoglicanase, já que geralmente, os microrganismos possuem múltiplas variedades distintas de endo- e exo- glicanases, sendo que essas duas trabalham em sinergismo na hidrólise da celulose.

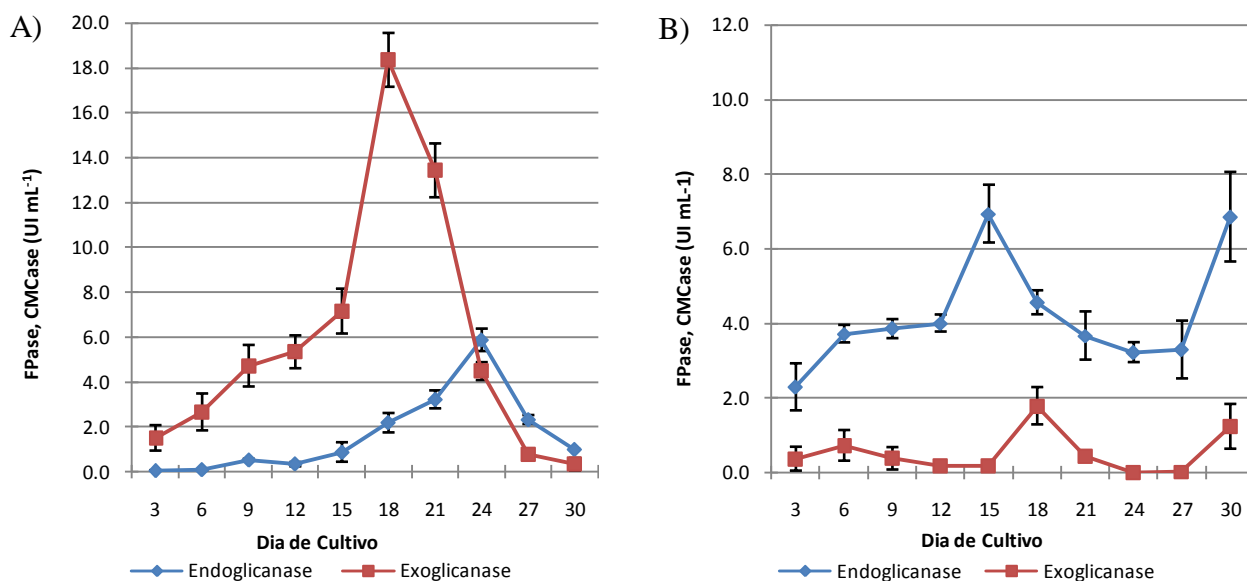


Figura 13 - Atividade celulolítica do fungo *Trichoderma reesei* cultivado durante 30 dias, a 30°C em meio: A) MBV e B) MBM

A atividade da endoglicanase do ascomiceto *T. reesei*, quando cultivado em MBM (Figura 13-B), é maior do que quando cultivado no meio com vinhaça (Figura 13-A), atingindo valores de 6,94 UI L⁻¹ e 6,85 UI L⁻¹ no 15º e 30º dia de cultivo, respectivamente. Enquanto a atividade da exoglicanase permaneceu baixa ao longo dos 30 dias. É provável que o uso da vinhaça no meio MBV esteja induzindo a produção de exoglicanases, possivelmente por ser um resíduo rico em sacarídeos.

A eficiência com que a celulose é hidrolisada depende de vários fatores que envolvem desde as características do substrato até natureza do sistema enzimático utilizado. Os fatores relacionados às enzimas incluem a inibição do complexo celulásico pelo acúmulo de produto final (celobiose e glicose), adsorção irreversível das enzimas sobre o substrato, desnaturação enzimática por exposição excessiva à temperatura e agitação necessárias ao processo. Já os fatores relacionados ao substrato correspondem à porosidade e cristalinidade das fibras de celulose, teor de lignina e o teor de hemiceluloses presentes no bagaço (FLACHNER *et al.*, 2004; LESCHINE *et al.*, 1995). O vapor ocasionado pela autoclave produz a redução do tamanho das partículas do substrato, abertura dos microporos quebra das fibras de lignina e também o aumento da área superficial do material (BOISSET, *et al.* 2000, ELISASHVILI *et al.* 1993). Estas alterações na estrutura são responsáveis pela melhora do ataque enzimático, sendo que o pré-tratamento produz um substrato com maior acessibilidade à ação enzimática. Conclui-se assim que a presença das fibras de lignina remanescente no substrato não impediu o processo de sacarificação da celulose.

4.6 Análise da atividade lignolítica (Lacase, Peroxidase e MnP)

A biodegradação da biomassa lignocelulolítica é um processo lento, principalmente por causa da lignina e da cristalinidade do substrato, que restringem o acesso a enzimas hidrolíticas aos componentes dos polissacarídeos. Entretanto, essa biomassa pode ser tratada e parcialmente fracionada usando processos que tipicamente envolve uma temperatura elevada, pressão e um pré-tratamento no substrato capaz de gerar materiais lignocelulolíticos mais suscetíveis ao ataque enzimático do microrganismo.

Nesse ensaio, os seguintes fungos *P. sajor-caju*, *P. ostreatoroseus*, *P. ostreatus* e *T. reesei*, foram cultivados em meio de bagaço-moído com vinhaça (MBV) e em meio bagaço-moído com meio líquido mineral (MBM). Isso permitiu uma análise da atividade das enzimas oxidativas

(lacase, peroxidase e MnP) na degradação do bagaço de cana-de-açúcar nos diferentes meios no decorrer de 30 dias.

Observando os resultados apresentados pelo fungo *P. sajor-caju* na Figura 14, as atividades da lacase e da peroxidase no meio MBV mantiveram-se altas nos seis primeiros dias e decaindo a partir do 6º dia. Enquanto a atividade da MnP no mesmo meio apresentou alta atividade a partir do 6º dia atingindo um pico de 17,93 UI L⁻¹ no 12º dia. O fungo *P. sajor-caju* não apresentou atividade das enzimas oxidativas quando cultivado em meio MBM (ANEXO A), é provável que esse meio não esteja induzindo o sistema enzimático do fungo por não conter compostos complexos. Segundo Ferraz (2004), as lacases atuam diretamente sobre estruturas fenólicas (presentes na vinhaça) por meio da oxidação dos fénois através da abstração de um elétron mediada pela redução de Cu⁺² a Cu⁺¹, que por sua vez reduz o oxigênio a água, permitindo que a enzima atue de forma cíclica.

Por outro lado o fungo *P. ostreatoroseus* não apresentou atividade lignolítica quando cultivado em meio MBV (ANEXO B). Isso implica que a vinhaça possa estar inibindo o sistema enzimático do fungo, assim sendo impossível detectar qualquer atividade promovida pelo microorganismo. Quando cultivado em meio mineral (Figura 15), o fungo *P. ostreatoroseus* também não apresentou atividade na manganês-peroxidase (MnP), com isso é possível afirmar que essa enzima não está presente no complexo enzimático lignolítico do fungo *P. ostreatoroseus* CCB440 uma vez que não apresentou MnP no meio com bagaço tratado quimicamente (Tabela 5). Segundo Hatakka (1994), desde a década de 80, quando foram descobertas as MnP e outras peroxidases, determinados grupos de fungos, principalmente os decompositores, puderam ser classificados de acordo com a sua produção enzimática: aqueles que produzem MnP-peroxidases, MnP-lacases e peroxidases-lacases, entretanto ocorrendo algumas exceções. Observando o gráfico da Figura 15, a atividade da peroxidase foi alta (1,73 UI L⁻¹) na primeira semana, enquanto a atividade da lacase manteve-se baixa (0,13 UI L⁻¹). Após o 15º dia a atividade da lacase aumentou (0,54 UI L⁻¹) enquanto a atividade da peroxidase diminuiu (0,87 UI L⁻¹).

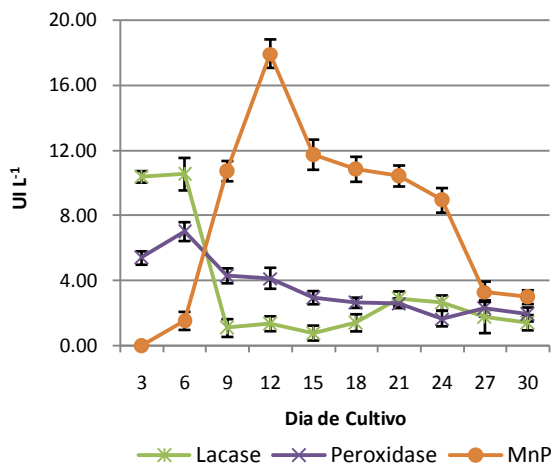


Figura 14 - Atividade lignolítica do fungo *Pleurotus sajor-caju* CCB020 cultivado durante 30 dias em meio MBV a 30°C

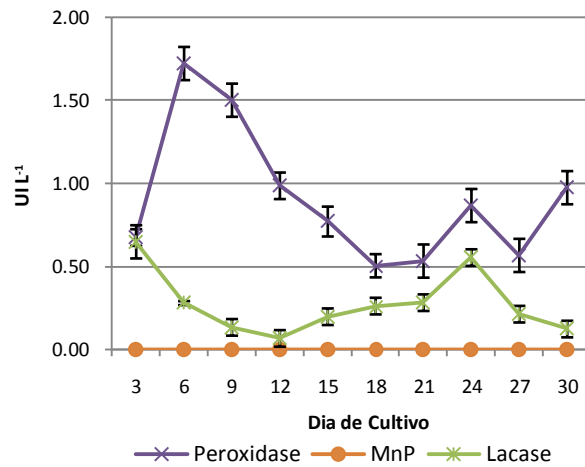


Figura 15 - Atividade lignolítica do fungo *Pleurotus ostreatoroseus* CCB440 cultivado durante 30 dias em meio MBM a 30°C

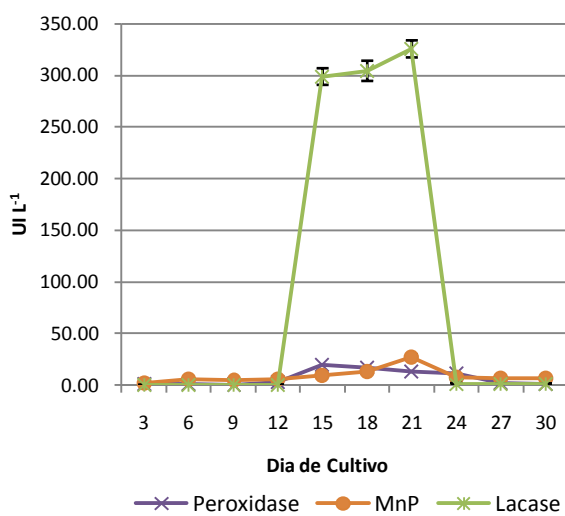


Figura 16 - Atividade lignolítica do fungo *Pleurotus ostreatus* cultivado durante 30 dias em meio MBV a 30°C

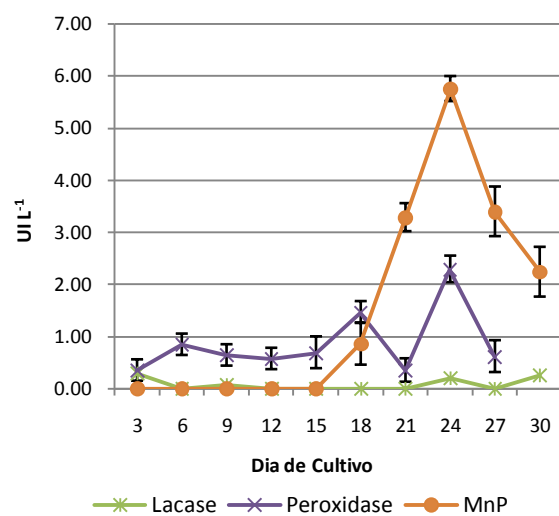


Figura 17 - Atividade lignolítica do fungo *Pleurotus ostreatus* cultivado durante 30 dias em meio MBM a 30°C

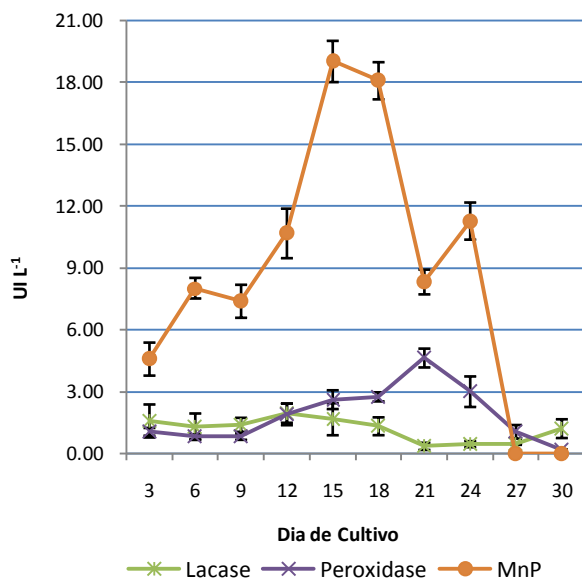


Figura 18 - Atividade lignolítica do fungo *Trichoderma reesei* cultivado durante 30 dias em meio MBV

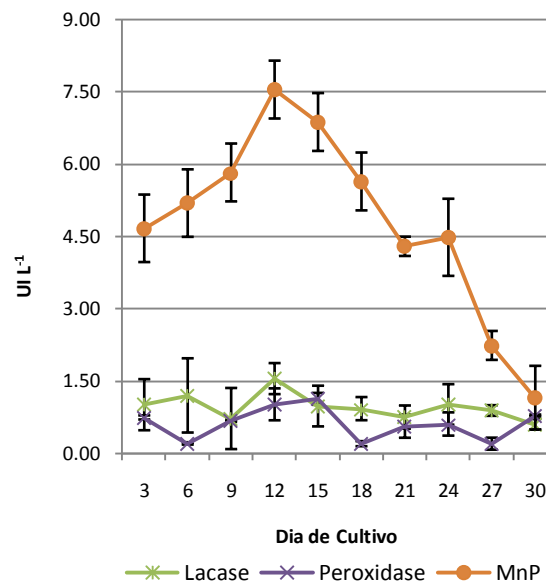


Figura 19 - Atividade lignolítica do fungo *Trichoderma reesei* cultivado durante 30 dias em meio MBM

O fungo *P. ostreatus* já é conhecido por ser um basidiomiceto degradador de lignina, e que todos os *Pleurotus* não apresentam ligninas peroxidases (LiP) (KIRK, 1986; HIGUCHI, 1990; COHEN, 2002; IKEHATA, 2004). Estudos revelam que o mecanismo de degradação da lignina por fungos tem revelado a complexidade do sistema enzimático porque existem mais que um caminho para a degradação desse composto e como já foi dito o maquinário enzimático é diferentes nos microrganismos (HATAKKA, 1994). Conforme a Figura 16, podemos observar que a atividade de lacase é bastante alta ($298,46 \text{ UI L}^{-1}$) a partir do 15º dia de cultivo em meio MBV até atingir $325,23 \text{ UI L}^{-1}$ no 24º dia de cultivo. As atividades de MnP e peroxidase também foram altas atingindo $27,69$ e $19,84 \text{ UI L}^{-1}$ respectivamente. Para o cultivo no meio líquido mineral (MBM) (Figura 17), não houve atividade significativa de lacase. A atividade da MnP aumentou de $0,85 \text{ UI L}^{-1}$ para $5,75 \text{ UI L}^{-1}$ a partir do 18º dia e a atividade da peroxidase manteve-se menor que $2,30 \text{ UI L}^{-1}$ durante todo o cultivo.

O ascomiceto *Trichoderma reesei* é conhecido por ter seu sistema enzimático bastante estudado (ELISASHVILI, 1993), porém vários desses estudos ainda resultam na não atividade das eximas oxidativas de *T. reesei*. Nos tratamentos utilizados (Figura 18 e 19) podemos observar que houve atividade lignolítica principalmente por parte da manganês-peroxidase. No meio contendo

vinhaça (MBV), a MnP teve atividade alta entre os dias 15° e 18° (19,02 e 18,08 UI L⁻¹, respectivamente), enquanto a lacase não houve atividade acima de 1,97 UI L⁻¹ e 4,64 UI L⁻¹ para peroxidase ao longo dos 30 dias de cultivo. O cultivo do fungo no meio mineral (Figura 19) manteve um mesmo padrão de atividade, tendo a MnP com uma maior atividade (7,54 UI L⁻¹) no 12° dia e atividades não maiores que 1,55 e 1,13 UI L⁻¹ para lacase e peroxidase, respectivamente. Com esse resultado podemos verificar que o tratamento em que a vinhaça é usada (MBV) influencia no complexo enzimático com um aumento de 2,5 vezes na atividade para a MnP, mas mantendo a atividade praticamente no mesmo nível para a lacase e peroxidase. Assim segundo Eriksson (1990), as vias de degradação de lignina e celulose estão interligadas e pode ocorrer uma regulação das atividades em conjunto. Há um sinergismo, já estudado entre as endoglicanases e exoglicanases, interpretado como um sistema seqüencial das endoglicanases agindo inicialmente em regiões amorfas da fibra de celulose liberando-as para a ação das exoglicanases, porém antes dessa degradação os substratos são atacados pelas enzimas extracelulares oxidativas, assim liberando os açúcares para as enzimas hidrolíticas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fungos constituem um dos grupos de microrganismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função de sua capacidade especializada de degradação. Esta atividade ocorre, sobretudo, através de sua fase vegetativa ou miceliana. Nas fases vegetativas e reprodutivas, a formação de biomassa depende da produção de enzimas extracelulares e endocelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes dos substratos, principalmente lignocelulose encontrada nas células de vegetais. A lignina e a hemicelulose são polímeros complexos presentes nas plantas. Cada polímero sozinho representa uma tarefa árdua para a degradação microbiológica. Em substratos nativos, entretanto, a lignina e hemicelulose estão entrelaçadas e quimicamente ligadas por ligações covalentes, fazendo com que seja mais difícil a ação de degradação por parte dos microrganismos.

Segundo Eriksson (1990), as vias de degradação de lignina e celulose estão interligadas e pode ocorrer uma regulação das atividades em conjunto. Há um sinergismo, já estudado entre as endo- e exoglicanases, interpretado como um sistema seqüencial das endoglicanases agindo inicialmente nas regiões amorfas da fibra de celulose liberando-as para a ação das exoglicanases (NIDETZKY, 1994). Este trabalho mostrou que as atividades celulolíticas são afetadas diretamente pelos diversos tratamentos realizados no bagaço, pelo meio em que são cultivados e que atuam em momentos diferentes. Essas atividades lignocelulolíticas atuam em diferentes porções do substrato, fazendo com que outros substratos são formados se utilizados por outras vias de degradação.

6 CONCLUSÃO

- O tratamento químico realizado no bagaço com 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH + autoclave a 121 °C por 15 minutos, foi o tratamento que melhor apresentou uma quebra nas fibras do substrato: a celulose aumentou 1,4 vezes em comparação ao controle, e fez o teor de hemicelulose baixar em 8,5 vezes.
- Os fungos *Pleurotus sajor-caju* CCB020, *Pleurotus ostreatus* e *Trichoderma reesei* apresentaram uma maior biomassa micelial quando cultivados em meio suplementado com vinhaça (MBV) a uma temperatura de 30 °C.
- Os melhores tratamentos químicos no bagaço para a produção de exoglicanases para os fungos *P. sajor-caju* CCB020, *P. ostreatoroseus* CCB440, *P. ostreatus* e *T. reesei* foram os tratamentos com 2% H₂O₂ e o tratamento em conjunto de 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH. E o melhor tratamento para atividade de endoglicanases dos mesmos fungos foi o tratamento que consistiu em 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH. Para a produção de enzimas lignolíticas o melhor tratamento foi o tratamento consistindo em conjunto de 2% H₂O₂ + 1,5% NaOH para os fungos *P. sajor-caju* CCB020, *P. ostreatoroseus* CCB440, *P. ostreatus* e *T. reesei*.
- O meio que apresentou maior atividade de exoglicanase para *P. ostreatoroseus* CCB440 e *T. reesei* foi o meio suplementado com vinhaça (MBV) enquanto para os fungos *P. sajor-caju* CCB020 e *P. ostreatus* foi o meio mineral (MBM).
- O meio que mais apresentou atividade de endoglicanase para os fungos *P. ostreatoroseus* CCB440, *P. ostreatus* e *T. reesei* foi o meio MBM, enquanto para o fungo *P. sajor-caju* CCB020 foi o meio MBV.
- O fungo *Trichoderma reesei* apresentou atividade de enzimas oxidativas, principalmente atividade de manganês-peroxidase nos tratamentos em que foi cultivado em meio com vinhaça (MBV) e meio mineral (MBM).
- O fungo *P. sajor-caju* apresentou alta atividade de lacase em meio de vinhaça (MBV), ao redor de 300 U L⁻¹ no 15º dia de inoculação, sendo que não apresentou atividade de lacase no bagaço quimicamente tratado em meio mineral.
- Os fungos *P. sajor-caju* CCB020 e *Trichoderma reesei* apresentaram alta atividade de manganês-peroxidase, ao redor de 18 a 20 U L⁻¹ quando comparados com *P. ostreatoroseus*, que não apresentou atividade de MnP e *P. ostreatus* que teve atividade por volta de 6 U L⁻¹.

REFERÊNCIAS

ARCHIBALD, F.S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, 1992 v. 58, n. 9, p. 3110–3116. 1992

AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.

AMJED, M.; JUNG, H.G.; DONKER, J.D. Effect of alkaline hydrogen peroxide treatment on cell wall composition and digestion kinetics of sugarcane residues and wheat straw. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, p. 2877-2884, 1992.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 219-248, 1990.

BERGUIN, P.; AUBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.13, p.25-58, 1994.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBUR, D.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEV, O.; GUSAKOV, A.; MAXIMENKO, V.; GREGG, D.; SINITSYN, A.; SADDLER, J. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates – evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.37, n.2, p.175-184, 2005.

BISARIA, V.S.; GHOSE, T.K.; Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme Microbiology and Technology**, New York, v. 3, p. 90-104, 1984.

BOISSET, C.; FRASCHINI, C.; SCHULEIN, M.; HENRISSAT, B.; CHANZY, H. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicol insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.1444-1452, 2000.

BREZNAK J.; BRUNE A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 39, p. 453–487, 1994.

BURDEN, D., WHITNEY, D. **Biotechnology: proteins to PCR – a course in strategies and lab techniques**. Boston, 1995.

CAMERON, M.D.; TIMOFEEVSKI, S.; AUST, S.D. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 54, p. 751-758, 2000.

CARASCHI, J.C. **Estudo das relações estrutura/propriedades de carboximetilcelulose obtida por derivatização de polpa de bagaço de cana-de-açúcar**. 1997. 188p. (Doutorado em Física) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

CHENG, C.; TSUKAGOSHI, N.; UDAKA, S. Nucleotide sequence of the cellobiohydrolase gene from *Trichoderma viride*. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, n. 18, p.5559, 1990.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus* **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v. 58, p.5 82–594, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Disponível em: www.conab.gov.br. Acesso em: 10 jan. 2008.

DELLAMATRICE, P.M. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana, SP**. 2005. 137p: Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

DOERGE, D.R.; DIVI, R.L.; CHURCHWELL, M.I. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 250, p. 10-17, 1997.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia ambiental**, Jaguariúna: CNPM/EMBRAPA, 1997. p. 269-292.

ELISASHVILI, V.L.; Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 29, p. 257-266, 1993.

ENARI, T. M. Microbial lipases. _____. **Microbial enzymes and biotechnology**. London: Applied Science Publishers, 1983.

ERIKSSON, K.E. Biotechnology in the pulp and paper industry. **Wood Science and Technology**, New York, v.24, p.79-101, 1990.

ERIKSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Endo-1,4- β -glucosidase of *Sporotrichum pulverulentum*. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.160, p.368-382, 1988.

FAGERSTAM, L.G.; PETTESSON L.G. The 1,4-h-glucan cellobiohydrolases of *Trichoderma reesei* QM9414. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 119, p. 97–101, 1980.

FÄHRAEUS, G. Aromatic compounds as growth substances for laccase producing rot fungi. **Physiology Plant**, v.15, p.572–579. 1962

FASANELLA, C.C. **Ação de enzimas lignocelulolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. 80p: Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure and reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1989.

FERRAZ, A.L. Fungos decompositores de materiais lignocelulolíticos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnológica**. Caxias do Sul: Educs. 2004. 510p.

FERRAZ, A.L.; PARRA, C.; FREER, J.; BAEZA, J.; RODRÍGUEZ, J.; Characterization of white zones produced on *Pinus radiata* wood chips by *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, p. 641-645, 2000.

FERREIRA, A.; HANNA, R. K.; LEBRÃO, G. W.; LEBRÃO, S. M. G.; NAGASHI, L.; SU, M. T.; VICENTINI T. Avaliação de compósito de poliéster e fibra de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 17, 2006. Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: s. ed. 2006.

FLACHNER, B.; RÉCZEY, K. β -glucosidase production and characterization of some *Aspergillus* strains. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Lausanne, v.18, n.3, p.303-307, 2004.

FUJIAN, X.; HONGZHANG, C.; ZUOHU, L. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 80, p. 149-151, 2001.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis (apparatus, reagentes, procedures and some applications)**. Washington: United States Department of Agriculture, 1970. 379 p. (Agriculture Handbook).

GONG, C.S.; TSAO, G.T.; Cellulase and biosynthesis regulation. **Annual Reports on Fermentation Processes**, New York, v. 3, p. 111-139, 1975.

GRGIC, I.; PERDIH, A. Stimulation of ligninolytic enzyme production in *Phanerochaete chrysosporium* by polyxyalkanes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, p.360-368, 2003.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by (pathogenic and saprophytic) fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HAQ, IKRAM-UL.; JAVED, M.M.; KHAN, T. S. Sugar cane bagasse pretreatment: An attempt to enhance the production potential of cellulases by *Humicola insolens* TAS-13. **Biokemistri**, Ilorin, v. 18, n. 2, p. 83-88, 2006.

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

HIGUCHI T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Wood Science and Technology**, Nova York, v. 24 p. 23–63, 1990.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I.D.; SMITH, D.W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal of Environmental of Engineering and Science**, Vancouver, v. 3, n. 1, p. 1–19, 2004.

JARVIS, M. Celulose stacks up. **Nature**, London, v. 426, p.611-612, 2003

JØRGENSEN, H.; MØRKEBERG, A.; KROGH, K.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, New York v. 36, p. 42-48, 2005.

JUHA´SZ , T.; SZENGYEL, Z.; RE´CZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, Londres, v. 40, p. 3519–3525, 2005.

KAMIDA, H.M.; DURRANT, L.R.; MONTEIRO, R.T.R.; ARMAS, E.D. Biodegradação de efluentes têxteis por *Pleurotus sajo- caju*. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.4, p. 629-632, 2005.

KIRK, T. K.; CROAN, S.; TIEN, M. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 8, p. 27-32, 1986.

KIRK, T.K.; CULLEN, D.; Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: KIRK, T.K. **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**. New York: John Wiley & Sons 1998. p. 273-308.

KLYOSOV, A.A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation, **Biochemistry**, Washington, v. 29, p. 10577–10585, 1990.

KUHAD, R.C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K.E.L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, Berlin v. 57, p. 45-126, 1997.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 169, p. 247-250, 1984.

LANGH, E.; ELLER, G.; ZADRAZIL, F. Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 34, p. 1-10, 1997.

LEE, K.; MOON, S.H. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.102, p.261-268, 2003.

LEE, S. B.; SHIN, H.S.; RYU, D.D.; MANDELS, M. Adsorption of cellulase on cellulose: effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 24, p. 2137–2153, 1982.

LESCHINE, S. Cellulose degradation in anaerobic environments. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 399-426, 1995.

LUNDELL, T.; LEONOWICZ, A.; HATAKKA, A. Metabolism of veratric acid by lignin-degrading white-rot fungi. **Biotechnology in pulp and paper manufacture**. Buttee, p. 387, 1990.

MACHADO, G. O. **Preparação e caracterização de CMC e CMC grafitizada**. 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulose. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, New York, v. 6, p. 2-34, 1976.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, Washington, v. 95, p. 391-414, 1969.

MANE, J.D.; MODI, S.; NAGAWADE, S.; PHADNIS, S.P.; BHANDARI, V.M. Treatment of spentwash using chemically modified bagasse and colour removal studies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 1752-1755, 2006.

MELLO, I.S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa - Meio Ambiente, 2008. v. 2, p. 304-319.

MENEZES, T. J. B. Os fungos na indústria. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 116-120, 1997.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, n.3, p.426-429, 1959.

NAIK, N. M.; JAGADEESH, K.S.; ALAGAWADI, A.R. Microbial decolorization of spentwash: a review. **Indian Journal of Microbiology**, Nova Delhi, v. 48, p. 41-48, 2008.

NIDETZKY, B.; STEINER, W. A new approach for modeling cellulase-cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.42, p. 469-479, 1994.

NIDETZKY, B.; STEINER, W.; HAYN, M.; CLAEYSSSENS, M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergism interaction. **The Biochemical Journal**, Londres, v. 298, p. 705-710, 1994.

NOVIKOVA, L.N; MEDVEDEVA, S.A; VOLCHATOVA, I.V.; BOGATYREVA, S.A. Changes in Macromolecular characteristics and biological activity of hydrolytic lignin in the course of composting. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.38, p. 181-185, 2002.

PALMIERI G, GIARDINA P, BIANCO C, SCALONI A, CAPASSO A, SANNIA G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p. 31301-31307. 1997

PALONEN, H. **Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose**. VTT: Espoo, 2004. 80 p.

PIETROBON, V.C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais**. 2008. 66p: Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Teresópolis: Editora Eventos, 2002.

SCHWARZ, W. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 56, p. 634-649, 2001.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO A MICRO E PEQUENAS EMPRESAS – SEBRAE. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/paginaInicial>. Acesso em: 10 jan. 2006.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: Impr. Univ. UFV, 1998. 166p.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v.2, p.27-32, 2007.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. 2nd ed. Oxford: Tarrytown, 1995. 357p.

STICKLEN, M.B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 9, p. 433-443, 2008.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, New York, v. 81, p. 234-240, 1989.

TAN, L.U.L.; MAYERS, P.; SADDLER, J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Tremoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 33, p. 689-692, 1987.

TANAKA, M.; NAKAMURA, H.; TANIGUCHI, M.; MORITA, T.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T. Elucidation of adsorption processes of cellulases during hydrolysis of crystalline cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v.23, p. 263–268, 1986.

TANAKA, T.; SHIMOMURA, Y.; HIMEJIMA, M.; TANIGUCHI, M.O.S. Characterization of xylan-utilizing anaerobes from mesophilic and thermophilic methane sludge and their xylan degrading enzymes. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tóquio, v. 50, n. 9, p. 2185-2192, 1981.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 81, p. 2280-2284, 1984.

TRIANA, O.; LEONARD, M.; SAAVEDRA, F.; FERNÁNDEZ, N.; GÁLVEZ, G.; PEÑA, E.- **Atlas del bagazo de la caña de azúcar**. México: GEPLACEA/ ICIDCA, 1990.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR – UNICA. São Paulo, 2008. Disponível em: < <http://www.portalunica.com.br>>. Acesso em: 5 de set. 2008.

UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA - UDOP. São Paulo, 2008. Disponível em: < <http://www.udop.com.br>>. Acesso em: 10 de out. 2008

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feed II. A rapid method for determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of the Official Agriculture Chemistry**, London, v. 46, n.5, p. 829-35, 1963.

VIANA, B.A. **Tratamento anaeróbio de vinhaça em reator UASB operado em temperatura na faixa termofílica (55°C) e submetido ao aumento progressivo de carga orgânica.** 2006. 88p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

VITTI, L.S.S. **Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus* sp e seus mutantes isolados de bagaço de cana.** 1988. 108p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

WADT, L.C. **Cultivo de *Pleurotus* ssp em vinhaça visando a produção de biomassa e exopolissacarídeos.** 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

WOOD, T.M; MCCRAE, S.I. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. **Advances in Chemistry Series**, Washington, v. 181, p. 181– 209, 1979.

WOODWARD, J. Synergism in cellulase systems. **Bioresource technology**, Essex, v. 36, n. 11, p. 67–75, 1991.

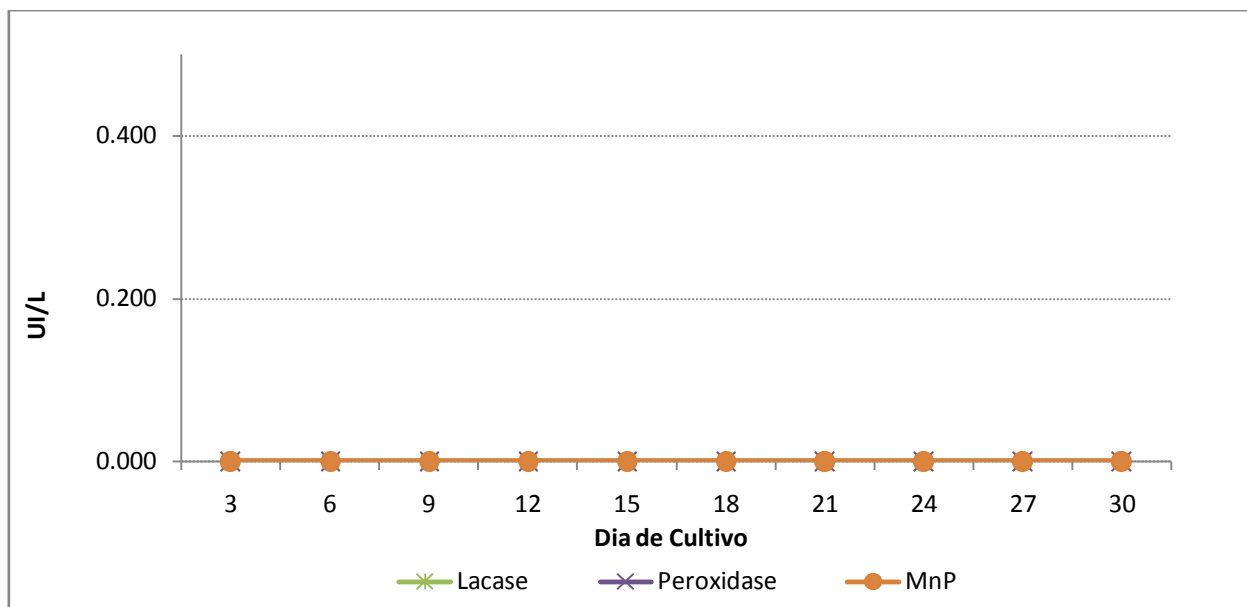
WRIGHT, J. D. Ethanol from lignocellulosics: an overview. **Energy Progress**, New York, v. 84, n. 8, p. 71-88, 1988.

WYMAN, C.E. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power. **Biotechnology Progress**, New York, v. 19, n.2, p. 254-262, 2003.

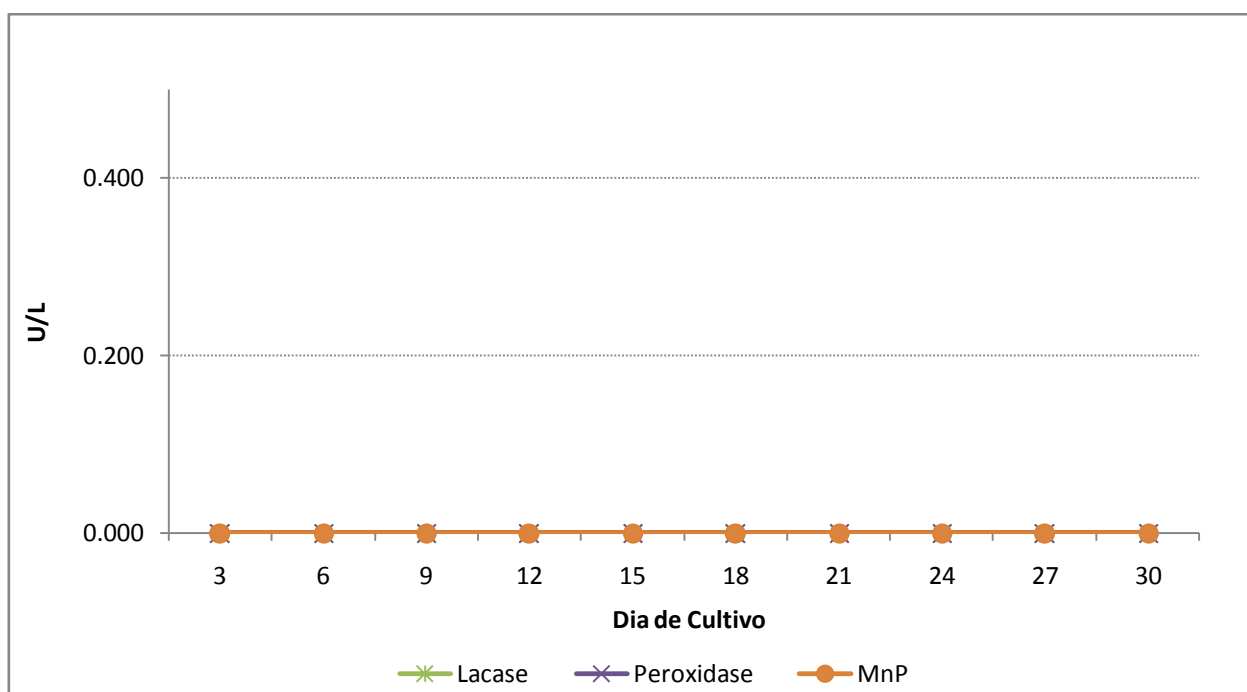
ZHANG, Y.; LYND, L. A functionally-based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 94, n. 5, p. 888-98, 2006.

ANEXOS

ANEXO A - Atividade lignolítica do fungo *Pleurotus sajor-caju* CCB020 cultivado durante 30 dias em meio MBM a 30°C



ANEXO B - Atividade lignolítica do fungo *Pleurotus ostreatoroseus* CCB440 cultivado durante 30 dias em meio MBM a 30°C



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)