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

**Obtenção de enzimas lignolíticas visando à hidrólise enzimática da
fração lignocelulósica de bagaço de cana pré-tratado
hidrotermicamente**

Tânia Regina de Assis

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

Tânia Regina de Assis
Licenciatura e Bacharel em Ciências Biológicas

**Obtenção de enzimas lignolíticas visando à hidrólise enzimática da fração
lignocelulósica de bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **SANDRA HELENA DA CRUZ**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Assis, Tânia Regina de

Obtenção de enzimas lignolíticas visando à hidrólise enzimática da fração
lignocelulósica de bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente / Tânia Regina
de Assis. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - -
Piracicaba, 2015.

90 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Lacase 2. Peroxidase 3. Fungo 4. Vinhaça I. Título

CDD 576.11925
A849o

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Gilberto e Euzânia, por todo incentivo, apoio, carinho e amor incondicional que me acompanham em todas as etapas da minha vida, em especial, em mais esta conquista, com muita gratidão,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Sandra Helena da Cruz, pela oportunidade, confiança, respeito e paciência durante o curso e elaboração deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz e ao Programa de Microbiologia Agrícola e seus professores e coordenadores, pela oportunidade de realizar este projeto.

Aos técnicos Pedro, Silvino e Rosemary pelo auxílio no laboratório. Pelo respeito, boa convivência e muitos momentos de alegria durante esses dois anos.

A minha família pelo apoio, incentivo e carinho.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram na realização deste trabalho.

E por último, mas não menos importante, a Deus por todas as dádivas recebidas e por me conceder mais esta conquista.

EPÍGRAFE

"O papel dos infinitamente pequenos na natureza é infinitamente grande."

Louis Pasteur

"Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade."

Marie Curie

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Resíduos do setor sucroenergético.....	21
2.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar	21
2.1.2 Vinhaça	23
2.2 Material lignocelulolítico.....	25
2.2.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulolítica	28
2.2.2 Hidrólise enzimática da biomassa	30
2.3 Obtenção de enzimas	31
2.3.1 <i>Pleurotus spp.</i>	31
2.3.2 Lacases	32
2.3.3 Peroxidase	35
2.4 Fermentação para obtenção das enzimas	36
2.4.1 Fermentação semissólido (FSS)	36
2.4.2 Fermentação Submersa (FSm)	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Bagaço de cana-de-açúcar e a vinhaça	39
3.2 Micro-organismo e cultivo da linhagem	39
3.3 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.....	39
3.4 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar	40
3.4.1 Teor de extrativos totais	40
3.4.2 Teor de lignina residual e solúvel	41
3.4.3 Teor de holocelulose	41
3.5 Composição da vinhaça	42
3.6 Obtenção do extrato bruto enzimático.....	42
3.6.1. Fermentação semissólido (FSS)	42
3.6.2 Fermentação submersa (FSm).....	43
3.7 Determinação das atividades enzimáticas	43

3.7.1 Determinação da Lacase	43
3.7.2 Determinação da Peroxidase.....	44
3.7.3 Determinação da concentração de proteínas totais.....	45
3.8 Análise eletroforética dos extratos enzimáticos obtidos: Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e não desnaturante (NATIVE-PAGE)	45
3.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)..	45
3.8.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida não-denaturantes (PAGE).....	46
3.9 Purificação parcial do extrato enzimático utilizando sulfato de amônio	47
3.10 Análise estatística	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Caracterização da matéria-prima.....	49
4.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar	49
4.1.2 Estudos de pré-tratamento do bagaço.....	51
4.1.3 Composição da vinhaça.....	52
4.2 Obtenção das enzimas lignolíticas	55
4.2.1 Enzimas obtidas por fermentação semissólida (FSS).....	55
4.2.2 Enzimas obtidas por Fermentação Submersa (FSm)	57
4.3 Caracterização parcial das enzimas	62
4.4 Descoloração da vinhaça.....	64
5 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICES	83
ANEXOS.....	87

RESUMO

Obtenção de enzimas lignolíticas visando à hidrólise enzimática da fração lignocelulósica de bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente

A vinhaça e o bagaço de cana são os principais subprodutos oriundos do processamento da cana-de-açúcar nas indústrias sucroalcooleiras, sendo geradas grandes quantidades dos mesmos. O fungo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* tem a capacidade de degradar materiais lignocelulolíticos e produzir enzimas lignolíticas de interesse para as indústrias. Com o objetivo de avaliar a produção das enzimas lacases e peroxidase, o fungo *Pleurotus ostreatus*, foi cultivado em meio contendo bagaço pré-tratado e vinhaça, ou em meio contendo apenas vinhaça, em sistema de fermentação semissólido ou submerso; as enzimas extracelulares foram avaliadas após 7, 10 e 12 dias de cultivo. O bagaço peneirado foi considerado pré-tratado fisicamente (T1); para o pré-tratamento T2 o bagaço umedecido foi submetido a autoclave (121°C e 1 atm por 15 min); nos pré-tratamentos químicos, T3 e T4, o bagaço foi tratado com peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio nas seguintes concentrações: 0,75% H₂O₂ + 0,75% NaOH (T3) e 0,75% H₂O₂ + 1% NaOH (T4) na proporção 1:10 (p/v) e, em seguida foram submetidos à autoclave (121°C e 1 atm por 15min). A vinhaça utilizada foi proveniente de uma indústria sucroalcooleira (V1) e outra de destilaria (V2); a composição físico-química mostrou que a primeira possuía os índices de matéria orgânica e fósforo mais elevados que na vinhaça V2, enquanto que a relação C:N foi menor na vinhaça V1. Os extratos enzimáticos foram obtidos após filtração do meio submerso; para o meio semissólido foi necessário a adição de tampão citrato (1:5 p/v) antes da filtração. A atividade de lacase e peroxidase em meio submerso, nos tratamentos com a vinhaça V1, foi superior ao observado em meio semissólido. A produção das enzimas em fermentação submersa, utilizando a vinhaça V1, apresentou valores de atividade de lacase, no tratamento TL1 e TL2, de 784,9 e 707,5 U.L⁻¹, com atividade específica de 3,04 e 2,86 U.mg⁻¹, respectivamente, e a amostra VL1, contendo apenas vinhaça, de 1,91 U.mg⁻¹, no 12º dia de fermentação. Os valores mais altos de atividade de peroxidase foram obtidos nos tratamentos TL1, TL2, VL1, com 133,1; 131,2 e 126,1 U.L⁻¹, respectivamente, após 12 dias de cultivo. A maior atividade específica obtida foi na VL1 (0,86 U.mg⁻¹) no 7º dia de cultivo. O pré-tratamento físico do bagaço mostrou melhores condições para a produção das enzimas. Para a produção da lacase e da peroxidase é fundamental a composição da vinhaça.

Palavras-chave: Lacase; Peroxidase; Fungo; Vinhaça

ABSTRACT

Enzyme lignolytic production focusing in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic fraction of hydrothermal pretreated sugarcane bagasse

The vinasse and bagasse are the principal by-products derived from the processing of sugarcane in the sugarcane industry, which generated large amounts of them. The basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus*, has the ability to degrade lignocellulolytic materials and produce lignolíticas enzymes of interest to industry. In order to evaluate the production of laccase and peroxidase enzymes, fungus *P. ostreatus* was grown in medium containing pre-treated bagasse and vinasse, or in medium containing only vinasse in semi-solid or submerged fermentation system; extracellular enzymes were evaluated after 7, 10 and 12 days of cultivation. The screened bagasse was considered pretreated physically (T1); for the pretreatment T2 moistened residue was subjected to autoclaving (121°C and 1 atm for 15 min). The chemical pretreatments, T3 and T4, the residue was treated with hydrogen peroxide and sodium hydroxide solution in the following concentrations 0,75% H₂O₂ + 0,75% NaOH (T3) and 0,75% H₂O₂ + 1% NaOH (T4) 1:10 (w/v) and then underwent autoclaving (121°C and 1 atm for 15 min). Vinasse used was coming from a sugar and alcohol industry (V1) and a distillery (V2); the physico-chemical composition showed that the former had the rates of organic matter and phosphorus higher than in V2 vinasse, whereas the C: N ratio was lower in V1 vinasse. The enzymatic extracts were obtained after filtration medium the submerged; to semisolid medium was necessary the addition of citrate buffer (1:5 w/v) prior to filtration. The activity of peroxidase and lacasse in submerged medium, in the treatments with the V1 vinasse, was higher than observed in semi-solid medium. The production of enzymes by submerged fermentation using the vinasse V1, presented laccase activity values, in the treatment TL1 and TL2, of 784,9 and 707,5 UI.L⁻¹, with specific activity of 3,04 e 2,86 U.mg⁻¹, on the 12th day of fermentation. Higher values peroxidase activity were obtained in the treatments TL1, TL2, VL1, with 133,1; 131,2 and 126,1 UI.L⁻¹, respectively, after 12 days of culture. The highest specific activity was obtained at VL1 (0,86 U.mg⁻¹) on the 7th day of culture. Physical bagasse pretreatment showed better conditions for the production of enzymes. For the production of the laccase and peroxidase is fundamental composition of vinasse.

Keywords: Laccase; Peroxidase; Fungus; Vinasse

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da parede celular vegetal..	26
Figura 2- Hidrólise da molécula de celulose.....	27
Figura 3 - Efeito do pré-tratamento sobre a biomassa lignocelulósica..	29
Figura 4 - Composição da fração sólida obtida por pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana.....	30
Figura 5 - Representação do ciclo catalítico da lacase..	34
Figura 6 – Esquema do processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.	40
Figura 7 – Foto da estrutura dos bagaços: T1. pré-tratamento físico; T2. Pré- tratamento termo-físico, T3. Pré-tratamento físico-químico (0,75% NaOH + 0,75% H ₂ O ₂), T4. Pré-tratamento físico-químico (0,75% NaOH + 1% H ₂ O ₂).	52
Figura 8 - Vinhaças V1 (Usina sucroalcooleira) e V2 (Destilaria). A) Cor visual das vinhaças (V1 e V2), e B) Cor das vinhaças em unidade EBC (European Brewery Convention) (Coluna preta), Açúcar redutor (AR) das vinhaças após filtração a 0,45µm (Coluna vermelha) e AR sem filtração (Coluna azul).....	55
Figura 9 – Atividade da Lacase após 7, 10 e 12 dias de cultivo do <i>P. ostreatus</i> em FSS nos diferentes pré-tratamentos do bagaço e umedecido com a V1. TS1. Bagaço pré- tratado 1; TS2. Bagaço pré- tratado 2; TS3. Bagaço pré-tratado 3; TS4. Bagaço pré- tratado 4.....	56
Figura 10 – Atividade da peroxidase produzida após 7, 10 e 12 dias de cultivo do <i>P.</i> <i>ostreatus</i> em FSS nos diferentes pré-tratamentos do bagaço e umedecido com a V1. TS1. Bagaço pré- tratado 1; TS2. Bagaço pré- tratado 2; TS3. Bagaço pré-tratado 3; TS4. Bagaço pré- tratado 4.	57
Figura 11 – Atividade da lacase produzida por <i>P. ostreatus</i> durante cultivo em meio líquido (FSm) contendo bagaço pré-tratamento e/ou vinhaça após 7, 10 e 12 dias. A) FSm utilizando a V1, B) FSm utilizando a V2.	59
Figura 12 - Atividade da peroxidase produzida por <i>P. ostreatus</i> durante cultivo em meio líquido (FSm) contendo bagaço pré-tratamento e/ou vinhaça após 7, 10 e 12 dias. A) FSm utilizando a V1, B) FSm utilizando a V2.	61

- Figura 13 – SDS-PAGE de extratos enzimáticos da FSm em V1 com 10 dias de cultivo do *P. ostreatus*. P. Padrão BSA; VL1. Vinhaça 1 pura; TL1. Bagaço pré-tratado 1; TL2. Bagaço pré-tratado 2; TL3. Bagaço pré-tratado 3; TL4. Bagaço pré-tratado 4 63
- Figura 14 – Análise quantitativa em gel não desaturante Native-PAGE 10%, dos extratos após 10 dias de cultivo do *P. ostreatus* em FSm com substrato V1, para detecção das enzimas: lacase (A), revelada com 1mM de Guaiacol em 100mM tampão acetato de sódio, e peroxidase (B), com o-dianizidine e H₂O₂. 64
- Figura 15 – Descoloração da vinhaça pelo *P. ostreatus*, sob o sistema de FSm, contendo ou não bagaço, após 10 dias de cultivo. A) Cor da vinhaça com pH 6,0 ajustado no início da fermentação. B) Substrato contendo 1 g de bagaço em conjunto com a vinhaça; C) vinhaça pura com produção de pellet (seta vermelha), e (D) formação de pellet (seta azul) em meio ao bagaço de cana-de-açúcar. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais constituintes do bagaço em estado natural.....	22
Tabela 2 – Alguns dos principais pré-tratamentos utilizados em materiais lignocelulolíticos	29
Tabela 3 - Os teores (%) de extrativos totais (ET), lignina residual (LR), lignina solúvel (LS) e holocelulose (HC) de bagaço de cana-de-açúcar sob diferentes pré-tratamentos	50
Tabela 4 - Composição química, macro e micro-minerais das vinhaças V1 (Usina sucroalcooleira) e V2 (Destilaria).....	53

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) no mundo (INSTITUTO CNA, 2013), com grande importância socioeconômica; esta matéria-prima é de múltipla utilização para a agroindústria brasileira, como para a produção de açúcar, álcoois combustíveis e industriais, aguardente, entre outros produtos, além de representar uma fonte potencial de geração de muitos empregos e movimentar a economia brasileira.

O aumento da produção sucroalcooleira gera, a cada ano, maior quantidade de resíduos, como o bagaço e vinhaça, que se, descartados ou empregados de forma incorreta são potentes poluidores de solo e água. Com isso, pesquisas vêm sendo aplicadas para a reutilização destes subprodutos com o intuito de minimizarem os impactos ambientais e ao mesmo tempo como forma de reaproveitamento, gerando economia para as indústrias canavieiras.

A biomassa lignocelulósica representa um dos recursos renováveis mais abundantes na terra, e certamente um dos mais baratos, motivo pelo qual a mesma é extensivamente estudada como fonte de energia sustentável para uso industrial (DIONISIO et al., 2009). As reservas energéticas da cana-de-açúcar encontram-se, principalmente, nos colmos, que é composto por água (65-75%), fibras (8-14%) e açúcares: sacarose (10-17%) e açúcares redutores (0,5-1%) (BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2008). Na extração do caldo da cana-de-açúcar é gerado o bagaço, um resíduo sólido composto de lignina, hemicelulose e celulose, e que possui nutrientes que podem ser aproveitados por muitos organismos.

Os resíduos lignocelulósicos, provenientes de indústrias agroindustriais, são compostos de lignina, polímeros de carboidratos (hemicelulose e celulose), e pequenas quantidades de outros compostos (extratos, ácidos, sais e minerais). A celulose e a hemicelulose são polissacarídeos constituídos de hexoses e pentoses que podem ser hidrolisadas a açúcares e, eventualmente, fermentadas para a produção de álcool de segunda geração.

Os fungos basidiomicetos, como o *Pleurotus ostreatus*, desempenham importante papel no processo de bioconservação, devido a produção de enzimas lignolíticas que atuam na conversão química e biológica de matérias lignocelulolíticas. Assim, os fungos podem reduzir a quantidade de resíduos,

minimizarem a poluição através da redução da DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), formar produtos de interesse para as indústrias de alimentos, papel, fármacos e enzimas de interesse (FERREIRA, 2009), como a lacase, celulase, peroxidase, xilanase e carboximetilcelulase. De acordo com Chundawat et al. (2011), os fungos possuem interesse industrial devido a sua capacidade em secretar proteínas acima de 100g.L⁻¹, e a possibilidade de suas enzimas atuarem naturalmente de maneira bastante efetiva na hidrólise da biomassa.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi obter um extrato enzimático a partir do cultivo de *Pleurotus ostreatus* em meios compostos por bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça. A atividade das enzimas lacase e peroxidases foi avaliada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resíduos do setor sucroenergético

Os resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais, sendo, na maioria, biomassa lignocelulolítica, representam uma fonte abundante e renovável de substrato que podem ser biologicamente convertidos em biomassa microbiana de elevado valor nutricional (KEREM; FRIESEM; HADAR, 1992).

No processamento da cana-de-açúcar diferentes resíduos são gerados: o bagaço, na etapa de obtenção do caldo de cana; as cinzas, da queima do bagaço em caldeira, para produção de energia; torta de filtro, resíduo da clarificação do caldo; melaço ou mel final, na obtenção do açúcar e os resíduos do processo de obtenção do etanol, entre eles a vinhaça.

2.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana, como os demais subprodutos fibrosos, é uma matéria orgânica vegetal rica em polissacarídeos (açúcares complexos), como a celulose, hemicelulose e a lignina. A celulose e a hemicelulose estão aglutinadas em um arranjo sistemático incrustado por lignina (OLIVEIRA et al., 2011).

A cana-de-açúcar, em especial, tem contribuído durante séculos e de forma expressiva para o desenvolvimento econômico de nosso país, sendo seu resíduo, o bagaço, constituído, aproximadamente, de 26,6 a 54,3% de celulose (Tabela 1), 14,3 a 24,4% são hemiceluloses, um polímero amorfo, e, o restante, 27,7 a 29,7% são formados por lignina (SILVA; SILVA; SILVA, 2011). Juntos representam 75% da composição fibrosa da cana-de-açúcar.

Para cada tonelada de cana-de-açúcar moída na indústria são obtidos 700 litros de caldo e 300 kg de bagaço, compondo 50% da matéria seca (BURGI, 1995). O bagaço é, sem dúvida, o resíduo agroindustrial produzido em maior quantidade no Brasil, correspondendo a cerca de 30% do total moído (SILVA; GOMES; ALSINA, 2007). Portanto, dos mais de 600 milhões de toneladas de cana moídas nas usinas e destilarias do Brasil nas últimas safras (UNICA, 2015), cerca de 180 milhões de toneladas foram de bagaço.

A principal utilização do bagaço é o seu aproveitamento como combustível das caldeiras, gerando vapor para aquecimento e para a geração de energia elétrica para o consumo na usina e para venda às concessionárias de energia elétrica. Agrega-se a esse fator, a crescente disponibilidade da palha da cana que antes era

queimada, quase em sua totalidade, no campo e que passa, com a eliminação gradativa da queima de cana no estado de São Paulo, a ser utilizada tanto no condicionamento do solo quanto na geração de vapor e energia extra nas usinas (SOARES; ROSSELL, 2009).

Tabela 1 - Principais constituintes do bagaço em estado natural

Componentes	Composição (%)
Celobiose	3,34
Glicose	46,2
Hidroximetilfurfural	0,30
Ácido fórmico	0,56
Xilose	24,2
Arabinose	1,70
Furfural	1,25
Ácido glucurônico	1,09
Ácido acético	2,64
Lignina solúvel	2,61
Lignina insolúvel	23,7
Cinzas	1,61
Celulose	46,9
Hemicelulose	27,5
Lignina total	26,3
Extrativos	-

Fonte: Canilha et al. (2007)

O bagaço é um subproduto do qual ficam apenas alguns constituintes do material original e, no caso da cana-de-açúcar, restam fibras e alguma quantidade de açúcar (OLIVEIRA, 2010). Embora, parte do bagaço de cana seja utilizada para a produção de energia, outra parte sobra; isto é preocupante, pois ocupa espaço e pode poluir. Assim, vias de utilização para o bagaço excedente devem ser encontradas. O bagaço prensado tem sido comercializado inclusive para a fabricação de conglomerados. O bagaço resultante das destilarias de produção de aguardente utiliza o bagaço para a queima e o restante pode ser utilizado para alimentação animal (CARDOSO, 2006). Para atender a demanda energética, desenvolveu-se, nas usinas de açúcar e bioetanol, a produção simultânea de diferentes formas de energia com base em um único combustível, o bagaço, chamado de co-geração.

Apesar da enorme abundância de materiais lignocelulósicos na biosfera, uma fração muito pequena destes têm importância econômica: sua grande maioria não é aproveitada pelos principais setores que fazem uso de matérias vegetais (agricultura, indústrias têxtil e de papel e celulose) e ainda é abordada como resíduo. Nos últimos anos, no entanto, a crescente população humana e a redução dos recursos naturais têm provocado modificações nesse panorama, em busca por aplicações industriais e biotecnológicas da biomassa vegetal como uma tentativa de agregar valor a esse conjunto de moléculas de alta potencialidade energética (JURADO et al., 2011).

2.1.2 Vinhaça

A vinhaça é um subproduto da agroindústria alcooleira resultante da produção de álcool (etanol). Inicialmente, têm-se os mostos que são os líquidos susceptíveis à fermentação, uma vez fermentados passam a ser denominados de vinhos. Destilando-se os vinhos, recupera-se o álcool produzido pela fermentação alcoólica na forma de um líquido alcoólico denominado flegma, de concentração variável, restando um resíduo que é a vinhaça (LONGO, 1994).

Mostos de diferentes composições podem dar origem a vinhaças de composição variada: (1) o mosto contendo apenas melaço é o mais rico e apresenta, em média, níveis de NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) em torno de 0,57; 0,10; 3,95 kg/m³ de vinhaça, respectivamente. (2) O mosto misto, proveniente da mistura de caldo de cana e melaço, e, que é utilizado na produção de etanol e cachaça, apresenta níveis em torno de 0,48 de N, 0,09 de P, 3,34 de K e o (3) mosto contendo apenas caldo de cana, utilizado em destilarias isoladas, apresenta os níveis de NPK em kg/m³ de vinhaça, de 0,28; 0,09; 1,29 respectivamente (BARROS et al., 2010).

A vinhaça, caracterizada por ser um resíduo de odor intenso e de cor marrom-escura, devido à presença de polímeros denominados melanoidinas, é efluente de destilarias, com alto valor fertilizante e alto poder poluente. O seu poder poluente é cerca de cem vezes maior que o do esgoto doméstico, e, decorre da sua riqueza em matéria orgânica, elementos minerais (K, Ca e Mg), baixo pH (variando entre 3,7 e 4,5), elevada corrosividade e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), além de elevada temperatura na saída dos destiladores; é considerada altamente nociva à fauna, flora, microfauna e

microflora das águas doces (FREIRE; CORTEZ, 2000). A cor da vinhaça associada aos sólidos suspensos pode obstruir a penetração de luz e os processos fotossintéticos, o que prejudica seriamente a vida aquática (FITZGIBBON et al., 1995).

Os sólidos suspensos causam o espalhamento da luz UV e os sólidos dissolvidos, durante a reação com a radiação ultravioleta, produzem outros radicais livres de eliminação, tais como Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} e NO_3^- , que competem com os radicais hidroxilas (SHU; CHANG; HSIEH, 2006). Quando aplicada ao solo, se torna persistente por possuir propriedades antioxidantes (NAIK; JAGADEESH; ALAGAWADI, 2008). Segundo Machado et al. (2004) a grande preocupação da vinhaça advém de sua composição química, da quantidade na qual é gerada, tornando-se um grande poluidor ao meio ambiente. Para cada litro de álcool produzido, cerca de doze litros de vinhaça são deixados como resíduo nas indústrias sucroalcooleiras (PARAIZO, 2013).

Diversas aplicações para a vinhaça têm sido apresentadas, algumas amplamente utilizadas outras, apenas discutidas e pouco aproveitadas. Em geral, podem ser citadas as seguintes técnicas: aplicação da vinhaça como fertilizante, concentração, produção de metano, tratamento físico-químico, complemento de ração animal e produção de proteína celular (GEHRING, 2014).

Por ser rica em água e nutrientes, quando introduzida na quantidade adequada, a vinhaça promove a melhoria da fertilidade do solo, sendo assim, ela é utilizada como fertilizante em áreas de plantio de cana-de-açúcar. Apesar da existência de algumas alternativas tecnológicas, o principal destino da vinhaça ainda é sua aplicação na lavoura canavieira por meio de uma técnica conhecida como fertirrigação. Os valores nutricionais da vinhaça, assim como os da torta de filtro, são conhecidos desde a década de 50, porém sua aplicação como fertilizante teve início apenas nos anos 70 e intensificou-se no final do século XX, período em que o preço dos fertilizantes químicos aumentou consideravelmente e a questão ambiental se tornou mais relevante no cenário nacional (ROSSETTO; SANTIAGO, 2015).

Quanto utilizado sem critérios adequados e em alta taxa, este subproduto pode ocasionar a salinização do solo, alterar suas condições naturais de fertilidade, atingir e contaminar as águas subterrâneas e acarretar uma alta concentração de matéria orgânica e de metais, como amônia, magnésio, alumínio, ferro e cloreto (CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL DO ESTADO DE MINAS

GERAIS, 2011; PIACENTE, 2005). Para evitar a contaminação, a aplicação de vinhaça deve levar em consideração as características do solo e suas necessidades nutricionais. Sendo assim, no estado de São Paulo, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), através da norma P4.231 de 2006, estabelece algumas normas para dosagem correta de vinhaça a ser aplicada no tratamento de solos agrícolas.

De acordo com Freire e Cortez (2000) a microbiota do solo, enriquecida pela presença de vinhaça, pode exercer funções relativas ao ciclo do nitrogênio, à mineralização de moléculas orgânicas e à modificação da estrutura edáfica. É sabido que a vinhaça, por adicionar matéria orgânica ao solo, promove sua humificação e facilita a mobilização de seus nutrientes. A concentração da vinhaça é utilizada para reduzir a quantidade de água presente neste subproduto, reduzindo o seu volume e consequentemente os custos com transporte e aplicação na fertirrigação (CRUZ, 2011).

A produção do metano se origina da digestão da matéria orgânica presente na vinhaça. Trabalhando em conjunto, um grupo de bactérias anaeróbicas degrada a matéria orgânica em um gás conhecido como biogás. Este gás possui alta concentração de metano e elevado valor energético (GEHRING, 2014). Segundo Silva (2012), um metro cúbico de vinhaça tem o potencial de gerar dez metros cúbicos de biogás.

2.2 Material lignocelulolítico

Os resíduos de biomassa são produzidos, praticamente, em todas as atividades agrícolas e industriais, e, mesmo o lixo urbano apresenta teores elevados de materiais lignocelulósicos.

A biomassa lignocelulósica (Figura 1) é composta, basicamente, por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e pela lignina, polímero complexo de grupos metoxi e fenilpropânicos, que mantém as células unidas. A fração celulósica (40-60% da matéria seca) é um polímero linear do dímero glicose-glicose (celobiose), rígido e difícil de ser quebrado; sua hidrólise gera glicose, um açúcar de seis carbonos. Por sua vez, a fração hemicelulósica (20-40%), em geral, é constituída de uma cadeia principal de xilose (ligações β -1,4) com várias ramificações de manose, arabinose, galactose, ácido glicurônico entre outros. A hemicelulose é muito mais fácil de ser hidrolisada do que a celulose, mas a

fermentação dos açúcares de cinco carbonos (pentoses) ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a glicose. Já a estrutura bioquímica da fração de lignina (10-25%) não está relacionada a moléculas simples de açúcar. Essa fração, no entanto, desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise (BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2008).

Figura 1 - Estrutura da parede celular vegetal

Fonte: Canilha et al. (2010)

A celulose (polímero natural cristalino que possui como monômero a glicose) e a hemicelulose podem ser hidrolisadas formando açúcares que podem ser, posteriormente, convertidos quimicamente ou por micro-organismos, em etanol ou butanol, ou também em vários outros produtos como: acetona, ácidos orgânicos, ou glicerol (WYMAN, 2003). A reação de hidrólise da molécula de celulose, onde as ligações glicosídicas são hidrolisadas pela reação com a água, pela ação de catalisadores químicos e enzimáticos está representada na Figura 2.

Figura 2- Hidrólise da molécula de celulose

Fonte: Santos et al. (2012)

Segundo Martínez et al. (2005) a lignina é um dos principais constituintes da madeira, responsável pela sua resistência, e caracterizada por ser um biopolímero aromático amorfo, tridimensional, formado via polimerização oxidativa.

A degradação da lignina ocorre pela ação concomitante de diferentes enzimas ligninolíticas, dentre as quais se pode destacar as enzimas extracelulares como as ligninases: lignina peroxidases (LiP), manganês peroxidases (MnP) e lacases. De acordo com Lauber, Sinsabaugh e Zak (2009), a degradação da biomassa lignocelulósica está relacionada com a manutenção do ciclo do carbono em ecossistemas terrestres. Os organismos basidiomicetos são o ponto chave nesses processos de decomposição devido a sua capacidade de transportar nutrientes e de produzir enzimas extracelulares.

O etanol de segunda geração é produzido a partir da biomassa vegetal, que é composta principalmente pela celulose, que ao ser hidrolisada em moléculas simples de glicose permite a fermentação desse monossacarídeo por micro-organismos decompositores e, subsequentemente, produção de etanol (MIDIA NEWS, 2012; SOCCOL et al., 2010).

Devido à grande disponibilidade de resíduos agrícolas, foi estimado que 491 bilhões de litros do biocombustível podem ser gerados a partir de biomassa lignocelulósica residual, ampliando em até 16 vezes a sua produção anual (SARKAR et al., 2012).

2.2.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulolítica

Diferentes resíduos industriais vêm sendo utilizados como substrato para obtenção de hemicelulolíticos, incluindo o bagaço de cana. Outros materiais como madeira, palha e capim, também são utilizados (BALAT, 2011)

Diversas estratégias para a conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis tem sido demonstrada em escala laboratorial. De forma geral, a primeira etapa do processo consiste no pré-tratamento mecânico da matéria-prima, que visa à limpeza e à “quebra” do material, a fim de causar a destruição da sua estrutura celular e torná-la mais acessível aos tratamentos químicos ou biológicos posteriores (BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, 2008). Uma grande variedade de fungos e bactérias é capaz de degradar o material lignocelulósico usando um conjunto de enzimas hidrolíticas e oxidativas (VITTI, 1988).

O pré-tratamento têm por finalidade remover ou alterar a lignina presente neste material orgânico, de modo a aumentar a área de contato, reduzir o grau de polimerização da celulose além de sua cristalização, facilitando a hidrólise enzimática (CANILHA et al., 2010). Assim, etapas de pré-tratamento da biomassa lignolítica são necessárias antes de induzir o material à hidrólise enzimática.

Diversas metodologias para pré-tratar a biomassa lignocelulósica estão relatadas no estudo de Ogeda e Petri (2010). Alguns dos métodos mais utilizados estão apresentados na Tabela 2.

As técnicas apresentadas possuem suas vantagens e desvantagens, porém é recomendado avaliar o método que melhor se adapte a cada caso, tais como os custos, equipamentos, o tipo de biomassa lignocelulolítica, micro-organismos e enzimas disponíveis.

Tabela 2 – Alguns dos principais pré-tratamentos utilizados em materiais lignocelulolíticos

Métodos	Processo	Tipos de Mudanças
Físico	Moagem e Trituração; Irradiação; Alta temperatura	Diminui o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose; Aumenta a área superficial e o tamanho dos poros da partícula.
Químico	Bases; Ácidos; Gases; Agentes oxidantes e redutores; Solventes para extração da lignina.	Aumenta a área superficial; Diminui o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose; Parcial ou quase completa degradação da hemicelulose e deslignificação.
Físico-químico	Tratamento alcalino associado à explosão a vapor; Moagem com tratamento alcalino ou ácido.	Degradação da hemicelulose e deslignificação; Aumenta a área superficial e os poros da partícula.
Biológico	Fungos e actinomicetos	Degradação da hemicelulose e deslignificação; Aumenta a área superficial e os poros da partícula; Diminui o grau de polimerização.

Fonte: Rabelo (2007); Taherzadeh; Karimi (2008)

Em outras palavras, o pré-tratamento é responsável por quebrar a matriz lignocelulósica expondo os carboidratos à reação enzimática (SÁEZ et al., 2013), como apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Efeito do pré-tratamento sobre a biomassa lignocelulósica

Fonte: Balat (2011)

Embora diversos métodos para pré tratamento de bagaço de cana estejam disponíveis (ALVIRA et al., 2010; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010; SOCCOL et al., 2010), o pré-tratamento hidrotérmico, onde as fibras são aquecidas em água, é de particular interesse; visto que o único solvente utilizado é a água (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJO, 1999; KUMAR et al., 2011; LASER et al., 2002; SILVA et al., 2010), o que elimina custos de catalisador e reduz fluxos de resíduos de processo.

Variando a temperatura de pré-tratamento hidrotérmico do bagaço e utilizando a equação do Fator de Severidade (GARROTE et al, 1999 apud CRUZ et al., 2012), foi possível observar que quando o fator de severidade atingiu valor 4,0, a concentração de hemicelulose diminuiu com relação ao bagaço sem tratamento (SCB), mas a concentração de lignina se manteve (Figura 4, CRUZ et al., 2012).

Figura 4 - Composição da fração sólida obtida por pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana (SCB), em diferentes fatores de severidade

Fonte: CRUZ et al. (2012)

2.2.2 Hidrólise enzimática da biomassa

O processo de hidrólise enzimática da biomassa está sujeito a diversos fatores que podem influenciar o rendimento da hidrólise, destacando-se a temperatura, pH, teor de sólido e relação enzima-substrato (GONÇALVES, 2010).

A ação das enzimas celulolíticas no substrato ocorre de maneira sinérgica entre os diferentes grupos. Dentre os diversos sinergismos possíveis, ocorrem ações sinérgicas por endoglucanases (por exemplo, endo-1,4-BD-glucanases, ou EC 3.2.1.3), exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH, celobiohidrolases 1,4-BD-glucana, ou EC 3.2.1.91), e β -glucosidases (BGL, celobiasas ou EC 3.2.1.21) (BALAT, 2011). Os sinergismos exo-endo ocorrem pelo fato das endoglucanases promoverem a quebra da superfície da celulose em cadeias menores e livres, para a ação das celobiohidrolases (RABELO, 2010).

2.3 Obtenção de enzimas

As enzimas são proteínas especializadas em catalisar reações nos sistemas biológicos, aumentando a velocidade de uma reação química por meio da diminuição da energia livre de ativação, sem interferir nos aspectos termodinâmicos da reação. Estão associadas a biomoléculas, devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, maior que os catalizadores sintéticos ou inorgânicos (NELSON; COX, 2002).

As enzimas podem ser obtidas por extração a partir de materiais vegetais ou animais, no entanto, as enzimas de fontes microbianas substituem as enzimas de origem vegetal e animal. Muitos micro-organismos, como bactérias, fungos e leveduras são capazes de produzir enzimas de interesse comercial (KIELING, 2002).

A presença de material lignocelulósico pode induzir a produção de enzimas lignocelulolíticas produzidas por fungos, como lacase e peroxidase que agem em sinergismo na degradação de efluentes industriais (FERREIRA et al., 2011).

2.3.1 *Pleurotus* spp.

Fungos do gênero *Pleurotus*, são conhecidos por sintetizarem diferentes enzimas hidrolíticas e oxidativas. Este gênero se destaca, ainda, pelo fato de ser de fácil cultivo e de necessitar de requerimentos nutricionais de custo não elevado dentre os cogumelos comestíveis cultivados (SOUZA, 2012).

Os fungos, denominados de podridão branca, incluem muitos dos fungos comestíveis e medicinais, entre eles *Lentinula edodes* (shiitake) e *Pleurotus ostreatus* (hiratake). São saprófitas e capazes de utilizar lignina, celulose e hemicelulose como fonte de carbono e nutrientes. Essas características permitem que sejam cultivados em grande variedade de matérias lignocelulósicas, como

resíduos agroindustriais, que podem ser utilizados também como substratos alternativos de baixo custo para a produção de cogumelos (RIBEIRO, 2009), assim como para a produção de enzima.

Os processos biológicos baseados na utilização de fungos, como o *Pleurotus ostreatus*, tem sido uma das grandes alternativas. Segundo Rajarathnam (1992) *Pleurotus sp.* este fungo apresenta facilidade de manejo e produção, crescimento rápido, além de utilizar matérias-primas como palhas, capins e bagaço.

Nutricionalmente, o cogumelo tem sabor único e propriedades aromáticas; e é considerado rico em proteínas, fibras, carboidratos, vitaminas, minerais e o teor de gorduras é baixo na maioria das espécies (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002). A composição dos fungos varia de acordo com a origem, solo, clima e condições de cultivo, apresentando diferenças significativas entre cogumelos da mesma espécie provenientes de lotes diferentes; embora água, carboidratos e proteínas mantenham-se como os principais constituintes (FURLANI; GODOY, 2007). Algumas enzimas produzidas por *Pleurotus spp.*, como as lacases, manganês peroxidase e lignina peroxidase foram descritas por diversos autores.

2.3.2 Lacases

As Lacases são enzimas facilmente encontradas em plantas, insetos, bactérias e principalmente em fungos, desempenhando diferentes papéis fisiológicos (MOROZOVA et al., 2007). A maioria das lacases descritas na literatura foi isolada de fungos e ocorre em Ascomicetos, Deuteromicetos e Basidiomicetos (BALDRIAN, 2006; BRIJWANI; RIGDON; VADLANI, 2010), mas são, especialmente, abundantes entre os basidiomicetos e vários genes de lacase foram descritos nesse grupo (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009).

A função das lacases em fungos é bastante diversificada e em muitos casos, ainda não é totalmente compreendida. Além da degradação da lignina, lacases parecem estar envolvidas também na despolimerização de carvão, húmus e soluções de ácidos húmicos (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009). Também participam de diferentes processos fisiológicos como na morfogênese, principalmente na síntese de pigmentos e no crescimento micelial (DAS; SENGUPTA; MUKHERJEE, 1997).

A lacase apresenta baixa especificidade por substratos, permitindo sua atuação sobre uma grande variedade de compostos o que a torna uma enzima

versátil e com potencial para ser utilizada em várias aplicações biotecnológicas industriais. Podem ser empregadas em processos da indústria de papel e celulose, têxtil, cosmética, na destoxificação de esgoto, em síntese inorgânica, degradação de xenobióticos e biorremediação, produção de aglomerados de madeira sem agregantes tóxicos e produção de detergentes (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007).

A degradação da lignina produz componentes fenólicos de baixa massa molecular que podem ser tóxicos para o micélio, os quais podem ser convertidos por lacases em polímeros não tóxicos protegendo as hifas durante o processo de deslignificação (MOROZOVA et al., 2007; THURSTON, 1994).

Enzimas da família lacase (benzenidiol: oxigênio oxidoredutores) são oxigenases contendo cobre que usam como substrato *orto*- e *para*-fenóis, importantes na degradação de moléculas derivadas da degradação de lignina. Essas enzimas são abundantemente produzidas por fungos ligninolíticos, mas estão envolvidas em outras funções, como proteção contra o estresse, interações planta-patógeno e morfogênese (GIARDINA et al., 2010; MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011).

A produção de lacase pode ser alterada por vários fatores durante o desenvolvimento fúngico, como a composição do meio de cultura (relação C/N, por exemplo), pH, temperatura, taxa de aeração entre outros (KAHRAMAN; GURDAL, 2002), formam importantes índices para os estudos de produção e aplicação das lacases na biotecnologia.

A gama de compostos potencialmente oxidáveis pela lacase pode ser ampliada com a utilização de mediadores químicos, substratos desta enzima que geram intermediários com alto potencial redox. Sob condições controladas por difusão estes intermediários oxidam outros compostos, cujo tamanho ou falta de afinidade impede a ação direta de lacases, sendo reduzidos ao estado inicial e, então, continuando um ciclo catalítico (MOROZOVA et al., 2007).

Os fungos ligninolíticos expressam múltiplos genes de lacase, com características físico-químicos diferentes, codificando isoenzimas com elevada similaridade na estrutura primária (BROWN; ZHAO; MAUK, 2002).

As lacases fúngicas são glicoproteínas de 520-550 aminoácidos que contêm quatro íons cobre (Cu) dispostos em três sítios de ligação. Cada íon desempenha um papel importante na reação catalítica que ocorre pela oxidação de um substrato fenólico, enquanto oxigênio molecular é reduzido à água (Figura 5) (KARP et al.,

2012; LEITNER et al., 2002). A sequência e anotação do genoma de *P. ostreatus* indica a presença de pelo menos 12 genes de oxidases multicobre (RAMÍREZ et al., 2011).

Figura 5 - Representação do ciclo catalítico da lacase

Fonte: Mikolasch e Schauer (2009)

Os quatro átomos de Cu estão distribuídos entre três sítios de ligação diferentes e altamente conservados em lacases, e cada um executa um papel importante no mecanismo catalítico da enzima. Um dos sítios contém um cobre tipo 1, responsável pela coloração azul da enzima e, é um aceptor de elétrons primário que a partir dele ocorrem quatro oxidações subsequentes, no fim das quais os elétrons são transferidos ao “cluster” trinuclear, no qual na formação há redução da molécula de oxigênio formando água. Os outros dois sítios formam um cluster trinuclear com um cobre tipo 2 e dois cobres tipo 3 (GIARDINA et al., 2010)

As enzimas lacases possuem grande potencial de aplicação na indústria devido a diversidade de substratos que podem oxidar (SOUZA, 2012). A habilidade da lacase de clivar substratos fenólicos pode ter surgido como um mecanismo de defesa contra moléculas aromáticas altamente reativas: promovendo a polimerização destas moléculas; elas se tornam menos reativas, consequentemente, produzem menos radicais oxigênio e diminuem o estresse oxidativo nos organismos (DURÁN, 2004; GIARDINA et al., 2010).

Segundo Mansur et al. (2003) as lacases são consistentes com a hipótese de que estes fenoloxidasas também tem uma ampla gama de especificidade de substrato *in vivo*. Hidroxilação de subestruturas de lignina pode representar uma estratégia para auxiliar lacases na biodegradação de lignina *in vivo*. Além disso, a possibilidade de conversão de moléculas recalcitrantes em substratos degradados

de forma eficiente poderia ajudar a otimizar as potenciais aplicações biotecnológicas desta classe de enzimas.

2.3.3 Peroxidase

A enzima peroxidase pode ser medida intracelular ou extracelular, sendo este último, agente de decomposição da matéria orgânica. Quando no solo, segundo Bach et al. (2013), estas enzimas podem mediar os processos de degradação de lignina, mineralização e sequestro de carbono, e exportação de C dissolvido.

As peroxidases, tais como Manganês peroxidase de lignina peroxidase utilizam o H_2O_2 como um aceptor de elétrons. Estas enzimas apresentam Fe contendo grupos prostéticos heme com potenciais redox de até 1490 mV, dando-lhes a capacidade de quebrar radicais arilo e alquilo, ligações dentro da lignina, quer diretamente quer através de intermediários redox, tais como Mn^{3+} (HIGUCHI, 1990; KERSTEN et al., 1990; RABINOVICH; BOLOBOVA; VASILCHENKO, 2004).

De acordo com dados genômicos, peroxidases ligninolíticas, incluindo lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e peroxidase versátil (PV), são exclusivos de basidiomicetos de decomposição branca-lignina-degradante, estando ausente de basidiomicetos de decomposição marrom-polissacarídeosdegradante (FLOUDAS et al., 2012). A distribuição de genes peroxidase ligninolíticas em genomas de basidiomicetos confirma seu papel central na biodegradação da lignina (FERNÁNDEZ-FUEYO et al., 2014).

As peroxidases (EC 1.11.1.7) são um grupo de enzimas oxi-redutases que catalisam a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos tendo o peróxido (peróxido de hidrogênio) como aceptor de elétrons (IKEHATA; BUCHANAN; SMITH, 2004).

A superfamília de peroxidases não-animal é formada por três classes de peroxidases denominadas peroxidases de classe I, II e III. Estas três classes compartilham características como a presença de um grupo heme por protoporfirina IX de ferro III e estruturas tridimensionais similares (CESARINO, 2012). Contudo, estas proteínas apresentam baixa identidade em termos de sequência primária de aminoácidos, bem como diferentes localizações subcelulares e estão associadas a funções fisiológicas distintas (MATHE et al., 2010).

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 esta molécula, formando

um complexo que pode oxidar uma variedade de doadores de elétrons formando água no final (DELLAMATRICE, 2005; POMPEU, 2010).

2.4 Fermentação para obtenção das enzimas

A fermentação é a principal técnica para a produção de várias enzimas de interesse em indústrias de fármacos, alimentícias (especialmente probióticos e prebióticos) e têxteis. Ela é baseada na técnica de conversão biológica de substratos complexos em compostos simples, realizadas por micro-organismos tais como fungos e bactérias, que produzem uma matriz de enzimas de valor inestimável quando fermentada em substratos adequados. Ambos estados fermentativos, semissólido e de fermentação submersa, são utilizados para a produção da enzima e no decurso desta degradação metabólica, também são liberados outros compostos, como dióxido de carbono e álcool (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012). Estes compostos adicionais são chamados de metabólitos secundários ou “compostos bioativos”, uma vez que possuem atividade biológica derivando de vários peptídeos, enzimas e fatores de crescimento que influenciam o micro-organismo (MACHADO et al., 2004; ROBINSON; SINGH; NIGAM, 2001).

Não existem vantagens e desvantagens concretas de um método em relação a outro, pois cada micro-organismo pode se adequar melhor a um ou outro processo fermentativo, bem como, originar produtos diferentes (PONTES, 2009) e em quantidades variáveis.

2.4.1 Fermentação semissólido (FSS)

A fermentação no estado semissólido (FSS) pode ser definida como o crescimento de micro-organismos em materiais sólidos na ausência de água livre, no entanto, o substrato deve conter umidade suficiente, existente na forma adsorvida na matriz sólida (PANDEY; RADHAKRISHNAN, 1992; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

A ação de micro-organismos feita em estado sólido do material, é considerada mais natural que outros tipos de fermentáveis, como, por exemplo, a fermentação submersa (FSm), uma vez que seus processos se assemelham as condições sob as quais a maioria dos micro-organismos cresce na natureza (GONZALEZ et al., 2013; HESSELTINE; KURTZMAN, 1987). Entretanto, algumas limitações são observadas no que se refere a adaptação de poucas espécies de micro-organismos capazes de

crescer em condições restritas a água (GOMBERT et al., 1999). Lonsane et al. (1991) e Gonzalez et al. (2013) recomendam que a FSS apresenta algumas barreiras que devem ser levadas em consideração em operações em grande escala, devido à dificuldade na transferência de massa e calor durante o metabolismo do micro-organismo, ao contrário dos cultivos submersos em que a grande quantidade de água presente no meio facilita o controle da temperatura.

O material sólido utilizado em FSS é geralmente fragmentado e de natureza granular ou fibrosa que permite a retenção de água por higroscopia ou capilaridade. A quantidade de água presente varia consideravelmente de acordo com o material utilizado (SANTANA, 2012). Segundo Oriol (1987) os principais micro-organismos cultivados em meio sólido são fungos filamentosos, cujas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas, propícias à colonização de matrizes sólidas porosas.

Neste caso, o micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz) ou sobre a superfície, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (MITCHELL et al., 2006; RAHARDJO; TRAMPER; RINZEMA, 2006). Esta degradação enzimática do substrato, pela fração penetrativa das hifas, é um fator determinante para o processo, pois, a partir daí os fragmentos difundem-se até a superfície das partículas, sendo transformados, pela ação de outras enzimas, em compostos metabolizáveis (SANTANA, 2012).

2.4.2 Fermentação Submersa (FSm)

A fermentação submersa (FSm) é caracterizada pela utilização de um meio fermentativo líquido contendo açúcares solúveis, resíduos agroindustriais como caldos e melaço, suco de frutas, água de esgoto entre outros (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012). As vantagens deste processo são: a facilidade de controle de parâmetros como aeração, agitação, pH, temperatura e a possibilidade de automação. A maior probabilidade de contaminação, pela maior quantidade de água, é um inconveniente do processo. Outra limitação é quando a enzima produzida é extracelular, obtendo-se uma preparação mais diluída, sendo necessária a inclusão de uma etapa de concentração mais trabalhosa no processo de purificação (ALONSO, 2001).

A fermentação submersa consiste de um meio fermentativo líquido, com nutrientes solúveis e é uma das metodologias mais utilizadas para a produção de lipases (ALONSO, 2001). Esta é preferida devido ao controle simples do processo fermentativo, acesso direto ao extrato enzimático ou mesmo às características naturais do substrato avaliado, como efluentes ou resíduos líquidos (STRONG, 2011); é utilizada para a produção de proteínas fúngicas ou de agentes flavorizantes (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002). E, segundo Confortin et al. (2008) espécies de fungos como o do gênero *Pleurotus spp*, são comumente cultivados em FSm para a produção de exopolissacarídeos (EPS), onde essas moléculas se destacam no campo biotecnológico porque várias delas possuem propriedades antitumorais, imonoestimuladoras e hipoglicêmicas.

O bioprocesso industrial com fungos filamentosos abrangem a produção da maioria dos produtos comercialmente importantes da biotecnologia, no sentido da quantidade bem como da diversidade dos metabólitos. Estes são, principalmente, os processos de culturas submersas, onde um relacionamento dinâmico existe entre circunstâncias ambientais e o padrão de crescimento destes micro-organismos (ZNIDARSIC; PAVCO, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Bebidas do Departamento de Agroindústria, Alimento e Nutrição (LAN II), na Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), *campus* de Piracicaba – SP.

3.1 Bagaço de cana-de-açúcar e a vinhaça

O bagaço de cana-de-açúcar e a vinhaça 1 (V1) foram cedidos pela Usina Ipiranga de Açúcar e Álcool S.A., localizada em Descalvado – SP. Enquanto que a vinhaça 2 (V2) foi doada pela Empresa Capuava S/A – Ind. Com., com sede em Piracicaba-SP.

O bagaço, após secagem em estufa de ar forçado, foi peneirado em malha 16, abertura 1,00 mm, para melhor uniformidade das fibras. A vinhaça foi armazenada sob congelamento para manter sua composição.

3.2 Micro-organismo e cultivo da linhagem

O fungo utilizado para este estudo foi o *Pleurotus ostreatus*. Este fungo ligninocelulolítico, presente na coleção de culturas do Laboratório da ESALQ/USP, foi mantido em cultura desenvolvida em meio extrato de malte-ágar (MEA).

Discos de 10 mm de diâmetro do fungo foram transferidos do estoque para a placa de Petri contendo o meio sólido de extrato de malte-ágar (MEA); estas foram incubadas a 30°C por cerca de 7 dias, em câmara B.O.D.

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

O bagaço *in natura*, por possuir muitas fibras de tamanhos e espessuras irregulares, foi submetido a homogeneização, e em seguida pelo processo de pré-tratamento físico que consistiu na peneiração em malha 1 mm. A partir deste pré-tratamento (T1) foi realizado os demais tratamentos (esquema apresentado na Figura 6): para o pré-tratamento termo-físico (T2), o bagaço foi umedecido com água destilada e submetido à autoclave por 15 min a 1 atm. Para os pré-tratamentos físico-químicos, T3 e T4, o bagaço foi tratado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e hidróxido de sódio (NaOH) nas concentrações: 0,75% H₂O₂ + 0,75% NaOH (T3) e 0,75% H₂O₂ + 1% NaOH (T4) na proporção 1:10 (p/v) e autoclavados a 121°C e 1 atm por 15 min.

Figura 6 – Esquema do processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Após esta etapa, os bagaços pré-tratados (com exceção do T1) foram lavados com água destilada para retirar o excesso de compostos adicionados e, assim, neutralizar os efeitos do pré-tratamento. Em seguida, o material foi seco a 60° C por 18 horas em estufa de ar forçada.

3.4 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

As determinações de composição química do bagaço de cana-de-açúcar foram realizadas no Laboratório de Química, Celulose e Energia (LQCE) do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP.

3.4.1 Teor de extrativos totais

A determinação do teor de extrativos totais foi realizada em três extrações consecutivas utilizando como solvente uma mistura de álcool tolueno: álcool etílico (2:1), álcool etílico e água quente, respectivamente. De acordo com a norma TAPPI T204:

$$ET (\%) = (1-PS) \times 100$$

Onde:

ET: teor de extrativos totais

PS: peso seco do material em gramas.

3.4.2 Teor de lignina residual e solúvel

A determinação dos teores de lignina foi realizada a partir de uma hidrólise do material com ácido sulfúrico em duas etapas: uma a baixa temperatura (30°C) e alta concentração (72%) e a outra etapa a alta temperatura (121°C) e baixa concentração de ácido (4%). Com este procedimento é possível quantificar a porcentagem de lignina residual (LR) pela equação:

$$LR (\%) = [PS / ((0,3 / (1 - ET/100)))] * 100$$

Onde:

PS – Peso seco

ET – Extrativos totais

O teor de lignina solúvel (LS) foi quantificado pela absorbância a 215 e 280 nm das soluções resultantes das filtrações do método Klason modificado por Gomide e Demuner (1986) e de acordo com a norma TAPPI T222. As concentrações de lignina foram calculadas pela equação:

$$LS(\%) = [(4,53 \times (L_{215} - L_{280})) / (300 \times (0,3 / (1 - ET/100)))] \times 100$$

A equação é resultante da resolução simultânea de duas equações:

$$L_{280} = 0,68 C_D + 18 C_L$$

$$L_{215} = 0,15 C_D + 70 C_L$$

Os valores 0,68 e 0,15 são as absortividades molares dos carboidratos em 280 e 215 nm, respectivamente, e os valores 18 e 70 são absortividades molares da lignina solúvel referentes as mesmas absortividades.

3.4.3 Teor de holocelulose

O teor de holocelulose (HC) foi obtido por diferença através da equação:

$$HC (\%) = 100 - (\text{extrativos} (\%) + \text{lignina} (\%))$$

3.5 Composição da vinhaça

A composição química e mineralógica das vinhaças foi realizada no Laboratório de solos do Departamento de Ciências do Solo/ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

As análises de açúcares redutores (AR e ART) foram realizadas pelo método do DNS (MILLER, 1959). As análises de açúcar redutor (ART) total foi realizada após hidrólise da amostra em presença de HCl 1,3N. Uma alíquota contendo 0,5 mL da amostra convenientemente diluída e/ou hidrolisada reagiu com 0,5 mL do reagente de DNS em banho fervente. Após resfriamento em água corrente foram adicionados a cada tubo 5 mL de água e procedeu-se a leitura de absorbância em 540 nm. O teor de AR ou ART foi obtido a partir da conversão de Abs em concentração utilizando a curva analítica obtida com glicose a 1mg/mL.

Para o preparo da solução de DNS, foram pesados 1,0 g de ácido 3,5 – dinitrossalicílico, e dissolvido em temperatura ambiente, com cerca de 50 mL de água destilada, sob constante agitação. Após dissolução do ácido, foi adicionado 10 mL de solução de Hidróxido de sódio 4 N, e 30 g de Tartarato duplo de sódio e potássio. Após dissolução por completo, a solução foi transferida para um balão de 100 mL (MILLER, 1959).

A cor da vinhaça, obtida como intensidade de cor, foi medida utilizando o método espectofotométrico EBC (European Brewery Convention, 2006). Uma alíquota do material com e sem filtração, foi submetida a leitura da absorbância a 430 nm, utilizando cubeta de 10 mm. A amostra de vinhaça foi filtrada em membrana 0,45 µm.

O cálculo da cor da amostra não diluída foi realizado pela equação:

$$\text{Cor (EBC)} = A \cdot f \cdot 25$$

onde:

A= absorbância a 430nm em cubetas de 10mm

f= fator de diluição

3.6 Obtenção do extrato bruto enzimático

3.6.1. Fermentação semissólido (FSS)

Para a fermentação semissólida, 5 g de bagaço pré-tratado, provenientes dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 foram transferidos para frascos Erlenmeyer (250 mL) e adicionados 25 mL de vinhaça (1:5 p/v), pH 6,0 (previamente ajustado) e submetido

a autoclave (121°C e 1 atm por 15 min). Após resfriamento do material até temperatura ambiente, foi inoculado, em cada frasco, dois discos de 10 mm de uma cultura recém obtida de *P. ostreatus*; os frascos foram incubados a 29°C em estufa tipo BOD (Tecnal). Após 7, 10 e 12 dias de cultivo, cada frasco recebeu 30 mL de solução tampão citrato de sódio (1:6 p/v) 0,05 M, pH 5,0, o material foi homogeneizado e filtrado a vácuo em papel de filtro Whatman nº 1 (85mm Ø). Cada tratamento foi realizado em triplicata.

3.6.2 Fermentação submersa (FSm)

Uma amostra referente a 1g de cada bagaço pré-tratado (T1, T2, T3 e T4) foi transferida para frascos Erlenmeyer (250 mL) e acrescentado 50 mL de vinhaça (proporção 1:10 p/v) com o pH 6,0, previamente ajustado, e autoclavado a 121°C e 1 atm por 15 minutos. Após resfriamento, em cada frasco foi adicionado, assepticamente, dois discos de 10 mm de diâmetro do fungo desejado. O mesmo procedimento foi realizado, sem adição de bagaço, o frasco continha apenas vinhaça e o fungo. Cada tratamento foi realizado em triplicata.

A seguir, as amostras foram mantidas em incubadora com agitação orbital, tipo Shaker horizontal (New Brunswick) à temperatura média de 29°C, sob agitação a 120 rpm por 7, 10 e 12 dias, para o crescimento do fungo. Após cada período, as amostras recolhidas foram filtradas a vácuo em papel de filtro Whatman nº 1 (85mm Ø), obtendo o extrato bruto, que foi separado para as determinações de atividades enzimáticas.

3.7 Determinação das atividades enzimáticas

3.7.1 Determinação da Lacase

A atividade enzimática da lacase, presente no extrato bruto, foi determinada em: 0,3 mL de solução tampão de citrato-fosfato a 0,05 M e pH 5,0; 0,6 mL do extrato bruto; 0,1 mL de siringaldazina (adicionada no momento da leitura e preparada com 0,05 g siringaldazina diluída em 50 mL de etanol). A reação oxidativa foi avaliada em espectrofotômetro com absorbância de 525 nm, após 10 minutos de reação. Para o branco, o extrato bruto foi fervido a 100°C por 20 minutos e, posteriormente, conduzido como descrito anteriormente para a leitura de atividade. Uma unidade de atividade enzimática foi determinada como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1,0 µmol por minuto da solução de siringaldazina, utilizando o

coeficiente de extinção molar de $6,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para siringaldazina oxidada. A atividade enzimática foi determinada em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{litro}^{-1}$ (U.L⁻¹) e a atividade específica em U.(mg de proteína)⁻¹ (SZKLARZ et al., 1989).

$$\text{Atividade } \left(\frac{\text{U}}{\text{L}}\right) = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \times V_e \times t} \times 10^6$$

Onde:

Abs = absorbância

ϵ = coeficiente de absorção molar = $65.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

V_e = volume de extrato enzimático (mL)

t = tempo da reação (minutos)

3.7.2 Determinação da Peroxidase

A atividade enzimática da peroxidase foi obtida utilizando guaiacol como substrato. Em uma alíquota de 1,0 mL da solução tampão citrato-fosfato 0,05 M e pH 5,0 foram adicionados 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 3 mmol L^{-1} preparado pela diluição de 30 μL deste reagente em 100 mL de água deionizada; 190 μL de guaiacol diluído a 1% e 810 μL de água deionizada. Após a homogeneização dessa solução, foram adicionados 50 μL do extrato bruto enzimático. Depois de 5 minutos de reação, a formação do tetraguaiacol foi analisada em espectrofotômetro (FEMTO 700 Plus) a 470 nm. Os controles (brancos) do substrato e da enzima, foram realizados para verificar se estes não absorviam no mesmo comprimento de onda do produto oxidado, segundo método proposto por Zeraik, Souza e Fatibello-Filho (2008).

Para o cálculo da atividade enzimática, U mL⁻¹, foi empregada a Equação:

$$\text{Atividade } \left(\frac{\text{U}}{\text{L}}\right) = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \times V_e \times t} \times 10^6$$

Onde:

Abs = absorbância

ϵ = coeficiente de absorção molar do tetraguaiacol ($26.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);

V_e = volume do caldo enzimático (mL)

t = tempo da reação (minutos)

Uma unidade da atividade da peroxidase representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de guaiacol em 1 min.

A atividade específica é a atividade da enzima dividida pela concentração de proteínas totais, resultando em $\text{U.}(\text{mg de proteína})^{-1}$.

3.7.3 Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), reagindo uma alíquota de 780 μL de água deionizada, 20 μL do extrato bruto enzimático e 200 μL do reagente Bradford (Bio-Rad). Para a regressão linear (Apêndice A) foi utilizado 1 mg/mL de soro albumina bovina (BSA) como padrão. Depois de 5 min de reação a leitura foi mensurada em espectrômetro (Femto – 700S) a 595 nm. O método de Bradford baseia-se na ligação do azul brilhante de Coomassie com a proteína e compara essa ligação com diferentes concentrações determinada pela curva padrão analítico.

3.8 Análise eletroforética dos extratos enzimáticos obtidos: Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e não desnaturante (NATIVE-PAGE)

A análise eletroforética desnaturante e não desnaturante foi utilizada para avaliar os extratos enzimáticos obtidos após dez dias de cultivo do fungo *P. ostreatus* em fermentação submersa (FSm).

3.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese em sistemas SDS-PAGE é empregada em estudos de proteínas, o qual utiliza um agente dissociante para desnaturá-las em subunidades determinando a mobilidade das proteínas ao utilizar corrente elétrica. A mistura de proteína é desnaturada pelo aquecimento, na presença do SDS e mercaptoetanol, que destrói as pontes dissulfeto, e o detergente iônico, dodecil-sulfato de sódio (SDS), desnaturante de proteína, age, ainda, na separação das cadeias polipeptídicas isoladas (LAEMMLI, 1970).

A eletroforese foi realizada em cuba vertical, utilizando sistema de mini-gel de poliacrilamida 10% no tamanho de 8,3 x 10,2 cm (Mini Protein II) da Bio-Rad.

Para a confecção do gel de resolução (um mini gel) foi utilizado 5 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 5 mL de tampão TRIS (36,3g Tris, ajustado para

pH 8,9 com HCl), 5 mL de água e 200 μ L de SDS 10%. Como catalisadores foram utilizados 38 μ L de TEMED e 50 μ L de persulfato de amônio 1%. Após a polimerização deste gel (cerca de 30 minutos), foi aplicado o gel de empacotamento. Para a confecção deste, foi utilizado 1 mL de acrilamida; 2,5 mL tampão TRIS pH 6,7; 5,5 mL de água; 100 μ L de SDS 10%. Para a polimerização foram utilizados 20 μ L de TEMED e 100 μ L de persulfato de amônio 1%.

Cada amostra foi diluída a 20% utilizando o corante azul de bromofenol aquecida a 100°C por 5 minutos. O padrão foi conduzido com 2 μ L de BenchMark - Protein Ladder – Invitrogen.

A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de corrida continha 25 mM TRIS, 192 mM de glicina e 1% de SDS 10%, em pH 8,3.

Para a coloração do gel foi utilizado nitrato de prata. Após a corrida, o gel foi colocado em solução fixadora por 12 h (overnight) contendo 40% de etanol e 10% de ácido acético glacial, completando o volume para 50 mL com água destilada. Posteriormente, o gel foi mantido em solução incubadora (acetato de sódio trihidratado, 7,0 g.L⁻¹; etanol, 300 mL.L⁻¹; tiosulfato de sódio, 4,0 g.L⁻¹ e glutaraldeído 25%, 5,2 mL.L⁻¹) por 15 minutos. Em seguida, o gel foi lavado por 45 minutos (3 x 15 minutos) com água destilada e incubado em solução de prata (nitrato de prata, 5 g.L⁻¹ e formaldeído, 200 mL.L⁻¹) por 15 minutos. O gel foi transferido para solução reveladora (carbonato de sódio, 25 g.L⁻¹ e de formaldeído, 100 μ L.L⁻¹) até aparecimento das bandas, sendo transferidos para solução stop (EDTA de sódio dihidratado – 29,2 g.L⁻¹) para parar a reação de coloração (BLUM; BEIER; GROSS, 1987). Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences

3.8.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida não-denaturantes (PAGE)

A avaliação das enzimas presentes nos extratos enzimáticos lignolíticos foi realizada por eletroforese em sistemas de tampão descontínuos e não desnaturantes, utilizando o sistema de mini-gel (Mini Protein II) da BioRad, (LAEMMLI, 1970), com exceção do uso de SDS. A concentração do gel de poliacrilamida foi de 10%. Uma corrente constante de 15 mA foi aplicada a cada gel mantendo-se uma temperatura de 4°C.

Para a enzima lacase, as amostras foram mensuradas a partir da concentração calculada para 6 µg de proteína (Bio-Rad) precipitada e diluídas em 30% de azul de bromofenol. Após a corrida, o gel foi visualizado seguindo metodologia proposta por Mansur et al. (2003), obtendo a coloração com 2 mM em guaiacol e tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, no tempo de aproximadamente 20 minutos.

A enzima peroxidase teve sua concentração calculada para até 10 µg de proteína (Bio-Rad) presente no extrato com diluição de 5% de azul de bromofenol. Após a separação, a enzima foi revelada com o-dianizidine na presença de 100 uM de H₂O₂ (POZDNYAKOVA; NIKIFOROVA; TURKOVSKAYA, 2010). Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

3.9 Purificação parcial do extrato enzimático utilizando sulfato de amônio

Os extratos enzimáticos foram submetidos a purificação parcial utilizando sulfato de amônio como indutor da precipitação, com objetivo de remover proteínas contaminantes e resíduos de fibras de bagaço de cana, concentrando as proteínas que estavam em soluções diluídas, com a vantagem de não ter efeito adverso sobre a atividade enzimática.

Para este procedimento, foram adicionados 1 g de sulfato de amônio sólido ao extrato enzimático (20 mL) e homogeneizado por agitação lenta (em agitador magnético), até a completa dissolução do sal e, posteriormente, o material foi centrifugado a 9.000 g por 30 minutos. Todo o processo foi conduzido a 4° C.

O precipitado obtido pela saturação com sulfato de amônio foi ressuspenso em tampão de eluição 25 mM Tris-HCl, pH 7,4, contendo 1 mM DTT, 0,1 mM L-lisina, 0,1 mM L-treonina e 10% (v/v) de glicerol. O volume utilizado de tampão de eluição foi o menor possível, apenas o suficiente para ressuspender completamente o precipitado e permitir a passagem através da coluna de dessalinização.

A coluna utilizada foi a Sephadex PD-10 (GE Healthcare) equilibrada com 5 vezes o volume da coluna com tampão de eluição. As amostras coletadas desta coluna foram aplicadas nos géis de eletroforese SDS-PAGE e Native-PAGE. Todo o processo foi conduzido a 4°C.

3.10 Análise estatística

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bagaço de cana-de-açúcar e a vinhaça foram utilizados para cultivar o fungo *P. ostreatus* a fim de obter as enzimas lignolíticas. Diferentes pré-tratamentos foram utilizados para o bagaço, assim como o uso de vinhaça procedente de dois diferentes locais.

4.1 Caracterização da matéria-prima

4.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana *in natura* foi submetido a remoção dos extrativos.

O teor dos extrativos totais no bagaço após o pré-tratamento foi obtido por extração sequencial com etanol/tolueno; etanol e água quente. O bagaço quando pré-tratado quimicamente (T3 e T4) apresentou acima de 8% (Tabela 3), enquanto o bagaço (T1) e o tratado com vapor (T2) apresentaram 7,2 e 6,4%, respectivamente. Isto sugere que o pré-tratamento facilitou a extração de compostos. A extração com a mistura de solventes orgânicos (cicloexano/etanol) possibilitou a remoção de compostos orgânicos, comumente chamados de extrativos, dentre os quais se incluem lignanas, terpenos, flavonóides e outros compostos aromáticos presentes na amostra (MARABEZI, 2009).

Na literatura foram encontrados resultados variados para os extrativos totais do bagaço. Análises, seguindo as normas do NREL na TAPPI (T 204 om-88), mostraram 6,8% (PITARELO, 2007) e 2,3% (RABELO, 2010) de extrativos no bagaço. Outros autores observaram percentuais acima do obtido neste estudo, como o de Carvalho (2012) que, seguindo a norma TAPPI (T 264 cm-97), encontrou na palha de cana (12,2%) e no bagaço (15,0%), e por Santos (2013) que obteve na palha de cana-de-açúcar 16,7% de extrativos totais. As diferenças nos resultados encontrados na literatura, podem ser devido a diferentes técnicas empregadas, assim como as influências ambientais, número de vezes de corte e se houve ou não a queima na colheita da cana.

Os bagaços, pré-tratados quimicamente (T3 e T4), apresentaram teores menores (Tabela 3) que o bagaço não submetido à pré-tratamento químico (T1 e T2), demonstrando maior eficiência na remoção de lignina solúvel (LS), assim como é possível observar que, o aumento da carga química em T4 em relação a T3, não correspondeu a maior solubilização da LS, o que pode ter ocorrido é a reestruturação destes compostos na fibra do material lignocelulolítico. Em todos os

tratamentos, o teor de LS foi significativamente diferente de acordo com o intervalo de confiança de 5%. O teor de lignina solúvel (LS) em bagaço de cana observado por Canilha et al. (2007) foi de 2,6%, Wolf (2011) foi de 2,4%, e por Carvalho (2012) de 1,9%, resultados compatíveis aos valores encontrados neste estudo.

Tabela 3 - Os teores (%) de extrativos totais (ET), lignina residual (LR), lignina solúvel (LS) e holocelulose (HC) de bagaço de cana-de-açúcar sob diferentes pré-tratamentos

Pré-tratamento	ET	LR	LS	HC
T1¹	7,16 ² (0,02) ^b	3,64 (0,4) ^b	1,98 (0,03) ^a	87,22 (0,4) ^a
T2	6,35 (0,05) ^c	3,78 (0,3) ^b	1,83 (0,02) ^b	88,04 (0,4) ^a
T3	8,35 (0,09) ^a	8,78 (0,5) ^a	1,00 (0,02) ^d	83,14 (1,8) ^a
T4	8,20 (0,24) ^a	4,48 (0,8) ^b	1,13 (0,02) ^c	86,19 (1,0) ^a

¹ Bagaço submetido a pré-tratamento: T1 Bagaço *in natura*; T2. Autoclave 121°C/15 min; T3. 0,75% NaOH + 0,75% H₂O₂; T4. 0,75% NaOH + 1% H₂O₂

² Valores representam a média de triplicata com o desvio padrão entre parênteses

Existe uma correlação inversa entre os valores de lignina residual (LR) e a holocelulose (HC) resultante. Segundo Marabezi (2009) teores menores de HC indicam que uma fração de polissacarídeos não foi hidrolisada e permanece como resíduo, aumentando a quantidade do teor de lignina residual. Desta forma, pode-se observar que para todos os tratamentos foram obtidos valores elevados de HC (Tabela 3), não diferindo significativamente entre si; isto indica grande eficiência na hidrólise dos polissacarídeos, resultando em teor baixo de LR.

A lignina total (LR + LS) de todos os tratamentos se mostrou baixa (de 5,6 – 9,8%) em relação ao encontrado na literatura de, 22,1% (ROCHA, 2009), 26,3% (CANILHA et al., 2007), 25% (CRUZ et al., 2012). No entanto, Carvalho (2010) após pré-tratamento do bagaço em concentrações variadas de H₂O₂, temperatura e tempo, obteve teores de lignina total de 8,1 a 19%. Segundo Fasanella (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.

4.1.2 Estudos de pré-tratamento do bagaço

A conformação estrutural das fibras do bagaço (T1 a T4) mostrou diferenças (Figura 7), após cada processo: o bagaço (T1), contém fibras (círculo vermelho), mas sem aglomeração do material; o T2 submetido à tratamento térmico, apresentou um aglomerado de fibras (apontados pelas setas vermelhas), que se desfaz facilmente; no T3 e T4 aglomerados de fibras também foram identificados, sendo que nestes ocorreu a queima superficial das fibras (setas vermelhas) permanecendo mais rígidos e a coloração do material apresentou mudança, sugerindo que o tratamento do bagaço por compostos químicos alcalinos favoreceu a queima das fibras e na reorganização das mesmas, de forma que uma vez estando mais rígidos provavelmente dificulte a penetração das hifas durante o cultivo do fungo.

Observa-se que em todos os tratamentos (com exceção T1), os aglomerados foram formados, aparentemente, pelas fibras menores, também denominada medula do bagaço.

Dependendo do pré-tratamento utilizado no resíduo lignocelulolítico, pode ocorrer a formação de compostos indesejáveis, principalmente para a produção enzimática. Alguns pesquisadores como Rodriguez-Zuñiga et al. (2008), identificaram em bagaços pré-tratados quimicamente e com explosão a vapor a presença de inibidores enzimáticos como furfural e hidroximetilfurfural. Estes compostos, se formados, nas condições deste exemplo, compõem a fração líquida, obtida após a neutralização do bagaço. Para os experimentos apresentados foram utilizados apenas a fração sólida.

Figura 7 – Foto da estrutura dos bagaços: T1- pré-tratamento físico; T2- Pré-tratamento termo-físico, T3- Pré-tratamento físico-químico (0,75% NaOH + 0,75% H₂O₂), T4- Pré-tratamento físico-químico (0,75% NaOH + 1% H₂O₂)

4.1.3 Composição da vinhaça

Vinhaças de diferentes procedências, V1 e V2 foram utilizadas neste estudo. A vinhaça V1 apresentou níveis maiores de macro e microminerais presentes quando comparados ao V2 (Tabela 4), destacando, principalmente, matéria orgânica total, carbono total, nitrogênio total, cálcio, fosforo e a relação C:N total.

Devido a sua composição, a vinhaça pode ser uma fonte de nutrientes para micro-organismos na degradação de resíduos (CRIVELARO et al., 2010; PRATA et al., 2001). Os nutrientes da amostra V1 estão em maior quantidade e equilíbrio para a degradação do fungo, de forma que alguns, como o nitrogênio, é indispensável

para assegurar a síntese de ácidos nucléicos, aminoácidos e de proteínas (ZANETTI; RANAL, 1997).

Tabela 4 - Composição química, macro e micro-minerais das vinhaças V1 (Usina sucroalcooleira) e V2 (Destilaria)

Determinação	Unidade	V 1	V 2
Índice pH	---	3,80	3,00
Densidade	g.mL ⁻¹	0,94	0,96
Resíduo seco a 100-110°C		24,79	18,13
Matéria Orgânica total (combustão)		17,72	12,51
Carbono total (orgânico e mineral)		9,84	6,95
Resíduo mineral total		7,07	5,62
Resíduo mineral insolúvel		0,12	0,10
Resíduo mineral solúvel	g.L ⁻¹	6,95	5,52
Nitrogênio total		0,67	0,20
Fósforo (P ₂ O ₅) total		0,18	0,04
Potássio (K ₂ O)		2,80	2,50
Cálcio (Ca)		0,86	0,57
Magnésio (Mg)		0,32	0,28
Enxofre (S)		0,73	0,48
Cobre (Cu) total		1,00	1,00
Manganês (Mn) total	ppm	3,00	7,00
Zinco (Zn) total		1,00	1,00
Ferro (Fe) total		7,00	14,00
Relação C/N (C total e N total)	---	15/1	35/1

A relação C:N do substrato é um fator importante no cultivo de *Pleurotus* e interfere tanto na colonização do substrato, como na produção de corpos de frutificação (PHILIPPOUSSIS; ZERVAKIS; DIAMANTOPOULOU, 2001). A matéria orgânica a partir da vinhaça é uma fonte importante de carbono solúvel prontamente disponível para os micro-organismos (PRATA et al., 2001), na qual, amostra V1 a taxa de matéria orgânica é superior ao V2. Segundo Sturion (1994), na fase de desenvolvimento dos basidiomas a existência de uma relação C:N baixa do substrato de cultivo é mais favorável. Figueiró e Gracioli (2011), utilizando substrato de palha de sorgo e sabugo, constataram relação entre a baixa produção de cogumelos, da espécie *Pleurotus florida*, com a taxa C:N elevada. D'Agostini et al. (2011) observaram que relações C:N menores que 30 induziram a síntese de lacase (produzidas pelos fungos, *P. ostreatus*, *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei*) e

inibiram o crescimento micelial, proporcionando condições ideais para a pré-hidrólise de resíduos vegetais.

A coloração das vinhaças diferenciou entre si devido ao processamento do qual se originaram; foi encontrada diferença de cor. Para este método de avaliação, em análise mais precisa (Figura 8B), foi realizada uma adaptação da metodologia usada para medir níveis de coloração de cerveja, após ambas serem filtradas em membrana de 0,45µm. A intensidade de cor das vinhaças difere da visual (Figura 8A), a V1 (usina sucroalcooleira) apresenta coloração mais intensa, ao contrário da visual, que a V2 (destilaria), com 19,9 e 15,3 EBC (European Brewery Convention), respectivamente. Segundo Fitzgibbon et al. (1995), a cor está associada aos sólidos suspensos e dissolvidos e, principalmente devido à presença de melanoidinas, caramelo, produtos de degradação alcalina e polifenóis. Estes compostos são originados a partir da fermentação do melaço durante o processo industrial (GOKARN; MAYADEVI, 2000).

O açúcar redutor (AR) foi analisado nas duas situações, sem e com filtração (0,45 µm) da vinhaça. Dessa forma, os resultados mostram que a V1 apresentou diferença na quantidade de AR presente na vinhaça filtrada e sem filtrar (4,6 e 2,4 g/L, respectivamente), indicando que a filtração concentrou alguns açúcares, enquanto que, na V2 o AR não sofreu alteração pela filtração, permanecendo em 5,4 g/L, provavelmente por conta de seu processamento de destilação. Convém lembrar que para as fermentações (FSm e FSS) as vinhaças não foram submetidas à filtração.

As análises de vinhaça mostram diferenças na composição química (Tabela 4) e na coloração (Figura 8) entre ambas as amostras de vinhaça, ressaltando que não há uma tendência dos dados em nenhum dos parâmetros, pois tais características estão relacionadas com o clima, o cultivo, e o processamento industrial da cana-de-açúcar.

Figura 8 - Vinhaças V1 (Usina sucroalcooleira) e V2 (Destilaria). A) Cor visual das vinhaças (V1 e V2), e B) Cor das vinhaças em unidade EBC (European Brewery Convention) (Coluna preta), Açúcar redutor (AR) das vinhaças após filtração a 0,45 μ m (Coluna vermelha) e AR sem filtração (Coluna azul)

4.2 Obtenção das enzimas lignolíticas

Os bagaços derivados dos diferentes tratamentos foram combinados com vinhaça e submetidos ao cultivo do fungo *P. ostreatus*, por fermentação semissólida (FSS) e fermentação submersa (FSm). As enzimas lacase e peroxidase foram analisadas em diferentes tempos. Como as vinhaças foram provenientes de processos industriais distintos, os resultados serão apresentados de acordo com a procedência das vinhaças (V1 e V2), dentro de cada processo de fermentativo.

4.2.1 Enzimas obtidas por fermentação semissólida (FSS)

A produção de enzimas lacase e peroxidase por FSS foi realizado utilizando a vinhaça V1 para umedecer o bagaço. Nestas condições ocorreram maior produção da enzima lacase (Figura 9) nos tratamentos TS3 com 65,4 U.L⁻¹ para o 10º dia, com queda da atividade no 12º dia de cultivo, o mesmo foi verificado na atividade específica, cujo pico foi de 0,45 U.mg⁻¹ no décimo dia.

O processo de fermentação utilizando bagaço submetido a pré-tratamento físico (TS1 e TS2), não apresentaram respostas positivas para produção da lacase quando comparados com os TS3 e TS4, apesar de no 12º dia todos os tratamentos não diferirem significativamente (Anexo A) entre si. Desta forma, o tratamento químico do bagaço contribuiu para o aumento da atividade enzimática pela ação do fungo *P. ostreatus*. Porém, quando o processo de FSS é correlacionado a FSm,

ambos tendo sido umedecidos com a V1, o cenário é inverso entre os tratamentos do bagaço, o qual será discutido posteriormente na etapa de FSm.

Figura 9 – Atividade de Lacase após 7, 10 e 12 dias de cultivo do *P. ostreatus* em FSS nos diferentes pré-tratamentos do bagaço e umedecido com a V1. TS1. Bagaço pré- tratado 1; TS2. Bagaço pré- tratado 2; TS3. Bagaço pré- tratado 3; TS4. Bagaço pré- tratado 4

A avaliação dos extratos enzimáticos para peroxidase (Figura 10) apresentou melhores taxas para os tratamentos TS3 com 30,9 no 10º dia e TS4 com 31,9 no 7º dia, sendo ambos os bagaços submetidos ao pré-tratamento químico. No entanto, no último dia de avaliação a atividade teve queda de mais de 50% para estas mesmas amostras. Porém, observa-se que, os tratamentos não diferem significativamente (Anexo B) entre si no 7º dia de cultivo. O extrato obtido do bagaço pré-tratado fisicamente, proporcionou atividade de peroxidase menor que o encontrado no pré-tratamento químico, sendo que este último influenciou positivamente a atividade das enzimas avaliadas.

Figura 10 – Atividade da peroxidase produzida após 7, 10 e 12 dias de cultivo do *P. ostreatus* em FSS nos diferentes pré-tratamentos do bagaço e umedecido com a V1. TS1. Bagaço pré- tratado 1; TS2. Bagaço pré- tratado 2; TS3. Bagaço pré- tratado 3; TS4. Bagaço pré- tratado 4

4.2.2 Enzimas obtidas por Fermentação Submersa (FSm)

4.2.2.1 Atividade de lacase

A composição do substrato tem ação direta nos níveis de produção de lacase, o cultivo do fungo *P. ostreatus* em meio contendo V1 proporcionou teores elevados de atividade enzimática (Figura 11A), principalmente para os tratamentos sem pré-tratamento químico, o TL1 e TL2 (784,9 e 707,5 U.L⁻¹), da mesma forma ocorreu com o substrato contendo apenas vinhaça (VL1) com 395,4 U.L⁻¹, após 12 dias de cultivo. Estes tratamentos apresentaram as atividades específicas mais altas, com aumento expressivo com o decorrer dos dias, obtendo especificidade máxima no 12º dia, com médias de 3,04; 2,86 e 1,91 U.mg⁻¹, respectivamente.

Pozdnyakova, Nikiforova e Turkovskaya (2010) observaram que o *P. ostreatus* D1 produziu lacase durante 21 dias com teores máximos entre 5 e 12 dias (11,7 e 11,1 U.mL⁻¹). Ferreira (2009) realizou o cultivo de *P. sajor-caju* em meio submerso de vinhaça, variando os tratamentos com vinhaça *in natura*; vinhaça + glicose; vinhaça + meio sintético para fungos, obteve os resultados melhores no 9º dia com 400 a 450 U.L⁻¹. Por outro lado, Souza e Monteiro (2015), cultivando *Pleurotus* em FSm, em meio contendo apenas vinhaça (proveniente de usina sucroalcooleira), atingiu pico máximo de lacase (1259 – 1463 U.L⁻¹) no 12º dia de incubação. Estes resultados mostram que a vinhaça contém em sua composição

nutrientes suficientes para suprir as necessidades energéticas do fungo, podendo produzir alta atividade enzimática.

Para os bagaços pré-tratados quimicamente (TL3 e TL4), a produção de enzimas permaneceu inferior em relação aos demais tratamentos. Segundo Fasanella (2008), os processos alcalinos tendem a promover maior dissolução da lignina e menor solubilização/fragmentação das hemiceluloses. Por outro lado, Pölönen (2000), afirma que mudanças na estrutura da lignina afetam a hidrólise enzimática em maior extensão do que a quantidade de lignina presente no substrato.

Quando utilizado a vinhaça V2 como substrato, observa-se que a maior produção da lacase foi na amostra VL2 (apenas vinhaça) que produziu 47,5 UI.L⁻¹ (Figura 11B), menor variação e não apresentando diferença estatística entre os diferentes tempos (Anexo C – Vinhaça 2). Porém, para os tratamentos que continham bagaço, a produção de enzima variou com o tempo de cultivo em relação ao bagaço pré-tratado utilizado. Nota-se que os tratamentos TL3 e TL4 (31,4 e 30,4 UI.L⁻¹) com pré-tratamento químico, apresentaram melhores atividades da lacase no 7º dia, com diminuição abrupta da atividade nos dias posteriores, ao contrário do bagaço sem pré-tratamento químico TL1 e TL2 (41,84 e 36,83 UI.L⁻¹), que apresentaram as maiores atividades no 12º dia. Para os dados de atividade específica os melhores resultados ficaram com o tratamento VL2, chegando a 0,889 U.mg⁻¹ de especificidade no 7º dia de cultivo.

Em uma avaliação geral, analisando apenas as vinhaças empregadas como substrato, é possível verificar que as fermentações quando utilizado a V1, a atividade da lacase superou cerca de 17 vezes quando comparado com a V2, não sendo considerado os tratamentos prévios do bagaço e o tempo de cultivo do fungo. Isso pode estar relacionado com os níveis favoráveis de minerais presentes nas vinhaças (Tabela 4), na qual a V1 possui melhores fontes de nutrientes, principalmente, de nitrogênio total, carbono e relação C:N, beneficiando o crescimento do fungo. Desse modo, nota-se que o crescimento do *P. ostreatus* objetivando a produção da enzima lacase foi determinado, principalmente, pela vinhaça empregada e não pelo tratamento aplicado ao bagaço.

Figura 11 – Atividade da lacase produzida por *P. ostreatus* durante cultivo em meio líquido (FSm) contendo bagaço pré-tratamento e/ou vinhaça após 7, 10 e 12 dias. A) FSm utilizando a V1, B) FSm utilizando a V2. Onde: TL1. Bagaço pré- tratado 1; TL2. Bagaço pré- tratado 2; TL3. Bagaço pré-tratado 3; TL4. Bagaço pré-tratado 4; VL1. Vinhaça 1 pura e VL2. Vinhaça 2 pura

4.2.2.2 Atividade da peroxidase

Ao analisar os resultados por vinhaça empregada, observa-se que nos substrato que utilizaram a vinhaça V1, a taxa de atividade da peroxidase (Figura 12A) sofreu alterações em consequência do tratamento prévio do bagaço e o período de fermentação. Dessa forma, os melhores níveis de produção da enzima ocorreram entre os meios contendo bagaço pré-tratados fisicamente, TL 1 e TL 2, assim como para a VL1, com picos de 133,1; 131,2 e 126,1 U.L⁻¹, respectivamente.

Valores estes obtidos no 12º dia e não apresentaram diferença estatística entre eles. Porém, com exceção do VL1, dentro de cada tratamento os TL1 e TL2 não apresentaram diferenças significativas (Anexo D – Vinhaça 1) entre o 10º e 12º dia. Resultados de alta atividade também foram encontradas por Souza e Monteiro (2015) com atividade de 356-442 U.L⁻¹.

A maior atividade específica obtida foi na VL1 (0,86 U.mg⁻¹) no 7º dia, seguida do TL1 e TL2 com 0,56 e 0,58 U.mg⁻¹, no período de 12 dias. Período também encontrado nos trabalhos de Ferreira (2009) com *P. sajor-caju* e Aguiar Filho (2008) com *P. ostreatus*, onde ambos os autores identificaram a manganês peroxidase (MnP) no 12º dia de cultivo.

Para as amostras de bagaço pré-tratadas quimicamente, a atividade enzimática manteve-se abaixo dos demais tratamentos. No entanto, apenas o TL3 apresentou maior atividade de peroxidase no 7º dia, mas houve queda da atividade no decorrer do tempo de cultivo. Quando comparado o tempo de cultivo em relação aos tratamentos TL3 e TL4, no qual ambos diferem entre si apenas por 0,25% de NaOH, a mais presente no pré-tratamento do bagaço T4 (referente a amostra TL4), no 7º e 10º dia possuem diferenças significativas (Anexo D – Vinhaça 1) e no 12º não diferem estatisticamente, indicando que o aumento de NaOH agiu de forma negativa para a produção da peroxidase.

Ao utilizar a vinhaça V2 como substrato para a cultura do *P. ostreatus* é observado que ao contrário do que ocorreu nas amostras utilizando como substrato a V1, a maior produção da peroxidase (Figura 12B) esteve nos meios contendo bagaço pré-tratados quimicamente TL3 e TL4 (41,4 e 31,6 U.L⁻¹, respectivamente), teor atingido no 7º dia de cultivo, porém diminuindo nos dias seguintes. Entretanto, ao analisar os demais tratamentos (TL1, TL2 e VL2) é observado que a produção da enzima se manteve constante durante o tempo de cultivo, sem alterações significativas (Anexo D – Vinhaça 2) dentro de cada tratamento, sendo que a amostra VL2 (0,58 U.mg⁻¹) ocorreu a atividade específica maior, alcançada no 7º dia.

Outro dado observado em relação aos tratamentos TL1 e VL2, é que em ambos ocorreu a maior produção enzimática para o 10º e 12º dia, sendo estatisticamente iguais (Anexo D – Vinhaça 2). Isso sugere que a adição do bagaço, assim como o pré-tratamento químico do bagaço, não induz melhor produção enzimática; o fungo cultivado em meio de vinhaça é possível obter alta produção enzimática.

Figura 12 - Atividade da peroxidase produzida por *P. ostreatus* durante cultivo em meio líquido (FSm) contendo bagaço pré-tratamento e/ou vinhaça após 7, 10 e 12 dias. A) FSm utilizando a V1, B) FSm utilizando a V2. Onde: TL1. Bagaço pré- tratado 1; TL2. Bagaço pré- tratado 2; TL3. Bagaço pré-tratado 3; TL4. Bagaço pré- tratado 4; VL1. Vinhaça 1 pura e VL2. Vinhaça 2 pura

Os dados de atividade da peroxidase a partir do cultivo do fungo *P. ostreatus*, demonstram que assim como para lacase, independente do tratamento aplicado ao bagaço, a produção dos níveis de peroxidase diferiram essencialmente em decorrência das vinhaças V1 ou V2 (Tabela 4). Em uma análise geral, a V1 quando utilizada como fonte de nutriente e umidade, proporcionou a produção da enzima de até 4,6 vezes superior em relação a vinhaça V2. Estes números reforçam a

necessidade de análise prévia sobre a composição dos resíduos agroindustriais a serem utilizados para cultivo de fungo, em especial para a produção de enzimas lignolíticas.

4.3 Caracterização parcial das enzimas

O cultivo de *P.ostreatus* em FSm, contendo vinhaça V1 como fonte energética, após 10 dias, teve seu perfil de proteínas extracelulares analisadas por gel de SDS-PAGE (Figura 13). As bandas reveladas apresentam proteínas com massa molar de 15 e 60 kDa. Apesar de alguns interferentes na revelação do gel desnaturante, é possível observar a semelhança na produção de proteínas para os diferentes extratos, sendo a amostra VL1 que se distinguiu ligeiramente em presença ou ausência de algumas bandas e na intensidade de algumas delas em comparação com os demais tratamentos. Faria (2010), trabalhando com o fungo *Ceriporiopsis subvermispora* para obtenção de enzimas, observou interferentes nos géis de proteínas, o que supõe que o fungo excreta compostos que interferem na caracterização eletroforética das proteínas.

A análise quantitativa das enzimas utilizou géis Native-PAGE por meio de eletroforese, corada com guaiacol para revelar a enzima extracelular lacase e, com o-dianizidine e H₂O₂ para a peroxidase. Os diferentes tratamentos após 10 dias de cultivo, mostram que para todas as amostras, a enzima lacase (Figura 14A) exibiu uma única banda de mesma mobilidade eletroforética e é possível quantificar a atividade enzimática pela maior intensidade das bandas, principalmente nos extratos VL1 e TL1. Nota-se que, estas amostras são referentes aos substratos em meio líquido utilizando a V1. Assim, quando a vinhaça foi utilizada como única fonte energética, a produção da lacase foi maior que nos demais tratamentos com adição de bagaço e sobretudo com o bagaço pré-tratado quimicamente, o qual permaneceu com a menor produção.

Sunil et al. (2011) isolou *P. ostreatus* de diversas fontes e visualizou apenas uma banda de lacase; nas mesmas condições de trabalho Asgher, Kamal e Iqbal (2012), identificaram apenas uma banda da lacase em aproximadamente 60 kDa, também produzido por *P. ostreatus* IBL-02 durante a descoloração de Drimarene brilhante vermelho K-4BL. Outros autores revelam que a maior parte das lacases são proteínas monoméricas com massas moleculares entre 50 e 80 kDa (MAYER; STAPLES, 2002; YAROLOV et al., 1994;).

Alguns autores identificaram subunidades para lacase, como apresentado por Mansur et al. (2003) que encontrou duas lacases (LCC1 e LCC2) e, por Pozdnyakova, Nikiforova e Turkovskaya (2010) que encontrou três lacases, todos trabalhando com o fungo *P. ostreatus* sob diferentes meios de cultura específico. É bem conhecido que os fungos basidiomicetos produzem enzimas ligninolíticas na forma de isozimas que são codificadas por famílias de genes. Em resposta a indutores, a expressão do gene de lacase varia de fungo para fungo (GIANFREDI; XU; BOLLAG, 1999).

Para a enzima peroxidase (Figura 14B), o extrato VL1 foi o único a apresentar uma banda com baixo peso molecular. Pozdnyakova, Nikiforova e Turkovskaya (2010) relatam a presença de duas peroxidases versáteis produzidas pelo *P. ostreatus* D1. Faria (2010), trabalhando com diversos meios suplementados, encontrou bandas únicas bem definidas de manganês peroxidase e bandas proteicas difusas/arrastadas que podem indicar mais de uma isoenzima MnP. Segundo Souza (2012), os basidiomicetos do gênero *Pleurotus* não produzem lignina peroxidase (LiP), mas tem atividade de lacase, manganês peroxidase e peroxidases não dependentes de Mn e outras oxidases.

Figura 13 – SDS-PAGE de extratos enzimáticos da FSm em V1 com 10 dias de cultivo do *P. ostreatus*. P. Padrão BSA; VL1. Vinhaça 1 pura; TL1. Bagaço pré-tratado 1; TL2. Bagaço pré-tratado 2; TL3. Bagaço pré-tratado 3; TL4. Bagaço pré-tratado 4

Figura 14 – Análise quantitativa em gel não desaturante Native-PAGE 10%, dos extratos após 10 dias de cultivo do *P. ostreatus* em FSm com substrato V1, para detecção das enzimas: lacase (A), revelada com 1mM de Guaiacol em 100mM tampão acetato de sódio, e peroxidase (B), com o-dianizidine e H_2O_2

4.4 Descoloração da vinhaça

Os resíduos lignocelulósicos submetidos a FSm, apresentaram alterações na coloração da vinhaça (Figura 15), demonstrando a ação que o fungo *P. ostreatus* teve como agente degradador de compostos orgânicos.

Houve a descoloração da vinhaça nos dois tratamentos estudados (apenas vinhaça e vinhaça + bagaço), assim como a formação de um grande pellet (seta vermelha – Figura 15C) para o substrato contendo apenas vinhaça e, pequenos e numerosos pellets (seta azul – Figura 15D) no substrato de vinhaça em conjunto com bagaço, a partir da biodegradação realizado pelo *P. ostreatus*. O mesmo não foi observado no processo de FSS. Em estudo com basidiomicetos Souza (2012) identificou que as espécies de *P. sajor-caju* CCB 020, *P. ostreatus*, *P. albidus* CCB 068 apresentaram uma descoloração de aproximadamente 70% da vinhaça.

Existem métodos químicos e biológicos para a remoção de cor de vinhaça. Esta última inclui descoloração por atividade microbiana envolvendo quebra enzimática de melanoidina e floculação por substâncias microbianamente secretadas (MANE et al., 2006). Entretanto, a cor devido à presença de lignina, caramelo e melanoidina persistem mesmo após um processo de anaerobiose como biometanização (GOKARN; MAYADEVI, 2000).

As substâncias responsáveis pela cor no processamento de cana-de-açúcar são normalmente materiais coloidais biopoliméricos carregados negativamente (GOKARN et al., 1998; GOKARN; MAYADEVI, 2000; MIGO; MATSUMURA; ERNESTO, 1993). Todos estes compostos, com exceção do caramelo contendo grupos fenólicos em sua estrutura (SMITH; GREGORY, 1971) e os compostos fenólicos, contribuem para a formação destes colorantes (GROSS; COOMBS, 1976).

O uso de micro-organismos nos processos de biorremediação e/ou de tratamento deve-se ao fato de que os fungos saprófitos manter um sistema multienzimático extracelular não específica capaz de romper uma grande quantidade de diferentes ligações químicas (EGGEN, 2000; RAGHUKUMAR et al., 2008). Segundo Kerem, Friesem e Hadar (1992), a lacase pode atuar na destoxificação de compostos do substrato como oxidar grupos fenólicos, agindo como enzima inicial na clivagem de cadeias e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina.

Figura 15 – Descoloração da vinhaça pelo *P. ostreatus*, sob o sistema de FSm, contendo ou não bagaço, após 10 dias de cultivo. A) Cor da vinhaça com pH 6,0 ajustado no início da fermentação. B) Substrato contendo 1 g de bagaço em conjunto com a vinhaça; C) vinhaça pura com produção de pellet (seta vermelha), e (D) formação de pellet (seta azul) em meio ao bagaço de cana-de-açúcar

5 CONCLUSÕES

A fermentação submersa proporcionou maior eficiência na produção das enzimas lacase e peroxidase, pelo fungo *Pleurotus ostreatus*, nas condições estudadas em comparação ao meio fermentativo semissólido.

Entre os pré-tratamentos utilizados para o bagaço, os tratamentos físicos (moagem e o tratamento térmico) foram os mais eficientes para a produção das enzimas lacase e peroxidase. Assim como, o meio contendo apenas vinhaça, superou a produção de enzimas em fermentação semissólida.

A composição da vinhaça, principalmente em fermentação submersa, foi essencial para produção de enzimas, o meio contendo vinhaça V1 (com maior taxa de nutrientes) propiciou atividade de lacase de, aproximadamente, 17 vezes superior que na vinhaça V2 e para peroxidase, 5 vezes maior.

Os dados de eletroforese confirmam os resultados da atividade enzimática, onde o uso do meio de cultivo contendo apenas vinhaça e bagaço pré-tratado fisicamente, apresentaram as maiores bandas, indicando elevada produção de enzimas.

O fungo *Pleurotus ostreatus*, quando cultivado em fermentação submersa, foi eficiente na descoloração da vinhaça.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. 2001. 138 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, T.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzyme hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, Madrid, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.093
- ASGHER, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H.M.N. Improvement of catalytic efficiency, thermo-stability and dye decolorization capability of *Pleurotus ostreatus* IBL-02 laccase by hydrophobic sol gel entrapment. **Chemistry Central Journal**, London, v. 6, n. 110, p. 1-10, 2012.
- BACH, C.E.; WARNOCK, D.D.; HORN, D.J.V.; WEINTRAUB, M.N.; SINSABAUGH, R.L.; ALLISON, E.D.; GERMAN, D.P. Measuring phenol oxidase and peroxidase activities with pyrogallol, L-DOPA, and ABTS: effect of assay conditions and soil type. **Soil Biology & Biochemistry**, New York, v. 67, p. 183-191, 2013.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, Trabzon, v. 52, p. 858-875, 2011.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases: occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 30, p. 215–242, 2006.
- BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro, 2008. 316 p.
- BARROS, R.P. de; VIÉGAS, P.R.A.; SILVA, T.L. da; SOUZA, R.M. de; BARBOSA, L.; VIÉGAS, R.A.; BARRETTO, M.C.V.; MELO, A.S. de. Alterações em atributos químicos de solo cultivado com cana-de-açúcar e adição de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 3, p. 341-346, 2010.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P.V. Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. **Enzyme Research**, New York, v. 2010, p. 1-10, 2010.

BROWN, M.A.; ZHAO, Z. MAUK, A.G. Expression and characterization of a recombinant multi-copper: laccase IV from *Trametes versicolor*. **Inorganica Chimica Acta**, New York, v. 331, p. 232-238, 2002.

BURGI, R. Utilização de resíduos culturais e de beneficiamento na alimentação de bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 6., 1995, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1995. p. 153-169.

CAMPOS, L.P. **Aplicação de cinza de bagaço de cana-de-açúcar nos atributos químicos e biológicos do solo**. 2014. 88 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2014.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G.J.M.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 47., 2007, Natal. **Anais...** Natal: ABQ, p. 1-3, 2007.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 44, p. 48-54, 2010.

CARDONA, A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresour Technology**, Manizales, v. 101, n. 13, p. 4754–4766, 2010. doi: 10.1007/s10295-010-0931-2C

CARDOSO, M.G. **Produção de aguardente de qualidade**. Lavras: UFLA, 2006. 263 p.

CARVALHO, D. N. de. **Caracterização físico-química e polpação etanol/soda do bagaço e da palha de cana-de-açúcar**. 2012. P. 166. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

CESARINO, I. **Estudos iniciais de caracterização funcional de peroxidase e laccases potencialmente envolvidas no processo de lignificação em cana-de-açúcar**. 2012. 126 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

CHUNDAWAT, S.P.S; BECKHAM, G.T; HIMMEL, M.E; DALE, B.E. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, Palo Alto, v. 2, p. 121–145, 2011.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 58, p. 582-594, 2002.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Vinhaça**: critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. São Paulo, 2006. 231 p.

CONFORTIN, F.G.; MARCHETTO, R.; BETTIN, F.; CAMASSOLA, M.; SALVADOR, M.; DILLON, A.J.P. Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 35, p. 1149–1155, 2008.

CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Deliberação normativa COPAM Nº 164**, de 30 de março de 2011: trata da elaboração de proposta de deliberação normativa específica para aplicação de vinhaça e águas residuárias provenientes da fabricação de aguardente em solo agrícola. Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <<http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=16794>>. Acesso em: 23 maio 2015.

COUTO, S.R.; TOCA-HERRERA, J.L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, Rehovot, v. 25, p. 558-569, 2007.

CRIVELARO, S.H.R.; MARIANO, A.P.; FURLAN, L.T.; GONÇALVES, R.A.; SEABRA, P.N.; ANGELIS, D.F. Evaluation of the use of vinasse as a biostimulation agent for the biodegradation of oily sludge in soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 5, p. 1217-1224, 2010.

CRUZ, L.F.L.S. **Viabilidade técnica/econômica/ ambiental das atuais formas de aproveitamento da vinhaça para o setor sucroenergético do Estado de São Paulo**. 2011. 136 p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

CRUZ, S.H. da; DIEN, B.S.; NICHOLS, N.N.; SAHA, B.C.; COTTA, M.A. Hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse using response surface methodology improves digestibility and ethanol production by SSF. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 39, p. 439-447, 2012.

D'AGOSTINI, E.C.; MANTOVANI, T.R.D'A.; VALLE, J.S.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; COLAUTO, N.B.; LINDE, G.A. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 68, n. 3, p. 295-300, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162011000300004>

DAS, N.; SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, M. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 4120-4122, 1997.

DELLAMATRICE, P.M. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da estação de tratamento de águas residuais de Americana, SP**. 2005. 137 p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agrossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

DIONISIO, G.F.; SANTANA, F.C.I.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Aplicação de complexo enzimático lignocelulósico para a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.

In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2009, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: cd-rom, p. 1-5, 2009.

DURÁN, N. Enzimas ligninolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 245-262.

EGGEN, T. **Bioremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi**. 2000. 119 p. Thesis (Doctor Scientiarum) - Agricultural University of Norway, Akershus, 2000.

FARIA, R.A. **Estudos da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora***. 2010. 102 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

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.

FERNÁNDEZ-FUEYO, E.; CASTANERA, R.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; LÓPEZ-LUCENDO, M.F. Ligninolytic peroxidase gene expression by *Pleurotus ostreatus*: differential regulation in lignocellulose medium and effect of temperature and pH. **Fungal Genetics and Biology**, Madison, v. 72, p. 150-161, 2014.

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

FERREIRA, L.F.R.; AGUIAR, J.M.M.; MESSIAS, T.G.; POMPEU, G.B.; QUEIJEIRO LOPEZ, A.M.; SILVA, D.P.; MONTEIRO, R.T.R. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, p. 132-137, 2011.

FIGUEIRÓ, G.G.; GRACIOLLI, L.A. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 924-930, 2011.

FITZGIBBON, F.J.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Biological treatment of distillery waste for pollution remediation. **Basic Microbiology**, London, v. 35, n. 5, p. 293-301, 1995.

FLOUDAS, D.; BINDER, M.; RILEY, R.; BARRY, K.; BLANCHETTE, R.A.; HENRISSAT, B.; MARTÍNEZ, A.T.; OTILLAR, R.; SPATAFORA, J.W.; YADAV, J.S.; AERTS, A.; BENOIT, I.; BOYD, A.; CARLSON, A.; COPELAND, A.; COUTINHO, P.M.; DE VRIES, R.P.; FERREIRA, P.; FINDLEY, K.; FOSTER, B.; GASKELL, J.; GLOTZER, D.; GÓRECKI, P.; HEITMAN, J.; HESSE, C.; HORI, C.; IGARASHI, K.; JURGENS, J.A.; KALLEN, N.; KERSTEN, P.; KOHLER, A.; KÚES, U.; KUMAR, T.K.A.; KUO, A.; LABUTTI, K.; LARRONDO, L.F.; LINDQUIST, E.; LING, A.; LOMBARD, V.; LUCAS, S.; LUNDELL, T.; MARTIN, R.; MCLAUGHLIN, D.J.; MORGENSTERN, I.; MORIN, E.; MURAT, C.; NAGY, L.G.; NOLAN, M.; OHM, R.A.; PATYSHAKULIYEVA, A.; ROKAS, A.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; SABAT, G.; SALAMOV, A.; SAMEJIMA, M.; SCHMUTZ, J.; SLOT, J.C.; ST. JOHN, F.; STENLID, J.; SUN, H.; SUN, S.; SYED, K.; TSANG, A.; WIEBENGA, A.; YOUNG, D.; PISABARRO, A.; EASTWOOD, D.C.; MARTIN, F.; CULLEN, D.; GRIGORIEV, I.V.; HIBBETT, D.S. The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**, New York, v. 336, p. 1715–1719, 2012.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Ed. Agropecuária, 2000. 203 p.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **Holz Roh Werk-und Werkstoff**. Orense, v. 57, n. 3, p. 191–202, 1999.

GEHRING, C.G. **Análise da geração de energia elétrica a partir do biogás produzido na fermentação anaeróbica de vinhaça**. 2014. 124 p. Monografia (Curso de Engenharia Elétrica com ênfase em Sistemas de Energia e Automação) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J.-M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes, **Biomedical Journal**, Mumbai, v. 3, p.1-25, 1999.

GIARDINA, P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, A.; VANHULLE, S.; SANNIA, G. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, p. 369–385, 2010.

GOKARN, A.N.; MAYADEVI, S. Active charcoal from agro-waste for color removal of treated spent-wash. In: VI ANNUAL CONVENTION OF DEFENCE SCIENCE & TECHNOLOGY AGENCY, 6, 2000, Pune. **Proceedings...** Pune: DSTA, 2000. pt. 1, p. B1-B10.

GOKARN, A.N.; SAPKAL, N.V.; JOSHI, A.P.; DONGARE, M.K. Towards customer friendly process for the treatment of distillery effluent. In: V ANNUAL CONVENTION OF DEFENCE SCIENCE & TECHNOLOGY AGENCY, 5, 1998, Pune. **Proceedings...** Pune: DSTA, 1998. pt. 1, p. B4-B5.

GOMBERT, A.K.; PINTO, A.L.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babaçu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, Vandoeuvre Cedex, v. 35, p. 85-90, 1999.

GOMIDE, J.L.; DEMUNER, B.J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método Klason modificado. **O Papel**, São Paulo, v. 47, n. 8, p. 36-38, 1986.

GONÇALVES, D.L. **Produção de álcool combustível a partir de hidrolizados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar por leveduras industriais e leveduras fermentadoras de xilose**. 2010. 69 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

GONZALEZ, J.C.; MEDINA, S.C.; RODRIGUEZ, A.; OSMA, J.F.; ALMÉCIGA-DÍAZ, C.J.; SÁNCHEZ, O.F. Production of *Trametes pubescens* Laccase under submerged and semi-solid culture conditions on agro-industrial wastes. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. 1-14, 2013.

GROSS, D.; COOMBS, J. Enzymic colour formation in beet and cane juices. **International Sugar Journal**, London, v. 928, p. 69-106, 1976.

HESELTIME, C.W.; KURTZMAN, C.P. *Aspergillus momius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. **Journal Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 53, p. 147-158, 1987.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Wood Science and Technology**, Tokyo, 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**, Ottawa, v. 3, n. 1, p. 1-19, 2004.

JURADO, M.; MARTÍNEZ, A.T.; MARTINEZ, M.J.; SAPARRAT, M.C.N. Application of White-rot fungi in transformation, detoxification, or revalorization of agriculture wastes: role of laccase in the processes. **Comprehensive Biotechnology**, Amsterdam, v. 6, p. 595-603, 2011.

KAHRAMAN, S.S.; GURDAL, I.H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. **Bioresource Technology**, Essex, v. 82, p. 215-217, 2002.

KARP, S.G.; FARACO, V.; AMORE, A.; BIROLO, L.; GIANGRANDE, C.; SOCCOL, V.T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Trivandrum, v. 114, p. 735-739, 2012.

KEREM, Z.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. Lignocellulose degradation during solid state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 4, p. 1121-1127, 1992.

KERSTEN, P.J.; KALYANARAMAN, B.; HAMMEL, K E.; REINHAMMAR, B.; KIRK, T.K. Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. **Biochemical Journal**, London, v. 268, p. 475-480, 1990.

KIELING, D.D. **Enzimas: aspectos gerais**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), p. 1-13, 2002.

KUMAR, S.; KOTHARI, U.; KONG, L.; LEE, Y.Y.; GUPTA, R.B. Hydrothermal pretreatment of switchgrass and corn stover for production of ethanol and carbon microspheres. **Biomass and Bioenergy**, Auburn, v. 35, n. 2, p. 956-968, 2011. doi:10.1016/j.biombioe.2010.11.023

INSTITUTO CNA. **Relatório de Inteligência: Do Bagaço ao posto**. 2013. Disponível em: <<http://www.icna.org.br/sites/default/files/relatorio/RELAT%C3%93RIO%20DO%20AGRONEG%C3%93CIO%20-%20janeiro%20de%202013.pdf>>. Acessado em: 15/08/2015.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680–685, 1970.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.G.; LICHWA, J.; ANTAL-JR, M.J.; LYND, L.R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, Trivandrum, v. 81, p. 33-44, 2002.

LAUBER, C.L.; SINSABAUGH, R.L.; ZAK, D.R. Laccase gene composition and relative abundance in oak forest soil is not affected by short-term nitrogen fertilization. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, p. 50–57, 2009.

LEITNER, C. HESS, J.; GALHAUP, C.; LUDWIG, R.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D.; HALTRICH, D. Purification and characterization of a laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolor*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 98/100, p. 497-507, 2002.

LONGO, R.M. **Efeito da vinhaça in natura e biodigerida em propriedades de um solo cultivado com cana-de-açúcar**. 1994. 98 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

LONSANE, B.K.; SAUCEDO-CASTANEDAM, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZALES G.; GHILDYAN, N.P.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M.M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems: a review. **Process Biotechnology**, Vandoeuvre Cedex, v. 26, p.1-15, 1991.

MACHADO, C.M.; OISHI, B.O.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Kinetics of *Gibberella fujikori* growth and gibberellic acid production by solid state fermentation in a packed-bed column bioreactor. **Biotechnology Progress**, Vandoeuvre Cedex, v. 20, p. 1449-1453, 2004.

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

MANSUR, M.; ARIAS, M.E.; COPA-PATÍÑO, J.L.; FLÅRDH, M.; GONZÁLEZ, A.E. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. **Mycologia**, Lawrence, v. 95, n. 6, p. 1013–1020, 2003.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 142 p. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2009.

MARTÍNEZ, A.T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTINEZ, M.J.; GUTIÉRREZ, A.; RIO, J.C. del. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, Barcelona, v. 8, p.195-204, 2005.

MATHE, C.; BARRE, A.; JOURDA, C.; DUNAND, C. Evolution and expression of class III peroxidases. **Archives Biochemistry Biophysics**, New York, v. 500, n. 1, p. 58-65, 2010.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochem**, Oxford, v. 60, p. 551–565, 2002.

MENDONÇA, S.F.; TENÓRIO, T.M.; MARQUES, S.K.J. Estudo da incorporação de cinzas do bagaço de cana-de-açúcar em formulações para fabricação de tijolos solo-cimento. In: CONNEPI (CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 7, 2012, Palmas. **Anais... Ciência, tecnologia e inovação: ações sustentáveis para o desenvolvimento regional**. Palmas: UTF, 2012. p. 1-7.

MIDIA NEWS. Etanol de segunda geração: nova possibilidade de combustível renovável. **Agronegócio/Agroenergia**, maio 2012. Disponível em: <<http://www.midianews.com.br/conteudo.php?sid=4&cid=119723>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

MIGO, V.P.; MATSUMURA, M.; ERNESTO, J.D.R. Decolourization of molasses wastewater using an inorganic flocculent. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v. 75, n. 6, p. 438-442, 1993.

MIKOLASCH, A.; SHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 82, p. 605-624, 2009.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. The bioreactor Step of SSF: a complex interaction of phenomena. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. (Ed.). **Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals of design and operation**. Heidelberg: Springer, 2006. p. 13-32.

MOORE, D.; ROBSON, G.; TRINCI, A.P.J. Fungi in ecosystems. In: _____. (Org.). **21st century guidebook to fungi**. New York: Cambridge University Press, 2011. p. 238-245.

MOROZOVA, O.V.; SHUMAKOVICH, G.P.; GORBACHEVA, M.A.; SHLEEV, S.V.; YAROLOV, A.I. Blue laccases. **Biochemistry**, New York, v. 72, n. 10, p. 1136-1150, 2007.

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

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, p. 975, 2002.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, J.N. **Compostagem e vermicompostagem de bagaço de cana-de-açúcar da produção de cachaça de alambique, Salinas-MG**. 2010. 62 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

OLIVEIRA, T.S.; ROCHA JÚNIOR, V.R.; REIS, S.T.; AGUIAR, E.F.; SOUZA, A.S.; SILVA, G.W.V.; DUTRA, E.S.; SILVA, C.J.; ABRE, C.L.; BONALTI, F.K.Q. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com diferentes doses de uréia e soja grão. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, n. 231, p. 625-635, 2011.

ORIOU, E. **Croissance d'*Aspergillus niger* sur milieu solide**: importance de l'éau et de l'activité de l'éau. 1987. 113 p. Thèse de Doctorat Microbiologie, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Toulouse, 1987.

PANDEY, A.; RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. **Enzyme and Microbiology Technology**, New York, v.14, n. 6, p. 486-488, 1992.

PARAIZO, D. **Uso da vinhaça na cultura de cana-de-açúcar**. Curitiba, 2013. Disponível em: <<http://www.novacana.com/cana/uso-vinhaca-cultura/>> Acesso em: 07 maio 2015.

PHILIPPOUSSIS, A.; ZERVAKIS, G.; DIAMANTOPOULOU, P. Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvaceae* and *Pleurotus* spp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.17, p.191-200, 2001.

PIACENTE, F.J. **Agroindústria canavieira e o sistema de gestão ambiental: o caso das usinas localizadas nas bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí**. 2005. 181 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Econômico) – Instituto de Economia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

PITARELO, A.P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento à vapor e hidrólise e enzimática.** 2007. 142 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PÖLÖNEN, I. **Preservation efficiency of formic acid and benzoic acid in the ensiling of slaughterhouse by-products and their subsequent metabolism in farmed fur animals.** 2000. 63 p. Dissertation (Graduation in Agriculture and Forestry) - Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, Helsinki, 2000.

POMPEU, G.B. **Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol.** 2010. 96 p. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PONTES, C.R. **Enriquecimento proteico do bagaço de caju através de fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger*.** 2009. 72 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

POZDNYAKOVA, N.N.; NIKIFOROVA, S.V.; TURKOVSKAYA, O.V. Influence of PAHs on ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus* D1. **Central European Journal of Biology**, Heidelberg, v. 5, n. 1, p. 83–94, 2010.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J.B.; TORNISIELO, V.L. Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 7, p. 975-981, 2001.

RABELO, S.C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** 2007. 150 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

_____. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** 2010. 447 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RABINOVICH, M.L.; BOLOBOVA, A.V.; VASILCHENKO, L.G. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Berlin, v. 40, p. 1-17, 2004.

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, p. 161-179, 2006.

RAJARATHNAM, S. Biopotentialities of the basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 37, p.233-361, 1992.

RAMÍREZ, L.; OQUIZA, J.A.; PÉREZ, G.; LAVÍN, J.L.; OMARINI, A.; SANTOYO, F.; ALFARO, M.; CASTANERA, R.; PARENTI, A.; MUQUERZA, E.; PISABARRO, A.G.. Genomics and transcriptomics characterization of genes expressed during postharvest at 4°C by the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **International Microbiology**, Pamplona, v. 14, p. 111-120, 2011. DOI: 10.2436/20.1501.01.141. ISSN: 1139-6709 www.im.microbios.org.

RIBEIRO, J.J.O. **Caracterização de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* produzidos em resíduos agroindustriais**. 2009. 152 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 55, p. 284-289, 2001.

ROCHA, G.J.M. Metodologia analítica para bagaço e palha de cana. In: WORKSHOP PROGRAMA BIOETANOL, 3., 2009, Brasília. **Anais...** Brasília: Bioetanol, 2009, 1 CD-ROM.

RODRIGUEZ-ZUÑIGA, U. F.; LEMO, V.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Produção de celulasas por fermentação semi-sólida do bagaço de cana submetido a diferentes pré-tratamentos. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 8., 2008, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: UFRJ, 2008. p. 175.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A.D. **Adubação**: resíduos alternativos. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_39_711200516717.html>. Acesso em: 19 maio 2015.

SÁEZ, F.; BALLESTEROS, M.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; OLIVA, J.M.; NEGRO, M.J. Enzymatic hydrolysis from carbohydrates of barley straw pretreated by ionic liquids. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Malden, v. 88, p. 937–941, 2013.

SANTANA, R.S.M. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido**. 2012. 73 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2012.

SANTOS, F.A. **Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico de palhas de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. 2013. 94 p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

SANTOS, F.A.; QUEIROZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, Lemesos, v. 37, p. 19-27, 2012.

SHU, H.Y.; CHANG, M.C.; HSIEH, W.P. Remedy of dye manufacturing process effluent by UV/H₂O₂ process. **Hazardous Materials**, New York, v. 128, p. 60–66, 2006.

SILVA, F.C.; SILVA, R.N.; SILVA, R.L.G.N.P. Avaliação do bagaço de cana-de-açúcar como adsorvente natural na remoção de corantes têxteis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA: MEIO AMBIENTE E ENERGIA, 51, 2011, São Luís. **Anais...** Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2011/trabalhos/13/13-629-9711.htm>>. Acesso em: 09 maio 2014.

SILVA, G.A. **Avaliação das tecnologias de disposição de vinhaça quanto ao aspecto de desenvolvimento ambiental e econômico**. 2012. 208 p. Tese (Doutorado em Térmica de Fluidos) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

SILVA, V.F.N.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A.; GONCALVES, A.R.; ROCHA, G.J.M.; Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Lorena, v. 38, n. 7, p. 809-817, 2010. doi. 10.1007/s10295-010-0815-5

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

SIMONS, K. **Do bagaço ao posto: etanol de segunda geração**. 2013. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfumUAA/bagaco-ao-posto-etanol-segunda-geracao>>. Acesso em: 27 jun. 2015.

SMITH, P.; GREGORY, P.E. Analytical techniques for colour studies. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 14., 1971, New Orleans. **Proceedings...** New Orleans: ISSCT, 1971. p. 1415.

SOARES, P.A.; ROSSELL, C.E.V. **O setor sucroalcooleiro e o domínio tecnológico**. São Paulo: USP, Núcleo de Análise Interdisciplinar de Políticas e Estratégia, 2009. 29 p. (Nova Série, 2).

SOCOL, C.R., VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, New York, v. 13, p. 205-218, 2003.

SOCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAUJO, J.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, Nova York, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.067

SOUZA, G. **Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação de compostos poluentes**. 2012. 111 p. Dissertação (Mestrando em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SOUZA, G.; MONTEIRO, R.T.R. Biodegradação de compostos poluentes por enzimas lignocelulolíticas produzidas por *Pleurotus*, em vinhaça. In: IV SYMPOSIUM ON AGRICULTURAL AND AGROINDUSTRIAL WASTE MANAGEMENT, 5, 2015, Rio de Janeiro. **Anais...** Brasília: Embrapa, 2015. p. 487.

STRONG, P.J. Improved laccase production by *Trametes pubescens* MB89 in distillery wastewaters. **Enzyme Research**, New York, v. 2011, p. 1- 8, 2011. doi:10.4061/2011/379176

STURION, G.L. **Utilização da folha de bananeira como substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp.)**. 1994. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, Lucknow, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

SUNIL, S.M.; RENUKA, P.S.; PRUTHVI, K.; SWETHA, M.; MALINI, S.; VEENA, S.M. Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. **Enzyme Research**, New York, v. 2011, p. 7, 2011. doi:10.4061/2011/248735

SZKLAR, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, New York, v. 81, n. 2, p. 234-240, 1989.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, Londres, v. 140, p. 19-26, 1994.

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

WOLF, L.D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço da cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 2011. 147 p. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

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.

YAROPOLOV, A.I.; SKOROBOGATKO, O.V.; VARTANOV, S.S.; VARFOLOMEYEV, S.D. Laccase-properties, catalytic mechanism, and applicability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 49, p. 257–280, 1994.

ZANETTI, A.L.; RANAL, M.A. Suplementação da cana-de-açúcar com guandu no cultivo de *Pleurotus* sp. 'Florida'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 959-964, 1997.

ZARDO, A.M.; BEZERRA, E.M.; MARTELLO, L.S.; SAVASTANO, H. Utilização da cinza de bagaço cana-de-açúcar como “filler” em compostos de fibrocimento. In: CONFERÊNCIA LATINO-AMERICANA DE CONSTRUÇÃO SUSTENTÁVEL, 1.; ENCONTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA DO AMBIENTE CONSTRUÍDO, 10., 2004, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ANTAC, p. 1-13, 2004.

ZERAIK, A.E.; SOUZA, F.S.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

ZNIDARSIC, P.; PAVKO, A. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. **Food Technology and Biotechnology**, Ljubljana, v. 39, p. 237-252, 2001.

APÊNDICES

Apêndice A – Curva analítica de proteína utilizando 1mg/mL de BSA (soro de albumina bovina) (BRADFORD, 1976)

ANEXOS

Anexo A – Atividade da lacase (U.L.⁻¹) em meio FSS sob diferentes substratos de pré-tratamento de bagaço, durante o período de 7 a 12 dias de cultivo de *P. ostreatus*

Tempo (dias)	TS1	TS2	TS3	TS4
7	12,03 Bb	12,18 Bb	26,81 Ba	33,1 ABa
10	14,22 Bc	28,07 Abc	65,37 Aa	41,1 Ab
12	24,28 Aa	28,58 Aa	32,36 Ba	28,71 Ba

TS1. Bagaço pré-tratado 1 em FSS; TS2. Bagaço pré- tratado 2 em FSS; TS3. Bagaço pré- tratado 3 em FSS; TS4. Bagaço pré- tratado 4 em FSS. Tukey ($p \leq 0,05$)

Letras maiúsculas compara os diferentes dias do mesmo tratamento (colunas). Letras minúsculas compara os diferentes tratamentos (linhas)

Anexo B – Atividade da peroxidase em meio FSS sob diferentes substratos de pré-tratamento de bagaço, durante o período de 7 a 12 dias de cultivo *P. ostreatus*

Tempo (dias)	TS1	TS2	TS3	TS4
7	18,78 Abc	12,79 ABc	25,21 Aab	31,86 Aa
10	15,19 Ab	15,11 Ab	30,92 Aa	18,74 Bb
12	16,28 Aa	9,88 Bb	10,29 Bb	16,16 Ba

TS1. Bagaço pré-tratado 1 em FSS; TS2. Bagaço pré- tratado 2 em FSS; TS3. Bagaço pré- tratado 3 em FSS; TS4. Bagaço pré- tratado 4 em FSS. Tukey ($p \leq 0,05$)

Letras maiúsculas compara os diferentes dias do mesmo tratamento (colunas). Letras minúsculas compara os diferentes tratamentos (linhas)

Anexo C – Atividade da lacase (UI.L⁻¹) produzida por *P. ostreatus* durante cultivo em meio líquido (FSm) contendo bagaço pré-tratamento e/ou vinhaça após diferentes após 7, 10 e 12 dias

Vinhaça V1	Tempo (dias)	TL1	TL2	TL3	TL4	VL1
	7	49,62 Ca	41,86 Ca	46,13 Ba	54,29 Ba	58,51 Ca
	10	452,9 Bb	541,67 Ba	196,59 Ac/d	112,23 Ad	267,92 Bc
	12	784,91 Aa	707,48 Aa	148,54 Ac	123,33 Ac	395,35 Ab

Vinhaça V2	Tempo (dias)	TL1	TL2	TL3	TL4	VL2
	7	1,89 Bb	1,35 Bb	31,44 Aa	30,35 Aa	43,85 Aa
	10	8,54 Bb	3,21 Bb	2,21 Bb	1,13 Bb	47,45 Aa
	12	41,84 Aa	36,83 Aa	2,31 Bb	2,05 Bb	34,29 Aa

TL1. Bagaço pré- tratado 1 em FSm; TL2. Bagaço pré- tratado 2 em FSm; TL3. Bagaço pré-tratado 3 em FSm; TL4. Bagaço pré- tratado 4 em FSm; VL1. Vinhaça 1 pura e VL2. Vinhaça 2 pura em FSm. Tukey ($p \leq 0,05$)

Letras maiúsculas compara os diferentes dias do mesmo tratamento (colunas). Letras minúsculas compara os diferentes tratamentos (linhas)

Anexo D - Atividade da peroxidase (UI.L⁻¹) produzida por *P. ostreatus* durante cultivo em meio líquido (FSm) contendo bagaço pré-tratamento e/ou vinhaça após diferentes após 7, 10 e 12 dias

Vinhaça V1	Tempo (dias)	TL1	TL2	TL3	TL4	VL1
	7	76,54 Bc	49,94 Bc	115,10 Aa	82,34 Ab	79,49 Cbc
	10	125,07 Aa	115,16 Aa	109,64 Aa	73,94 Ab	110,79 Ba
	12	133,11 Aa	131,16 Aa	65,96 Bb	61,07 Ab	126,06 Aa

Vinhaça V2	Tempo (dias)	TL1	TL2	TL3	TL4	VL2
	7	24,02 Ab	19,83 Ab	41,40 Aa	31,56 Aab	28,25 Ab
	10	25,99 Aa	17,28 Ab	9,25 Bbc	8,15 Bc	27,06 Aa
	12	28,49 Aa	18,18 Ab	4,60 Bc	6,30 Bc	24,58 Aa

TL1. Bagaço pré- tratado 1 em FSm; TL2. Bagaço pré- tratado 2 em FSm; TL3. Bagaço pré-tratado 3 em FSm; TL4. Bagaço pré- tratado 4 em FSm; VL1. Vinhaça 1 pura e VL2. Vinhaça 2 pura em FSm. Tukey ($p \leq 0,05$)

Letras maiúsculas compara os diferentes dias do mesmo tratamento (colunas). Letras minúsculas compara os diferentes tratamentos (linhas)