UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

GEORGIA BERTONI POMPEU

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

Piracicaba
2010

GEORGIA BERTONI POMPEU

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

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro

Piracicaba
2010

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Pompeu, Georgia Bertoni
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 / Georgia Bertoni Pompeu; orientadora Regina Teresa Rosim Monteiro. - - Piracicaba, 2010.
96 p.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Ativação enzimática 2. Biodegradação 3. Enzimas celulolíticas 4. Fungos 5. Superóxido dismutase I. Título

CDU 577.152.3:633.61

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro, pela oportunidade, respeito, orientação e amizade;

À Profa. Dra. Sandra Helena da Cruz, pelas sugestões e pela amizade;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pela amizade e por manter sempre as portas do seu laboratório abertas;

À técnica do Laboratório de Ecologia Aplicada, Rosângela, pela ajuda, pelas conversas e pela amizade;

Aos queridos amigos do Laboratório de Ecologia Aplicada: Gabriela, Nuno, Tâmara, Carlos, Cecília, Rita, Samantha, Sabrina, Rachel e Alexandre e, em especial, a Cristiane, Vivian, Mário e Luiz Fernando, que contribuíram diretamente com o trabalho e Ana, Sérgio e Gleison, pela amizade e companheirismo na fase final do trabalho;

Aos queridos amigos e colegas do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas: Salete, Priscila, Paula, Flavia, Carol, Gicka, Bertha, Manu, Dai, Sandra, Mônica, Lucas, Rogério e Fernando.

A todos os professores, funcionários e alunos do CENA e da gloriosa ESALQ, que contribuíram para minha formação e desenvolvimento do meu projeto;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Dr. João Batista Martins Neto, pelos intermináveis e utilíssimos questionamentos;

Aos meus pais, Jorgino e Maria Ivone, aos meus irmãos, Ricardo (e Gisele) e Marcelo, pelo apoio, compreensão, amizade e sugestões e ao meu filho Lucas, pela sua ternura e pelo meu amor incondicional por você, sempre!

Sabedoria

"Os sábios não se lamentam pelos ignorantes nem pelos eruditos se regozijam, economizam palavras e tomam atitudes, sempre motivados pela necessidade imediata de cada momento. Sabedoria não se conquista com conhecimento nem tampouco pela falta de estudo, é a constante atenção ao processo de vida e a ousadia de participar dela que torna uma alma mais ou menos sábia. Além disso, a percepção direta e indiscutível da vida que vive através do que chamamos de nossas vidas evoca a resposta sábia, o entusiasmo de entregar-se à realidade superior e fazer parte dela com íntima e inabalável alegria. Amor e sabedoria andam de mãos dadas, porque assim como não somos nós que vivemos, mas a vida que vive através de nós, tampouco amamos, é o amor que ama através de nós."

Oscar Quiroga

RESUMO

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. 96p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Estima-se que o Brasil produza no ano de 2010 cerca de 160 milhões de toneladas de bagaço e palha de cana-de-açúcar. O bagaço é um subproduto decorrente do esmagamento da cana, constituído por fibras, partículas de terra e resíduos de caldo. A palha é o material remanescente encontrado na superfície da área plantada, após a colheita, constituída por frações de folhas, ponteiros, colmos e raízes. Estes subprodutos são utilizados como fonte de energia dentro das próprias usinas e destilarias. Porém, com o interesse mundial voltado para o uso de outras fontes de energia, além do petróleo, a importância do emprego destes substratos na produção de etanol, aumentou. As fibras presentes nestes subprodutos são constituídas principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Os mecanismos enzimáticos envolvidos na degradação destes materiais, resultando na conversão da biomassa em produtos de alto valor agregado, são bastante complexos, necessitando da participação de enzimas lignocelulolíticas produzidas, sobretudo por fungos. Este estudo visou à caracterização enzimática lignocelulósica e a liberação de açúcares redutores por fungos ligninolíticos e celulolíticos, expostos a duas concentrações de nitrogênio e o comportamento destes organismos perante situação de estresse nutricional. Os fungos utilizados foram *Pleurotus sajor caju*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*, selecionados em trabalhos anteriores. Estes organismos foram inoculados em frascos Erlenmeyers, contendo bagaço e palha de cana pré-tratados com H_2SO_4 (0,5%) e duas concentrações de nitrogênio (0,5% e 1% de extrato de levedura), por 15 dias. Diariamente, foram coletadas amostras e analisadas quanto à concentração de proteínas, atividade específica de Lacase, Peroxidases, Manganês peroxidase, Endoglicanases, atividade celulolítica total, Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e quantificação de açúcares redutores. A enzima SOD foi analisada através de PAGE não desnaturante e o perfil protéico observado em SDS-PAGE. As demais análises foram realizadas em espectrofotômetro. O meio contendo 0,5% de extrato de levedura foi favorável ao crescimento dos fungos *P. sajor caju* e *T. reesei*, e o meio com 1% de extrato foi favorável à *P. chrysosporium* e *A. niger*. Quanto à produção das enzimas ligninolíticas (µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}), a maior produção de Lacase foi observada em *P. sajor caju* (2,2; 1%; 13º dia), de Peroxidases também para *P. sajor caju* (1,5; 1%; 12º dia) e MnP para *T. reesei* (0,172; 1%; 4º dia). A maior atividade celulolítica total (FPU.mg proteína^{-1}) e de Endoglicanases (CMC.mg proteína^{-1}) foi observada para *T. reesei* (10,1 e 20,6; 0,5%; 7º dia, respectivamente). Quanto à maior liberação de açúcares redutores, *P. chrysosporium* (0,757 mgAR.gBS^{-1}; 1%; 9º dia). Foram observadas até quatro isoformas de SOD que variaram entre os fungos, concentrações de nitrogênio e dias. As maiores atividades de CAT (µmol.min^{-1}.mgproteína^{-1}) foram observadas para *P. sajor caju* (0,811; 5º dia), *T. reesei* (0,726; 1º dia), *P. chrysosporium* (0,441; 3º dia) e *A. niger* (0,194; 10º dia), todos na concentração de 0,5%. As espécies, as concentrações de nitrogênio e o período de incubação influenciaram no crescimento, nas atividades enzimáticas e na liberação de açúcares redutores dos fungos.

Palavras-chave: *P. sajor caju. T. reesei.* Lacase. Celulases. EAOs. Etanol.

ABSTRACT

POMPEU, G. B. **Enzymatic behavior of four lignocellulolytic fungi grown on sugarcane bagasse and straw, exposed to two concentrations of nitrogen, aiming the production of ethanol.** 2010. 96p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

It is estimated that Brazil will produce in 2010 about 160 million tons of sugarcane bagasse and straw. The bagasse is a byproduct resulting from the crushing of sugarcane, consisting of fibers, particles of dirt and waste broth. The straw is the material found on the surface of the remaining crop, after harvest, consisting of fractions of leaves, pointers, stems and roots. These products are used as an energy source within their own mills and distilleries. However, with the global interest focused on the use of other energy sources instead of petroleum, the importance of using these substrates in ethanol production increased. The fibers in these products are composed primarily of cellulose, hemicellulose and lignin. The mechanisms involved in enzymatic degradation of these materials, resulting in conversion of biomass into high value added products, are quite complex, requiring the participation of lignocellulolytic enzymes produced mainly by fungi. This study aimed to a lignocellulosic enzymatic characterization and the release of reducing sugars by ligninolytic and cellulolytic fungi exposed to two concentrations of nitrogen and the behavior of these organisms against a nutritional stress situation. The fungi used were *Pleurotus sajor caju*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*, selected from previous work. These organisms were inoculated in Erlenmeyer flasks containing sugarcane bagasse and straw pretreated with H_2SO_4 (0.5%) and two concentrations of nitrogen (0.5% and 1% yeast extract) for 15 days. Daily samples were collected and analyzed for proteins concentration, specific activity of Laccase, Peroxidases, Manganese Peroxidase, Endoglucanases, total cellulolytic activity, Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and quantification of total sugar. The enzyme SOD was analyzed by native PAGE gels and the protein profile observed in SDS-PAGE. Other analyses were performed on a spectrophotometer. The medium containing 0.5% yeast extract was favorable to the growth of fungi *P. sajor caju* and *T. reesei* and the medium with 1% extract favored *P. chrysosporium* and *A. niger*. Regarding the production of lignilolytic enzymes ($\mu mol.min^{-1}.mg\ protein^{-1}$), the highest activity of Laccase was found in *P. sajor caju* (2.2, 1%, 13 days), for Peroxidases also in *P. sajor caju* (1.5, 1%, day 12) and MnP in *T. reesei* (0.172, 1%, day 4). The highest total cellulolytic activity ($FPU.mg\ protein^{-1}$) and Endoglucanases ($CMC.mg\ protein^{-1}$) was observed for *T. reesei* (10.1 and 20.6, 0.5%, day 7, respectively). As for the highest release of total sugars, *P. chrysosporium* (0.757 $mgAR.gBS^{-1}$, 1%, 9 day). It was observed up to four SOD isoforms that varied from fungi, nitrogen concentrations and days. The highest CAT activities ($\mu mol.min^{-1}.mg\ protein^{-1}$) were observed for *P. sajor caju* (0.811, 5 days), *T. reesei* (0.726, day 1), *P.* chrysosporium (0.441, day 3) and *A. niger* (0.194, 10 days), all at 0.5% concentration. The species, nitrogen concentrations and the period of incubation influenced the growth, the enzymatic activity and the release of total sugars in the fungi.

Key-words: *P. sajor caju. T. reesei.* Laccase. Cellulases. ROS. Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (A) *Pleurotus sajor caju* CCB 020, (B) *Phanerochaete chrysosporium*, (C) *Trichoderma reesei*, e (D) *Aspergillus niger* em meio MEA, com 8 dias de incubação a 28±2°C.....39

Figura 2 – Perfil enzimático da Lacase, em µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}, produzida pelos fungos (A) *P. sajor caju*, (B) *P. chrysosporium*, (C) *T. reesei* e (D) *A. niger*, crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C.....53

Figura 3 – Perfil enzimático das Peroxidases, em µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}, produzidas pelos fungos (A) *P. sajor caju*, (B) *P. chrysosporium*, (C) *T. reesei* e (D) *A. niger*, crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C.....54

Figura 4 – Perfil enzimático da MnP, em µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}, produzida pelos fungos (A) *P. sajor caju*, (B) *P. chrysosporium*, (C) *T. reesei* e (D) *A. niger*, crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C.....55

Figura 5 – Perfil enzimático da atividade celulolítica total, em FPU.mg proteína^{-1}, produzida pelos fungos (A) *P. sajor caju*, (B) *P. chrysosporium*, (C) *T. reesei* e (D) *A. niger*, crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C.....60

Figura 6 – Perfil enzimático das Endoglicanases, em CMC.mg proteína^{-1}, produzidas pelos fungos (A) *P. sajor caju*, (B) *P. chrysosporium*, (C) *T. reesei* e (D) *A. niger*, crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C.....61

Figura 7 – Quantificação dos açúcares redutores (ARs) liberados do bagaço e palha de cana-de-açúcar secos (BS) (mgAR.gBS^{-1}) pelos fungos (A) *P. sajor caju*, (B) *P. chrysosporium*, (C) *T. reesei* e (D) *A. niger*, em meio contendo 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por um período de 15 dias, à 28±2°C.....64

Figura 8 – Atividade de SOD em PAGE não desnaturante. (P) padrão SOD de fígado bovino; (1) *P. sajor caju* 0,5%; (2) *P. sajor caju* 1%; (3) *P. chrysosporium* 0,5%; (4) *P. chrysosporium* 1%; (5) *T. reesei* 0,5%; (6) *T. reesei* 1%; (7) *A. niger* 0,5%; (8) *A. niger* 1%; (9) controle abiótico. Dias 1 (A), 2 (B), 3 (C), 5 (D), 7 (E), 10 (F), e 15 (G).....67

Figura 9 – Atividade específica da enzima Catalase (µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}) produzida pelos fungos (A) *P. sajor caju* e *P. chrysosporium*, (B) *T. reesei* e *A. niger*, em meio contendo 0,5% ou 1% de extrato de levedura, durante os dias 1, 2, 3, 5, 7, 10 e 15, à 28±2°C.....68

Figura 10 – Concentração de proteína (mg.mL de amostra^{-1}) dos fungos (A) *P. sajor caju* e *P. chrysosporium*, (B) *T. reesei* e *A. niger*, em meio com 0,5% e 1% de extrato de levedura, por um período de 15 dias, à 28±2°C.....71

Figura 11 – Proteína em gel SDS-PAGE onde, (P) padrão BSA; (1) *P. sajor caju* 0,5%; (2) *P. sajor caju* 1%; (3) *P. chrysosporium* 0,5%; (4) *P. chrysosporium* 1%; (5) *T. reesei* 0,5%; (6) *T. reesei* 1%; (7) *A. niger* 0,5%; (8) *A. niger* 1%; e (9) controle abiótico, 10º dia do experimento.....71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Maiores atividades enzimáticas de Lacase, em µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1} e UI.L^{-1}, produzidas pelos fungos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C.....52

Tabela 2 – Maiores atividades enzimáticas de Peroxidases, em µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1} e UI.L^{-1}, produzidas pelos fungos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C.....52

Tabela 3 – Maiores atividades enzimáticas de MnP, em µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1} e UI.L^{-1}, produzidas pelos fungos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C.....52

Tabela 4 – Maiores atividades enzimáticas de Lacase, Peroxidases e MnP, em UI.L^{-1}, produzidas pelo fungo *P. sajor caju* crescido em meio líquido ou sólido, por 15 dias, a 28±2°C, segundo Ferreira (2009) e Aguiar Filho (2008).....56

Tabela 5 – Maiores atividades enzimáticas de Lacase, Peroxidases e MnP, em UI.L^{-1}, produzidas pelos fungos *T. reesei e A. niger* crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar com vinhaça, meio líquido mineral ou farelo de soja, por 15 dias, a 28±2°C, segundo Aguiar Filho (2008) e Fasanella (2008).....58

Tabela 6 – Maiores atividades celulolítica total (FPU. mg proteína^{-1} e FPU.mL^{-1}) produzidas pelos fungos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C.....59

Tabela 7 – Maiores atividades de Endoglicanases (CMC.mg proteína^{-1} e CMC.mL^{-1}) produzidas pelos fungos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C.....59

Tabela 8 – Maiores atividades enzimáticas de Exoglicanases e Endoglicanases, em FPU (unidades.mL^{-1}) e CMC (unidades.mL^{-1}), produzidas pelos fungos *P. sajor caju* e *T. reesei* crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar com vinhaça ou meio líquido mineral, por 15 dias, a 28±2°C, segundo Aguiar Filho (2008).....62

Tabela 9 – Maiores concentrações de AR, em mg.gBS^{-1} e mg.mL^{-1}, liberados pelos fungos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C.....63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....16
2.1 Cana-de-açúcar.....16
2.2 Parede celular e seus componentes.....18
2.3 Pré-tratamento do bagaço e da palha da cana-de-açúcar.....20
2.4 Degradação enzimática da lignina.....22
2.4.1 Lacase.....24
2.4.2 Peroxidases 25
2.4.3 Manganês peroxidase 25
2.4.4 Lignina peroxidase e outras enzimas relacionadas com a degradação da lignina.....26
2.5 Hidrólise enzimática da celulose.....27
2.5.1 Endoglinanase 28
2.5.2 Exoglicanase 29
2.5.3 β-glicosidase 29
2.6 Fungos celulolíticos e lignocelulolíticos.....30
2.7 Sistema enzimático antioxidante.....32
2.7.1 Superóxido dismutase.....33
2.7.2 Catalase.....34
2.8 Produção de etanol.....36
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....38
3.1 Bagaço e palha de cana-de-açúcar.....38
3.2 Fungos.....38
3.2.1 Manutenção das culturas dos fungos em grão de trigo.....38
3.2.2 Cultivo dos fungos.....39
3.3 Metodologia para produção das enzimas ligninolíticas.....40
3.3.1 Determinação da atividade enzimática da Lacase.....41
3.3.2 Determinação da atividade enzimática das Peroxidases.....41
3.3.3 Determinação da atividade enzimática da Manganês peroxidase.....42
3.4 Metodologia para produção das enzimas celulolíticas.....42
3.4.1 Determinação da atividade celulolítica total.....43
3.4.2 Determinação da atividade enzimática das Endoglicanases.....43

3.4.3 Curva padrão de glicose.....44
3.4.4 Cálculo da atividade celulolítica total.....44
3.4.5 Cálculo da atividade enzimática das Endoglicanases.....45
3.4.6 Cálculo da concentração de açúcares redutores.....46
3.5 Determinação das enzimas antioxidantes.....46
3.5.1 Extração protéica.....46
3.5.2 Atividade de Superóxido dismutase (SOD).....47
3.5.3 Atividade de Catalase (CAT).....48
3.6 Determinação das proteínas totais.....48
3.7 Gel SDS-PAGE.....48
3.8 Análise estatística.....49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....50
4.1 Enzimas ligninolíticas.....51
4.2 Enzimas celulolíticas.....59
4.3 Açúcares redutores.....63
4.4 Enzimas antioxidantes.....65
4.5 Quantificação de proteínas e variação do perfil protéico.....70
5 CONCLUSÕES.....73
REFERÊNCIAS.....74
ANEXOS.....88

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com cerca de sete milhões de hectares de área plantada, seguido por Índia, Tailândia e Austrália (UNICA, 2010). Esta cultura é totalmente aproveitada, desde a produção de açúcar e álcool até a utilização dos subprodutos como bagaço, palha e vinhaça (RIPOLI; RIPOLI, 2004). Pesquisas utilizando o bagaço e atualmente a palha da cana visam o emprego destes subprodutos, ricos em fibras como a celulose, na produção de etanol, chamado então de bicombustível de segunda geração.

Segundo a UNICA (União da Indústria de Cana-de-Açúcar), a safra de cana estimada para este ano (2010) é de 573,8 milhões de toneladas. Deste total 56% deverão ser destinados à produção de etanol (26,4 bilhões de litros) e os 44% restantes deverão ser utilizados na produção de açúcar (33,7 milhões de toneladas) (AGROSOFT BRASIL, 2010b).

O estudo das enzimas que degradam a celulose, chamadas de celulases, iniciou-se no pós-guerra (década de 50), nos Estados Unidos, com o objetivo de bioconversão de materiais lignocelulósicos visando à produção de combustível (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004).

A celulose é um carboidrato proveniente da biomassa terrestre e marítima, com uma taxa de síntese de aproximadamente $4x10^{10}$ toneladas.ano^{-1} estimulando pesquisas para sua utilização como combustível de fonte renovável (BÉGUIN, 1990). É geralmente encontrada na forma de complexos que afetam sua degradação natural tanto quanto a atividade microbiana (LESCHINE, 1995).

A hidrólise enzimática da celulose é um processo complexo que requer a participação de diversas enzimas celulolíticas sendo as de origem fúngicas as mais estudadas. O mecanismo clássico da degradação enzimática da celulose envolve a ação sinérgica por parte das endoglicanases e exoglicanases. Estas enzimas hidrolisam a celulose na forma sólida em componentes solúveis enquanto a β-glicosidase catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas levando ao aparecimento de duas moléculas de glicose livres na forma solúvel (ZHANG, 2006). Entretanto, para atingir a celulose, é necessária a degradação de outros polímeros que se encontram fixados a celulose, principalmente hemicelulose, lignina e pectina (ENARI, 1983).

A proposta deste trabalho foi estudar o comportamento enzimático de fungos com potencial para a produção de enzimas celulolíticas e ligninolíticas que degradam o complexo lignocelulósico do bagaço e da palha da cana, permitindo o acesso à glicose presente na celulose. Para tanto, foram utilizados os fungos *Pleurotus sajor caju*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*, os quais secretam ampla variedade de

enzimas extracelulares. Além disso, foram quantificados os açúcares redutores a fim de uma posterior identificação e possível fermentação do material. Para finalizar, foram analisadas duas enzimas que participam do mecanismo de defesa dos fungos quanto a condições de estresse, com o intuito de verificar se os meios de cultivo destes materiais podem interferir no comportamento destes organismos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea cultivada em regiões tropicais e subtropicais, apresentando a propriedade de sintetizar e armazenar significativa quantidade de sacarose (entre 14 a 24%) em seus tecidos de reserva (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

É uma cultura semi-perene, permitindo cerca de cinco cortes. Dependendo da variedade utilizada e da época do ano que será realizado o plantio, devem ser plantadas de 12 a 16 gemas por metro, evitando assim falhas no canavial. No estado de São Paulo as variedades de cana estão divididas em três blocos: cana de ano e meio (plantada entre fevereiro e maio, possuindo boa produtividade e tempo de crescimento de 15 a 18 meses, com variedades precoces, médias e tardias); cana de inverno (plantada entre final de maio a agosto/setembro, desenvolvendo-se no período de baixas temperaturas, utilizadas quando há possibilidade de irrigação e seu tempo de crescimento é de 12 a 14 meses); e por fim, a cana de ano (plantada entre setembro e novembro, no inicio das chuvas da primavera, exigindo solos férteis, devendo ficar prontas para a colheita do meio para o final da safra, havendo à necessidade de tratos culturais como controle de pragas e ervas daninha) (UNICA, 2010).

A planta é composta por duas partes: uma subterrânea (rizomas e raízes) e outra aérea (colmo, folhas e flores). O colmo é constituído de nós e entrenós e possui um sistema com duas fases, a fase insolúvel, também chamada de fibra, constituída por celulose, hemicelulose e lignina e a fase solúvel cujo caldo contém água e substâncias orgânicas, dentre as quais a sacarose. A função do colmo é de suportar a parte aérea, conduzir água e nutrientes do solo para as folhas onde os açúcares são sintetizados, transportar estes carboidratos para as outras partes da planta e armazenar sacarose e outras substâncias (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

A composição química do colmo é influenciada pelo clima, propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, tipo de cultivo empregado, variedade, estágio de maturação e idade da planta, sendo que a variação desta composição ocorre quantitativamente. Qualitativamente, é semelhante em todas as variedades, sendo constituída de água (±70%), matéria orgânica (±25%) e matéria mineral (±0,5%). Estes constituintes não se encontram nas mesmas proporções nas diferentes partes do colmo (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

Depois de colhida, a cana é transportada para a indústria, onde é lavada, picada e seu caldo é extraído. O caldo passa por peneiras e tratamento químico para regular o pH. Em seguida, é aquecido a 105ºC, passando depois pelo processo de purificação para a retirada de resíduos. É decantado e, por meio da evaporação, é concentrado, recebendo o nome de xarope. Para a produção de açúcar, o xarope passa pelo processo de cristalização por cozimento ou por resfriamento. Dos cristalizadores, o açúcar passa para a fase de centrifugação e, em seguida, pela secagem. O açúcar é então transferido para sacos de 50 quilos. Para a obtenção do álcool, o caldo é fermentado, após tratamento de purificação por meio da pasteurização. A fermentação ocorre em tanques, obtendo-se teor alcoólico de 7 a 10%, passando a se chamar vinho. O vinho é então resfriado e centrifugado para separar as leveduras, passando, em seguida, para as colunas de destilação. O álcool resultante é o hidratado, a 96º GL. O anidro passa por outro processo de desidratação para chegar a 99,7º GL. (UNICA, 2010).

Relatou-se que esta planta pode ser totalmente aproveitada. Após o corte, as pontas da cana, que ficam no campo, podem ser usadas como adubo ou ração. O bagaço obtido após a moagem dos colmos pode ser aproveitado, entre outros, na geração de energia. (informação pessoal)[1]. Após a fermentação do caldo, as leveduras empregadas no processo podem servir como ração animal. Seguido da destilação, a vinhaça produzida pode ser usada na fertirrigação e por fim, após a concentração do caldo, a borra pode ser empregada como ração animal (O NOVO CICLO DA CANA, 2005).

O processamento de uma tonelada de cana gera, em média, 280 kg de bagaço (VITTI et al., 1998). Este subproduto é constituído por celulose (±45%), hemicelulose (±25%) e lignina (±20%), com pequenas quantidades de outros compostos classificados como componentes estranhos (O NOVO CICLO DA CANA, 2005; VIEIRA et al., 2007). Além de ser utilizado como gerador de energia, substituindo os combustíveis fósseis e a madeira, o bagaço também pode ser aproveitado na alimentação animal, na produção de papel e de produtos empregados na síntese de compostos orgânicos aplicados na indústria química e farmacêutica (RIPOLI; RIPOLI, 2004).

A palha é utilizada em conjunto com o bagaço na geração de energia elétrica nas usinas (RIPOLI; RIPOLI, 2004). Sua composição química consiste em celulose (±45%), hemicelulose (±25%), lignina (±12%), matéria orgânica (±4,3%), cinzas (±8%) e

[1] COUTINHO, E.P. Dinâmica da modernização do setor de produção de aguardente de cana-de-açúcar no Brasil: construindo uma cachaça de qualidade. 2001. Tese (Doutorado) - COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 2001.

umidade (±9,7%) (ROSSELL, 2006). A palha tem sido considerada um dos resíduos mais preocupantes devido à colheita mecanizada e a lei estadual de São Paulo (Lei nº. 11.241 de 19/09/2002) que determina que a queima desta seja progressivamente reduzida até 2031. Porém, este prazo foi reduzido para o ano de 2014, através de decisão tomada pelos próprios plantadores de cana-de-açúcar (informação verbal)[2].

A cana constitui uma fonte de energia abundante e renovável. O seu uso e dos seus subprodutos têm resultado em diversos estudos científicos, visando seu máximo aproveitamento, não somente na geração de vapor e eletricidade para as indústrias, mas também como matéria prima para produção de álcool (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005; PIETROBON, 2008).

2.2 Parede celular e seus componentes

A parede celular das plantas superiores é constituída por carboidratos (até 90%) e proteínas (até 10%). Estas paredes são compostas por celulose, hemicelulose, lignina, substâncias pécticas e proteínas. A proporção e a distribuição destes componentes são variáveis, de acordo com as células de diferentes tecidos, idade e condições ambientais. As paredes são formadas por duas camadas, chamadas de lamela média e parede primária. Uma camada parietal, chamada de parede secundária, é constituída por depósito de células (WULFF, 2002). Este conjunto recebe o nome de estrutura lignocelulósica (BON et al., 2008).

A lamela média está localizada entre as paredes primária e secundária. Constituída por substâncias pécticas (galacturononanas, ramnogalacturonanas, arabinanas, galactanas e arabinogalactanas) e hemicelulose, sua diferenciação com a parede primária é dificultada principalmente nas células que formam paredes secundárias espessas. A parede primária, formada antes e durante o crescimento celular, é constituída por celulose (glicana β-D-1,4), hemicelulose (xiloglicana), pectina (ácido α-1,4-D-poligalacturônico) e proteínas ricas em hidroxiprolina. A parede secundária contém maior quantidade de celulose do que a parede primária, sendo, portanto, mais rígida e resistente. Encontram-se também hemicelulose, pectinas e lignina (RAVEN et al., 2001).

---

[2] Prof. Dr. André Ricardo Alcarde, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Setor de Açúcar e Álcool, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"; Universidade de São Paulo, em 2008.

As fibras são um conjunto de substâncias insolúveis em água, constituídas principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. O teor ideal de fibras na cana está na faixa de 10 a 16%. Os altos teores destas dificultam a extração do caldo que se encontram retidos nas células do tecido parenquimatoso. Neste caso, para a extração, há necessidade de um preparo da planta para moagem, conseguido pela desintegração e rompimento das células e do aumento da embebição, que é eficiente à extração, porém dificulta as demais fases do processamento da cultura para produção de açúcar e álcool. O baixo teor de fibra diminui a produção de bagaço e palha, provocando o desequilíbrio térmico da usina, que se utiliza então da queima de lenha ou de óleo (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005).

A celulose é um polímero linear, parte cristalino e parte amorfo, constituído por unidades de β-D-glicopiranose unidas através de ligações glicosídicas β-(1, 4) formando cadeias longas e paralelas e com massa molecular que varia entre 50 mil e 2,5 milhões de Dalton, dependendo da sua origem. É composta por unidades monoméricas de celobiose, a qual é formada pela junção de duas moléculas de glicose seguida da eliminação da água através das hidroxilas ligadas ao carbono 1 e 4 (FENGEL; WEGENER, 1989). Segundo Leschine (1995), a celulose é considerada o biopolímero mais abundante do ambiente terrestre, sendo que, a cada ano, mais de 10^{11} toneladas de CO_2 são fixadas por meio da fotossíntese derivada de material vegetal, e metade desse material consiste em celulose, que também possui propriedade semicristalina, dificultando sua degradação (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004).

As hemiceluloses são um conjunto de heteropolissacarídeos, incluindo glicanas, mananas, arabinanas e xilanas. Estas últimas são os polissacarídeos mais comuns entre as hemiceluloses, compostas de unidades D-xilopiranosil com ligações β-(1, 4) e são os componentes principais das paredes secundárias, apresentando baixo grau de ramificações (ASPINALL, 1980). São classificadas de acordo com os açúcares residuais presentes, que podem ser pentoses ou hexoses, como xilose e glicose, respectivamente (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004).

A celulose consiste em unidades de glicose ligadas entre si, com alto grau de polimerização, formando um arranjo fibroso, com regiões cristalinas e amorfas, pode ser atacada lentamente por ácidos inorgânicos diluídos e é insolúvel em álcalis. Entretanto, a hemicelulose consiste em diversas unidades de pentoses e hexoses ligadas entre si, com baixo grau de polimerização, não forma arranjo fibroso, apresentando somente regiões amorfas, sendo atacada rapidamente por ácidos inorgânicos diluídos e é solúvel em álcalis. Estas

características são importantes para o melhor aproveitamento de biomassas lignocelulósicas como matéria prima para produção de etanol (BON et al., 2008).

A lignina é uma macromolécula constituída de unidades de fenilpropano, apresentando uma conformação tridimensional e amorfa, representando de 20% a 30% do total dos lignocelulósicos. Devido ao seu mecanismo de biossíntese, o acoplamento das unidades de fenilpropano ocorre de maneira irregular e não repetitiva. Vários tipos de ligações entre as unidades de fenilpropano são observados como: β-O-4 e α-O-4 (50 a 65%), β-5 (6 a 15%), β-1 (9 a 15%), 5-5 (2 a 9%) e β-β (2 a 5%) (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004). É um dos principais componentes da parede secundária. A lignificação começa na lamela média, espalhando-se pela parede primária e, atingindo por fim, a parede secundária (RAVEN et al., 1976; WULFF, 2002).

As substâncias pécticas constituem um grupo complexo de polissacarídeos das paredes celulares primárias e regiões intercelulares das plantas superiores. Abrangem a pectina, o éster metílico, o ácido péctico desesterificado e seus sais (pectatos), além de polissacarídeos neutros sem a estrutura principal galacturonana. A pectina é o principal constituinte das substâncias pécticas. É uma cadeia linear de unidades de ácido D-galacturônico no qual proporções variáveis dos grupos ácidos (40 a 60%) estão presentes como ésteres metílicos (PRADE et al., 1999; GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004).

A matriz extracelular vegetal contém diversas classes de proteínas, as quais podem ser covalentemente ligadas na parede celular ou podem ser solúveis em grau variado. As glicoproteínas, ricas em hidroxiprolina e prolina, acompanham a diferenciação do tecido vegetal podendo apresentar funções como a rigidez da parede celular (ASPINALL, 1980; WULFF, 2002).

2.3 Pré-tratamento do bagaço e da palha da cana-de-açúcar

O processo de produção de etanol a partir do bagaço e da palha da cana necessita da transformação da celulose e hemicelulose em monômeros, como glicose e xilose e, em seguida, a conversão destes em etanol, por meio da ação de microrganismos, como as leveduras. A celulose encontra-se protegida pelas fibras de lignina e hemicelulose de modo que o processo de conversão da celulose em glicose é bastante lento. Portanto, é necessária a realização de um pré-tratamento do bagaço e da palha de modo a aumentar à exposição das fibras de celulose, tornando-as mais acessíveis aos agentes hidrolíticos, como as enzimas (BAUDEL, 2006).

Os fatores que afetam a hidrólise da celulose incluem a porosidade do material (superfície de acesso), cristalinidade da fibra e conteúdo de lignina e hemicelulose (SUN; CHENG, 2002). Existem vários métodos disponíveis para o pré-tratamento dos materiais lignocelulolíticos, como os pré-tratamentos físico (moagem, aquecimento, irradiação), físico-químico (explosão com vapor, explosão com amônia, explosão com gás carbônico), químico (hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa), biológico (tratamentos com fungos) e/ou uma combinação de métodos (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996; FASANELLA, 2008, BON et al., 2008).

Os métodos químicos mais comuns de pré-tratamentos usados para resíduos celulósicos são ácido-diluído, álcali, solvente orgânico, amônia, dióxido de enxofre, dióxido de carbono ou outros produtos químicos para improvisar uma biomassa mais digerível pelas enzimas. Os pré-tratamentos biológicos são usados às vezes em combinação com tratamentos químicos para solubilizar a lignina e a hemicelulose, a fim de deixar a celulose mais acessível à hidrólise e a fermentação. (GRAF; KOEHLER, 2000). Segundo Baudel (2006), apesar de existirem diversas técnicas de pré-tratamento do bagaço, a comparação entre estas é dificultada pelas diferenças nas metodologias de pesquisa, nas características físicas do material e nos métodos de preparação da matéria-prima.

Os processos físico-químicos de pré-tratamentos utilizando explosão com vapor (temperaturas entre 140 e 200°C) e ácido-diluído, principalmente ácido sulfúrico (H_2SO_4), na concentração de 0,5-2,0%, possibilitam a hidrólise de 80 a 95% da fração hemicelulose e 30 a 50% da fração lignina (BAUDEL, 2006; PIETROBON, 2008), produzindo soluções sacarídicas com elevado teor de pentoses e elevados rendimentos glicosídicos (ROSSELL, 2006). Estes processos consistem numa tecnologia promissora de pré-tratamento do bagaço, pois apresentam vantagens como elevada digestibilidade da celulose, elevada recuperação de hemicelulose, reduzida solubilização, degradação e fracionamento da lignina, moderado custo capital, facilidade operacional e reduzida geração de efluentes (BAUDEL, 2006).

A hidrólise ácida é considerada um método rápido, porém é necessário o uso de equipamentos resistentes a corrosão além da recuperação do ácido e neutralização do hidrolisado (MARTÍN et al., 2007). A utilização da explosão a vapor juntamente com a hidrólise ácida pode resultar na formação de subprodutos com capacidade de interferir no processo da fermentação como o ácido acético (formado pela hidrólise do grupo acetil presente na fração hemicelulose), os ácidos fórmicos e levulínicos (resultantes da degradação dos açúcares), compostos fenólicos (resultantes da degradação da fração lignina) e furaldeídos (formados pela degradação de pentoses e hexoses) (PIETROBON, 2008). Entretanto, uma

alternativa é a realização da fermentação em batelada alimentada (“Fed-Batch”), minimizando os efeitos inibidores (BAUDEL, 2006).

Segundo estudos realizados em bagaço de cana por Pietrobon (2008) utilizando H_2SO_4 diluído a 0,5% em água (H_2O) ou hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) 3%, ambos tratamentos seguidos de autoclave a 121°C por 30 minutos, e, em seguida, o bagaço tratado exposto a enzimas comerciais, observou-se que o H_2SO_4 0,5% contribuiu para uma maior eficiência no processo de hidrólise pelas enzimas. A hidrólise do bagaço em soluções contendo H_2SO_4 2,0%, ou hidróxido de sódio (NaOH) 1,5%, ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 2,0%, ou H_2O_2 2,0% + NaOH 1,5%, resultou em diferentes exposições das fibras de celulose, hemicelulose e lignina. Comparando com o controle (bagaço *in natura*), a solução ácida permitiu a exposição de 70% das fibras de celulose contra 53% em meio álcali, 59,5% em H_2O_2 e 67% em H_2O_2 + NaOH (AGUIAR FILHO, 2008). Para Fasanella (2008), a combinação NaOH 4% + $Ca(OH)_2$ 4% + autoclave a 121°C, por 30 minutos, permitiu a degradação das fibras de lignina e de hemicelulose em 42% e 77%, respectivamente. A utilização do pré-tratamento é de extrema importância, pois permite a degradação das fibras que constituem o bagaço e a palha da cana permitindo uma maior exposição da celulose e conseqüentemente da glicose presente nestas fibras, facilitando a colonização deste material por microrganismos (FASANELLA, 2008).

2.4 Degradação enzimática da lignina

A degradação de um polímero de lignina ocorre por reação não específica a qual enzimas ligninolíticas desestabilizam as ligações da macromolécula, causando assim seu colapso (FUJIAN et al., 2001). O mecanismo mais estudado de degradação da lignina é por *Phanerochaete chrysosporium* (CAMERON et al., 2000). Este fungo é causador da podridão branca, com rápido crescimento e temperatura ótima entre 37 e 40°C. Através destes estudos foi possível observar a necessidade de um co-substrato, pois a lignina não é um substrato energético, interferindo no crescimento do fungo e também que o sistema ligninolítico não é indutivo, ocorrendo somente em meio com uma fonte assimilável de energia, como, por exemplo, a glicose (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004).

Para Kirk et al. (1978), citado por Galvagno e Forchiassin (2004), a degradação da lignina é um processo relacionado com o crescimento secundário do fungo que, com a diminuição de nutrientes e a extinção do seu crescimento, ocorre o aumento da atividade ligninolítica. Esta atividade é iniciada pela redução de nitrogênio no meio e alta concentração de oxigênio (O_2), pois é um processo oxidativo (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004).

Segundo Cameron et al. (2000), durante o crescimento secundário ocorre a síntese de peroxidases, álcool veratril (3, 4 dimetoxibenzil) e polissacarídeos extracelulares que armazenam as enzimas ligninolíticas. Para Galvagno e Forchiassin (2004), a hidrólise da lignina deve ser estudada para cada espécie, sobretudo com relação à concentração de nitrogênio (N), devido a existência de fungos chamados de N-desregulados já citados por Kaal et al. (1995) e Levin e Forchiassin (2001).

Esposito e Azevedo (2004) relatam que estudos realizados com organismos como *P. chrysosporium* e *Trichoderma versicolor* permitiram verificar os três principais modos de degradação da lignina: ruptura oxidativa de cadeias laterais envolvendo os carbonos α e β, levando à formação de ácidos carboxílicos; ruptura de ligações β-aril-éter e a conseqüente modificação das cadeias laterais; e a degradação de núcleos aromáticos a partir da abertura oxidativa dos anéis. Segundo Eriksson (1990) é sabido que as vias de degradação da lignina e da celulose estão provavelmente interligadas e podem existir aspectos comuns na regulação das atividades lignolíticas, celulolíticas e hemicelulolíticas.

A biodegradação da lignina por enzimas extracelulares secretadas por fungos ocorre por quebra deste substrato em fragmentos menores capazes de difundir-se através das hifas, atravessando as membranas celulares. A etapa final de mineralização da lignina resultando na liberação de gás carbônico (CO_2) e H_2O é realizada no interior das hifas. A biossíntese e degradação da lignina são, em sua maioria, provenientes de reações oxidativas, porém, reações de redução também são observadas (BAVUTTI, 2002).

Esta biodegradação é dependente de interações enzimáticas (BONO et al., 1998). Diferenças na estrutura e na composição química de substratos não homogêneos de lignina levam os organismos a uma especialização na produção de enzimas ligninolíticas (TUOR et al., 1995). Os fungos de decomposição branca podem expressar as enzimas Lignina Peroxidase (LiP), Manganês Peroxidase (MnP) e Lacase, como observado em *P. chrysosporium*. Porém, outros fungos como *Pleurotus spp.* expressam as enzimas MnP e Lacase, porém não secretam níveis detectáveis de LiP. Também é possível observar fungos que apresentam produção de LiP e Lacase ou LiP e MnP (TUOR et al., 1995). Dentre os fungos de decomposição branca, existe um grupo onde as enzimas ligninolíticas não foram detectadas (BAVUTTI, 2002).

As enzimas envolvidas na degradação da lignina podem ser agrupadas em duas classes: as fenoloxidases e as enzimas que produzem H_2O_2. As fenoloxidases correspondem há um grupo de metaloproteínas e se dividem em dois subgrupos: as peroxidases (dependentes de H_2O_2) e são conhecidas como LiP e MnP, produzidas geralmente por fungos

de decomposição branca e o outro subgrupo é representado pelas Lacases, que são cuproproteínas (não dependentes de H_2O_2). As enzimas que produzem H_2O_2 auxiliam às peroxidases, gerando H_2O_2 *in situ*. Dentre estas enzimas estão as Glicose Oxidase e Metanol Oxidase, enzimas intracelulares, que utilizam da glicose e do metanol como substrato e as Glioxal Oxidase e Aril-Álcool Oxidase, enzimas extracelulares produtoras de H_2O_2 (FERRAZ, 2004).

2.4.1 Lacase

A enzima Lacase (EC 1.10.3.2) pertence à família das multicobre-oxidases e oxida principalmente compostos fenólicos, agindo na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina (DURAN; ESPÓSITO, 1997). São fenoloxidases produzidas por fungos e plantas e não são dependentes de H_2O_2 para sua atividade. Possuem um íon cobre (Cu^{+2}) em seu sítio ativo que por processo oxidativo remove fenilpropano mais externo à cadeia, gerando radicais fenoloxila. Esses radicais atuam em reações não catalíticas, como acoplamento radical-radical, desprotonação a ataques nucleofílicos pela água, levando às reações de polimerização, quebras e oxidações nos centros ativos e desmetilações (LANGH, 1997; AZEVEDO, 2004). Alguns intermediários aromáticos de baixo peso molecular acabam também liberados resultando na despolimerização da lignina. Esta enzima atua na destoxificação de compostos e também pode oxidar grupos fenólicos, agindo como enzima inicial na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina (TIEN; KIRK, 1988).

Segundo Szklarz et al. (1989), a Lacase é produzida pela maioria dos fungos de decomposição branca e sua especificidade depende do fungo, podendo oxidar diferentes substratos. O pH ótimo de atividade pode variar de 2,5-3,5 em faixas ácidas ou de 6-7 (pH neutro) (RIGLING; VAN ALFEN, 1993). A massa molecular esta dentro da faixa de 60 a 100 kDa (DURAN, 2004).

A participação de Lacase na degradação da lignina foi considerada, por muitos anos, limitada à oxidação de unidades fenólicas, que compreendem de 10 a 20% do polímero. Entretanto, foi demonstrado que esta enzima também pode oxidar unidades não-fenólicas de lignina na presença de certos compostos, conhecidos como mediadores, que incluem substratos artificiais (CALL; MÜCKE, 1997) e metabólitos fúngicos (EGGERT et al., 1996a).

Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, as Lacases de origem fúngicas têm recebido atenção em diversas aplicações industriais como

deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes em processos têxteis, síntese de produtos químicos/medicinais e remediação de solos e águas contaminadas (DURÁN et al., 2002; MOREIRA NETO, 2006; FERREIRA 2009).

Até recentemente a Lacase foi estabelecida somente em organismos eucariotos como fungos, plantas e insetos, porém há evidências de sua distribuição em procariotos sendo que a primeira estrutura cristalina de uma Lacase bacteriana foi descrita. Em plantas, a Lacase está envolvida na lignificação; em fungos, além da degradação de lignina, parece estar envolvida na esporulação, produção de pigmentos e patogenicidade de plantas; nos insetos, a Lacase esta envolvida na esclerotização da cutícula (YAVER et al., 1996; ENGUITA et al., 2003; CLAUS, 2004).

A produção de Lacase é afetada por diversos fatores durante o desenvolvimento do fungo, como a composição do meio de cultura (relação carbono e nitrogênio), pH, temperatura e taxa de aeração (KAHRAMAN; GURDAL 2002). A participação da Lacase na geração de espécies ativas de oxigênio (EAOs) como radicais superóxido aniônicos, têm sido demonstrado por meio da oxidação de hidroquinonas derivadas de lignina (SCHLOSSER; HÖFER, 2002; FERREIRA, 2009).

2.4.2 Peroxidases

A secreção de H_2O_2 inicia-se com a atividade ligninolítica. As oxidases produzidas pelos fungos de decomposição branca são capazes de gerar H_2O_2 possivelmente para a utilização por peroxidases extracelulares durante a degradação do polímero de lignina. Estas oxidases podem ser intra ou extracelulares (BAVUTTI, 2002). As peroxidases (EC 1.11.1.7) são enzimas extracelulares que contem um grupo heme e são dependentes de H_2O_2 para atuarem sobre a lignina, desempenhando importante papel durante a degradação do substrato através da diminuição de H_2O_2 do meio, evitando a toxicidade para a célula (SZKLARZ; LEONOWICZ, 1986).

2.4.3 Manganês peroxidase

A MnP (EC 1.11.1.13) é uma hemeperoxidase, com elevada especificidade pelo íon manganês (Mn^{+2}) como substrato redutor (GLENN; GOLD, 1985). O íon Mn^{+2} forma um complexo com ácidos orgânicos que se difundem oxidando outros metais, não podendo oxidar

modelos de lignina não fenólicos. Portanto, os substratos fenólicos são oxidados a radicais fenoxi que podem reagir por desmetilação, clivagem das ligações alquil-fenil e Cα-Cβ, ou oxidação do Cα (GLENN; GOLD, 1985; REID, 1995).

Em estudos realizados com *P. chrysosporium*, Kuwahara et al. (1984) isolaram a enzima MnP e classificaram como glicoproteína com ferro (Fe) como grupo prostético, dependente de H_2O_2, possuindo ponto isoelétrico de 4,2-4,9 e peso molecular entre 45-47 kDa, sendo seu ciclo catalítico semelhante ao ciclo da LiP. A MnP é produzida concomitantemente com a LiP, durante o metabolismo secundário e é regulada pelas concentrações de nitrogênio e carbono disponíveis no meio (BUSWELL; ODIER, 1987).

A Lacase e a MnP agem em sinergismo. Galliano et al. (1991) estudaram a degradação da lignina por *Rigidoporus lignosus*, um organismo que não produz LiP, mas sintetiza Lacase e MnP. Quando estas duas enzimas foram purificadas e suas propriedades estudadas *in vitro*, nenhuma destas foi capaz de solubilizar a lignina. Quando ambas as enzimas foram adicionadas ao mesmo tempo à mistura de reação, a solubilização da lignina foi extensa, observando-se então que MnP e Lacase atuaram sinergicamente.

A MnP gera Mn^{+3}, um poderoso agente oxidante, que possui papel chave no primeiro estágio de ligninólise. O Mn^{+3} oxida determinadas estruturas aromáticas não-fenólicas de lignina, resultando na formação de radicais livres que reduzem o Fe^{+3} e iniciam reações com o envolvimento de radicais hidroxilas. Durante a oxidação da lignina, o Mn^{+3} é quelado e estabilizado por ácidos orgânicos, atuando desta forma como mediador de baixa massa molecular, longe do sítio ativo de MnP. O sistema Mn^{+3}-quelados gera radicais reativos intermediários (radicais peroxi) a partir de ácidos graxos insaturados, como o ácido linoléico e outros derivados. O sistema MnP-lipídeo é forte o bastante para degradar ligações C_α-C_β de estruturas não-fenólicas de lignina, pela subtração de hidrogênio do anel aromático (HIGUCHI, 2004, HERNÁNDEZ-LUNA et al., 2008; FERREIRA, 2009).

2.4.4 Lignina peroxidase e outras enzimas relacionadas com a degradação da lignina

Isolada por Tien e Kirk (1983) e Glenn et al. (1983), a LiP é uma glicoproteína que contém ferroprotoporfirina IX (heme) como grupo prostético e requer H_2O_2 para sua ação catalítica. Possuí massa molecular entre 38-43 kDa e apresenta ponto isoelétrico entre 3,2-4,0 (DURAN, 2004). O pH ótimo de atividade é próximo de 3,0 (BONNEN et al., 1994). A LiP oxida a lignina e outros compostos derivados da mesma, além de compostos não fenólicos por retirada de elétron de um núcleo aromático, criando radical instável que passa por diversas

transformações levando à decomposição do substrato. Geralmente, são produzidas na fase exponencial de crescimento dos fungos, subseqüentemente à ação das enzimas celulolíticas.

A ação da enzima LiP resulta em: oxidação de alcoóis benzílicos, quebra de cadeias aromáticas, desmetilação, rearranjos intramoleculares e quebra de anéis em compostos não fenólicos relacionados à lignina (GOLD et al., 1989). Reddy e D'Souza (1994), em estudos realizados com *P. chrysosporium*, observaram que a LiP é constituída por diversas isoenzimas cuja produção é regulada por condições limitantes de nitrogênio e carbono, sendo produzida durante o metabolismo secundário, em resposta a ausência destes nutrientes.

As Álcool-veratril-oxidases são enzimas de natureza oxidativa, possuindo papel importante na degradação da lignina agindo como catalisadoras da reação do álcool veratril a H_2O_2 necessário para atividades de peroxidases (KAMIDA et al., 2005). O álcool veratril é o redutor optado pela LiP, sendo produzido pelo fungo de degradação branca após ligninólise e, aparentemente, protege a enzima contra inativação pelo excesso de H_2O_2. Na presença de H_2O_2, a LiP oxida o álcool a veratraldeído, reação esta comum em ensaios de atividade da LiP (DURAN; ESPÓSITO, 1997). As Tirosinases contêm átomos de cobre e são conhecidas no processo de melanização, exercendo dois tipos de reações: a hidroxilação de monofenóis a o-difenóis e a oxidação de o-difenóis a o-quinonas (DURÁN, 2004).

A ação das enzimas ligninolíticas extracelulares na degradação de materiais lignocelulósicos têm sido observada também na descoloração de efluentes têxteis e papeleiro, na degradação de compostos poluentes como fenóis, pesticidas e explosivos e também na descoloração de subprodutos resultantes da produção de álcool, como a vinhaça e o melaço (DELLAMATRICE, 2005; DELLAMATRICE et al., 2005; FERREIRA et al., 2010).

2.5 Hidrólise enzimática da celulose

Na natureza, o ciclo do carbono ocorre por meio de organismos e microrganismos celulolíticos, como fungos, leveduras e bactérias, provenientes de diversos habitats. A quebra da celulose ocorre por meio de processos que agem em conjunto sobre um complexo composto de celulose unido à lignina e hemicelulose. A ação combinada de enzimas extracelulares com complementar especificidade é essencial para sua degradação (BÉGUIN; AUBERT, 1994).

A hidrólise enzimática da celulose é geralmente um processo incompleto e lento, embora, em intervalos de 48 horas, temos exemplos de consumação satisfatória, como a da

flora microbiana do rúmen bovino, hidrolisando de 60 a 65% da celulose disponível e também de cupins capazes de assimilar até 90% de celulose da madeira (BREZNAK; BRUNE, 1994).

Em sistemas mais complexos, como o apodrecimento de uma árvore no solo, essa degradação pode levar meses para ser completada. Ainda assim, uma pequena porcentagem da celulose é inacessível, principalmente se coberta por lignina, que é convertida em ácidos húmicos (SCHWARZ, 2001).

Os mecanismos enzimáticos envolvidos na degradação da celulose até a liberação das moléculas de glicose foram muito estudados em *T. reesei* e *P. chrysosporium* (KUHAD et al., 1997). Três principais tipos de celulases têm sido encontrados em fungos. As endoglicanases são responsáveis pela quebra das ligações 1,4-β da celulose, deixando as pontas das regiões amorfas abertas para hidrólise pelas exoglicanases, que formam fragmentos menores e as 1,4-β-glicosidases, que hidrolisam celobioses e celodextrinas de baixo peso molecular, resultando em glicose (LESCHINE, 1995; BOISSET et al., 2000). Estas três enzimas apresentam um alto grau de sinergismo durante a hidrólise da celulose, porém, apenas as endo e exoglicanases são capazes de adsorver (fixar) sobre o substrato sendo então consideradas como celulases verdadeiras (KLYOSOV, 1990; PITARELLO, 2007).

Celulases de diversos organismos foram isoladas, clonadas e caracterizadas bioquimicamente. Essas enzimas hidrolisam ligações β-1,4-glicosídicas por meio de catálise ácida simples, com a doação de um próton e uma base nucleofílica, liberando produtos pela inversão ou pela retenção das configurações anoméricas no carbono 1 (SCHWARZ, 2001).

O sistema celulose-celulase é heterogêneo e a reação de hidrólise da celulose requer vários passos, entre estes, um dos mais importantes consiste em um pré-requisito para as reações catalíticas subseqüentes: a adsorção das moléculas de celulases sob os pertinentes sítios da superfície da celulose (LEE et al., 1982). A fixação da endoglicanase é um fator catalítico na hidrólise da celulose amorfa e cristalina (KLYOSOV, 1990). Algumas celulases difundem lentamente dentro dos pequenos espaços entre as microfibras, fixando especificamente sobre a superfície interna dos feixes e apresentam baixa ação catalítica, diferentemente das proteínas adsorvidas sob a superfície das fibras (TANAKA et al., 1986).

2.5.1 Endoglicanase

As Endoglicanases (Endo-1,4-β-glucanases ou endocelulases ou CMCases, EC 3.2.1.4) hidrolisam as ligações β-1,4-glicosídicas aleatoriamente, agindo sobre as

celodextrinas, combinações de celulose e ácido fosfórico e outros substitutos de celulose (BHAT; BHAT, 1997). As ligações glicosídicas são quebradas nas regiões amorfas da celulose, abrindo espaço para as celobiohidrolases (ZHANG; LYND, 2006). Estas enzimas agem ao longo da cadeia de celulose, onde as regiões com menor organização estrutural são facilmente atacadas com relação às regiões cristalinas, resultando numa exposição maior das ligações glicosídicas da cadeia de celulose (ELISASHVILI, 1993; AGUIAR FILHO, 2008). Para a quantificação da atividade da Endoglicanase utiliza-se como substrato o polímero solúvel carboximetilcelulose (CMC). Este polímero é atacado pela enzima resultando em uma alteração no grau de polimerização. Após a reação enzimática é determinada a formação de açúcares redutores (MILLER, 1959; GHOSE, 1987; ADNEY; BAKER, 1996; BON et al., 2008).

2.5.2 Exoglicanase

As Exoglicanases (Exo-1,4-β-glucanases ou exocelulases ou celobiohidrolases ou FPases, EC 3.2.1.91) atuam sobre as celobioses nas terminações deixadas pelas Endoglicanases (BHAT; BHAT, 1997). Estas enzimas são altamente específicas, hidrolisando somente a celulose (ZHANG; LYND, 2006). Atuam sobre a celulose cristalina, reduzindo sua polimerização (AGUIAR FILHO, 2008). A quantificação da atividade enzimática, também utilizada para quantificar a atividade celulósica total, é realizada através da utilização do substrato papel de filtro Whatman Nº1 (MILLER, 1959; GHOSE, 1987; ADNEY; BAKER, 1996). Outra maneira de quantificar as Exoglicanases é através da celulose microcristalina (Avicel) (BON et al., 2008).

2.5.3 β-glicosidase

Estas enzimas (1,4-β-glicosidases ou celobiase, EC 3.2.1.21) hidrolisam a celobiose, prevenindo o acúmulo desse dissacarídeo, inibidor da atividade das exoglicanases (BHAT; BHAT, 1997). Também hidrolisam celo-oligossacarídeos em glicose. Sua secreção depende do meio de cultivo e o pH básico auxilia na sua produção (ZHANG; LYND, 2006; AGUIAR FILHO, 2008). Segundo Bon et al. (2008) esta celobiase sofre inibição provocada pelo seu produto de hidrólise, ou seja, a glicose.

2.6 Fungos celulolíticos e lignocelulolíticos

Os fungos que decompõem substâncias celulósicas são encontrados no solo, colonizando vegetais, raízes e resíduos, com importante função de reciclagem de nutrientes. Na natureza, encontra-se uma grande variedade de organismos que produzem celulases. Entretanto, apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, capazes de degradar a celulose natural (AGUIAR; MENEZES, 2000).

Os resíduos agrícolas, devidamente moídos ou triturados, servem de fonte de nutrientes e podem ser enriquecidos com nitrogênio, minerais e vitaminas, tornando-se fonte de elevada produção de atividade enzimática (ELISASHVILI, 1993). Os indutores da síntese celulolítica dos fungos variam dependendo da concentração do indutor ou pela presença de glicose ou outros açúcares no meio de crescimento. Os indutores podem ser fontes de carbono para o crescimento celular ou então, induzirem a síntese enzimática (GONG; TSAO, 1975).

Os fungos com maior eficiência em degradar os materiais lignocelulósicos são os de decomposição branca que degradam todos os componentes da madeira, rompendo os materiais no sentido das fibras e os de decomposição parda ou castanha que degradam principalmente polissacarídeos no sentido transversal das fibras, formando cubos. A maioria destes fungos pertencem à classe Basideomycota, como os *Pleurotus* sp e o *P. chrysosporium.* Os ascomicetos e os fungos mitospóricos, como os *Trichoderma* sp e *Aspergillus* sp, são classificados como fungos de decomposição branda ou mole, podendo degradar lignina e polissacarídeos, porém em baixa velocidade (FERRAZ, 2004).

Durante a decomposição, os materiais lignocelulósicos são despolimerizados até serem transformados em CO_2 e H_2O, finalizando o ciclo do carbono inicializado na fotossíntese pelo mesmo material, só que ainda ativo. A ação dos fungos ocorre por meio da penetração das suas hifas no lúmen das células. Estas hifas produzem uma grande diversidade de metabólitos extracelulares que atuam degradando a parede vegetal (FERRAZ, 2004).

Os fungos possuem habilidade para desenvolverem-se em qualquer substância orgânica, fazendo uso de substratos variados. As fontes de carbono como polissacarídeos, lignina, glicose, manose, frutose, óleos e ácidos orgânicos são importantes fornecedoras de energia para a atividade metabólica dos fungos. Os fungos basideomicetos com habilidade saprofítica de colonização desempenham importante papel de decompositores na natureza, assimilando os elementos e transformando-os em substâncias mais simples, permitindo a reciclagem dos nutrientes (MODA et al., 2005). Fungos filamentosos, tipicamente espécies de *Trichoderma*, são as fontes preferidas para obtenção de celulases em função de sua capacidade de produção

de proteínas extracelular, em comparação com as bactérias celulolíticas. São produzidas basicamente endoglicanases e exoglicanases, ambas envolvidas na hidrólise da celulose, além disso, é incluída uma série de enzimas complementares, como β-glicosidases, hemicelulases e pectinases (BERLIN et al., 2005).

Em *T. reesei*, foram reportados de cinco a oito endoglicanases com diferentes especificidades de substrato, duas exoglicanases imunologicamente distintas e três β-glicosidases também diferindo com relação à especificidade de substrato (HOFER et al., 1989; CHENG et al., 1990). Segundo Eriksson e Pettersson (1988), tanto o sistema celulolítico do *P. chrysosporium* quanto o do *T. reesei*, é induzido por celulose e seus derivados e é reprimido catabolicamente por glicose.

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

Os fungos de decomposição branca são os principais agentes de degradação da lignina. Estes fungos são dotados de um sistema enzimático constituído de peroxidases (LiP e MnP) e Lacases. Essas enzimas atribuem aos fungos à capacidade de desestabilizar a estrutura da lignina (CHAGAS; DURRANT, 2001). O fungo *P. sajor caju*, reconhecido pelas suas propriedades nutricionais e terapêuticas, pode ser cultivado comercialmente em resíduos agrícolas, entre eles, o bagaço da cana (DIAS et al., 2003). Este fungo secreta exoenzimas durante seu desenvolvimento degradando compostos para obtenção de carbono, nitrogênio, enxofre e outros nutrientes necessários ao seu crescimento, incluindo a glicose, resultante da degradação da celulose pelas enzimas lignocelulolíticas excretadas pelo fungo (DONINI et al., 2005).

O fungo *P. chrysosporium* é amplamente estudado por sua habilidade em produzir LiP e MnP. A MnP, na presença de H_2O_2, degrada a lignina e outros substratos fenólicos. A LiP degrada a lignina e também vários compostos aromáticos não fenólicos. O álcool veratril aparece como metabólito secundário nas culturas de *P. chrysosporium*, sendo sintetizado e acumulado no meio extracelular (GRGIC; PERDIH, 2003).

2.7 Sistema enzimático antioxidante

Os fungos possuem um sistema antioxidante de defesa que possibilita o crescimento na presença de H_2O_2 em concentrações maiores que 1% e esta propriedade permite que estes possam habitar diferentes ambientes (BAI et al., 2003; BELOZERSKAYA; GESSLER, 2007).

Os organismos aeróbios dispõem de vantagens energéticas utilizando o oxigênio molecular (O_2) como um oxidante terminal na respiração ou na oxidação de nutrientes. A presença do O_2 no ambiente celular pode provocar a oxidação das suas próprias estruturas devido ao seu potencial de agir como redutor parcial, formando as espécies ativas de oxigênio (EAOs) (FOYER et al., 1997; MALLICK; MOHN, 2000). O O_2 é estável e reage com a maioria das moléculas orgânicas de maneira lenta. Durante as reações metabólicas que utilizam o O_2, como a oxidação de substratos orgânicos durante a respiração e nas reações de defesa provocadas por fatores internos ou externos, ocorre à produção de H_2O_2 e EAOs, como o radical anion superóxido ($O_2^{-\bullet}$), o radical peróxido ($HO_2^{-\bullet}$), o íon peróxido (HO_2^-), o oxigênio 'singlet' ($^1O_2$) e o radical hidroxila ($OH^\bullet$) (SIGLER et al., 1999). O aumento na concentração de EAOs para níveis que ultrapassam a capacidade de defesa celular caracteriza o estresse oxidativo devido à ação tóxica e mutagênica das EAOs sobre as células (MALLICK; MOHN, 2000; YAO et al., 2006).

Durante a respiração, parte do O_2 utilizado pela mitocôndria (2 a 5%) não é totalmente reduzido resultando em $O_2^{-\bullet}$. O excesso deste radical pode provocar alterações na expressão de genes, como observado em *Aspergillus nidulans* e *Dictyostellium discoideum* (BLOOMFIELD; PEARS, 2003). Entretanto, a deficiência de $O_2^{-\bullet}$ pode prejudicar o processo de germinação em *Podospora anserine* e *Neurospora crassa* (AGUIRRE et al., 2005).

O H_2O_2 pode ser gerado durante a ação do $O_2^{-\bullet}$ e da enzima superóxido dismutase (SOD). Este H_2O_2 está envolvido em diversos processos como crescimento, diferenciação e proliferação, podendo reagir com metais, como ferro (Fe^{+2}) e cobre (Cu^+) na reação de Fenton ou com $O_2^{-\bullet}$ na reação de Haber-Weiss, resultando na formação do radical $OH^\bullet$. Entretanto, o tempo de ação deste radical $OH^\bullet$ é muito curto (menor que 1 nanosegundo), porém é capaz de reagir oxidando DNA, proteínas e lipídios (BELOZERSKAYA; GESSLER, 2007). No fungo *Sclerotium rolfsii* foi observado que alterações na luminosidade e a adição de íons de metais resultaram em um aumento na concentração de H_2O_2 dentro das células do organismo (BELOZERSKAYA; GESSLER, 2007).

O $^1O_2$ pode ser produzido na presença de elevada luminosidade, reagindo com os ácidos graxos e as bases que constituem o DNA, resultando em H_2O_2 e hidroperóxidos. Além disso, o $^1O_2$ estimula a formação de esporos, o desenvolvimento de conídios e a síntese de carotenóides como observado em *N. crassa* (AGUIRRE et al., 2005). A ionização (raios α-, β-, γ- e x) e a radiação (luz ultravioleta) induzem a produção de EAOs (BELOZERSKAYA; GESSLER, 2007). Segundo Aguirre et al. (2005), pH, temperatura, umidade, concentração de substratos, danos físicos entre outros fatores externos, também influenciam na produção de EAOs pelos fungos.

O excesso de EAOs pode gerar uma hiperoxidação, provocando um estresse oxidativo que altera os processos metabólicos das células, podendo levar a morte das mesmas. Sinais de apoptose provocados por EAOs foram observados em leveduras e fungos (LAUN et al., 2005).

O tempo de vida de um fungo está correlacionado com a estabilidade de fatores ambientais e também com a presença de componentes de defesa antioxidantes presentes nas células do organismo. Estes componentes são enzimas (como superóxido dismutase, catalase e tiol-peroxidases) e antioxidantes (como glutationa, ascorbato, pigmentos como carotenóides e melanina, além de compostos fenólicos). O transporte de compostos tóxicos para vacúolos, a quelação de metais e o sistema de reparação celular aumentam a estabilidade do fungo na presença de estresse oxidativo. As enzimas superóxido dismutase e catalase atuam diminuindo a concentração de $^1O_2$, $O_2^{-\bullet}$ e H_2O_2. Estas enzimas possuem uma alta especificidade com relação às EAOs, têm localização distinta dentro da célula e contém metais como cobre, zinco, manganês e ferro, que ativam seus centros de catalise. Estas enzimas são de extrema importância para a sobrevivência dos fungos em condições de estresse (BELOZERSKAYA; GESSLER, 2007).

2.7.1 Superóxido dismutase

A SOD (EC 1.15.1.1) foi isolada em eritrócitos bovinos em 1938 e sua função foi descrita em 1969, por McCorde e Fridovick. É encontrada em organismos aeróbios e anaeróbios facultativos. Esta enzima caracteriza um grupo de metaloenzimas que catalisam a formação de H_2O_2 a partir de $O_2^{-\bullet}$, livrando as células da oxidação por esses radicais (POMPEU, 2006; POMPEU et al., 2008). É a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EAOs nas células e a única cuja atividade interfere nas concentrações de $O_2^{-\bullet}$ e H_2O_2, os dois substratos da reação de Haber-Weiss, que origina os radicais hidroxila ($OH^{-\bullet}$)

e, provavelmente por isso, representam o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (BOWLER et al., 1992; ALSCHER et al., 2002).

$$2O_2^{-\bullet} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$$

É classificada em quatro grupos, de acordo com o componente metálico de seu sítio ativo (KEITH; VALVANO, 2007). O grupo manganês (Mn) SOD-A possui importante papel na mitocôndria; o grupo ferro (Fe) SOD-B é encontrado no citoplasma; o grupo cobre/zinco (Cu/Zn) SOD-C é observado no citosol e no estroma dos cloroplastos; e, finalmente, o grupo níquel (Ni) SOD é observado em bactérias do gênero *Streptomyces*, considerado um quarto grupo da enzima SOD (MALLICK; MOHN, 2000; OKAMOTO et al., 2001).

A presença de dois tipos de SOD é observada nos fungos (GIL-AD et al., 2000). A SOD-A (Mn) e SOD-C (Cu/Zn) (ANGELOVA et al., 2005). A SOD-A é um homotetrâmero (96 kDa) contendo um átomo de Mn por subunidade e a SOD-C possui duas subunidades idênticas de aproximadamente 32 kDa (MATÉS, 2000). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* a SOD-A é a primeira enzima de defesa contra o $O_2^{-\bullet}$ (GUIDOT, 1993). Entretanto, mutantes desta mesma levedura e do fungo *Neurospora crassa* não possuem a SOD-C, sendo mais sensíveis ao O_2 e $O_2^{-\bullet}$ (CHARY, 1994).

A SOD geralmente atua de forma coordenada cooperando com as enzimas ligninolíticas, celulases e hemicelulases. Entretanto, não ataca os componentes dos materiais lignocelulósicos de forma isolada. É uma enzima chave na proteção da célula fúngica contra o estresse oxidativo. Os $O_2^{-\bullet}$ comumente aparecem durante a redução cíclica de quinonas e também durante a atuação de Lacases, Manganês Peroxidases e Lignina Peroxidases por fungos ligninolíticos. As EAOs agem como agente oxidante ou redutor, reagindo com outros radicais produzidos pelas enzimas ligninolíticas, contribuindo ainda para vários processos essenciais na transformação da lignina, como por exemplo, a quebra do anel aromático ou desmetoxilação (LEONOWICZ et al., 1999; GONZALES et al., 2002; FERREIRA, 2009).

2.7.2 Catalase

A CAT (EC 1.11.1.6), descrita em 1901 por Loew (FRUGOLI et al., 1996), é uma enzima tetramérica, que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos.

Possui a capacidade de degradar o H_2O_2, sendo proposto por vários pesquisadores, que a CAT desempenha papel fundamental nos sistemas que capacitam os organismos a viverem em ambientes aeróbios (MALLICK; MOHN, 2000, POMPEU, 2006).

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{CAT}} 2H_2O + O_2$$

Esta enzima é a única entre aquelas que degradam o H_2O_2 que não consome equivalentes redutores celulares, possuindo um mecanismo bastante eficiente para remoção do H_2O_2 formado nas células sob condições de estresse (MALLICK; MOHN, 2000). São encontradas nos peroxissomos, organelas onde ocorrem os processos que geram o H_2O_2 através da β-oxidação dos ácidos graxos (ANGELOVA et al., 2000).

Segundo Angelova et al. (2005) existem três famílias de CAT, as Mn-catalases, que incluem um elevado número de catalases de bactérias, plantas, fungos e animais; as catalase-peroxidases bifuncional encontradas em bactérias e fungos filamentosos, porém, não observadas em eucariotos complexos (KAWASAKI; AGUIRRE, 2001); e as catalases verdadeiras ou monofuncionais onde encontram-se duas subunidades, uma com 50-65 kDa e outra com aproximadamente 80 kDa (ANGELOVA et al., 2005).

Para Scandalios (1994) a CAT utiliza mecanismos de dois estágios para as reações peroxidativas e catalíticas sendo que, no primeiro estágio, o Fe do grupo heme interage com o H_2O_2 formando peróxido de ferro, rico em O_2, denominado componente I, e em baixas concentrações de H_2O_2, este componente pode ser reduzido por doadores de hidrogênio (H), como o etanol e o ácido ascórbico. Em elevadas concentrações, o componente I reage com outra molécula de H_2O_2, produzindo H_2O e O_2. Condições ambientais podem alterar a atividade da CAT. Em bactérias do gênero *Prochloron* sp, a atividade da CAT é diretamente proporcional a radiação UV, enquanto que a alteração na temperatura afeta a atividade da CAT em cianobactérias do gênero *Synechocystis* sp (LESSER; STOCHAJ, 1990; RADY et al., 1994).

Duas isoformas foram identificadas no fungo *Aspergillus nidulans*, a CAT A, codificada pelo gene *catA*, cuja transcrição é induzida durante a esporulação e em resposta a estresses e a CAT B, codificada pelo gene *catB*, presente no micélio, cuja expressão é induzida pelo H_2O_2 ou $H_2O_2^{-\bullet}$, não possuindo controle regulatório pós-transcricional. Estas

enzimas constituem mecanismos de defesa antioxidativa alternativo e específico para os diferentes estágios do ciclo de vida do fungo (CALERA et al., 2000).

A CAT pode ser obtida de fígado de animais, principalmente bovinos e suínos. O H_2O_2, substrato da CAT, é um potente agente bactericida, utilizado nas indústrias, como a de laticínios, para preservar os alimentos. A retirada do H_2O_2 residual é realizada pela CAT (SAID; PIETRO, 2002). Porém esta enzima pode ser produzida por *Aspergillus niger*, com a vantagem de ser mais termoestável que a enzima extraída do fígado de mamíferos. Para a sua produção, a fonte de nitrogênio ideal é o nitrato em meio contendo 3% de sacarose e 6% de farelo de trigo. Em leveduras cultivadas em meio contendo metanol, em condições aeróbicas, a CAT atua na assimilação de carbono, onde o metanol é oxidado pela enzima álcool oxidase, produzindo H_2O_2 que é decomposto pela CAT, liberando O_2 que participa da oxidação de outras moléculas (SAID; PIETRO, 2002).

2.8 Produção de etanol

O caldo da cana-de-açúcar e o sorgo sacarino são matérias primas para o processo imediato de fermentação alcoólica, pois a sacarose presente nestes substratos constituiu um dissacarídeo que pode ser prontamente metabolizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As matérias primas amiláceas (como amido de milho, trigo e cevada) e lignocelulósicas (como resíduos agroindustriais e madeira) necessitam da hidrólise dos polissacarídeos presentes nestes materiais, para então a liberação dos açúcares fermentáveis. Entre os diversos tipos de hidrólise encontra-se a enzimática que é considerada um processo elaborado e altamente relacionado com os componentes do material vegetal (BON et al., 2008).

Dentre os subprodutos agroindustriais lignocelulósicos com potencial de uso na produção de etanol encontram-se o bagaço (±38% de glicose) e a palha da cana, o sabugo (±39% de glicose) e palha de milho, palhas de trigo (±37% de glicose) e arroz (±41% de glicose), restos de madeira e papel (±65% de glicose) (WAYMAN; PAREKH, 1990). Estes materiais, após a hidrólise, possuem uma mistura de hexoses (glicose) derivadas da celulose e pentoses (xilose) derivadas da hemicelulose. Entretanto, a fermentação alcoólica mais eficiente é a da glicose, realizada por *S. cerevisiae*, que não são capazes de fermentar xiloses (BON et al., 2008).

Outros organismos, como bactérias, leveduras e fungos, podem fermentar a xilose a etanol e este processo ocorre em três etapas, primeiramente com a conversão da xilose a xilulose 5-P, que por sua vez é incorporada à via das pentoses-fosfato, resultando em

gliceraldeído 3-P e frutose 6-P, sendo então convertidos, via glicolítica, a piruvato que originará o etanol por meio de reações seqüenciais de descarboxilação e redução (JEFFRIES; JIN, 2004). Algumas leveduras, como *Pichia stipitis* e *P. segobiensis*, *Candida tenius* e *C. shehatae* e *Pacchsolen tannophilus*, são capazes de fermentar xilose a etanol, porém as taxas de produção são baixas quando comparadas a fermentação alcoólica da glicose realizada pela *S. cerevisiae* (BON et al., 2008).

As tecnologias de produção de etanol utilizando matérias-primas açucaradas como o caldo da cana ou matérias-primas amiláceas como milho e trigo, já estão bem estabelecidas. Entretanto, o aproveitamento da celulose e hemicelulose como fonte de energia renovável é de enorme interesse mundial, já que o petróleo, principal combustível atual, além de não ser renovável, é caracterizado por afetar a distribuição mundial de riquezas, gerar conflitos, danos à saúde humana e ao ambiente (BON et al., 2008).

A estatal brasileira Petrobrás junto com a KL Energy Corporation (empresa norte americana), assinaram, em agosto de 2010, um acordo relacionado com as pesquisas na produção de etanol a partir do bagaço da cana onde é esperado um aumento de até 40% na produção de etanol a partir da mesma quantidade de cana. Segundo a Petrobrás, atualmente é possível produzir até 86 litros de etanol a partir de uma tonelada de cana, utilizando o bagaço, pode-se aumentar esta produtividade em até 34 litros. O estudo utilizando o etanol do bagaço ocorre desde 2004 na Petrobrás e esta empresa pretende produzir este etanol a partir de 2013 (AGROSOFT BRASIL, 2010a).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ecologia Aplicada pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo (CENA-USP) e no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, do Departamento de Genética, pertencente à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP).

Neste estudo, foram analisadas as enzimas Lacase, Peroxidases e Manganês Peroxidases para avaliar o comportamento dos fungos quanto à atividade de ligninases; as Endoglicanases e a atividade celulolítica total para avaliar as celulases; a concentração de açúcares redutores liberados após a ação dos fungos e também as enzimas Superóxido dismutase e Catalase com o objetivo de observar o comportamento dos fungos quanto à diferença na concentração de nitrogênio, no que se refere a estresse, utilizando o bagaço e a palha da cana como substrato. Todo o experimento e todas as análises enzimáticas foram realizados com três repetições.

3.1 Bagaço e palha de cana-de-açúcar

O material vegetal utilizado foi fornecido pela Usina Costa Pinto, pertencente ao grupo COSAN, localizada em Piracicaba, SP, safra 2006/2007.

3.2 Fungos

Os fungos utilizados na realização deste projeto foram os lignolíticos *Pleurotus sajor caju* CCB 020 e *Phanerochaete chrysosporium* e os celulolíticos *Trichoderma reesei*, e *Aspergillus niger*, pertencentes ao estoque de culturas do Laboratório de Ecologia Aplicada, CENA/USP, Piracicaba, SP (Figura 1).

3.2.1 Manutenção das culturas dos fungos em grão de trigo

Para a manutenção das culturas dos fungos utilizou-se a metodologia descrita por Rosolen (2004). Os fungos foram mantidos em grãos de trigo previamente cozidos por 30 minutos em autoclave somente tampada, na proporção de 1:2 (peso do grão em gramas. volume de água em mL^{-1}). Após o cozimento, os grãos foram escorridos e acrescentou-se

0,2% de carbonato de cálcio e 0,8% de sulfato de cálcio na proporção do peso dos grãos, para ajustar o pH. Amostras de 75 g foram separadas em saquinhos de polietileno (10x15 cm) fechados com espuma e barbante e autoclavadas por 30 minutos, a 121°C.

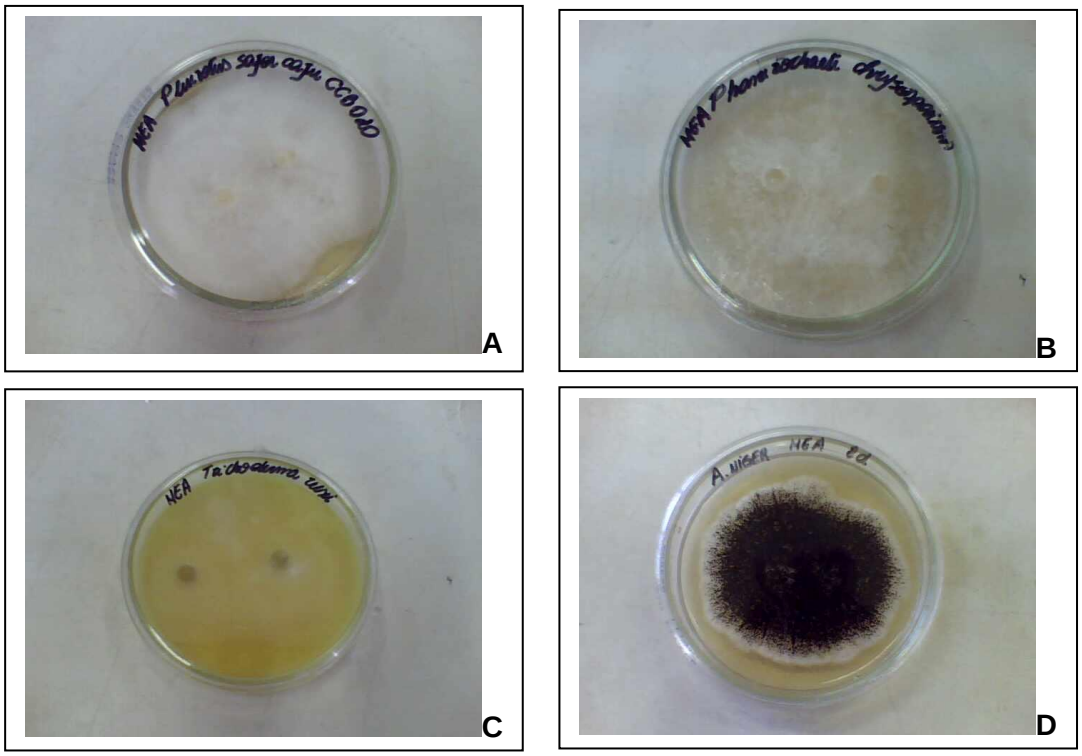

Figura 1 – (A) *Pleurotus sajor caju* CCB 020, (B) *Phanerochaete chrysosporium*, (C) *Trichoderma reesei*, e (D) *Aspergillus niger* em meio MEA, com 8 dias de incubação a 28±2°C

Após a esterilização, os saquinhos contendo as amostras foram colocados em câmara de fluxo, sob luz ultravioleta, até esfriarem. Em seguida, foi realizada a inoculação com o fungo desejado. Os saquinhos inoculados foram incubados em estufa por 20 dias, na temperatura de 28°C. Uma vez crescido os micélios e/ou esporos, os saquinhos foram armazenados sob refrigeração a 4°C e renovados a cada 6 meses. Esta metodologia é utilizada tanto para a manutenção quanto para ativação das culturas dos microrganismos.

3.2.2 Cultivo dos fungos

As culturas crescidas em grãos de trigo foram utilizadas para inocular placas de Petri contendo meio sólido de extrato de malte (MEA) previamente esterilizado. Um grão colonizado foi inoculado em cada placa e estas foram incubadas por 8 dias em estufa, na temperatura de 28°C, conforme metodologia descrita por Mandels e Weber (1969) e Kirk et

al. (1986). O meio sólido de extrato de malte utilizado foi “Malt Extract Agar, EMD Chemicals Inc.” (Alemanha), cuja composição, por litro, é de 30 g de extrato de malte, 3 g de peptona e 15 g de agar-agar. Foram utilizados 48 g deste composto para cada litro de água destilada. Este material foi autoclavado por 10 minutos, a 121°C, conforme recomendação do fabricante. O pH final deste meio é de 5,6 ±0,2, à 25°C.

3.3 Metodologia para produção das enzimas ligninolíticas

Em frascos Erlenmeyers de 125 mL foram colocados 3 g de bagaço e palha de cana-de-açúcar previamente secos em estufa até atingir peso constante. Em seguida, foram adicionados 5 mL da solução de acido sulfúrico (H_2SO_4) diluído na concentração de 0,5% (em água destilada) para cada 1 g de bagaço e palha, permanecendo nesta etapa por 24h e em temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 2,25 mL da solução de NaOH 2% (em água destilada), por frasco, com o objetivo de elevar o pH do meio até 4,5, ideal para o crescimento dos fungos.

Os frascos foram separados em dois tratamentos. No primeiro tratamento foram adicionados 10 mL de água destilada e 0,5% do volume total (bagaço + palha + água destilada) de extrato de levedura. Para o segundo, adicionou-se 10 mL de água destilada e 1% do volume total de extrato de levedura. Em seguida, estes materiais foram autoclavados por 20 minutos, a 121°C.

O bagaço e a palha, previamente caracterizados por Pietrobon (2008), apresentavam, antes do pré-tratamento com ácido diluído (H_2SO_4, 0,5%) e autoclave, 54,5% de celulose, 10,4% de lignina e 26,7% de hemicelulose e após este pré-tratamento, os teores de celulose, lignina e hemicelulose foram de 69,7%, 17,6% e 2,2%, respectivamente.

Depois de atingirem a temperatura ambiente, em câmara de fluxo, os frascos foram inoculados com o fungo desejado (3 discos com 1 centímetro de diâmetro por frasco). As coletas das amostras para análises enzimáticas foram realizadas a cada 24h a partir de dois dias após a inoculação do fungo, por um período de 13 dias. Estas amostras foram extraídas com 30 mL de água destilada, sob agitação de 40 rpm, por 30 minutos, a 25°C. Após este período, as amostras foram filtradas a vácuo e o sobrenadante (caldo enzimático) foi imediatamente analisado.

3.3.1 Determinação da atividade enzimática da Lacase

A atividade da enzima Lacase (EC 1.10.3.2) foi determinada segundo a metodologia e Szklarz et al. (1989), utilizando a siringaldazina como substrato enzimático, oxidando até formação de quinona.

Em tubos de ensaio foram colocados 0,6 mL de caldo enzimático, 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 Molar (pH 5,0) e 0,1 mL de solução de siringaldazina 0,1% (em etanol), considerada o iniciador da reação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, com absorbância de 525 nm, no início da reação (chamado de T0) e após 10 minutos (T10). Para o branco, o caldo enzimático foi fervido a 100°C, por 20 minutos e em seguida foi realizada a leitura como descrito anteriormente. A atividade enzimática foi determinada em $\mu mol.min^{-1}.litro^{-1}$ ($UI.L^{-1}$) e $\mu mol.min^{-1}$.mg de $proteína^{-1}$ (atividade específica).

$$\text{Atividade enzimática } (UI.L^{-1}) = \left(\frac{\frac{(\Delta\ Abs)}{\varepsilon}}{R \times T} \right) \times 10^6$$

$$\text{Atividade específica } (\mu mol.min^{-1}.mg\ de\ proteína^{-1}) = \left(\frac{\frac{(\Delta\ Abs)}{(\varepsilon/1000)}}{R \times T \times P} \right)$$

Onde:

Δ Abs = absorbância [Abs final (T10) – Abs inicial (T0)]

ε = coeficiente de absorção molar = 65.000 $L.M^{-1}.cm^{-1}$

R = volume do caldo enzimático (mL)

T = tempo da reação (minutos)

P = concentração de proteína ($mg.mL^{-1}$)

3.3.2 Determinação da atividade enzimática das Peroxidases

A atividade das Peroxidases (EC 1.11.1.7) foi determinada segundo a metodologia de Szklarz et al. (1989), utilizando a siringaldazina como substrato enzimático, oxidando até formação de quinona, na presença de H_2O_2 exógeno no meio de reação.

Adicionou-se em 0,6 mL de caldo enzimático, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 Molar (pH 5,0), 0,1 mL de solução de H_2O_2 0,002 Molar (em água destilada) e 0,1 mL de solução de siringaldazina 0,1% (em etanol), considerada o iniciador da reação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, com absorbância de 460 nm, no início da reação (T0) e após 10 minutos (T10). Para o branco, o caldo enzimático foi fervido a 100°C, por 20

minutos e em seguida foi realizada a leitura como descrito anteriormente. A atividade enzimática foi determinada em µmol.min^{-1}.litro^{-1} (UI.L^{-1}) e µmol.min^{-1}.mg de proteína^{-1}, através da equação descrita em 3.3.1, considerando o valor do coeficiente de absorção molar (Ɛ) de 29.400 L.M^{-1}.cm^{-1}.

3.3.3 Determinação da atividade enzimática da Manganês peroxidase

A atividade da enzima MnP (EC 1.11.1.13) foi determinada segundo a metodologia de Kuwahara et al. (1984), quantificada através da oxidação do vermelho de fenol na presença de Mn^{+2} e H_2O_2.

Para esta reação, foram adicionados em 0,6 mL de caldo enzimático, 0,1 mL de solução de lactato de sódio 0,25 Molar; 0,1 mL de solução de albumina bovina 0,5% (em água destilada), 0,1 mL de tampão succinato de sódio 0,2 Molar (pH 4,5), 0,05 mL de solução de $MnSO_4$ 0,002 Molar, 0,05 mL de H_2O_2 0,002 Molar e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1% (em água destilada), considerado o iniciador da reação. Para o branco, o caldo enzimático foi fervido a 100°C, por 20 minutos e em seguida foi realizada a leitura como descrito anteriormente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, com absorbância de 610 nm, no início da reação (T0) e após 10 minutos a reação foi interrompida pela adição de 0,04 mL da solução de NaOH 2,0 N, sendo realizada nova leitura (T10).

A atividade enzimática foi determinada em µmol.min^{-1}.litro^{-1} (UI.L^{-1}) e µmol.min^{-1}.mg de proteína^{-1}, através da equação descrita em 3.3.1 considerando o valor do coeficiente de absorção molar (Ɛ) de 4.460 L.M^{-1}.cm^{-1}.

3.4 Metodologia para produção das enzimas celulolíticas

O procedimento utilizado para a produção das enzimas celulolíticas foi semelhante à metodologia utilizada para a produção de enzimas lignolíticas, com exceção da extração. Neste caso, as amostras foram extraídas com 30 mL de tampão citrato de sódio 0,05 Molar (pH 4,8), sob agitação de 40 rpm, por 30 minutos, a 25°C. Após este período, estas amostras foram filtradas a vácuo e o caldo enzimático foi imediatamente analisado.

3.4.1 Determinação da atividade celulolítica total

A atividade celulolítica total foi determinada através do método do ácido dinitrosalicílico (DNS) em papel de filtro, de acordo com a metodologia proposta por Miller (1959), Ghose (1987) e Adney e Baker (1996).

Em um tubo de ensaio foram colocados 1,5 mL de tampão citrato de sódio 0,05 Molar (pH 4,8) juntamente com uma tira de papel de filtro Whatman nº1 de 1,0 x 6,0 cm (aproximadamente 50 mg), este tubo representa o branco papel. Em outro tubo, o branco reagente, foi adicionado somente 1,5 mL de tampão citrato de sódio. Para os brancos substratos, foram colocados em cada tubo de ensaio 1,0 mL de tampão citrato de sódio juntamente com 0,5 mL do caldo enzimático. Por fim, para a análise da atividade, 1,0 mL de tampão citrato de sódio foi adicionado em 0,5 mL de caldo enzimático, juntamente com uma tira de papel de filtro.

Estas amostras foram colocadas em banho, a 50°C, por 60 minutos. Em seguida, foram adicionados 3,0 mL de DNS, paralisando a reação. Para a produção de cor, as amostras foram fervidas (100°C) por 5 minutos e após esta etapa os tubos foram colocados em banho frio. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a absorbância de 540 nm.

3.4.2 Determinação da atividade enzimática das Endoglicanases

A atividade celulolítica da endoglicanase (Endoglicanase ou carboximetil celulase, EC 3.2.1.4) foi determinada pelo método do carboximetilcelulose (CMC), de acordo com a metodologia proposta por Miller (1959), Ghose (1987) e Adney e Baker (1996).

Em um tubo de ensaio foi adicionado 1,5 mL de tampão citrato de sódio 0,05 Molar (pH 4,8) este tubo representa o branco CMC. Em outro tubo, o branco reagente, foi adicionado somente 2,0 mL de tampão citrato de sódio. Para os brancos substratos, foram colocados em cada tubo de ensaio 1,5 mL de tampão citrato de sódio juntamente com 0,5 mL do caldo enzimático. Por fim, para a análise da atividade da endoglicanase, 1,0 mL de tampão citrato de sódio foi adicionado em 0,5 mL de caldo enzimático.

Estas amostras foram colocadas em banho, a 50°C, por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de CMC nos tubos contendo branco CMC e caldo enzimático. As amostras foram recolocadas no banho por 30 minutos e após este período, 3,0 mL de DNS foi acrescentado, paralisando a reação. Para a produção de cor, as amostras foram fervidas

(100°C) por 5 minutos e após esta etapa os tubos foram colocados em banho frio. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a absorbância de 540 nm.

3.4.3 Curva padrão de glicose

Uma solução contendo 10 mg de glicose a cada 1,0 mL de água destilada foi diluída nas seguintes proporções, em tampão citrato de sódio 0,05 Molar (pH 4,8):

1,0 mL de solução de glicose + 0,5 mL de tampão → (1:1,5) → 6,7 $mg.mL^{-1}$ de glicose
1,0 mL de solução de glicose + 1mL de tampão → (1:2) → 5,0 $mg.mL^{-1}$ de glicose
1,0 mL de solução de glicose + 2mL de tampão → (1:3) → 3,3 $mg.mL^{-1}$ de glicose
1,0 mL de solução de glicose + 4mL de tampão → (1:5) → 2,0 $mg.mL^{-1}$ de glicose

Após as diluições, as amostras contendo glicose foram tratadas como descrito para a atividade celulolítica total (3.4.1), porém sem a adição do papel de filtro. Após este procedimento, estas amostras foram analisadas em espectrofotômetro (Femto – 432) na absorbância de 540 nm. As absorbâncias foram colocadas em uma curva padrão (absorbância = y por concentração de glicose = x) e a equação da reta foi anotada assim como o R^2 (próximo a 1). Para cada nova solução de DNS feita, uma nova curva padrão de glicose utilizando este DNS foi realizada. As equações da reta foram utilizadas no cálculo das atividades enzimáticas.

3.4.4 Cálculo da atividade celulolítica total

Para a atividade celulolítica total (FPU) foram realizados os seguintes cálculos:

O resultado da diferença entre a absorbância da enzima e a absorbância do branco enzima foram colocados na curva padrão de glicose no lugar de y sendo então encontrado o valor A. Em seguida,

$$\frac{\dfrac{\text{Valor A}}{\text{0,18016 (peso molecular da glicose em micromol)}}}{\text{[0,5 mL (volume da amostra) x 60 (tempo da reação em minutos)]}} = \text{valor B}$$

$$\frac{\text{Valor B}}{\text{Fator de diluição (quando houver)}} = \text{valor C}$$

FPU (unidades.mL^{-1})

Para a determinação da atividade específica,

$$\frac{\text{Valor C}}{\text{mg de proteína correspondente ao dia da amostra C}} = \text{valor D}$$

FPU. mg de proteína^{-1}

3.4.5 Cálculo da atividade enzimática das Endoglicanases

Para a atividade da endoglicanase (CMC) foram realizados os seguintes cálculos:

O resultado da diferença entre a absorbância da enzima e a absorbância do branco enzima foram colocados na curva padrão de glicose no lugar de y sendo então encontrado o valor E. Em seguida,

$$\frac{\dfrac{\text{Valor E}}{\text{0,18016 (peso molecular da glicose em micromol)}}}{\text{[0,5 mL (volume da amostra) x 30 (tempo da reação em minutos)]}} = \text{valor F}$$

$$\frac{\text{Valor F}}{\text{Fator de diluição (quando houver)}} = \text{valor G}$$

CMC (unidades.mL^{-1})

Para a determinação da atividade específica,

$$\frac{\text{Valor G}}{\text{mg de proteína correspondente ao dia da amostra G}} = \text{valor H}$$

CMC. mg de proteína^{-1}

3.4.6 Cálculo da concentração de açúcares redutores

Para a concentração dos açúcares redutores foram realizados os seguintes cálculos:

O resultado da diferença entre a absorbância do branco enzima, absorbância do branco reagente e a absorbância do branco controle foram colocados na curva padrão de glicose no lugar de y sendo então encontrado o valor H. Este valor representa a concentração de açúcares redutores (AR) em $mg.mL^{-1}$ de solução.

Para 1 grama de bagaço seco,

$$\frac{\text{Valor H}}{\text{3 (peso total de bagaço seco por frasco)}} = \frac{\text{valor I}}{\text{mg de AR.g de BS (bagaço seco)}^{-1}}$$

3.5 Determinação das enzimas antioxidantes

3.5.1 Extração protéica

Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT foi preparado um novo experimento, com três repetições, onde foram coletadas as amostras dos dias 1, 2, 3, 5, 7, 10 e 15. As amostras de cada tratamento foram maceradas em mortar, na presença de nitrogênio líquido, até formar uma farinha. Em seguida, foi adicionado o tampão de extração na proporção de 2 mL de tampão para cada 1 g de amostra, segundo a metodologia de Azevedo et al. (1998), citado em Gratão et al. (2008). O tampão de extração ou tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contém fosfato de potássio dibásico (14,52 g K_2HPO_4. L^{-1} de tampão), fosfato de potássio monobásico (2,27 g de $KH_2PO_4.L^{-1}$ de tampão), 1 mM de ácido etileno diamino tetracético (0,372 g de $EDTA.L^{-1}$ de tampão), 3 mM de ditiotreitol (0,462 g de $DTT.L^{-1}$ de tampão) e 4% (p/v) de polivinil polipirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi centrifugado à 10.000 rpm, por 30 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi coletado, alíquotado e estocado em freezer -80°C até o momento das análises.

3.5.2 Atividade de Superóxido dismutase (SOD)

A atividade de SOD foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) não-desnaturante. Os materiais biológicos extraídos conforme descrito em 3.5.1 foram aplicados em gel com concentração de 12% de poliacrilamida. O gel possui espessura de 3,0 mm, altura de 6,5 cm e largura de 7,3 cm, contendo 6,0 mL de solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma), 5,0 mL de tampão tris (hidroximetil)-aminometano (TRIS) 2,9 M (pH 8,9) e 9,0 mL de água osmose. Como catalisadores foram utilizados 38,0 µL de N, N, N', N'-tetrametilenodiamina (TEMED) e 50,0 µL de persulfato de amônia (PA) (10%).

Após a polimerização, o gel de empilhamento foi aplicado sobre o gel principal. Foram utilizados para este gel 1,0 mL da solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão TRIS 0,5 M (pH 6,8) e 5,5 mL de água osmose. Para a polimerização do gel foram utilizados 20,0 µL de TEMED e 100,0 µL de PA (10%).

A eletroforese foi realizada a 4°C em corrente constante de 20 mA, por placa. O tampão estoque de eletrodo continha TRIS 250 mM (15,2 g) pH 8,3 e Glicina 192 mM (72,0 g), onde 150,0 mL deste tampão foram misturados em 600,0 mL de água osmose. O padrão utilizado foi duas unidades de SOD de fígado de boi (Sigma) e a concentração de proteínas das amostras foi de 20,0 µg.

Após a separação por eletroforese, a atividade de SOD foi determinada como descrito por Beuchamp e Fridovick (1971). Os géis foram lavados em água osmose e incubados no escuro, à temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM de EDTA, 0,05 mM de riboflavina, 0,1 mM de nitro blue tetrazolium (NBT) e 0,3% de TEMED. Depois de 30 minutos, a mistura da reação foi removida, os géis lavados com água osmose e colocados sob iluminação até o aparecimento das bandas negativas sob fundo roxo. Nestas condições, ocorre a fotoxidação do gel com a formação de uma coloração púrpura e as bandas correspondentes a atividade de SOD permanecem sem fotoxidar, promovendo uma revelação negativa. A fotoxidação é interrompida com solução de água osmose e ácido acético 7%, para então a documentação em Image Scanner – AmershanBioscence.

3.5.3 Atividade de Catalase (CAT)

A atividade de CAT foi determinada por espectrofotometria (Perkin Elmer, Lambda 40) segundo Kraus et al. (1995), com algumas modificações conforme Azevedo et al. (1998). A CAT foi determinada à 25°C, em solução contendo 1,0 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,025 mL de H_2O_2 (solução 0,25%) preparado imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 0,025 mL de material biológico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição de H_2O_2 por 1 minuto, através das alterações na absorbância à 240 nm. Os resultados são expressos em $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína.

Cálculo:

Absorbância do espectrofotômetro / 39,4 = (valor A)

A / 1000 = (valor B)

B / (proteína / volume em µL*) = (valor C)

C x 10^6

*Para a leitura foram utilizados 25 µL de amostra (material biológico), portanto: 1000/25 = 40, sendo este valor utilizado no volume para a obtenção do valor C.

3.6 Determinação das proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi baseada no método de Bradford (1976). Foram utilizados 20 µL do sobrenadante para 1 mL de reagente. A quantificação protéica foi realizada em espectrofotômetro (Femto 432) na absorbância de 595 nm. Para o branco, 20 µL de água destilada foram utilizados no lugar da amostra.

3.7 Gel 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. O agente dissociante comumente utilizado é o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A mistura de proteína é desnaturada pelo aquecimento, na presença do SDS e mercaptoetanol, cuja função é quebrar as ligações dissulfeto. Esta eletroforese ocorre em cuba vertical, em sistema de tampão descontínuo e desnaturante, utilizando-se mini-gel no tamanho de 8,3 x 10,2 cm na

concentração de acrilamida de acordo com Laemmli (1970). As soluções estoques são descritas como segue.

O tampão de corrida (5x concentrado) contém 15,2 g de TRIS (25 mM), 72,0 g de glicina (192 mM) (pH 8,3) e 1% SDS (10%). O tampão do gel principal contém 36,3 g de TRIS (pH 8,9) e o tampão do gel de empacotamento, 6,0 g de TRIS (pH 6,7).

Para a preparação de 2 géis na concentração de 10% de acrilamida, foram utilizados no gel de resolução (principal) 5,0 mL de acrilamida/bis-acrilamida (40%), 5,0 mL do tampão do gel principal, 10,0 mL de H_2O destilada, 200,0 µL SDS (10%), 38,0 µL de TEMED e 50,0µL de PA (10%). Para o gel de empacotamento, 1,0 mL de acrilamida/bis-acrilamida (40%), 2,5 mL de tampão de empacotamento, 5,5 mL de H_2O destilada, 100,0 µL de SDS (10%), 20,0 µL de TEMED e 100,0 µL de PA (10%).

O tampão de amostra contém 3,0 mL de H_2O destilada, 1,0 mL de tampão de empacotamento, 1,6 mL de glicerol, 1,6 mL de SDS (10%), 0,4 mL de solução 0,5% de azul de bromofenol e 0,4 mL mercaptoetanol. A corrida foi realizada em amperagem constante de 20 mA por placa.

Ao final da corrida, os géis foram colocados em solução corante de Coomassie Blue (0,5g de Coomassie Blue R-250 em 500 mL de solução descorante), e após 2 horas, os géis foram colocados em solução descorante (400 mL de metanol P.A., 70 mL de ácido acético glacial e o volume desta solução completado para 1000 mL em água osmose), por 3 horas, seguida da documentação do gel em Image Scanner – AmershanBioscence.

3.8 Análise estatística

Os tratamentos foram dispostos de forma inteiramente casualizada, com 3 repetições onde foram analisados três fatores (fungos, concentrações de nitrogênio e período de incubação). Os fungos foram separados em ligninolíticos (*P. sajor caju* e *P. chrysosporium*) e celulolíticos (*T. reesei* e *A. niger*). Para esta análise foi empregado o teste de Tukey, utilizando o programa ESTAT desenvolvido pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - UNESP, Jaboticabal.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existem algumas formas as quais o nitrogênio pode ser encontrado e que possuem elevado potencial de assimilação pelos fungos. São estas o nitrato (NO_3^-), a amônia (NH_3), o amônio (NH_4^+), aminoácidos, aminas, amidas, peptídeos, proteínas e uréia.

Os fungos filamentosos possuem a capacidade de utilizar o NO_3^-, porém fungos como os Basideomicetos (*P. sajor caju* e *P. chrysosporium*) e leveduras, não conseguem utilizá-lo. Geralmente são adicionados ao meio na forma de sais orgânicos como $NaNO_3$, KNO_3 e NH_4NO_3. O NH_4^+ é um dos íons mais utilizados entre as formas inorgânicas de nitrogênio, sendo adicionado na forma de sulfatos, cloretos, carbonato, acetatos, tartaratos, fosfatos, ou na forma orgânica. Os fungos também são capazes de utilizar fontes de nitrogênio orgânico como aminoácidos, aminas e amidas, hidrolisados enzimáticos ou ácidos de origem animal ou vegetal, que normalmente aparecem misturados formando uma fonte complexa de nitrogênio. Peptídeos como caseína hidrolisada e a peptona também são consideradas fontes de nitrogênio para os fungos, assim com a uréia (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004).

O uso do extrato de levedura foi determinado devido à disponibilidade deste material, obtido através da secagem das células de leveduras utilizadas nas usinas e destilarias durante o processo de fermentação. O extrato utilizado neste experimento contém nitrogênio α–amino, cloreto de sódio (NaCl) e vitaminas do complexo B como tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), niacina, ácido pantotênico, ácido fólico e biotina.

Exigências nutricionais são uma das características fisiológicas fundamentais não somente para o crescimento dos fungos, mas também para um melhor entendimento do papel ecológico destes (LI; NAN, 2009). Para seu crescimento, o fungo necessita cerca de quarenta nutrientes, entre eles, carbono e nitrogênio (AHAMAD et al., 2004). Diversos são os estudos relacionando fontes de nitrogênio com a produção de enzimas lignocelulolíticas em *P. sajor caju* (ELISASHVILI et al., 2008; BETTIN et al., 2009) *P. chrysosporium* (KAAL et al., 1995; ROBINSON et al., 2001) *T. reesei* (KUMAR, et al., 2008; WANG et al., 2010) e *Aspergillus* (LOCKINGTON et al., 2002; SHERIEF et al., 2010)

A lignina não é considerada um substrato energético que permite o crescimento de organismos, é necessário a presença de outro substrato para ser utilizado como fonte de energia. A degradação da lignina está relacionada com o crescimento secundário do fungo que, com a diminuição de nutrientes e a extinção do seu crescimento, gera a atividade ligninolítica. Esta atividade é iniciada pela redução de nitrogênio no meio e alta concentração de oxigênio, pois é um processo oxidativo (KIRK et al., 1978; KAAL et al., 1995; LEVIN;

FORCHIASSIN, 2001). No caso da degradação da celulose, além da fonte de nitrogênio, é observado que a presença de glicose pode induzir ou reprimir a ação das celulases (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2004).

4.1 Enzimas ligninolíticas

Foi observado que, entre os fungos ligninolíticos e os celulolíticos, ocorreram diferenças significativas entre as atividades enzimáticas da Lacase, Peroxidases e Manganês Peroxidase para os fatores analisados, concentrações de nitrogênio e período de incubação (Figura 2; 3 e 4; Anexos A - F).

As maiores atividades enzimáticas de Lacase e Peroxidases foram observadas em *P. sajor caju*, na concentração de 1% de extrato de levedura, no 13º e 12º dias de incubação, respectivamente, seguido por *T. reesei*, 1%, 4º e 5º dias, *A. niger*, 1%, 4º e 5º dias e *P. chrysosporium*, 0,5%, 5º e 8º dias (Tabelas 1, 2). Com relação a MnP, a maior atividade enzimática foi observada em *T. reesei*, 1%, 4º dia, *A. niger*, 1%, 10º dia, *P. sajor caju*, 0,5%, 8º dia e *P. chrysosporium*, 9º dia, 1% (Tabela 3).

Comparando os resultados obtidos verifica-se que, apesar das maiores atividades das enzimas Lacase e Peroxidases para *P. sajor caju* terem sido observadas no 13º e 12º dia, este fungo possui uma maior atividade enzimática em relação aos demais organismos estudados, a partir do 4º dia de incubação. Com relação ao fungo ligninolítico *P. chrysosporium*, a atividade enzimática foi a menor observada com relação aos quatro fungos estudados e a maior atividade específica de MnP foi observada para o fungo *T. reesei* seguido por *A. niger*, mesmo sendo estes fungos caracterizados por produzir celulases.

Segundo Ferreira et al. (2010), existem diferenças com relação ao perfil enzimático quanto ao organismo, substrato utilizado e período de incubação. As características físico-químicas do meio de cultivo são de fundamental importância, não apenas para o crescimento celular como também para a produtividade enzimática. Isto ocorre porque as células são capazes de responder aos estímulos químicos e físicos do meio externo através de mecanismos bioquímicos que regulam a expressão gênica e a fisiologia do microrganismo e, por extensão, seu desempenho na formação do produto desejado. Esses mecanismos são acionados, dentre outro fatores, por indutores, ativadores, inibidores e repressores (BON et al., 2008).

Tabela 1 – Maiores atividades enzimáticas de Lacase, em µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1} e UI.L^{-1}, produzidas pelos fungos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C

Fungos	Dias	Lacase (µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1})	Lacase (UI.L^{-1})
P. sajor caju 0,5%	12	0,6	1113,3
P. sajor caju 1%	13	2,2	3032,7
P. chrysosporium 0,5%	5	0,018	15,5
P. chrysosporium 1%	9	0,009	11,3
T. reesei 0,5%	5	0,138	8,4
T. reesei 1%	4	0,182	7,1
A. niger 0,5%	5	0,035	6,8
A. niger 1%	4	0,046	3,7
Controle abiótico*	3	0	0

*bagaço e palha pré-tratados com ácido diluído e autoclave, juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura

Tabela 2 – Maiores atividades enzimáticas de Peroxidases, em µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1} e UI.L^{-1}, produzidas pelos fungos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C

Fungos	Dias	Peroxidases (µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1})	Peroxidases (UI.L^{-1})
P. sajor caju 0,5%	12	0,468	1113,3
P. sajor caju 1%	12	1,5	2663,6
P. chrysosporium 0,5%	8	0,009	9,3
P. chrysosporium 1%	4	0,007	3,0
T. reesei 0,5%	3	0,008	2,4
T. reesei 1%	5	0,183	8,8
A. niger 0,5%	6	0,043	9,2
A. niger 1%	5	0,081	10,9
Controle abiótico*	3	0	0

*bagaço e palha pré-tratados com ácido diluído e autoclave, juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura

Tabela 3 – Maiores atividades enzimáticas de MnP, em µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1} e UI.L^{-1}, produzidas pelos fungos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C

Fungos	Dias	MnP (µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1})	MnP (UI.L^{-1})
P. sajor caju 0,5%	8	0,046	47,1
P. sajor caju 1%	10	0,022	25,4
P. chrysosporium 0,5%	8	0,004	3,5
P. chrysosporium 1%	9	0,014	17,7
T. reesei 0,5%	4	0,091	3,0
T. reesei 1%	4	0,172	6,7
A. niger 0,5%	9	0,058	24,2
A. niger 1%	10	0,070	29,1
Controle abiótico*	3	0	0

*bagaço e palha pré-tratados com ácido diluído e autoclave, juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura

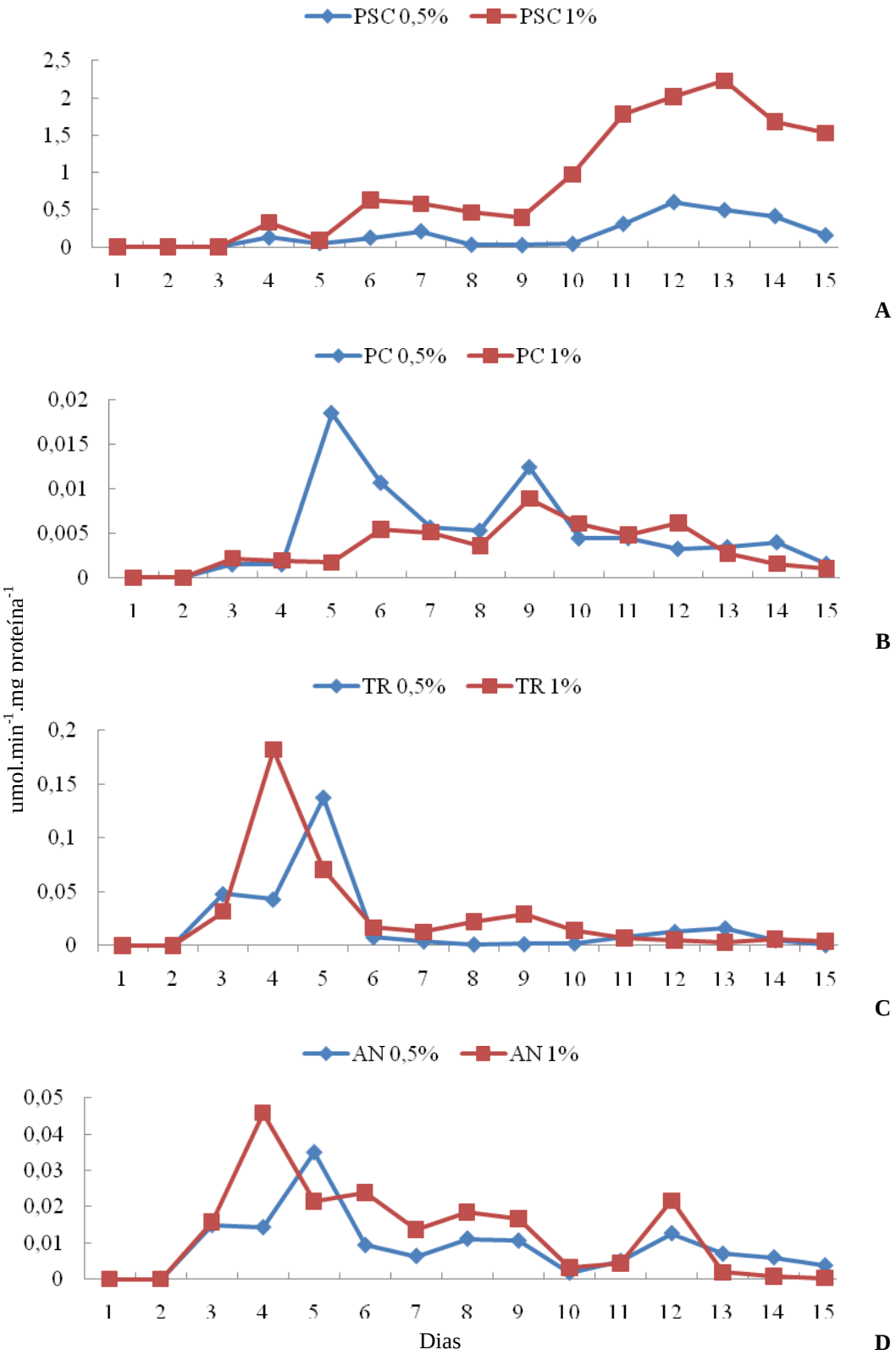

Figura 2 – Perfil enzimático da Lacase, em µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}, produzida pelos fungos (A) *P. sajor caju*, (B) *P. chrysosporium*, (C) *T. reesei* e (D) *A. niger*, crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C

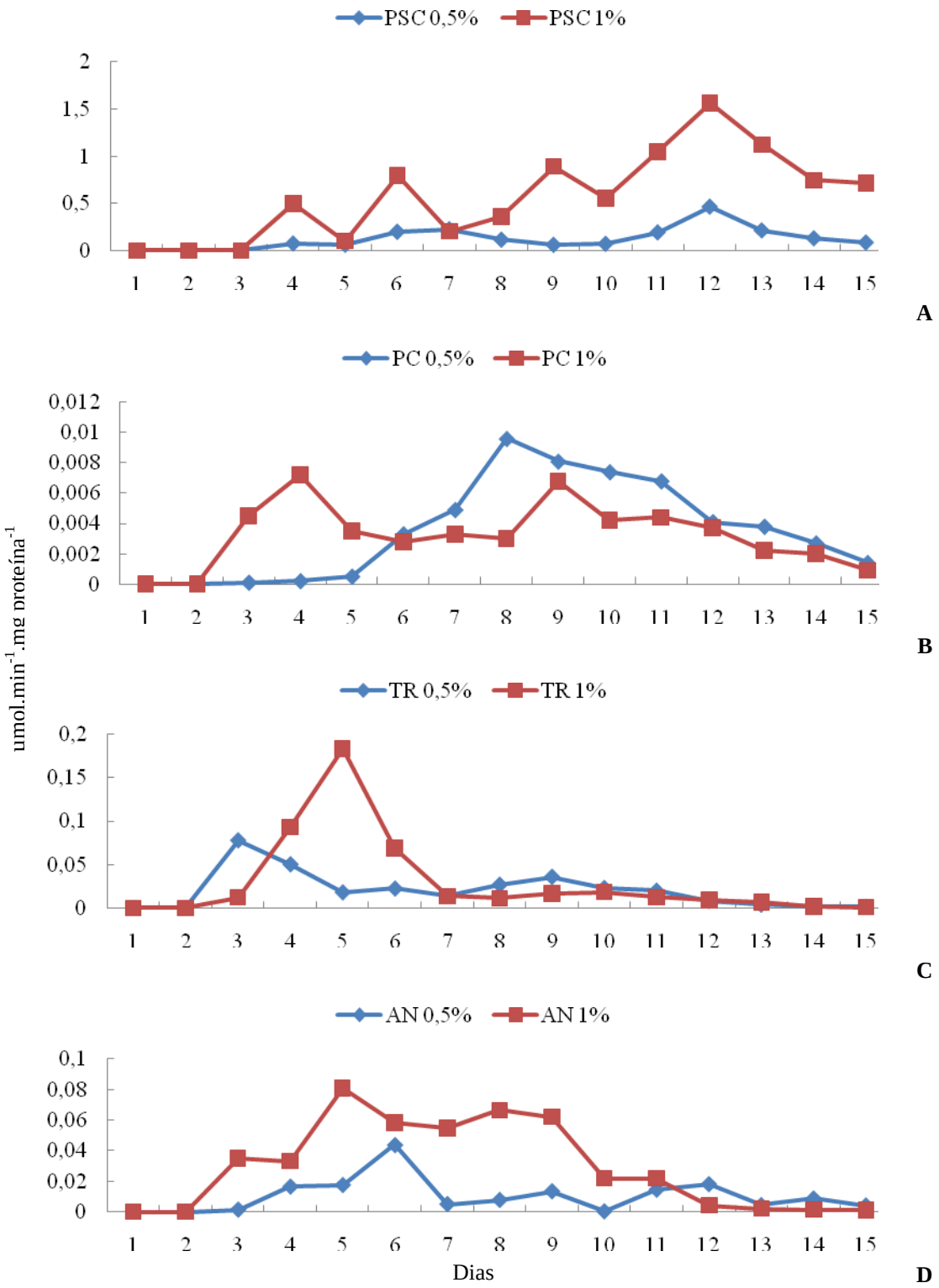

Figura 3 – Perfil enzimático das Peroxidases, em µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}, produzidas pelos fungos (A) *P. sajor caju*, (B) *P. chrysosporium*, (C) *T. reesei* e (D) *A. niger*, crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C

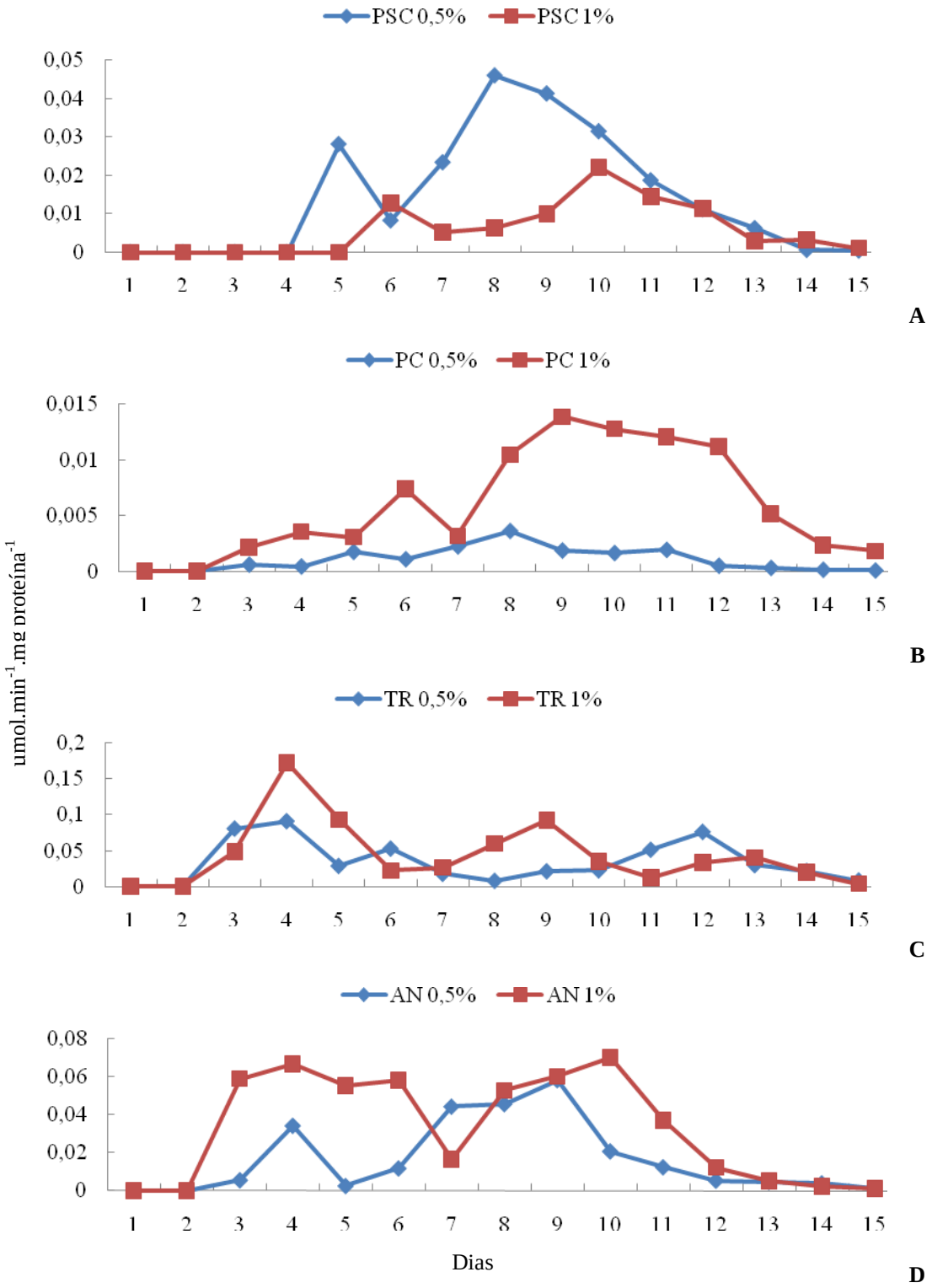

Figura 4 – Perfil enzimático da MnP, em µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}, produzida pelos fungos (A) *P. sajor caju*, (B) *P. chrysosporium*, (C) *T. reesei* e (D) *A. niger*, crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C

O material vegetal e os fungos utilizados neste estudo foram também avaliados em diversas situações pelos pesquisadores do Laboratório de Ecologia Aplicada (CENA-USP) (AGUIAR FILHO, 2008; FASANELLA, 2008; PIETROBON, 2008; FERREIRA, 2009). Como observado na literatura, à alteração do substrato ou do organismo inoculado resulta na alteração das atividades enzimáticas, portanto os resultados deste trabalho foram comparados com os resultados dos demais estudos, visando manter o substrato e os fungos para uma melhor avaliação.

O fungo *P. sajor caju* foi inoculado nos meios líquidos contendo vinhaça (M1), vinhaça com meio sintético para fungos (M2) e vinhaça com glicose (M3) (FERREIRA, 2009) e meios sólidos contendo bagaço e palha de cana com vinhaça (M4) e bagaço e palha de cana com meio líquido mineral (M5) (AGUIAR FILHO, 2008) e incubado por 15 dias (Tabela 4).

Com relação à atividade enzimática de Lacase, o meio sólido contendo bagaço e palha de cana com 0,5% de extrato de levedura foi, em média, 2,6 vezes mais eficiente que os meios líquidos M1, M2 e M3 e 100 vezes mais eficiente que o meio sólido T4. O meio contendo 1% de extrato de levedura foi 7 vezes mais eficiente que os meios líquidos e 275 vezes mais eficiente que o meio sólido.

A atividade de Peroxidases em meio contendo 0,5% ou 1% de extrato de levedura foi 150 e 355 vezes maior, respectivamente, que o meio sólido M4. Entretanto, os meios líquidos M1, M2 e M3, foram, em média, 1,5 e 2,7 vezes maiores na atividade de MnP com relação aos meios com 0,5% e 1% de extrato de levedura e estes meios foram 2,6 e 1,4 vezes mais eficientes que o meio sólido M4.

Tabela 4 – Maiores atividades enzimáticas de Lacase, Peroxidases e MnP, em $UI.L^{-1}$, produzidas pelo fungo *P. sajor caju* crescido em meio líquido ou sólido, por 15 dias, a 28±2°C, segundo Ferreira (2009) e Aguiar Filho (2008)

Tratamentos	Dias	Lacase ($UI.l^{-1}$)	Peroxidases ($UI.l^{-1}$)	MnP ($UI.l^{-1}$)	Autores
M1	9, 12	400	NO*	60	Ferreira (2009)
M2	9, 12	425	NO*	70	Ferreira (2009)
M3	9, 12	450	NO*	80	Ferreira (2009)
M4	6, 6, 12	11	7,5	18	Aguiar F° (2008)
M5		NO*	NO*	NO*	Aguiar F° (2008)

*NO = não foi observada atividade enzimática.
Vinhaça (M1); vinhaça com meio sintético para fungos (M2); vinhaça com glicose (M3); bagaço e palha de cana com vinhaça (M4); e bagaço e palha de cana com meio líquido mineral (M5)

Observa-se que sendo o objetivo a atividade de enzimas ligninolíticas, o meio sólido contendo bagaço e palha de cana com extrato de levedura na concentração de 1% foi o meio mais eficiente.

Segundo Bettin et al. (2009), em experimento realizado com *P. sajor caju* (PS-2001), cultivado em diferentes concentrações de caseína (0,5, 1, 1,5 e 2 $g.L^{-1}$) em meio submerso, por 15 dias, observou-se uma produção média de Lacase que variou de 3600,0 a 11300,0 $UI.L^{-1}$, e a maior atividade foi observada para a concentração de 1,5 $g.L^{-1}$ de caseína, demonstrando que alterações na concentração de nitrogênio resultaram em uma variação na produção da enzima e que não existe uma relação entre maior concentração de nitrogênio e maior atividade enzimática.

Estes resultados demonstram que um mesmo fungo exposto a diferentes condições e fontes de nutrientes obtém uma produção enzimática variável, assim como verificado por Elisashvili et al. (2008) em estudo realizado com sete fungos de decomposição branca expostos a quatro fontes de carbono (folha de árvore, palha de trigo, casca de maça e de banana) e quatro fontes de nitrogênio [KNO_3, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3 e peptona]. Entre estes fungos, o *Pleurotus ostreatus* obteve uma produtividade enzimática de Lacase que variou de 73 $UI.L^{-1}$ em folhas de árvore à 631 $UI.L^{-1}$ em casca de banana e para a enzima MnP, a variação foi de 164 $UI.L^{-1}$ em casca de maça a 437 $UI.L^{-1}$ em meio sólido com peptona.

A enzima Lacase é produzida por todos os fungos de decomposição branca, exceto *P. chrysosporium* (KIRK; FARRELL, 1987; BAVUTTI, 2002) que somente é capaz de produzi-la em determinadas condições, como na presença de cobre (DITTMER et al., 1997). Para Singh e Chen (2008), em uma mini revisão sobre condições de cultivo do *P. chrysosporium* para produção de enzimas que degradam a lignina, a capacidade deste fungo está em produzir principalmente lignina peroxidase (LiP) e MnP e a maior dificuldade no uso deste organismo para produção de enzimas está na instabilidade da produtividade, pois o fungo responde de diferentes maneiras as diversas fontes de nutrientes.

Os fungos *T. reesei* e *A. niger* são caracterizados por produzirem principalmente celulases, porém, neste estudo, foi observado que estes fungos também produziram enzimas que degradam a lignina, assim como observado por outros autores.

Em estudos realizados por Aguiar Filho (2008) onde o fungo *T. reesei* foi inoculado em meio sólido contendo bagaço e palha de cana com vinhaça (M4) e bagaço e palha com meio líquido mineral (M5) e por Fasanella (2008) que inoculou *A. niger* em meio sólido contendo bagaço e palha de cana com farelo de soja (M6), foram analisadas as enzimas Lacase, Peroxidases e MnP (Tabela 5).

Tabela 5 – Maiores atividades enzimáticas de Lacase, Peroxidases e MnP, em $UI.L^{-1}$, produzidas pelos fungos *T. reesei e A. niger* crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar com vinhaça, meio líquido mineral ou farelo de soja, por 15 dias, a 28±2°C, segundo Aguiar Filho (2008) e Fasanella (2008)

Tratamentos	Dias	Lacase ($UI.l^{-1}$)	Peroxidases ($UI.l^{-1}$)	MnP ($UI.l^{-1}$)	Autores
M4	12, 15, 15	2,8	3,0	19,0	Aguiar F° (2008)
M5	12, 15, 12	1,5	1,4	7,5	Aguiar Fº (2008)
M6	8, 7	40	NO*	55	Fasanella (2008)

*NO = não foi observada atividade enzimática.
Bagaço e palha de cana com vinhaça (M4); bagaço e palha com meio líquido mineral (M5); bagaço e palha de cana com farelo de soja (M6)

A atividade enzimática de Lacase em meio sólido contendo 0,5% de extrato de levedura foi 3 e 5,6 vezes maior que os meios M4 e M5, entretanto, o meio M6 foi 5,9 vezes mais eficiente na atividade desta enzima. Com relação ao meio contendo 1% de extrato de levedura, este foi 2,5 e 4,7 vezes mais eficiente que os meios M4 e M5, porém 10,8 vezes menos eficiente que o meio M6.

O meio com 0,5% de extrato de levedura foi 1,25 vezes menos eficiente que o meio M4, 1,7 vezes mais eficiente que o meio M5 e para 1% de extrato de levedura, 2,9 e 6,3 vezes maior que M4 e M5, respectivamente, para a produção de Peroxidases.

Observando a atividade enzimática de MnP, os meios M4, M5 e M6 foram 6,3, 2,5 e 2,2 vezes mais eficientes na atividade desta enzima que o meio contendo 0,5% de extrato de levedura e 2,8, 1,2 e 1,9 vezes mais eficientes que o meio contendo 1%.

Estes resultados sugerem que o meio sólido contendo bagaço e palha de cana com farelo de soja é mais eficiente com relação a atividade das enzimas Lacase, Peroxidases e MnP, para o fungo *A. niger*. Entretanto, com relação ao *T. reesei*, os meios contendo extrato de levedura foram mais eficientes nas atividades de Lacase e Peroxidases.

As enzimas ligninolíticas podem ser inativadas por processos bióticos e/ou abióticos como adsorção a matriz orgânica do substrato fúngico, elevada acidez ou alcalinidade, pela biodegradação por enzimas como as proteases, pelo excesso de matéria orgânica, entre outros (AHN et al., 2002). Durante a degradação do bagaço de cana, a reação da enzima Lacase com compostos fenólicos podem gerar substâncias húmicas, resultando na perda da atividade e estabilidade das enzimas ligninolíticas (GIANFREDA; BOLLAG, 1994). Segundo Machado (1998), a temperatura e o tempo de incubação do organismo interferem na atividade enzimática. Elevadas temperaturas podem estimular a produção de enzimas, porém também podem provocar a desnaturação protéica, resultando na perda da atividade.

4.2 Enzimas celulolíticas

Nas análises das atividades celulolítica total e de Endoglicanases foram observadas diferenças significativas entre os fungos ligninolíticos e celulolíticos com relação às concentrações de nitrogênio e o período de incubação (Figuras 5 e 6; Tabelas 6 e 7; Anexos G - J). Comparando os resultados obtidos verifica-se que as maiores atividades enzimáticas foram observada para os fungos *T. reesei* (0,5%), *A. niger* (1%), seguido por *P. sajor caju* (1%) e *P. chrysosporium* (0,5%), confirmando o perfil celulolítico dos dois primeiros fungos.

Tabela 6 – Maiores atividades celulolítica total (FPU. mg proteína^{-1} e FPU.mL^{-1}) produzidas pelos fungos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C

Fungos	Dias	FPU. mg proteína^{-1}	FPU.mL^{-1}
P. sajor caju 0,5%	3	2,7	0,362
P. sajor caju 1%	3	7,6	0,522
P. chrysosporium 0,5%	5	3,6	1,9
P. chrysosporium 1%	6	2,8	2,8
T. reesei 0,5%	7	10,1	1,3
T. reesei 1%	8	5,3	1,3
A. niger 0,5%	7	6,2	1,9
A. niger 1%	7	8,5	2,3
Controle abiótico*	3	0	0

*bagaço e palha pré-tratados com ácido diluído e autoclave, juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura

Tabela 7 – Maiores atividades de Endoglicanases (CMC.mg proteína^{-1} e CMC.mL^{-1}) produzidas pelos fungos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C

Fungos	Dias	CMC. mg proteína^{-1}	CMC.mL^{-1}
P. sajor caju 0,5%	3	6,1	0,800
P. sajor caju 1%	3	8,5	0,167
P. chrysosporium 0,5%	5	5,3	2,9
P. chrysosporium 1%	6	4,6	4,5
T. reesei 0,5%	7	20,6	2,6
T. reesei 1%	3	18,3	0,600
A. niger 0,5%	7	12,4	3,9
A. niger 1%	7	14,1	3,9
Controle abiótico*	3	0	0

*bagaço e palha pré-tratados com ácido diluído e autoclave, juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura

Foi verificado também que as maiores atividades enzimáticas ocorreram nos primeiros sete dias de inoculação. O sistema enzimático produtor de celulases é induzido principalmente na presença do substrato celulose (BHAT; BHAT, 1997). Sugere-se, então, que o pré-tratamento do bagaço e da palha com ácido diluído deve ter provocado um afrouxamento das

fibras de hemicelulose e lignina, resultando em uma maior exposição das fibras de celulose, induzindo a atividade das celulases.

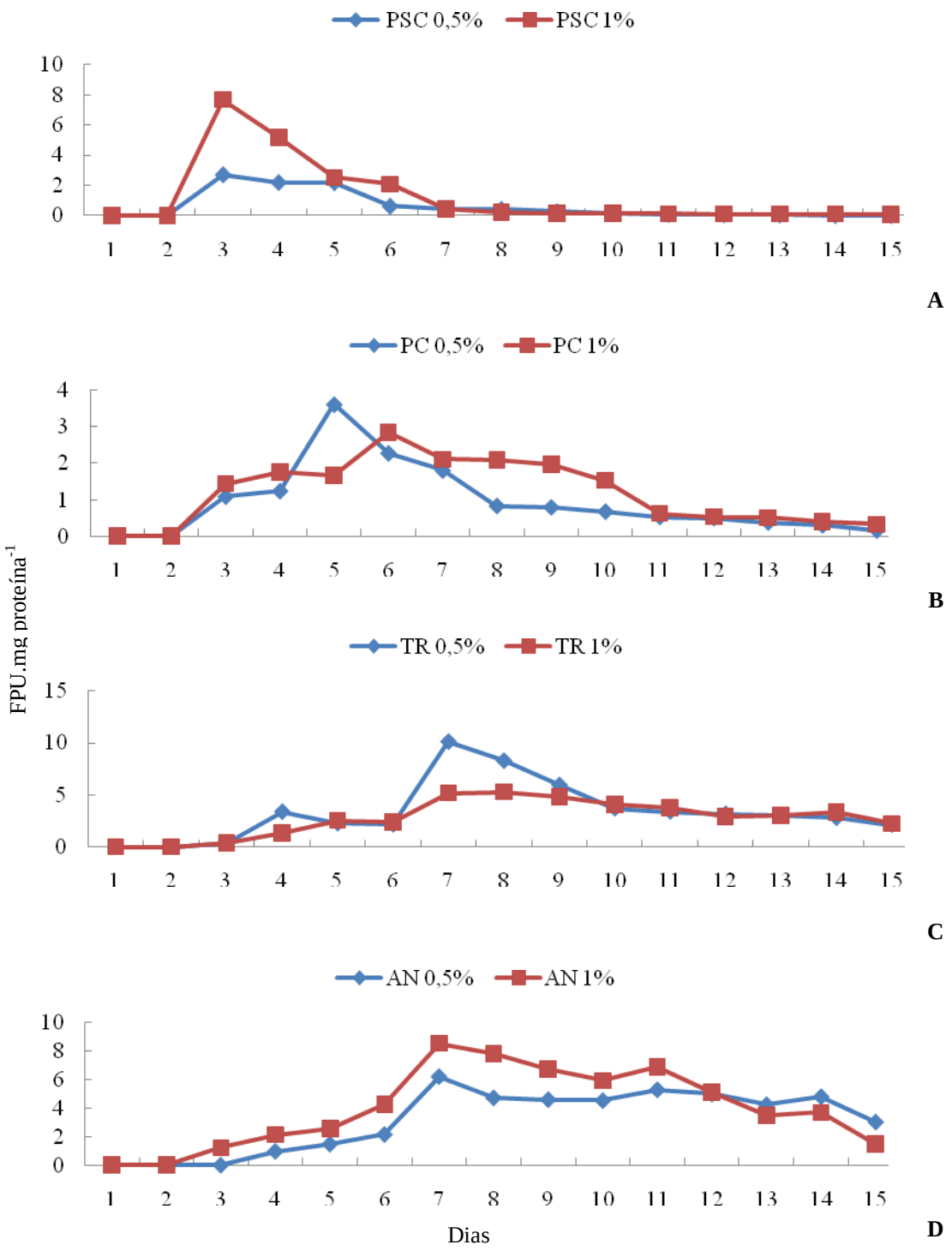

Figura 5 – Perfil enzimático da atividade celulolítica total, em FPU.mg proteína^{-1}, produzidas pelos fungos (A) *P. sajor caju*, (B) *P. chrysosporium*, (C) *T. reesei* e (D) *A. niger*, crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C

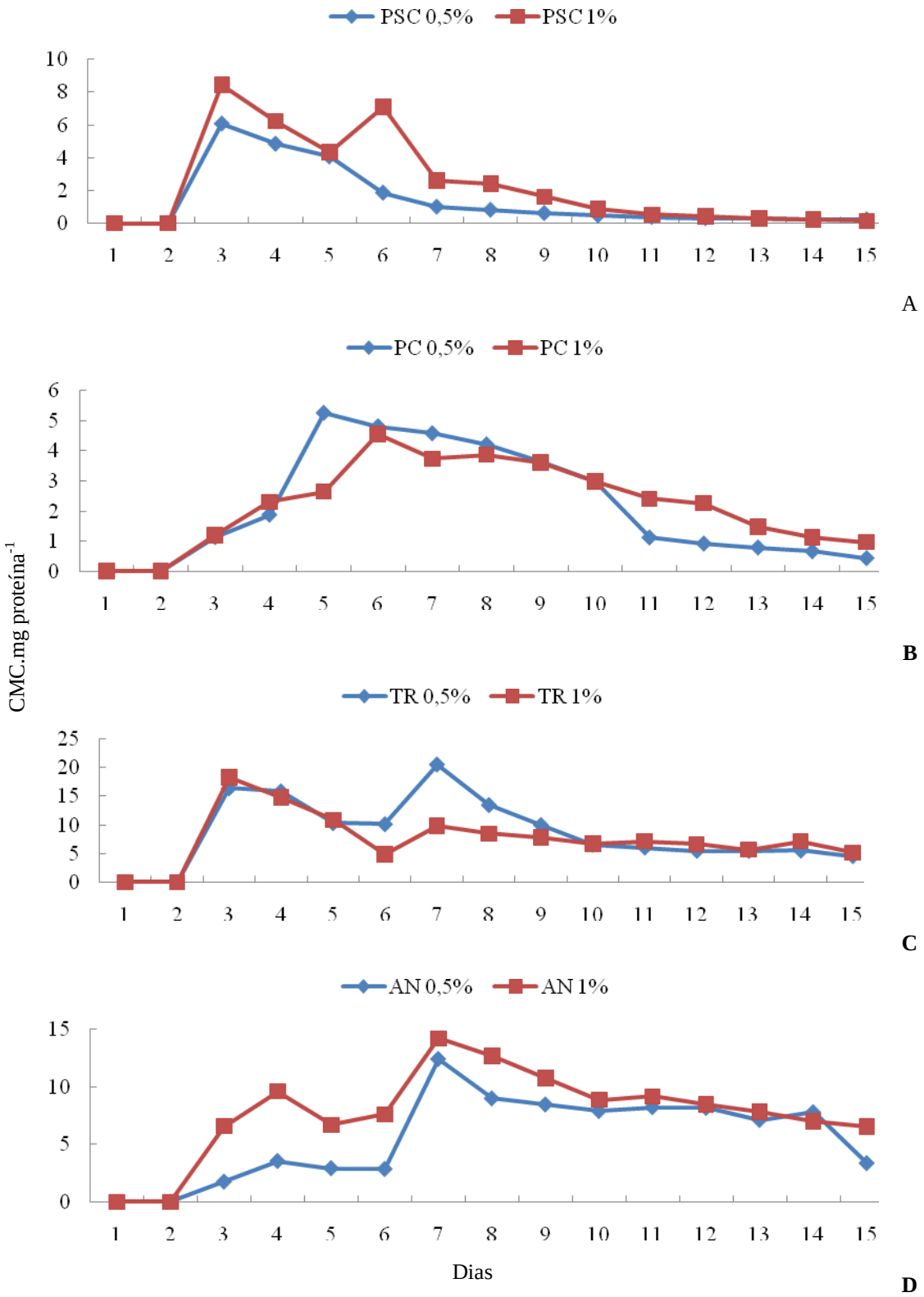

Figura 6 – Perfil enzimático das Endoglicanases, em CMC.mg proteína^{-1}, produzidas pelos fungos (A) *P. sajor caju*, (B) *P. chrysosporium*, (C) *T. reesei* e (D) *A. niger*, crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C

Em estudo realizado por Aguiar Filho (2008) com os fungos *P. sajor caju* (CCB 020) e *T. reesei*, crescidos por 30 dias em dois meios, foram analisadas as atividades enzimáticas das celulases (Tabela 8). M7 representa o meio contendo bagaço de cana com vinhaça e *P. sajor caju*, M8 bagaço de cana com meio líquido mineral e *P. sajor caju*, M9 bagaço de cana com vinhaça e *T. reesei* e M10 bagaço de cana com meio líquido mineral e *T. reesei*.

Tabela 8 – Maiores atividades enzimáticas de Exoglicanases e Endoglicanases, em FPU (unidades.mL^{-1}) e CMC (unidades.mL^{-1}), produzidas pelos fungos *P. sajor caju* e *T. reesei* crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar com vinhaça ou meio líquido mineral, por 15 dias, a 28±2°C, segundo Aguiar Filho (2008)

Tratamentos	Dias	Exoglicanases (FPU.mL^{-1})	Endoglicanases (CMC.mL^{-1})	Autores
M7	15, 12	2,3	0,5	Aguiar F° (2008)
M8	18	17,3	NO*	Aguiar Fº (2008)
M9	18, 24	18	6	Aguiar Fº (2008)
M10	18, 15	2	7	Aguiar Fº (2008)

*NO = não foi observada atividade enzimática.
Bagaço e palha de cana com vinhaça e *P. sajor caju* (M7); bagaço e palha de cana com meio líquido mineral e *P. sajor caju* (M8); bagaço e palha de cana com vinhaça e *T. reesei* (M9); e bagaço e palha de cana com meio líquido mineral e *T. reesei* (M10)

No caso deste estudo, as maiores atividades enzimáticas das celulases ocorreram sempre após 15 dias de inoculação do fungo, sugerindo-se que, provavelmente, tanto a vinhaça quanto o meio líquido mineral continham os nutrientes necessários para que estes dois fungos não tivessem a necessidade de elevada produção de celulases nos primeiros dias a fim de utilizar o bagaço da cana como fonte primária de carbono.

Pietrobon (2008), utilizando enzimas comerciais obtidas do fungo *T. reesei*, obteve uma atividade celulolítica total que variou entre 52,2 a 444 FPU.mL^{-1}. Comparando os resultados obtidos neste estudo com os resultados de Pietrobon (2008), foi observado que as enzimas comerciais foram pelo menos 18,6 vezes mais eficientes com relação à atividade das celulases. Com relação aos fungos *P. sajor caju* e *T. reesei* (AGUIAR FILHO, 2008), estes foram mais eficientes quanto à atividade enzimática de celulases em meio contendo bagaço e palha de cana com vinhaça ou meio líquido mineral do que os meios contendo o bagaço e a palha da cana com 0,5% ou 1% de extrato de levedura.

Em estudos realizados por Membrillo et al. (2008), utilizando o bagaço de cana peneirado (fragmentos com diversos tamanhos) e inoculado com o fungo *P. ostreatus*, foi observado diferenças nas atividades das celulases com relação ao tamanho das partículas de bagaço. *A. niger* e *T. reesei* expostos a diferentes períodos de incubação, pH, temperatura,

fontes de nitrogênio e carbono também resultaram em diferentes atividades enzimáticas de celulases (WANG et al., 2009; SHERIEF et al., 2010), confirmando os diferentes resultados obtidos neste estudo com relação a atividade enzimática.

4.3 Açúcares redutores

A quantificação de açúcares redutores (AR) liberados foi baseada no método do ácido dinitrosalicílico (DNS). Este método parte do princípio onde o ácido 3,5-dinitrosalicílico é reduzido para ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, enquanto o grupamento aldeído parece ser oxidado a agrupamento carboxila. A equivalência entre o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico produzido e a quantidade de açúcar não é exata, pois diferentes açúcares, como hexoses e pentoses, produzem diferentes intensidades na cor da amostra, sugerindo que a química da reação, parcialmente elucidada, deva ser mais complexa.

Foram verificadas diferenças significativas entre os fungos, concentrações de nitrogênio e período de incubação, com relação aos ARs (Tabela 9; Figura 7; Anexos K e L). O fungo que obteve a maior liberação de AR foi o *P. chrysosporium*, no 9º dia, para a concentração de 1% de extrato de levedura, seguido por *T. reesei* 0,5%, 14º dia, *P. sajor caju* 1%, 6º dia e *A. niger*, 1%, 4º dia.

Tabela 9 – Maiores concentrações de AR, em $mg.gBS^{-1}$ e $mg.mL^{-1}$, liberados pelos fungos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por 15 dias, a 28±2°C

Fungos	Dias	AR ($mg.gBS^{-1}$)	AR ($mg.mL^{-1}$)
P.sajor caju 0,5%	8	0,381	1,2
P.sajor caju 1%	6	0,623	1,9
P. chrysosporium 0,5%	6	0,544	1,6
P. chrysosporium 1%	9	0,757	2,3
T. reesei 0,5%	14	0,630	1,9
T. reesei 1%	12	0,430	1,3
A. niger 0,5%	3	0,451	1,4
A. niger 1%	4	0,526	1,6
Controle abiótico*	1	Nq**	4,2

*bagaço e palha pré-tratados com ácido diluído e autoclave.

**Nq = não quantificado

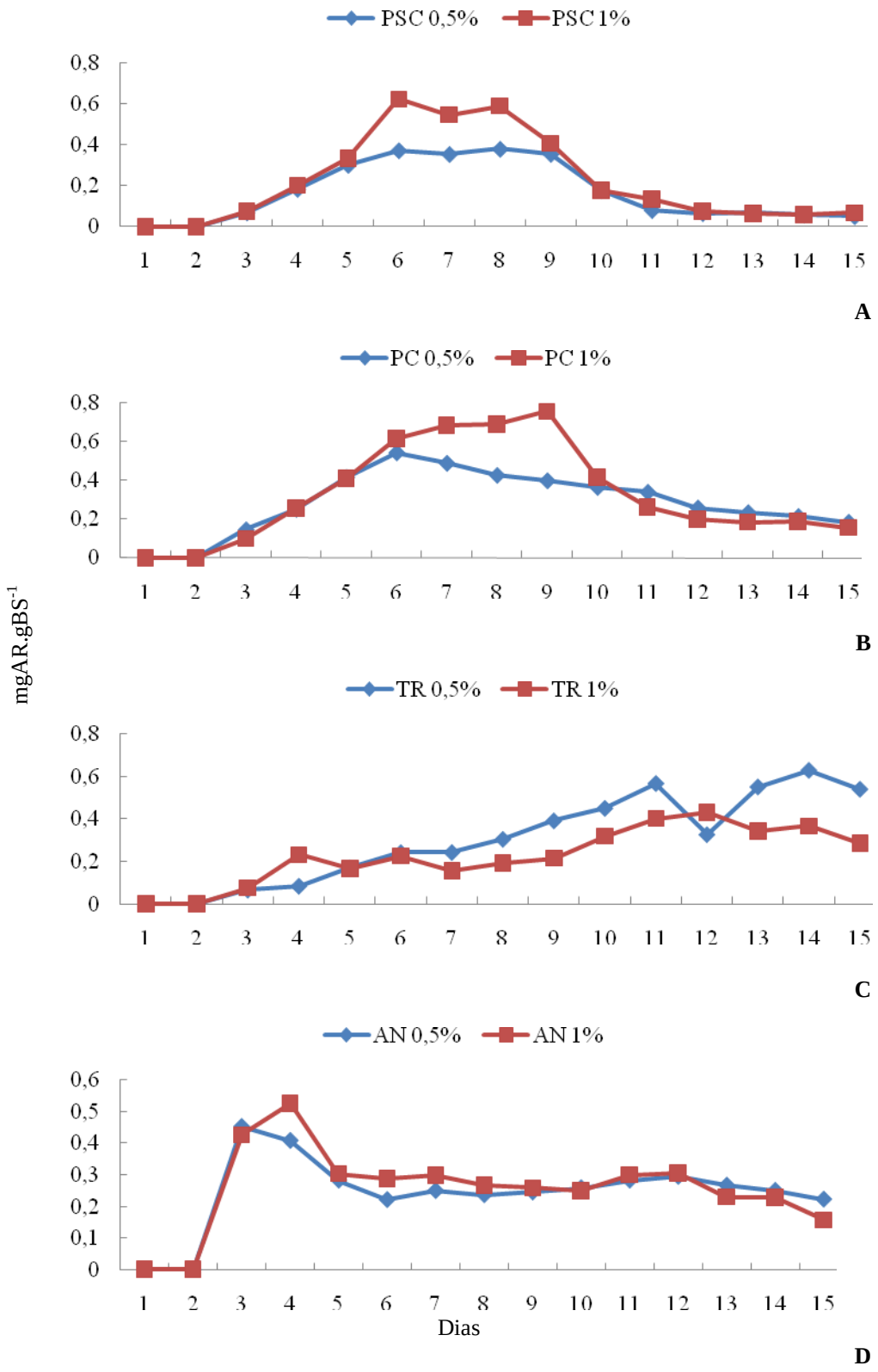

Figura 7 – Quantificação dos açúcares redutores (ARs) liberados do bagaço e palha de cana-de-açúcar secos (BS) (mgAR.gBS^{-1}) pelos fungos (A) *P. sajor caju*, (B) *P. chrysosporium*, (C) *T. reesei* e (D) *A. niger*, em meio contendo 0,5% ou 1% de extrato de levedura, por um período de 15 dias, à 28±2°C

Comparando a atividade enzimática celulolítica com a quantificação dos ARs observa-se que o fungo que mais liberou os açúcares, *P. chrysosporium*, não foi o organismo que obteve a maior atividade enzimática das celulases. Observando o valor de AR para o controle abiótico, de 4,2 $mg.mL^{-1}$, sugere-se que os fungos possam estar consumindo grande parte dos açúcares liberados, como fonte de carbono para o próprio crescimento. Entretanto, as elevadas atividades enzimáticas sugerem que os fungos estejam degradando o material lignocelulósico.

No caso do *P. chrysosporium*, supõe-se que este fungo esteja produzindo uma elevada atividade de β-glicosidase, não analisada neste estudo, liberando uma alta concentração de açúcares. Apesar de ser um fungo de decomposição branca, geralmente caracterizado por degradar a lignina, este organismo esta entre aqueles que tiveram o complexo celulolítico extensivamente estudado e caracterizado por ser completo, ou seja, possuindo todas as celulases (KUHAD et al., 1997; FERRAZ, 2004).

O bagaço e palha de cana utilizados neste estudo e com o mesmo pré-tratamento foram hidrolisados com enzimas comerciais obtidas do fungo *T. ressei*, por Pietrobon (2008). A média dos ARs liberados foi de 6,1 $mg.mL^{-1}$, sendo que os valores variaram entre 5,7 e 6,5. A enzima indicada como a mais eficiente foi aquela que liberou a maior quantidade de ARs com relação à menor atividade celulolítica total. Comparando os valores de ARs destes dois estudos, verifica-se que as enzimas comerciais liberaram, em média, com relação ao fungo *P. chrysosporium*, 2,7 vezes mais de ARs. O uso de enzimas comerciais na hidrólise de materiais lignocelulolíticos é muito desejável, porém os custos destas enzimas ainda as tornam inviáveis (BAUDEL, 2006).

Contudo, é essencial que se faça a identificação destes açúcares redutores, através da cromatografia, por exemplo, para então, selecionar o fungo que possa liberar glicose em quantidade suficiente para a fermentação.

4.4 Enzimas antioxidantes

No intuito de verificar um possível estresse oxidativo sobre os fungos em função de duas concentrações de extrato de levedura (estresse nutricional), foi determinada a atividade de duas enzimas antioxidantes, SOD e CAT, responsáveis pela defesa contra as espécies ativas de oxigênio (EAOs), geradas principalmente em resposta ao estresse.

A atividade da SOD, enzima que catalisa a formação de H_2O_2 e O_2 a partir de radicais superóxido ($O_2^{-\bullet}$), foi realizada através de PAGE não desnaturante (Figura 8).

Foram observadas diferenças quanto à presença e ausência de bandas, sendo possível visualizar até quatro isoformas (para *T. reesei*, em 0,5%, nos dias 3 e 5) e também com relação à intensidade das bandas, tanto entre os fungos, quanto as concentrações e o período de incubação.

Somente para o primeiro dia de análise (Figura 8; A), não foi possível afirmar sobre as diferenças observadas devido à baixa quantidade de proteína extraída neste dia. Nos demais dias analisados (2, 3, 5, 7, 10 e 15), todas as amostras possuíam 20 µg de proteína. O controle abiótico não apresentou atividade enzimática com relação às concentrações e o período de incubação.

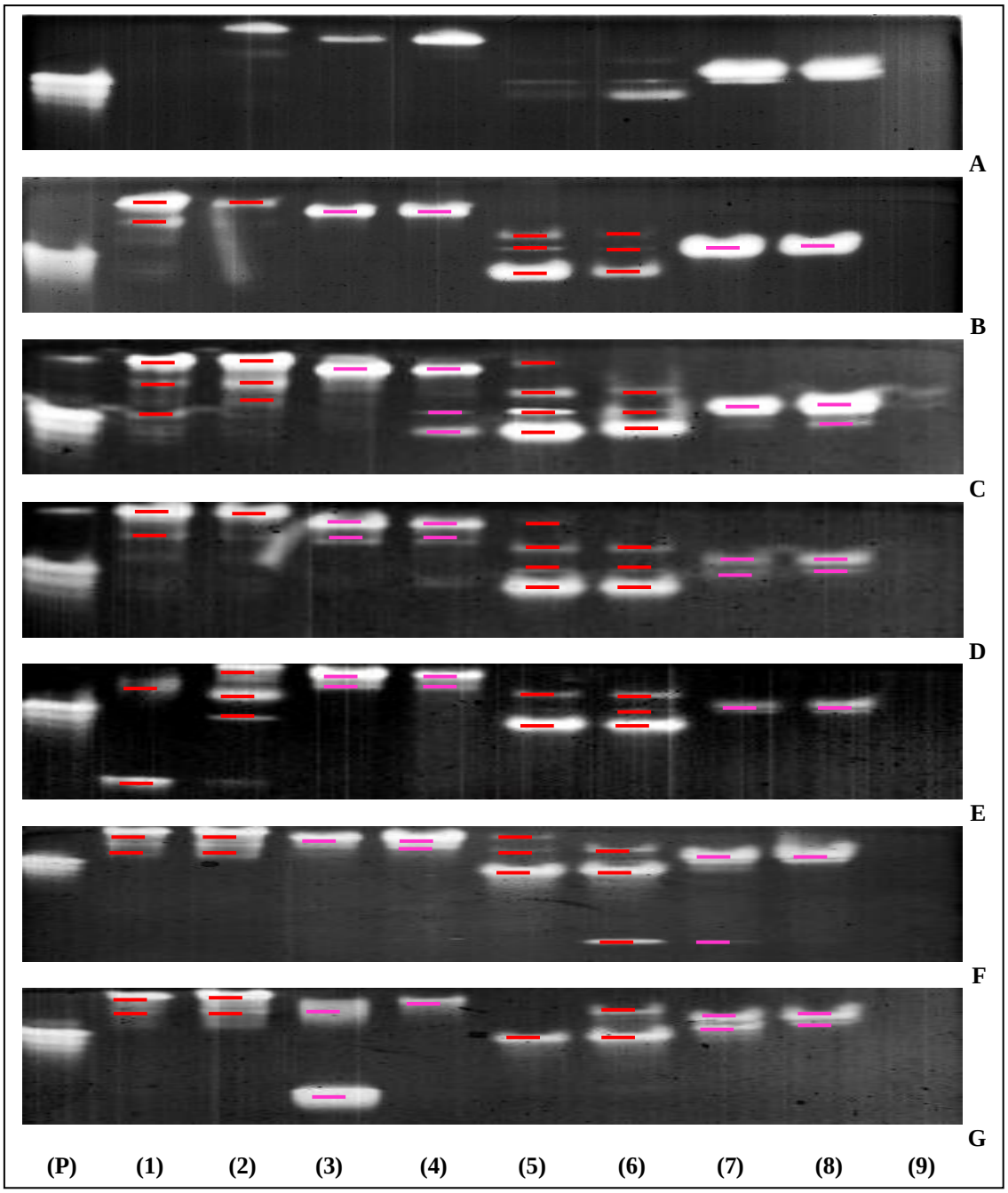

Figura 8 – Atividade de SOD em PAGE não desnaturante. (P) padrão SOD de fígado bovino; (1) *P. sajor caju* 0,5%; (2) *P. sajor caju* 1%; (3) *P. chrysosporium* 0,5%; (4) *P. chrysosporium* 1%; (5) *T. reesei* 0,5%; (6) *T. reesei* 1%; (7) *A. niger* 0,5%; (8) *A. niger* 1%; (9) controle abiótico. Dias 1 (A), 2 (B), 3 (C), 5 (D), 7 (E), 10 (F), e 15 (G)

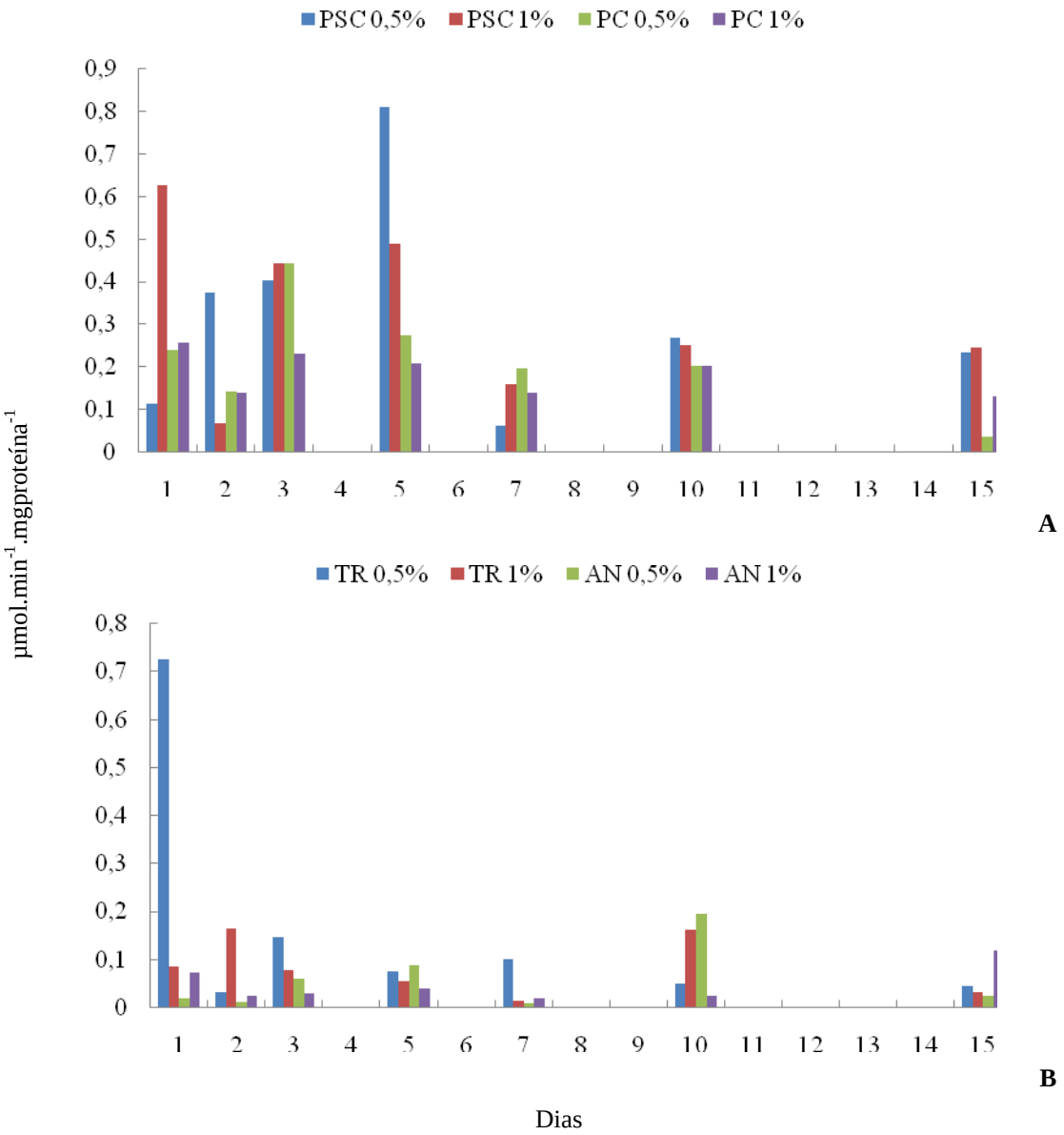

Figura 9 – Atividade específica da enzima Catalase (µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}) produzida pelos fungos (A) *P. sajor caju* e *P. chrysosporium*, (B) *T. reesei* e *A. niger*, em meio contendo 0,5% ou 1% de extrato de levedura, durante os dias 1, 2, 3, 5, 7, 10 e 15, à 28±2°C

Foram observadas diferenças significativas na atividade específica da enzima CAT com relação aos fungos, concentrações de nitrogênio e períodos de incubação (Figura 9; Anexo M).

A enzima CAT catalisa a formação de H_20 e O_2 a partir do H_2O_2. A maior atividade desta enzima foi observada no 5º dia, na concentração de 0,5% de extrato de levedura, para o fungo *P. sajor caju* (0,811 µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}). Para a concentração de 1%, a maior

atividade foi verificada no 1º dia (0,626 µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}). Em seguida, o fungo *T. reesei*, na concentração de 0,5%, no 1º dia (0,726 µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}). Para a concentração de 1%, a maior atividade foi observada no 2º dia (0,163 µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}). O fungo ligninolítico *P. chrysosporium* foi o terceiro maior produtor da enzima CAT, verificado no 3º dia, para a concentração de 0,5% (0,441 µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}) e na concentração de 1%, 0,256 µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}, no 1º dia. Para *A. niger*, a maior atividade enzimática foi observada no 10º dia, também na concentração de 0,5% de extrato de levedura (0,194 µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}). Para a concentração de 1%, no 15º dia, foi observada a atividade de 0,119 µmol.min^{-1}.mg proteína^{-1}. O controle abiótico não apresentou atividade enzimática com relação às concentrações e os dias.

Portanto, é possível verificar que todos os fungos produziram uma elevada atividade de CAT quando crescidos na menor concentração de nitrogênio (0,5%), demonstrando que ocorreu uma situação estresse maior em relação ao meio contendo 1% de extrato de levedura. E esta atividade elevada foi observada entre os cinco primeiros dias de inoculação do fungo, sugerindo uma provável concentração de H_2O_2 neste período.

Segundo estudos realizados por Kwon e Anderson (2001) em *P. chrysosporium*, é sabido que este fungo utiliza o H_2O_2 como substrato para a produção de diversas peroxidases durante a degradação da lignina. Entretanto, estes autores determinaram como este fungo se protege do efeito deletério das EAOs e para isso observaram a atividade da CAT. Este fungo produz quatro isoformas de catalase (CAT A – CAT D). A CAT C foi dominante em todas as condições de crescimento e a CAT D foi verificada somente em condições de baixa concentração de carbono ou elevadas concentrações de nitrogênio. Em baixas concentrações de nitrogênio, um aumento na atividade específica da CAT antecede o ataque das enzimas ligninolíticas. Em baixas concentrações de carbono, a CAT é produzida em elevados níveis, porém sem relação com a produção de enzima ligninolíticas. A atividade da CAT não está coordenada com o metabolismo ligninolítico (KWON; ANDERSON, 2001).

Foram analisados micélios de *Cordyceps militaris*, utilizado na China como medicamento, expostos a fontes de carbono e nitrogênio, quanto à produção de SOD, CAT e peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica (MDA) é utilizada como indicador de danos na membrana celular, principalmente em situações de exposição a metais pesados, herbicidas entre outros agentes poluentes. Em meio com 1% e 4% de glicose, a SOD foi de 21 e 32 U.mg proteína^{-1} respectivamente, a CAT de 93 e 46 U.mg proteína^{-1} e a MDA de 4,5 e 4,0 nM.g micélio seco^{-1}. Para meio contendo 0,1% e 0,5% de extrato de levedura, a atividade de SOD foi de 21 e 16 U.mg proteína^{-1}, a de CAT foi de 19 e 10 U.mg proteína^{-1} e a MDA foi de 4 e 3

nM.g micélio seco^{-1}. A diminuição do valor da peroxidação lipídica nos dois tratamentos com a maior concentração de glicose e extrato de levedura indica que as células de *C. militaris* não sofreram danos com relação aos radicais gerados pela SOD.

Temperatura, pH, umidade, concentração de substratos, danos físicos entre outros fatores externos influenciam na produção de EAOs pelos fungos (AGUIRRE et al., 2005). A SOD geralmente atua de forma coordenada no sentido de cooperar com as enzimas lignocelulolíticas. Entretanto, não age sobre os componentes dos materiais lignocelulósicos de forma isolada. É considerada uma enzima chave na proteção das células contra o estresse oxidativo. Os $O_2^{-\bullet}$ são observados durante a atuação das enzimas Lacases, MnP e LiP. As EAOs agem como agente oxidante ou redutor, reagindo com outros radicais produzidos pelas enzimas lignolíticas, contribuindo com vários processos essenciais na transformação da lignina (FERREIRA, 2009). Assim como as Peroxidases, a CAT também desempenha importante papel durante a degradação do substrato, diminuindo a concentração de H_2O_2 do meio, evitando a toxicidade para a célula (SZKLARZ; LEONOWICZ, 1986).

4.5 Quantificação de proteínas e variação do perfil protéico

A quantificação das proteínas foi realizada através da metodologia de Bradford (1976). Esta avaliação é considerada um método indireto de medida de biomassa fúngica. Foram observadas, entre os fungos ligninolíticos e celulolíticos, diferenças significativas entre a quantificação de proteína para os fatores analisados, concentrações de nitrogênio e período de incubação (Figuras 10 e 11; Anexos N e O). A utilização do bagaço e da palha da cana juntamente com o extrato de levedura permitiu o crescimento dos quatro fungos analisados.

Para *P. sajor caju* o meio contendo 0,5% de extrato de levedura foi mais eficiente para o crescimento do fungo (1,9 mg de proteína por mL de amostra, 15º dia), em relação aos frascos com 1% do extrato (1,4 mg.mL^{-1}, 15º dia). Para o fungo *P. chrysosporium*, os frascos contendo 1% do extrato apresentaram maior crescimento (1,3 mg.mL^{-1}, 15º dia) do que 0,5% (1,2 mg.mL^{-1}, 15º dia). Entre os fungos celulolíticos, para *T. reesei*, a concentração de 0,5% de extrato de levedura por frasco obteve maior êxito para o crescimento do fungo (0,5 mg.mL^{-1}, 15º dia) do que 1% (0,4 mg.mL^{-1}, 15º dia). Para *A. niger*, a concentração de 1% de extrato foi mais benéfica para o crescimento do fungo (0,8 mg.mL^{-1}, 15º dia) do que 0,5% (0,6 mg.mL^{-1}, 15º dia).

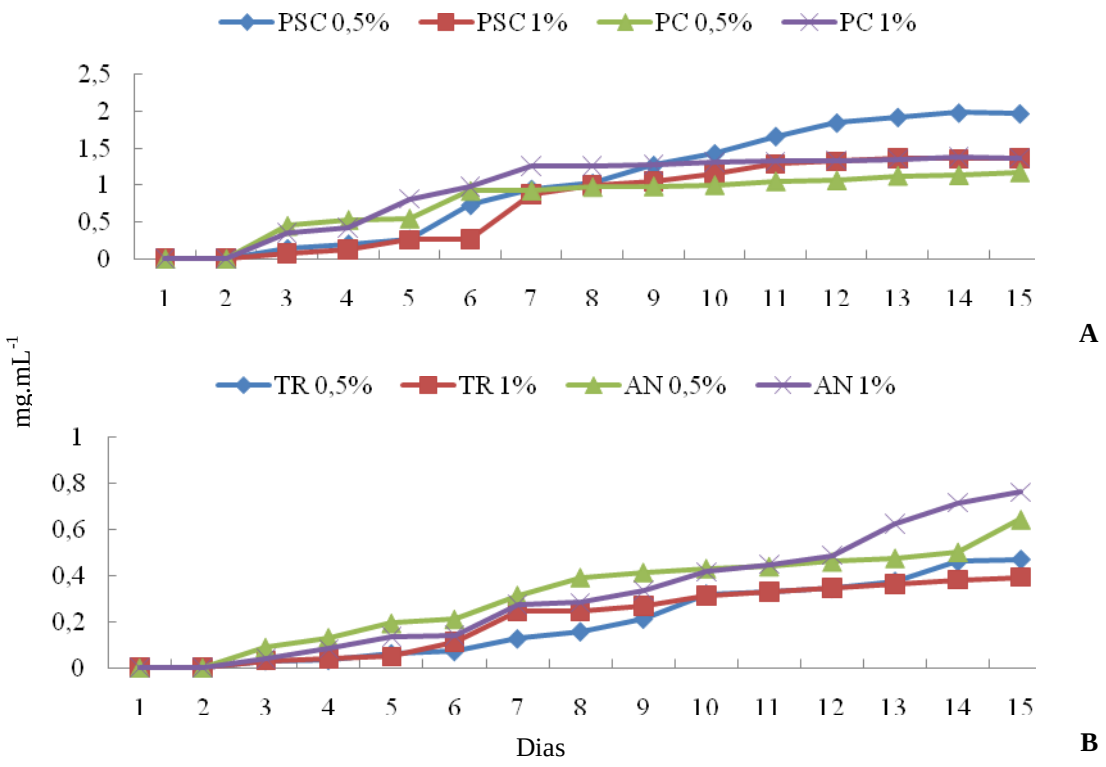

Figura 10 – Concentração de proteína (mg.mL de amostra^{-1}) dos fungos (A) *P. sajor caju* e *P. chrysosporium*, (B) *T. reesei* e *A. niger*, em meio com 0,5% e 1% de extrato de levedura, por um período de 15 dias, à 28±2°C

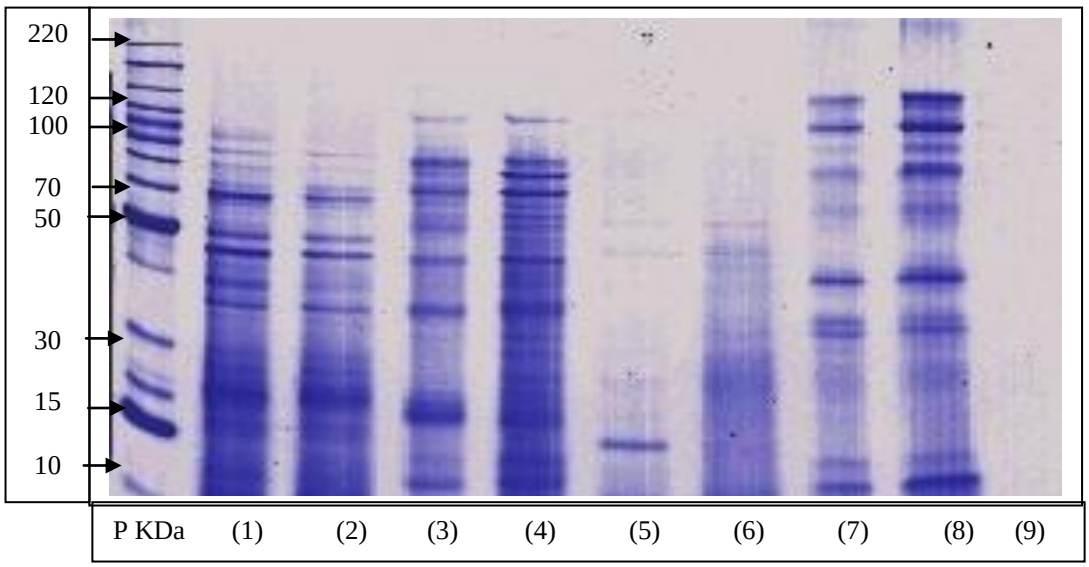

Figura 11 – Proteína em gel SDS-PAGE onde, (P) padrão BSA; (1) *P. sajor caju* 0,5%; (2) *P. sajor caju* 1%; (3) *P. chrysosporium* 0,5%; (4) *P. chrysosporium* 1%; (5) *T. reesei* 0,5%; (6) *T. reesei* 1%; (7) *A. niger* 0,5%; (8) *A. niger* 1%; e (9) controle abiótico, 10º dia do experimento

Na análise das proteínas em gel SDS-PAGE (Figura 11) foi possível verificar que o comportamento de cada fungo foi constante quanto à presença e ausência de bandas entre as concentrações de nitrogênio, porém foi possível observar diferenças na intensidade de determinadas bandas.

Segundo Macedo (2006) a regulação dos genes que codificam as enzimas extracelulares envolvidas na biodegradação é dependente da fonte de carbono de fácil metabolismo como glicose e induzidos na presença de polímeros complexos, como a lignina.

Em geral, a expressão de genes ligninolíticos é induzida pela restrição de alguns nutrientes como nitrogênio, carbono ou enxofre. A expressão destes genes é vista como resposta ao estresse de nutrientes. Em *P. chrysosporium* a expressão de *mnp* é ativada pela baixa concentração de nitrogênio e pela presença de Mn^{+2} em cultura. De forma similar aos genes *mnp*, os genes *lip* neste fungo são também diferencialmente regulados de acordo com vários fatores como resposta a falta de nitrogênio e carbono no meio (STEWART et al., 1992; STEWART; CULLEN, 1999). A expressão de lacases não depende da falta de nutrientes, esses genes são expressos constitutivamente em muitos basidiomicetos (EGGER et al., 1996b).

A degradação da celulose ocorre pela indução das enzimas endo-1,4-β-D-glicanase, exo-1,4-β-D-glicanase e β-glicosidase (HAMADA et al., 1999). O sistema de regulação dos genes de celulases estudado no fungo *T. reesei* contém cinco genes que codificam endoglicanases, *egl1-egl5*, dois genes que codificam celobiohidrolases, *cbh1* e *cbh2*, e dois genes codificantes de β-glicosidase, *bgl1* e *bgl2*. A expressão das celulases é controlada no nível transcricional. Na presença de D-glicose a transcrição é reprimida, enquanto que na ausência da mesma e na presença de certos oligossacarídeos ou dissacarídeos a transcrição é fortemente induzida. A repressão da transcrição de D-glicose neste fungo é mediada por *Cre1* o qual media a repressão dos genes que codificam enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose (HASPER et al., 2000).

Neste estudo foi possível observar que as variáveis (fungos, concentrações de nitrogênio e período de incubação) interferiram na atividade das enzimas, liberação de açúcares e crescimento dos fungos. Foi possível verificar também a ocorrência de estresse oxidativo, provavelmente provocado pelas diferentes concentrações de nitrogênio e a relação entre as enzimas antioxidantes com as enzimas ligninolíticas.

5. CONCLUSÕES

As concentrações de nitrogênio influenciaram na atividade enzimática;

Com relação à atividade das enzimas ligninolíticas, quanto a Lacase e Peroxidases, o fungo que apresentou maior atividade foi o *P. sajor caju*, em meio com 1% de extrato de levedura, no 13º e 12º dia após sua incubação, respectivamente. A maior atividade da enzima MnP foi observada em *T. reesei*, na concentração de 1%, no 4º dia de incubação;

Os fungos celulolíticos *T. reesei* e *A. niger* também apresentaram atividade enzimática ligninolíticas;

Quanto às enzimas celulolíticas, as maiores atividades celulolítica total e de Endoglicanases foram observadas na concentração de 0,5% de extrato de levedura, no 7º dia de inoculação do fungo *T. reesei;*

Os fungos ligninolíticos *P. sajor caju* e *P. chrysosporium* também apresentaram atividade enzimática das celulases;

O fungo que liberou a maior quantidade de açúcares redutores foi *P. chrysosporium*, no 9º dia de inoculação, para a concentração de 1% de extrato de levedura. Entretanto, não é possível indicar nenhum destes fungos para a fermentação a não ser após análise de identificação e quantificação destes açúcares;

Com relação às enzimas antioxidantes, o perfil em gel PAGE não desnaturante da SOD revelou que a atividade desta enzima variou entre os fungos, concentrações de nitrogênio e período de incubação, podendo ser observada até quatro isoformas para *T. reesei*. A enzima CAT apresentou a maior atividade enzimática, para todos os fungos, na concentração de 0,5%, nos primeiros sete dias de incubação, indicando provável estresse nutricional;

O meio de cultivo contendo bagaço e palha de cana-de-açúcar juntamente com 0,5% de extrato de levedura foi favorável, após15 dias, ao crescimento dos fungos *P. sajor caju* e *T. reesei*. E o meio contendo bagaço e palha de cana-de-açúcar e 1% de extrato de levedura foi favorável, após o mesmo período de crescimento, aos fungos *P. chrysosporium* e *A. niger*.

REFERÊNCIAS

ADNEY, B.; BAKER, J. **Measurement of cellulase activities**. Chemical Analysis and Testing Task: Laboratory Analytical Procedure. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 1996. 11 p. (NREL LAP, 006).

AGROSOFT BRASIL. Petrobras assina acordo com empresa norte-americana para pesquisas de etanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Jornal AGROSOFT**, edição de 25 de agosto de 2010a. Disponível em: http://www.agrosoft.org.br/agropag/215348.htm. Acesso em: 30 ago. 2010.

AGROSOFT BRASIL. Única revisa para baixo estimativa de produção de cana-de-açúcar. **Jornal AGROSOFT**, edição de 27 de agosto de 2010b. Disponível em: http://www.agrosoft.org.br/agropag/215365.htm. Acesso em: 30 ago. 2010.

AGUIAR FILHO, J.M.M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

AGUIRRE, J.; RIOS MOMBERG, M.; HEWITT, D.; HANSBERG, W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends in Microbiology**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 111-118, 2005.

AHAMAD, S.; NARAIN, U.; CHAUHAN, S.S. Carbon and nitrogen nutrition in relation to growth and sporulation of *Fusarium moniliforme*. **Journal Plant Protection Science,** Boston n. 12, p. 226–227, 2004.

AHN, M.Y.; DEC, J.; KIM, J.E.; BOLLAG, J.M. Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized lacase. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, p. 1509-1515, 2002.

ALCSHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

ANGELOVA, M.B.; PASHOVA, S.B.; SLOKOSKA, L.S. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus nidulans* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, p. 544-549, 2000.

ANGELOVA, M.B.; PASHOVA, S.B.; SPASOVA, B.K.; VASSILEV, S.V. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. **Mycology Research**, London, v. 109, p. 150-158, 2005.

ASPINALL, G.O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P.K.; CORN, E.E. (Ed.). **The biochemistry of plants a comprehensive treatise**. New York: Academic Press, 1980. cap. 12, p. 473-500.

AZEVEDO, J.L. Genética de fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. cap. 5, p. 173-214.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.

BAI, Z.; HARVEY, L.M.; MCNEIL, B. Elevated temperature effects on the oxidant/antioxidant balance in submerged batch cultures of the filamentous fungus *Aspergillus Níger* B1-D. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 83, p. 772-779, 2003.

BAUDEL, H.M. Pré-tratamento e hidrólise. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE: HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, PROJETO PROGRAMA DE PESQUISAS EM POLÍTICAS PÚBLICAS, 3., 2006, Campinas. **Palestra...** Campinas: UNICAMP, 2006. Disponível em: http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Baudel%20Apresenta%E7%E3o.pdf. Acesso em: 20 jun. 2008.

BAVUTTI, H.R.F. **Isolamento, seleção e estudo de microrganismos ligninolíticos degradadores de chorume**. 2002. 152 p. Tese (Doutorado em Microbiologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

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

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

BELOZERSKAYA, T.A.; GESSLER, N.N. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology,** New York v. 43, n. 5, p. 506-515, 2007.

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

BETTIN, F.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T.A.; SILVEIRA, M.M.; DILLON, A.J.P. Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 36, p. 1–9, 2009.

BEUCHAMP, C.; FRIDOVIC, I. Superoxide dismutase- Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 44, p. 276-282, 1971.

BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, Ontario, v. 15, n. 3, p. 583-620, 1997.

BLOOMFIELD, G.; PEARS, C. Superoxide signalling required for multicellular development of *Dictyostelium*. **Journal of Cell Science,** Oxford, v. 116, n. 16, p. 3387-3397, 2003.

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

BON, E.P.S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção do etanol. In: BON, E.P.S. (Ed.). **Enzimas em biotecnologia, produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência; UFRJ; CAPES; FAPERJ; FCT (Portugal), 2008. cap. 10, p. 241-271.

BONNEN, M.A.; ANTON, L.H.; ORTH, A.B. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. **Applied Environmental and Microbiology**, Washington, v. 60, p. 960-965, 1994.

BONO, I.; RIOLA, M.C.M.; BRADLEY, J.A. Oxidations of phenolic compounds by lignin peroxidase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 429, p. 390-392, 1998.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide-dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, PaloAlto, v. 43, p. 83-116, 1992.

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**, New York, v. 72, p. 248-259, 1976.

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

BUSWELL, J.A.; ODIER, E. Lignin biodegradation. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 6, p. 1-60, 1987.

CALERA, J.A.; SANCHES-WEATHERBY, J.; LOPES-MEDRANO, R.; LEAL, F. Distinctive properties of the Catalase B of *A. nudulans*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 475, p. 117-120, 2000.

CALL, H.P.; MUCKE, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®- process). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 53, p. 163-202, 1997.

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

CHAGAS, E.P.; DURRANT, L.R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosoporium* and *Pleurotus sajor caju*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 29, p. 473-477, 2001.

CHARY, P. SOD 1 null mutants of *Neurospora crassa*: oxidative stress sensitivity, spontaneous mutation rate and response to mutagens. **Genetics,** Bethesda, v. 157, p. 723-730, 1994.

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

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**, New York, v. 35, p. 93-96, 2004.

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

DELLAMATRICE, P.M.; MONTEIRO, R.T.R.; KAMIDA, H.M.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L.; BLAISE, C. Decolourization of municipal effluent and sludge by Pleurotus sajor-caju and *Pleurotus ostreatus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, p. 1363-1369, 2005.

DIAS, E.S.; KOSHIKUMO, E.M.S.; SCHWAN, R.F.; da SILVA, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.

DITTMER, J.K.; PATEL, N.J.; DHAWALE, S.W.; DHAWALE, S.S. Production of multiple lacase isoforms by *P. chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 148, p. 65-70, 1997.

DONINI, L.P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; do NASCIMENTO, J.S. Desenvolvimento in vitro de *Pleurotus* spp sob a influencia de diferentes substratos e dextrose. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 331-338, 2005.

DURAN, N. Enzimas ligninolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. cap. 7, p. 243-260.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, 1997. 440 p.

DURÁN, N.; ROSA, M.A.; D´ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: A Review. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 31, n. 7, p. 907-931, 2002.

EGGERT, C.; TEMPU, T.; ERICKSSON, K.E. The ligninolytic system of the white rot fungus *P. cinnabarinus*: purification and characterization of laccase. **Applied Environmental and Microbiology**, New York, v. 62, p. 1151-1158, 1996a.

EGGERT, C.; TEMP, U.; DEAN, J.F.D.; ERIKSSON, K.E.L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by lacase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 391, p. 144-148, 1996b.

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

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; PENNINCKX, M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 35, p. 1531–1538, 2008.

ENARI, T.M. Microbial cellulases. In: FOGARTY, W. M. (Ed.). **Microbial enzymes and biotechnology**. London: Applied Science Publishers, 1983. p. 183–224.

ENGUITA, F.J.; MARTINS, L.O.; HENRIQUES, A.O.; CARRONDO, M.A. crystal structure of a bacterial endospore coat component. A Laccase with enhanced thermostability properties. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 278, n. 21, p. 19416-19425, 2003.

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

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

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. de **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. 510 p.

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

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

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

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

FERREIRA, L.F.; AGUIAR, M.; POMPEU, G.B.; MESSIAS, T.G.; MONTEIRO, R.T.R. Selection of vinasse degrading microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnolology**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 1613-1621, 2010.

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

FOYER, C.H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J.F.; SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 241-254, 1997.

FRUGOLI, J.A.; ZONGH, H.H.; NUCCIO, M.L.; McCOURT, P.; McPEEK, M.A.; THOMAS, T.L.; McCLUNG, C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 327-336, 1996.

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

GALLIANO, H.; GAS, G.; SERIS, J.L.; BOUDET, A.M. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 13, p. 478-482, 1991.

GALVAGNO, M.A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. cap. 4, p. 123-169.

GIL-AD, N.L.; BAR-NUN, N.; NOY, T.; MAYER, A.M. Enzymes of *Botrytes cinerea* capable of breaking down hydrogen peroxide. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 190, p. 121-126, 2000.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GIANFREDA, L.; BOLLAG, J.M. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 58, p. 1672-1681, 1994.

GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; MAYFIELD, M.B.; KUWAHARA, M.; GOLD, M.H. An extracellular H_2O_2 requiring enzyme preparation involved in the lignin biodegradation by the white rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry and Biophysics Research Community**, Baltimore, v. 114, p. 1077-1083, 1983.

GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 242, p. 329-341, 1985.

GOLD, M.H.; WARIISH, J.; VALLI, K. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosoporium*. In: WHTAKER, J.R.; SONNET, P.E. (Ed.). **Biocatalysis in agricultural biotechnology**. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 127-140.

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

GONZALES, L.; HERNÁNDEZ, J.R.; PERESTELO, F.; CARNICERO, A.; FALCÓN, M.A. Relationship between mineralization of synthetic lignins and the generation of hydroxyl radicals by lacase and a low molecular weight substance produced by *Petriellidium fusoideum*. **Enzyme and Microbial Technology**, Oxford, v. 30, p. 474-481, 2002.

GRAF, A.; KOEHLER, T. **Oregon cellulose-ethanol study**. An evaluation of the potential for ethanol production in Oregon using cellulose-based feedstocks. Apendice B: Overview of cellulose-ethanol production technology. Salem, OR: Oregon Office of Energy, 2000. p. 57-60.

GRATÃO, P.L.; POMPEU, G.B.; CAPALDI, F.R.; VITORELLO, V.A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant response of Nicotiana tabacum cv. Bright Yellow 2 cells to cadmium and nickel stress. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 94, p. 73-83, 2008.

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

GUIDOT, D.M. Absence of electron transport restores growth of Mn-SOD-deficient *S. cerevisiae* in hyperoxia. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, p. 699-703, 1993.

HAMADA, N.; FUSE, N.; KODAIRA, R.; KANDA, J. Cloning and characterization of a new exo-cellulase gene, *cel3*, in *I. lactus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 172, p. 231-237, 1999.

HASPER, A.A.; VISSER, J.; GRAAFF, L.H. The *A. niger* transcriptional activator *XlnR*, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose, also regulates D-xylose reductase gene expression. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 36, p. 193-200, 2000.

HERNÁNDEZ-LUNA, C.E.; GUTIÉRREZ-SOTO, G.; SALCEDO-MARTÍNEZ, S.M. Screening for decolorizing basidiomycetes in México: Screening and selection of ligninolytic basidiomycetes with decolorizing ability in Northeast México. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 465–473, 2008.

HIGUCHI, T. Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. **Proceedings of the Japan Academy. Series B Physical and Biological Sciences**, Tokyo, v. 80, p. 204-214, 2004.

HOFER, F.; WEISSINGER, E.; MISCHACK, M.; MESSNER, R.; MEIXNER-MONORI, B.; BLAAS, D.; VISSER, J.; KUBICEK, C.P. A monoclonal antibody against the alkaline extracellular β-glucosidase from *Trichoderma reesei*: reactivity with others *Trichoderma* β-glycosidase. **Biochemical and Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 992, p. 298-306, 1989.

JEFFRIES, T.W.; JIN, Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeast. **Applied Biotechnology and Microbiology**, New York, v. 63, p. 495-509, 2004.

KAAL, E.E.J.; FIOD, J.A.; JOYCE, T.W. Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. **Bioresource Technology**, Washington, v. 53, p. 133-139, 1995.

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

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

KAWASAKI, L.; AGUIRRE, J. Multiple CAT genes are differentially regulated in *A. nudulans*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 183, p. 1434-1440, 2001.

KEITH, K.E.; VALVANO, M.A. Characterization of SOD-C, a periplasmic SOD from *Burkholderia cenocepacia*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 75, p. 2451-2460, 2007.

KHELIFI, E.; AYED, L.; BOUALLAGUI, H.; TOUHAMI, Y.; HAMDI, M. Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red decolourization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C. **Journal of Hazardous Materials**, Baltimore, v. 163, p. 1056–1062, 2009.

KIRK, T.K.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W.; LOREMZ, L.; ZEIKUS, J. Influence of culture parameters of lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 117, p. 277-285, 1978.

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

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

KRAUS, T.E.; McKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol induces tolerance on wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 145, p. 570-576, 1995.

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

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives - review. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 35, p. 377–391, 2008.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 169, p. 247-250, 1984.

KWON, S.; ANDERSON, A.J. Catalase activities of *Phanerochaete chrysosporium* are not coordinately produced with ligninolytic metabolism: catalases from a white-rot fungus. **Current Microbiology**, New York, v. 42, p. 8–11, 2001.

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

LAUN, P.; RAMACHANDRAN, L.; JAROLIM, S.; HERKER, E.; LIANG, P.; WANG, J.; WEINBERGER, J.; BURHANS, D.T.; SUTER, D.; MADEO, F.; BURHANS, W.C.; BREITENBACH, M. A comparison of the aging and apoptotic transcriptome of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, p. 1261–1272, 2005.

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

LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO, N.S.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, New York, v. 27, p. 175-185, 1999.

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

LESSER, M.P.; STOCHAJ, W.R. Protoadaptation and protection against active forms of oxygen in the symbiotic prokaryote *Prochloron sp* and its ascidian host. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 56, p. 1530-1535, 1990.

LEVIN, L.; FORCHIASSIN, F. Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. **Acta Biotechnologica**, Berlin, v. 21, p. 179-186, 2001.

LI, Y.Z.; NAN, Z.B. Nutritional study on *Embellisia astragali*, a fungal pathogen of milk vetch (*Astragalus adsurgens*). **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 95, p. 275–284, 2009.

LOCKINGTON, R.A.; RODBOURN, L.; BARNETT, S.; CARTER, C.J.; KELLY, J.M. Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans* **Fungal Genetics and Biology**, New York, v. 37, p. 190–196, 2002.

MACEDO, M.L.H. **Identificação de transcritos de *C. subvermispora* expressos nas fases iniciais da biodegradação da madeira**. 2006. 105 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MACHADO, K.M.G. **Biodegradação de pentaclorofenol por fungos basideomicetos lignocelulolíticos em solos contaminados com resíduos industriais**. 1998. 172 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 1998.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of alga cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 157, p. 183-193, 2000.

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

MARTÍN, C.; ALMAZÁN, O; MARCET, M; JÖNSSON, L.J. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **International Sugar Journal**, London, v. 109, n. 1267, p. 33-39, 2007.

MATES, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, Amsterdam, v. 133, p. 83-104, 2000.

MEMBRILLO, I.; SANCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. **Bioresource Technology**, Boston, v. 99, p. 7842-7847, 2008.

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

MODA, E.M.; HORII, J.; SPOTO, M.H.F. Edible mushroom *Pleurotus sajor caju* production on washed and supplemented sugar cane bagasse. **Sciencia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 2, p. 127-132, 2005.

MOREIRA NETO, S.L. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. 2006. 124 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, 2006.

NOGUEIRA, A.M.P.; VENTURINI FILHO W.G. **Aguardente de cana**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, 2005.

OKAMOTO, O.K.; PINTO, E.; LATORRE, L.R.; BECHARA, E.J.H.; COLEPICOLO, P. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 40, p. 18-24, 2001.

O NOVO CICLO DA CANA: Estudo sobre a competitividade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar e prospecção de novos empreendimentos. Brasília, DF: IEL/NC; SEBRAE, 2005. 344 p.

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

PITARELLO, A.P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática.** 2007. 125 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

POMPEU, G.B. **Análise da resposta antioxidativa de células *in vitro* de fumo (*Nicotiana tabacum* cv BY-2) submetidas ao metal pesado níquel.** 2006. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

POMPEU, G.B.; GRATÃO, P.L.; VITORELLO, V.A.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. **Sciencia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 5, p. 548-552, 2008.

PRADE, R.A.; ZHANG, D.F.; AYOUBI, P.; MORT, A.J. Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. **Biotechnology and Genetic Engineer Review**, Baltimore, v. 16, p. 361-391, 1999.

RADY, A.A.; EL-SHEEKH, M.M.; MATROVICS, B. Temperature shift-induced changes in the antioxidant enzyme system of cyanobacterium *Synechosystis* PCC6803. **International Journal Biochemistry**, Bristol, v. 26, p. 433-435, 1994.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 2001. 906 p.

REDDY, C.A.; D'SOUZA, T.M. Physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 13, p. 137-152, 1994.

REID, I.D. Biodegradation of lignin. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. S1011-S1018, 1995. Supl. 1.

RINGLING, D.; VAN ALFEN, N.K. Extra and intracellular laccases of the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasítica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.59, p.3634-3639, 1993.

RIPOLI, T.C.C.; RIPOLI, M.L.C. O setor sucroalcooleiro no Brasil. In: _____. **Biomassa de cana-de-açúcar**: colheita, energia e ambiente. 1. ed. Piracicaba: USP, ESALQ, 2004. 302 p.

ROBINSON, T.; CHANDRAN, B.; NIGAM, P. Studies on the decolourisation of an artificial textile-effluent by white-rot fungi in N-rich and N-limited media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim**,** v. 57, p. 810–813, 2001.

ROSOLEN, L.A. **Biodegradação de efluente têxtil e corantes utilizando fungos basideomicetos.** 2004. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

ROSSELL, C.E.V. Fermentação do hidrolisado. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, 3., Campinas. Campinas: Unicamp, 2006. 1 CD-ROM.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Teresópolis: Editora Eventos, 2002. 121 p.

SCANDALIOS, J.G. Regulation and properties of plant catalases. In: FOYER, C.H.; MULIUNEAUX, P.M. (Ed.). **Causes of photoxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 275-315.

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

SCHLOSSER, D.; HÖFER, C. Laccase-Catalyzed Oxidation of Mn^{2+} in the Presence of Natural Mn^{3+} Chelators as a Novel Source of Extracellular H_2O_2 Production and Its Impact on Manganese Peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, n. 7, p. 3514-3521, 2002.

SHERIEF, A.A.; EL TANASH, A.B.; ATIA, N. Cellulase production by *A. fumigates* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. **Research Journal of Microbiology**, Washington, v. 5, p. 199-211, 2010.

SIGLER, K.; CHALOUPKA, J.; BROZMANOVA, J.; STADLER, N.; HOFER, M. Oxidative stress in microorganisms - I Microbial vs. higher cells - damage and defenses in relation to cell aging and death. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 44, n. 6, p. 587-624, 1999.

SINGH, D.; CHEN, S. The white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium: conditions for the production of lignin-degrading enzymes, mini-review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 81, p. 399–417, 2008.

STEWART, P., CULLEN, D. Organization and differential regulation a cluster of lignin peroxidase genes of *P. chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 181, p. 3427-3432, 1999.

STEWART, P., KERSTEN, P., VANDEN, W.A., GASKELL, J., CULLEN, D. Lignin peroxidase gene family of *P. chrysosporium*: complex regulation by carbon and nitrogen limitation and identification of a second dimorphic chromosome. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 174, p. 5035-5042, 1992.

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

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, p. 1–11, 2002.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy,** Baltimore, v. 10, n. S/6, p. 367-375, 1996.

SZKLARZ, G.; LEONOWICZ, A. Cooperation between fungal lacase and glucose oxidase in the degradation of lignin derivates. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, p. 2537-2539, 1986.

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

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

TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H_2O_2 requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 81, p. 2280-2284, 1984.

TIEN, M., KIRK, T.K. Lignin peroxidase of *Phanerochaetes chrysosporium*. In: WOOD, W.A.; KELLOGG, S.T. (Ed.). **Methods in enzymology**. Part B. Biomass - lignin, pectin, and chitin. San Diego: Academic Press, 1988. p. 238-249.

TUOR, U.; WINTERHALTER, H.; FIECHTER, A. Enzymes of white rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 41, p. 1-17, 1995.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR – ÚNICA. Página que foi usada deste site. São Paulo, 2010. Disponível em: http://www.unica.com.br. Acesso em: 17 jun. 2010.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Pólo Computacional - Departamento de Ciências Exatas. **Programa ESTAT**. Sistemas para análises estatísticas (softwares). Jaboticabal: FCAV - UNESP.

VIEIRA, R.G.P.; RODRIGUES FILHO, G.; de ASSUNÇÃO, R.M.N.: MEIRELES, C.S.; VIEIRA, J.G.; OLIVEIRA, G.S. Synthesis and characterization of methylcellulose from sugar cane bagasse cellulose. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 67, p. 182-189, 2007.

VITTI, D.M.S.S.; DEL MASTRO, N.L.; KIKUCHI, O.K.; NOGUEIRA, N.L. Irradiação de resíduos fibrosos com feixes de elétrons: efeitos na composição química e digestibilidade. **Sciencia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 2, p. 159-171, 1998.

WANG, Z.; GU, Y.; YUAN, Q. Effect of nutrition factors on the synthesis of superoxide dismutase, catalase, and membrane lipid peroxide levels in *Cordyceps militaris* mycelium. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 74–79, 2006.

WANG, W.; KANG, L.; LEE, Y.Y. Production of cellulase from kraft paper mill sludge by *Trichoderma reesei* rut c-30. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 161, p. 382–394, 2010.

WAYMAN, M.; PARESH, S. Biotechnology of biomass conversion: fuels and chemicals from renewable resources. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 278 p. (Biotechnology Series, 30).

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.

WULFF, N.A. **Caracterização enzimática das celulases XF 180, XF 818 e XF 2708 de *Xylella fastidiosa* e purificação da proteína XF 818 expressas em *E. coli*.** 2002. 196 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

YAO, X.-H.; MIN, H.; LV, Z.-M. Response of SOD, CAT and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. **Biomedical and Environmental Sciences**, Amsterdam, v. 19, p. 309-314, 2006.

YAVER, D.S.; XU, F.; GOLIGHTLY, E.J.; BROWN, K.M.; BROWN, S.H.; REY, M.W.; SCHNEIDER, P.; HALKIER, T.; MONDORF, K.; DALBOGE, H. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, n. 3, p. 834-841, 1996.

ZHANG, Y.; LYND, L. A functionally-based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulose. **Biotechnology and Bioengineering,** New York, v. 94, n. 5, p. 888-898, 2006.

ANEXOS

Anexo A - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de atividade enzimática da Lacase produzida pelos fungos *P. sajor caju* e *P. chrysosporium* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	13,2848	13,2848	1466691,1366**
Concentrações	1	5,8263	5,8263	643242,6780**
Dias	12	8,0173	0,6681	73761,7632**
Fungos x Conc	1	5,8720	5,8720	648287,8669**
Fungos x Dias	12	8,0864	0,6739	74396,8438**
Conc x Dias	12	3,3323	0,2777	30657,8955**
FunxConcxDias	12	3,2848	0,2737	30221,5405**
Tratamentos	51	47,7040	0,9354	
Resíduos	104	0,0009	0,0000	

** 1% de significância; CV = 1,0149; DP = 0,0030

Anexo B - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de atividade enzimática da Lacase produzida pelos fungos *T. reesei* e *A. niger* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	0,0077	0,0077	9669,5565**
Concentrações	1	0,0014	0,0014	1728,7823**
Dias	12	0,0762	0,0063	7986,9530**
Fungos x Conc	1	0,0002	0,0002	246,9758**
Fungos x Dias	12	0,0322	0,0027	3378,0632**
Conc x Dias	12	0,0274	0,0023	2868,1169**
FunxConcxDias	12	0,0114	0,0010	1200,1519**
Tratamentos	51	0,1565	0,0031	
Resíduos	104	0,0001	0,0000	

** 1% de significância; CV = 4,5348; DP = 0,0009

Anexo C - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de atividade enzimática das Peroxidases produzidas pelos fungos *P. sajor caju* e *P. chrysosporium* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	6,2001	6,2001	440441,7122**
Concentrações	1	2,5569	2,5569	181639,7013**
Dias	12	2,5749	0,2146	15242,8497**
Fungos x Conc	1	2,5651	2,5651	182222,2295**
Fungos x Dias	12	2,5649	0,2137	15184,0379**
Conc x Dias	12	1,1880	0,0990	7032,7715**
FunxConcxDias	12	1,2009	0,1001	7109,2035**
Tratamentos	51	18,8505	0,3696	
Resíduos	104	0,0015	0,0000	

** 1% de significância; CV = 1,8480; DP = 0,0038

Anexo D - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de atividade enzimática das Peroxidases produzidas pelos fungos *T. reesei* e *A. niger* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	0,0013	0,0013	1362,0066**
Concentrações	1	0,0105	0,0105	10728,4803**
Dias	12	0,0659	0,0055	5640,3257**
Fungos x Conc	1	0,0013	0,0013	1338,1645**
Fungos x Dias	12	0,0178	0,0015	1519,8169**
Conc x Dias	12	0,0383	0,0032	3274,5910**
FunxConcxDias	12	0,0260	0,0022	2222,0647**
Tratamentos	51	0,1611	0,0032	
Resíduos	104	0,0001	0,0000	

** 1% de significância; CV = 3,7677; DP = 0,0010

Anexo E - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de atividade enzimática da Manganês Peroxidase produzida pelos fungos *P. sajor caju* e *P. chrysosporium* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	0,0024	0,0024	4440,9767**
Concentrações	1	0,0002	0,0002	305,1628**
Dias	12	0,0054	0,0005	822,2539**
Fungos x Conc	1	0,0024	0,0024	4298,4186**
Fungos x Dias	12	0,0021	0,0002	316,5756**
Conc x Dias	12	0,0019	0,0002	282,5136**
FunxConcxDias	12	0,0023	0,0002	340,3469**
Tratamentos	51	0,0166	0,0003	
Resíduos	104	0,0001	0,0000	

** 1% de significância; CV = 9,5567; DP = 0,0007

Anexo F - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de atividade enzimática da Manganês Peroxidase produzida pelos fungos *T. reesei* e *A. niger* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	0,0103	0,0103	3810,0595**
Concentrações	1	0,0095	0,0095	3526,4024**
Dias	12	0,0715	0,0060	2213,3194**
Fungos x Conc	1	0,0004	0,0004	164,6881**
Fungos x Dias	12	0,0280	0,0023	866,2869**
Conc x Dias	12	0,0222	0,0018	686,1036**
FunxConcxDias	12	0,0224	0,0019	694,4536**
Tratamentos	51	0,1643	0,0032	
Resíduos	104	0,0003	0,0000	

** 1% de significância; CV = 4,4155; DP = 0,0016

Anexo G - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de atividade celulolítica total produzidas pelos fungos *P. sajor caju* e *P. chrysosporium* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	0,9486	0,9486	112366,9134**
Concentrações	1	10,0437	10,0437	1189684,0463**
Dias	12	160,5741	13,3812	1585014,2661**
Fungos x Conc	1	2,1264	2,1264	251870,4396**
Fungos x Dias	12	83,9231	6,9936	828398,1793**
Conc x Dias	12	27,9892	2,3324	276279,0647**
FunxConcxDias	12	26,7118	2,2260	263670,4205**
Tratamentos	51	312,3170	6,1239	
Resíduos	104	0,0009	0,0000	

** 1% de significância; CV = 0,2516; DP = 0,0029

Anexo H - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de atividade celulolítica total produzidas pelos fungos *T. reesei* e *A. niger* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	12,4616	12,4616	2358,6849**
Concentrações	1	0,5948	0,5948	112,5883**
Dias	12	553,5313	46,1276	8730,8304**
Fungos x Conc	1	27,0608	27,0608	5121,9562**
Fungos x Dias	12	34,6569	2,8881	546,6417**
Conc x Dias	12	18,6864	1,5572	294,7407**
FunxConcxDias	12	64,5098	5,3758	1017,5103**
Tratamentos	51	711,5017	13,9510	
Resíduos	104	0,5495	0,0053	

** 1% de significância; CV = 1,9046; DP = 0,0727

Anexo I - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de atividade enzimática das Endoglicanases produzidas pelos fungos *P. sajor caju* e *P. chrysosporium* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	4,5719	4,5719	711,2658**
Concentrações	1	11,9642	11,9642	1861,3239**
Dias	12	325,4912	27,1243	4219,8480**
Fungos x Conc	1	10,7967	10,7967	1679,6893**
Fungos x Dias	12	230,2914	19,1909	2985,6252**
Conc x Dias	12	23,1587	1,9299	300,2422**
FunxConcxDias	12	34,0336	2,8361	441,2300**
Tratamentos	51	640,3075	12,5550	
Resíduos	104	0,6685	0,0064	

** 1% de significância; CV = 3,4226; DP = 0,0802

Anexo J - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de atividade enzimática das Endoglicanases produzidas pelos fungos *T. reesei* e *A. niger* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	111,9107	111,9107	18223457,8716**
Concentrações	1	13,5317	13,5317	2203489,5877**
Dias	12	947,1063	78,9255	12852172,6110**
Fungos x Conc	1	141,1874	141,1874	22990846,8486**
Fungos x Dias	12	822,0260	68,5022	11159841,5852**
Conc x Dias	12	132,4293	11,0358	1797057,1037**
FunxConcxDias	12	187,9275	15,6606	2550164,8720**
Tratamentos	51	2356,1158	46,1984	
Resíduos	104	0,0006	0,0000	

** 1% de significância; CV = 0,0291; DP = 0,0025

Anexo K - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de quantificação dos açúcares redutores liberados pelos fungos *P. sajor caju* e *P. chrysosporium* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	0,6430	0,6430	393334,2157**
Concentrações	1	0,1248	0,1248	76370,8588**
Dias	12	4,2835	0,3570	218374,0098**
Fungos x Conc	1	0,0021	0,0021	1305,6039**
Fungos x Dias	12	0,1042	0,0087	5312,5353**
Conc x Dias	12	0,3663	0,0305	18675,1170**
FunxConcxDias	12	0,1218	0,0101	6207,4281**
Tratamentos	51	5,6457	0,1107	
Resíduos	104	0,0002	0,0000	

** 1% de significância; CV = 0,4406; DP = 0,0013

Anexo L- Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de quantificação dos açúcares redutores liberados pelos fungos *T. reesei* e *A. niger* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	0,0115	0,0115	3990,2222**
Concentrações	1	0,0584	0,0584	20240,7200**
Dias	12	0,4065	0,0339	11742,8833**
Fungos x Conc	1	0,1040	0,1040	36055,0756**
Fungos x Dias	12	1,3970	0,1164	40358,7189**
Conc x Dias	12	0,2511	0,0209	7252,8196**
FunxConcxDias	12	0,0963	0,0080	2783,3811**
Tratamentos	51	2,3248	0,0456	
Resíduos	104	0,0003	0,0000	

** 1% de significância; CV = 0,5683; DP = 0,0017

Anexo M - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises da atividade enzimática da Catalase produzidas pelos fungos *P. sajor caju*, *P. chrysosporium*, *T. reesei* e *A. niger* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	3	1,6928	0,5643	541707,9695**
Concentrações	1	0,0409	0,0409	39225,1429**
Dias	6	0,7958	0,1326	127329,1829**
Fungos x Conc	3	0,0441	0,0147	14123,4286**
Fungos x Dias	18	1,1787	0,0655	62862,0717**
Conc x Dias	6	0,0914	0,0152	14630,2495**
FunxConcxDias	18	1,3630	0,0757	72690,8997**
Tratamentos	55	5,2067	0,0947	
Resíduos	112	0,0001	0,0000	

** 1% de significância; CV = 0,5783; DP = 0,0010

Anexo N - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de quantificação protéica dos fungos *P. sajor caju* e *P. chrysosporium* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	0,0058	0,0058	822,2360**
Concentrações	1	0,1698	0,1698	24228,1025**
Dias	12	29,000	2,4167	344922.6102**
Fungos x Conc	1	2,1930	2,1930	312993,6102**
Fungos x Dias	12	3,7516	0,3126	44620,7882**
Conc x Dias	12	0,7872	0,0656	9362,7254**
FunxConcxDias	12	0,7330	0,6110	8717,9196**
Tratamentos	51	36,640	0,7184	
Resíduos	104	0,0007	0,0000	

** 1% de significância; CV = 0,2574; DP = 0,0026

Anexo O - Análise fatorial com 3 fatores, fungos, concentrações de nitrogênio e dias, dos dados provenientes das análises de quantificação protéica dos fungos *T. reesei* e *A. niger* (UNESP - Programa ESTAT)

Variação	GL	SQ	QM	F
Fungo	1	0,6468	0,6468	136723,6111**
Concentrações	1	0,0015	0,0015	318,7331**
Dias	12	4,2287	0,3524	74489,3692**
Fungos x Conc	1	0,0004	0,0004	80,0122**
Fungos x Dias	12	0,1278	0,1070	2251,7256**
Conc x Dias	12	0,0418	0,0035	736,9085**
FunxConcxDias	12	0,1964	0,0164	3459,3751**
Tratamentos	51	5,2434	0,1028	
Resíduos	104	0,0007	0,0000	

** 1% de significância; CV = 0,7251; DP = 0,0022