

## DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GLICOSE EM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR HIDROLIZADO PELO PROCESSO DE CONVERSÃO ENZIMÁTICA

Aline Cristina Rabonato<sup>1</sup>, Marli Teixeira de Almeida Minhoni<sup>2</sup>, Thalita Cristina Marques Cervezan<sup>3</sup>, Filipe Pereira Giardini Bonfim<sup>4</sup> & Marta Cristina Teixeira Duarte<sup>5</sup>

**RESUMO:** A produção de bioetanol e de açúcares a partir do caldo de cana gera como um dos subprodutos, o bagaço. Atualmente, esse último, uma biomassa industrial lignocelulósica, pode ser aproveitado para produção de etanol de segunda geração, desde que previamente submetido a processos hidrolíticos para gerar açúcares fermentescíveis. O objetivo deste trabalho foi produzir enzimas fúngicas capazes de hidrolizar a biomassa agroindustrial a fim de gerar glicose. Para tanto, foram utilizados os cogumelos *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Pycnoporus sanguineus* como potenciais fontes produtoras das enzimas lacase, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP), capazes de hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar. A partir das maiores atividades enzimáticas observadas para lacase em *L. edodes* (39,23 U<sup>-mL</sup> ao 25º dia de incubação), *P. ostreatus* (2,5 U<sup>-mL</sup> ao 27º dia de incubação), *P. sanguineus* (80 U<sup>-mL</sup> ao 27º dia de incubação) e *P. eryngii* (16,45 U<sup>-mL</sup> ao 15º dia) foram realizadas o processo de hidrólise. As enzimas MnP e LiP não apresentaram resultados expressivos. A hidrólise enzimática do bagaço de cana *in natura* (32,17% de hemicelulose, 52,45% de celulose e 10,62% de lignina) e o bagaço de cana hidrolizado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,0% (0,20% de hemicelulose, 68,82% de celulose e 25,33% de lignina) foram avaliados para cada conjunto enzimático obtido. Comparado aos demais, as enzimas produzidas pelo *P. sanguineus* incubado em bagaço *in natura* apresentaram uma melhor eficiência na conversão dos açúcares, com teor médio de 0,14 g<sup>-L</sup> de glicose. Embora os baixos teores de glicose determinada nesse trabalho, em relação com a literatura, pode-se afirmar que as enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, demonstraram ter potencial hidrolítico, principalmente para as produzidas pelo fungo *P. sanguineus*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase.

## DETERMINATION OF SUGAR CONTENT IN SUGARCANE BAGASSE HYDROLYZED BY THE PROCESS OF ENZYMATIC CONVERSION

**ABSTRACT:** The production of ethanol and sugar from sugarcane juice generate as byproduct, the bagasse. Currently, the bagasse, an industrial lignocellulosic biomass, can be used for production of second-generation ethanol, since when it is submitted to hydrolytic processes generates fermentable sugars. The objective of this study was to produce fungal enzymes capable of hydrolyzing this lignocellulosic biomass to generate glucose. For this, we used the mushroom species *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, and *Pycnoporus sanguineus* as potential sources of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase enzymes, capable of hydrolyzing the crushed sugarcane. The hydrolysis process was performed with the highest enzymatic activities observed from laccase in *L. edodes* (39.23 U<sup>-mL</sup> after 25 day incubation), *P. ostreatus* (2.5 U U<sup>-mL</sup> after 27 day incubation), *P. sanguineus* (80 U<sup>-mL</sup> after 27 days of incubation) and *P. eryngii* (16.45 U<sup>-mL</sup> 15 days incubation). MnP and LiP showed no significant results. The enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse *in natura* (32,17% hemicellulose, cellulose 52,45% and 10,62% lignin) and bagasse hydrolyzate with 7,0% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,20% hemicellulose, 68,82% to 25,33% cellulose and lignin) were evaluated for each enzymatic obtained. Compared to others, the enzymes produced by *P. sanguineus* incubated in sugarcane bagasse showed better efficiency resulting in glucose with an average content of 0,14 g<sup>-L</sup>. Although the levels of glucose determined in this work were low in relation to the literature, it can be stated that the laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase enzymes demonstrated good hydrolytic potential, especially those produced by the fungus *P. sanguineus*.

**KEYWORDS:** Laccase, manganese peroxidase, lignin peroxidase.

<sup>1</sup>Mestre em Agronomia (Energia na Agricultura), FCA/UNESP. E-mail: [alinerabonato@yahoo.com.br](mailto:alinerabonato@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Orientadora. Doutora, discente e pesquisadora do Depto. de Proteção de Plantas (FCA/UNESP). Rua José Barbosa de Barros, 1780. CEP: 18610-307, Botucatu, SP. E-mail: [marliminhoni@fca.unesp.br](mailto:marliminhoni@fca.unesp.br)

<sup>3</sup>Doutoranda em Agronomia (Energia na Agricultura). Depto. de Engenharia Rural (FCA/UNESP). Rua José Barbosa de Barros, 1780. CEP: 18610-307, Botucatu, SP. E-mail: [thacmc@yahoo.com.br](mailto:thacmc@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Doutor, pesquisador e discente do Depto. de Horticultura (FCA/UNESP). Rua José Barbosa de Barros, 1780. CEP: 18610-307, Botucatu, SP. E-mail: [filipegiardini@fca.unesp.br](mailto:filipegiardini@fca.unesp.br)

<sup>5</sup>Doutora e pesquisadora da Divisão de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP. Rua Alexandre Cazelatto, 999. Vila Betel, CEP: 13148-218, Paulínia, SP. E-mail: [mduarte@cpqba.unicamp.br](mailto:mduarte@cpqba.unicamp.br)

## 1 INTRODUÇÃO

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

Estima-se que a conversão do bagaço a etanol resulte num aumento de 30% na produção de álcool, sem a necessidade de se aumentar a área agrícola de plantio da cana. Esta prática evitaria assim a grande polêmica sobre a substituição de terras agrícolas destinadas ao plantio de alimentos pela lavoura de cana-de-açúcar (GONÇALVES, 2007).

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

As enzimas celulasas são eficientes na degradação de celulose, sendo as mais comuns no processo (BARRICHELO; BRITO, 1985). Diversos tipos de microrganismos são potencialmente produtores de celulase, mas, para isso, precisam ser submetidos a condições adequadas.

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

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

A fim de viabilizar o processo e torná-lo altamente econômico, tem sido utilizados fungos de fácil disponibilidade e baixo valor comercial, como *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Pycnoporus sanguineus*, como potenciais fontes enzimáticas das enzimas lacase, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP). Esses cogumelos,

expostos a biomassas lignocelulósicas, representam o principal exemplo da conversão direta de resíduos de baixo grau, em um produto com valor agregado elevado com benefício para o homem e uma fonte produtora de metabólitos comercialmente importantes (BUSWELL; CHANG, 1993). Deste modo, o presente trabalho visou cultivar as espécies *L. edodes*, *P. ostreatus*, *P. eryngii* e *P. sanguineus* a fim de obter as enzimas lacase, MnP e LiP para posterior ensaios hidrolíticos. A partir da obtenção destas enzimas pelos microrganismos, cada conjunto enzimático foi utilizado para hidrolisar amostras de bagaço de cana-de-açúcar e, posteriormente, para a dosagem da quantidade de açúcares fermentescíveis formados.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Biomassa agroindustrial

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

#### 2.1.1. Redução granulométrica

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

#### 2.1.2. Remoção de açúcares residuais no bagaço de cana

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

#### 2.1.3. Hidrólise ácida

A hidrólise ácida foi realizada utilizando ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) diluído na concentração de 7,0% na proporção de 1 g de biomassa: 40 g de ácido (m/m). A mistura foi submetida ao calor úmido sob pressão em autoclave 121 °C a 1 atm, por 60 minutos. Após a hidrólise, a mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo, seguido por lavagem com 230 mL de água destilada.

Uma fração da biomassa foi separada para as determinações físico-químicas da fibra pelo método proposto por Van Soest (1965) e descrito por Silva e Queiroz (2002). A fração líquida foi submetida à determinação de percentual de açúcares redutores (AR) pelo método enzimático de glicose oxidativa.

#### 2.1.4. Concentração de açúcares redutores (AR)

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

Antes de iniciar o experimento da hidrólise enzimática, o bagaço da cana-de-açúcar foi avaliado quando a dosagem de glicose. Para isso, foi realizado três pré-tratamentos para comparação. O primeiro tratamento é caracterizado por uma lavagem de 2 horas com água quente para remoção de açúcar residual proveniente do processamento da moagem da cana (item 2.1.2). O segundo tratamento constitui na submersão do bagaço de cana em água destilada e explosão a vapor, em autoclave, a temperatura de 120°C sob pressão de 1 atm por 1 hora. O terceiro tratamento é a submersão do bagaço de cana em solução diluída de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7%, submetidos a explosão a vapor em autoclave, como dito anteriormente (item 2.1.3).

#### 2.1.5. Determinação dos constituintes do bagaço

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

Inicialmente, o bagaço foi triturado em moinho de faca para ter sua granulometria reduzida a 0,5 mm. Em seguida, foram pesados cerca de 0,35g da amostra em saquinhos de tecido TNT (Tecido Não Tecido), sendo posteriormente lacrados em seladora. Os saquinhos foram submetidos ao processo de lavagem com detergente neutro (FDN) para a remoção de gorduras, ácidos graxos e outros componentes da parede celular. As amostras permaneceram em banho termostabilizado por 70 min à 97 °C. Ao final do tempo, ocorreu a lavagem das mesmas com água deionizada fervente por 5 minutos, em três vezes. Após essa etapa, as amostras foram lavadas com acetona a fim de retirar a água das mesmas e, posteriormente, seguiram para secagem em estufa a 105 °C por 3h. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em dessecador, pesadas e submetidas ao cálculo por diferença de massas.

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

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

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

#### 2.2. Linhagens fúngicas

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

##### 2.2.1. Multiplicação das Linhagens

###### 2.2.1.1. Cultivo em meio de cultura sólida

Foi realizada a inoculação das linhagens em meio de cultura à base de extrato contendo uma mistura de 158g do bagaço de cana, 40g de farelo arroz, 2g de Carbonato de Cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e água destilada para obtenção da umidade a 60%. Inicialmente, a mistura foi autoclavada por 30 minutos a 120 °C (1atm). A seguir, o extrato foi preparado por adição de 1 L de água destilada à mistura e fervido por 20 minutos. O extrato foi filtrado à vácuo com funil de buckner com placa porosa e papel de filtro e, ao extrato obtido foi adicionado 15g L<sup>-1</sup> de ágar. O volume foi completado para 1 L e novamente autoclavado a 120 °C (1 atm), por 30 minutos. O meio de cultura foi então vertido em placas de petri e inoculado com as linhagens de *L. edodes*, *P. ostreatus*, *P. sanguineus* e *P. eryngii*. A incubação foi realizada na Micoteca do Módulo de Cogumelos do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP - Campus de Botucatu, São Paulo, em câmara de crescimento, a temperatura de 25 °C, no escuro, por sete dias.

###### 2.2.1.2. Cultivo em meio de cultura líquido

Após o crescimento das linhagens em meio sólido, foi realizado o preparo do meio de cultura líquido à base de extrato de bagaço obtendo-se um caldo enriquecido do bagaço de cana. Posteriormente, foram transferidos 400 mL desse caldo para frascos de Erlenmeyers de 500 mL, os quais foram autoclavados a 120 °C (1 atm), por 30 minutos. A inoculação foi feita, em triplicata, recortando um disco com 1mm de diâmetro do meio de cultura sólido com as linhagens e introduzindo no caldo à base do bagaço. Os frascos foram mantidos em agitador

orbital com rotação de 150 rpm e temperatura controlada a 25 °C.

### 2.2.2. Obtenção das enzimas

As enzimas foram obtidas cultivando-se as linhagens fúngicas em meio de cultura líquido (item 2.2.1.2.) à base do mesmo extrato utilizado para o meio de cultura sólido. Após o início do desenvolvimento micelial, realizaram-se dez coletas para análise enzimática, sendo realizadas aos 3, 5, 7, 9, 11, 13, 16, 18, 20, 24 e 27 dias após a inoculação. Cada amostra fúngica contendo a mistura micélio e enzima coletada anteriormente foi acondicionada em eppendorf e centrifugadas (10.000 rpm) por 5 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para as análises enzimáticas. O procedimento foi realizado na Divisão de Agrotecnologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA da Unicamp.

### 2.2.3. Hidrólise enzimática

Nessa etapa, o conjunto enzimático da lacase, MnP e LiP obtido do cultivo dos fungos *L. edodes*, *P. ostreatus*, *P. sanguineus* e *P. eryngii* foram misturados ao bagaço tratado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 7%. Em vista de obter uma maior eficiência na hidrólise, foi realizado mais um tratamento chamado de Misto. Para a composição do tratamento Misto, foi utilizado 1 mL de cada uma das frações com maior atividade enzimática dos fungos, de acordo com a cinética enzimática, sendo eles *L. edodes*, *P. sanguineus* e *P. eryngii*, totalizando 3 mL de conjunto enzimático. A adição das enzimas nesse processo teve a finalidade de quebrar as moléculas constituintes no hidrolisado fazendo com que ocorresse formação de açúcares fermentescíveis no meio. Para isso, as hidrólises enzimáticas foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 150 mL de tampão citrato 50 mM, 2 mL de enzima fúngica obtida nos processos anteriores e 10 g de substrato pré-tratado. Os frascos foram mantidos em mesa incubadora rotativa Shaker, à 25 °C e 150 rpm. Ao final desse processo, foi calculada a cinética de açúcar fermentescível pelo kit de glicose oxidativa.

#### 2.2.3.1. Atividade enzimática

O procedimento foi realizado na Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA da Unicamp.

##### 2.2.3.1.1. Lacase

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

(pH 5,0), e 0,1 mL de seringaldazina 1,0mM preparada em etanol.

##### 2.2.3.1.2. Manganês peroxidase

A atividade de peroxidase foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol (KUWAHARA et al., 1984). A mistura de reação (1,0 mL) foi constituída por 0,5 mL de caldo enzimático, 0,1mL de lactato de sódio 0,25M, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,05 mL de MnSO<sub>4</sub> 2,0 mM, 0,05 mL de uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,0 mM preparada em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura foi incubada durante 5 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 40  $\mu\text{L}$  de NaOH 2,0 N, com a leitura em absorbância de 610 nm.

##### 2.2.3.1.3. Lignina peroxidase

Quanto à determinação da lignina peroxidase, a mesma foi medida através da formação de veratrilaldeído (3,4 dimetoxibenaldeído). O volume de reação (1 mL) foi composto por 0,4 mM de álcool veratril em tampão tartarato 0,1 M pH 3,0; 0,2 mM de peróxido de hidrogênio e volume necessário de amostra. A atividade foi seguida em cinética a 30°C, medindo absorção a 310 nm ( $\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

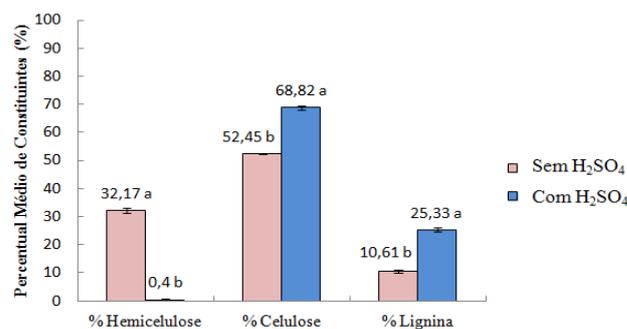
## 2.3. Delineamento experimental

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

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Caracterização dos constituintes fibrosos do bagaço de cana-de-açúcar

A composição química dos constituintes fibrosos do bagaço (Figura 1) foi determinada para a biomassa com e sem tratamento ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,0%).



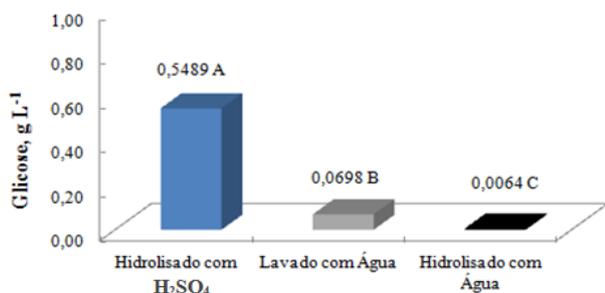
**Figura 1** - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar com e sem tratamento ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,0%). Para cada

constituente, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

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

### 3.2. Tratamento do bagaço de cana para hidrólise enzimática

Os resultados da dosagem de glicose para as soluções resultantes dos pré-tratamentos (itens 2.1.2 e 2.1.3) encontram-se expressos na Figura 2.



**Figura 2** - Dosagem de glicose na água de lavagem do bagaço de cana submetido a diferentes tratamentos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%). DMS = 0,0212; Coeficiente de Variação = 4,058.

Esses resultados se assemelham com os da literatura. Hamelinck et al. (2005) revelam que a utilização de ácido sulfúrico diluído obtem de 50 a 70% de glicose, quando combinados com temperaturas elevadas. Deste modo, os resultados comprovam que a ação de ácido forte em interação com o sistema de explosão a vapor consegue hidrolisar a hemicelulose, convertendo-a em açúcares redutores incluindo a glicose.

### 3.3. Determinação da atividade enzimática

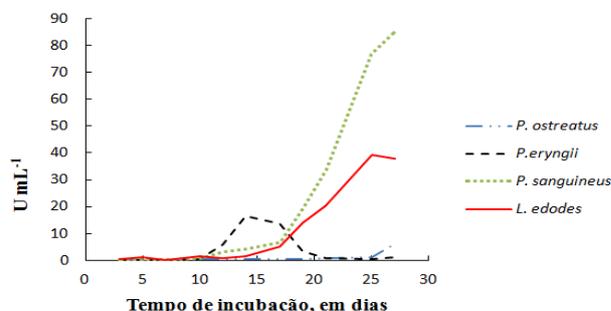
As amostras coletadas conforme descrito no item 2.2.2, foram analisadas quanto a atividade enzimática de lacase, LiP e MnP. A partir dos resultados obtidos nos diferentes tempos foi calculada a cinética enzimática.

#### 3.3.1. Atividade enzimática de lacase

Entre as enzimas produzidas por fungos basidiomicetos, a lacase possui maior atividade enzimática. No presente trabalho, a lacase foi produzida por todas as linhagens cultivadas, destacando-se o *P. sanguineus* que obteve maior produção, com atividade de 85,07 U mL<sup>-1</sup>, após 27 dias (Figura 3). O *L. edodes* também apresentou

resultados satisfatórios, com atividade enzimática de lacase de 39,23 U mL<sup>-1</sup>, no 25º dia.

As linhagens de *P. eryngii* e *P. ostreatus* apresentaram respectivamente, 16,45 U mL<sup>-1</sup> (no 14º dia) e 6,21 U mL<sup>-1</sup> (27º dia) como os melhores resultados de produção da lacase. A literatura apresenta diversas linhagens de *Pleurotus* com resultados baixos para a lacase, inferiores a 10 U mL<sup>-1</sup>.



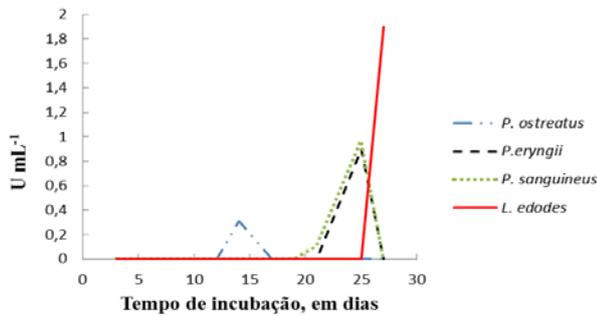
**Figura 3** - Cinética de produção da enzima lacase para os cogumelos *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* e *Pycnoporus sanguineus* cultivados em meio líquido em bagaço de cana.

Menezes et al. (2009) incubaram linhagens de *Pleurotus* em meios de cultura à base de bagaço de cana por 30 dias. Os autores observaram a presença de lacase em todas as linhagens estudadas, destacando-se a *Pleurotus sp* BCCB068 com as atividades de 6,23 U mL<sup>-1</sup> no 15º dia e 4,68 U mL<sup>-1</sup> no 20º dia, respectivamente. As demais linhagens não obtiveram resultados expressivos, tendo o fungo *P. sajor-caju* produzido uma atividade máxima de 3,52 U mL<sup>-1</sup> no 10º dia e a *Pleurotus tailandia* 1,63 U mL<sup>-1</sup> no 10º dia.

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

#### 3.3.2. Determinação da Lignina Peroxidase

A lignina peroxidase foi produzida por todas as linhagens cultivadas; no entanto, com baixa atividade (FIGURA 4). As linhagens de *L. edodes* e *P. sanguineus* demonstraram ter, novamente, maior atividade enzimática, 1,90 U mL<sup>-1</sup> no 27º dia e 0,9677 U mL<sup>-1</sup> no 25º dia, respectivamente. O *P. eryngii* e o *P. ostreatus* apresentaram atividade enzimática de LiP mais baixa, obtendo 0,8961 U mL<sup>-1</sup> no 25º dia e 0,3106 U mL<sup>-1</sup> no 14º dia, respectivamente.



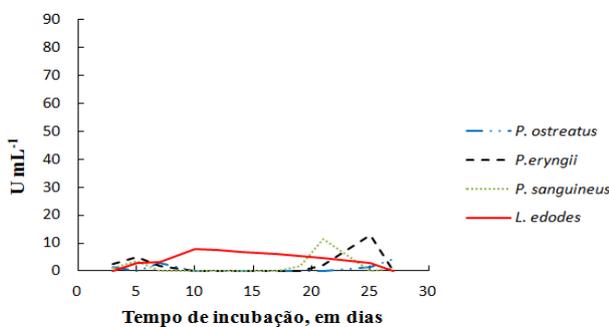
**Figura 4** - Cinética de produção da enzima lignina peroxidase para os cogumelos *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* e *Pycnoporus sanguineus* cultivados em meio líquido de bagaço de cana.

Sales et al. (2012) desenvolveram um trabalho para tratamentos de efluentes oriundos da área de produção de medicamentos de uma indústria farmacêutica da região de Goiânia com linhagens de *Schizophyllum commune* e *P. sanguineus*. Não foi detectada atividade de LiP, fato que os autores correlacionaram com a concentração baixa de oxigênio durante o processo foi um fator inibitório para o crescimento dos fungos e síntese da enzima.

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

### 3.3.3. Determinação da Manganês Peroxidase

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



**Figura 5** - Cinética de produção da enzima manganês peroxidase para os cogumelos *L. edodes*, *P. eryngii*, *P. edodes* e *P. sanguineus* cultivados em meio líquido de bagaço de cana.

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

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

### 3.4. Determinação de açúcares redutores

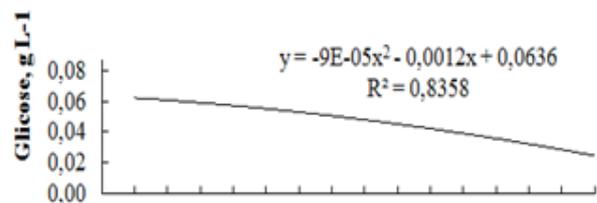
Após determinação da atividade enzimática, as enzimas foram adicionadas ao bagaço de cana sem e com tratamento com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7% para o processo de hidrólise. A formação de açúcar foi monitorada periodicamente conforme descrito no item 2.2.3.

### 3.5. Quantificação do teor de glicose ao longo do tempo

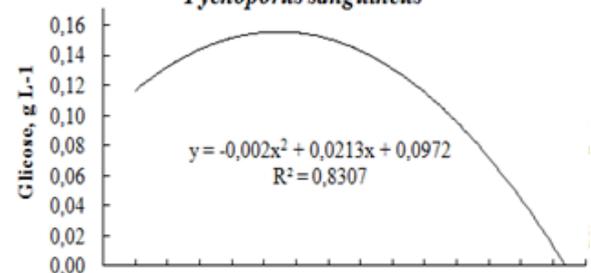
Foi possível averiguar a quantidade de glicose que foi liberada ao meio e o comportamento das enzimas conforme os dez tratamentos propostos pelo tempo de 15 dias de incubação (Figura 6).

#### Bagaço não tratado

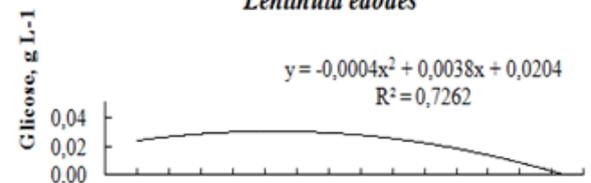
##### Misto



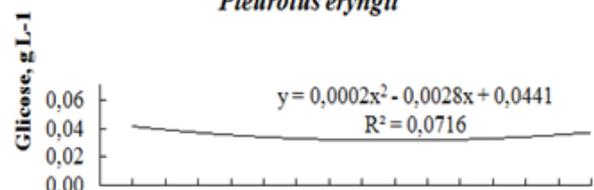
##### *Pycnoporus sanguineus*

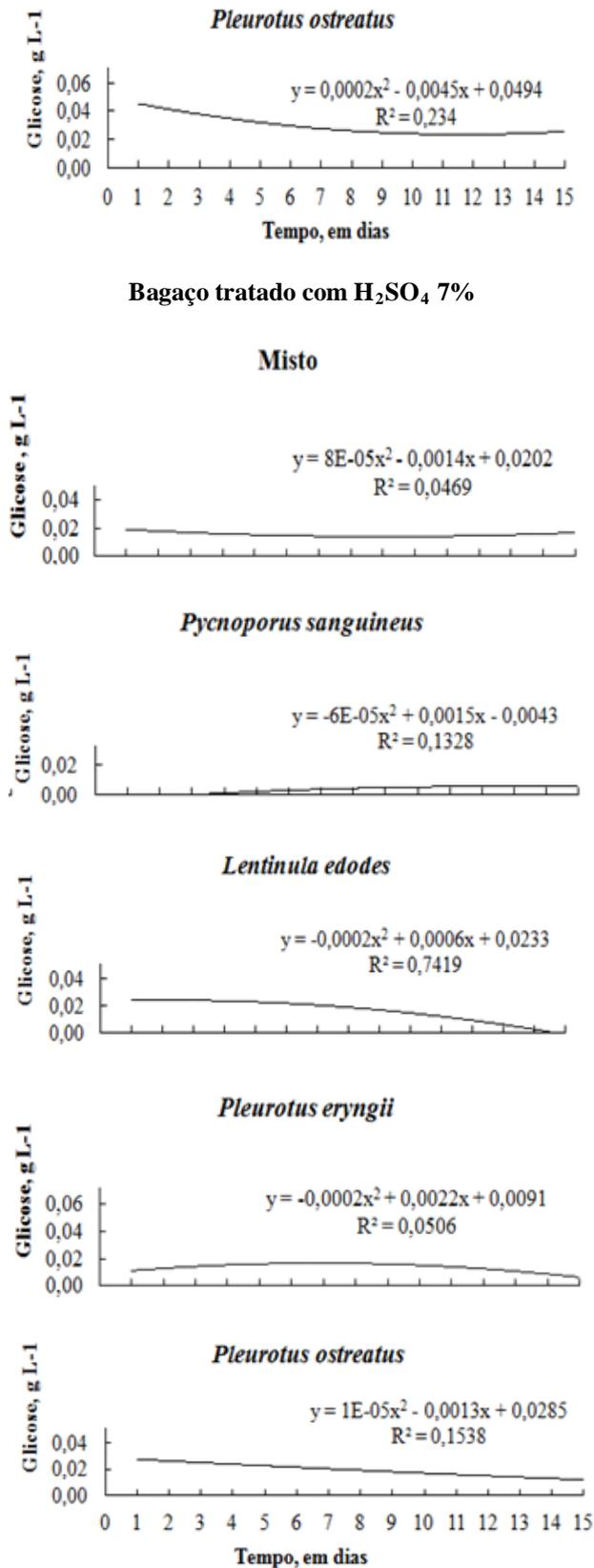


##### *Lentinula edodes*



##### *Pleurotus eryngii*



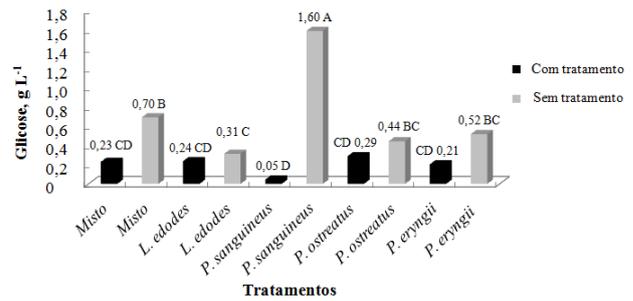


**Figura 6** - Variação da dosagem de glicose durante o período hidrolítico. Misto = conjunto enzimático de *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus eryngii*.

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

temperaturas altas e períodos de tempos longos, mas é claro que há exceções. O tratamento que melhor manteve uma estabilidade ao decorrer dos 15 dias foi o misto em bagaço sem tratamento.

A avaliação da quantidade de glicose em função do tratamento foi realizada no período de 15 dias de incubação (Figura 7). De um modo geral, as enzimas submetidas ao meio contendo o substrato não tratado com ácido apresentaram os maiores teores de glicose e os melhores índices de estabilidade por tempo. Esses resultados são controversos aos encontrados na literatura uma vez que, o bagaço de cana-de-açúcar tratado com ácido apresenta maiores teores de glicose em relação ao bagaço sem tratamento (HAMELINK et al., 2005).



**Figura 7** - Teores de glicose obtidos em função do tratamento após 15 dias de incubação. Médias seguidas por letra iguais não diferem entre si (Tukey, 5%). Coeficiente de Variação = 36,038; DMS = 0,0447.

Outros autores avaliaram a dosagem de glicose conforme os tratamentos fornecidos ao bagaço de cana-de-açúcar. Diferente desse trabalho, Santos et al., (2010) avaliaram o processo de hidrólise enzimática de duas enzimas comerciais, celulasas e β-glucosidases, quando postas em contato com bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio, NaOH, e sem tratamento. Eles determinaram que as enzimas comerciais foram mais eficientes no bagaço tratado, que produziram 50 g/L de glicose, do que em relação ao sem tratamento, 20 g/L, ambos em 70 horas de incubação. É possível notar que os valores de glicose encontrados pelos autores foram extremamente superiores aos resultados obtidos pelo presente trabalho.

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

De acordo com os estudos enzimáticos realizados, o bagaço de cana mostra-se que possui potencial para a produção de enzimas lignocelulolíticas, o que proporciona uma melhor alternativa para o aproveitamento dessa biomassa. Com base nessas

informações e com os resultados obtidos nesse processo, é possível que as enzimas avaliadas atuem com mais eficiência na hemicelulose, visto que, os melhores valores foram obtidos no bagaço sem tratamento ácido, já que o emprego do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hidrolisa quase completamente o constituinte em questão.

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

#### 4 CONCLUSÕES

O uso inicial de hidrólise ácida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7% no bagaço de cana-de-açúcar possibilitou obter uma maior quantidade de celulose quando comparado ao bagaço sem tratamento. Esse processo torna-se necessário para aumentar a eficiência do uso de enzimas, uma vez que, as mesmas utilizam a glicose para conversão em açúcares fermentescíveis.

Entre as quatro linhagens avaliadas, o *Lentinula edodes* e o *Pycnoporus sanguineus* foram os melhores produtores de enzimas, em destaque a lacase. As enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase produzidas nesse trabalho, demonstraram ter baixa ação sobre a biomassa, no entanto, as enzimas produzidas por *P. sanguineus* obtiveram as melhores conversões enzimáticas para o bagaço de cana sem tratamento, com maior teor de glicose.

Embora os resultados de obtenção da glicose tenham sido mais baixos do que as enzimas comerciais, as enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, demonstraram potencial hidrolítico, principalmente para as produzidas pelo fungo *P. sanguineus*.

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

#### 5 REFERÊNCIAS

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

BUSWELL, Jhon A.; CHANG, Shu-ting. Edible mushrooms: Attributes and applications. In: CHANG, Shu-ting; BUSWELL, Jhon A., MILES, Philip G..

**Genetics and breeding of edible mushrooms**. Gordon and Breach Scientific Publishers, Philadelphia, p. 297-324, 1993

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

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

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

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

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

KUWAHARA, M.; et al. **Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium***. FEBS Letters, v.169, p. 247-250, 1984.

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

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

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

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

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

SANTOS, M.E.X. dos; BENACHOUR, M. **Oxidação catalítica de glicose de hidrolisado enzimático de**

**bagaço de cana-de-açúcar em reator batelada para produção de ácido glucônico** UFPE, 2011.

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

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

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