



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**BIODEGRADAÇÃO DE BAGAÇO DE  
CANA DE AÇÚCAR POR  
LINHAGENS/ESPÉCIES DE *PLEUROTUS*  
spp E AVALIAÇÃO NUTRICIONAL PARA  
RUMINANTES**

**Nélida Eladia Vicente Vicente**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucia Regina Durrant  
Orientadora**

**Campinas-SP**

**2002**

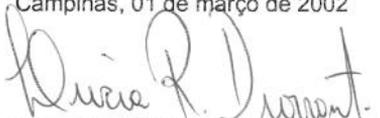
i

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Nelida Eladia Vicente Vicente**, aprovada pela Comissão Julgadora em 01 de março de 2002.

Campinas, 01 de março de 2002

  
**Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant**  
Presidente da Banca

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	V662b
V	
TOMBO BC	48720
PROC.	16-827102
C	<input type="checkbox"/> +
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	01/05/02
Nº CPD	

CMO0167029-6

BIB ID 239228

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

V662b Vicente Vicente, Nélide Eladia  
Biodegradação de bagaço de cana de açúcar por  
linhagens/espécie de *Pleurotus* spp e avaliação nutricional para  
ruminantes / Nélide Eladia Vicente Vicente. – Campinas, SP:  
[s.n.], 2002.

Orientador: Lucia Regina Durrant  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Pleurotus ostreatus*. 2. *Pleurotus ostreatusroseus*.  
3. Fermentação. 4. Bagaço de cana. 5. Enzimas. I. Durrant,  
Lucia Regina. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Engenharia de Alimentos. III. Título.

**BANCA EXAMINADORA**

*Lucia R. Durrant*

**Profª Drª Lucia Regina Durrant**  
**Orientadora**

*58311*

**Prof. Dr. Fumio Yokoya**

*suplente*

**Prof. Dr. José Luiz Pereira**

*suplente*

*Maria José Valarini*

**Drª Maria José Valarini**

*302366*

**Profª Drª Marta Cristina Teixeira Duarte**

*Ranulfo Monte Alegre*

**Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre**

*652112*

*Romildo Martins Sampaio*

**Dr. Romildo Martins Sampaio**

*3011891*

*2002-8278*

Ao Senhor, Nosso Deus:

*São muitas, Senhor, Deus meu,  
as maravilhas que tens operado  
e também os teus desígnios para conosco;  
ninguém há quem se possa igualar contigo.  
eu quisera anuncia-los e deles falar,  
mas são mais do que se pode contar.*

*Sl. 40:5*

*Pois o Senhor Altíssimo é tremendo,  
É o grande rei de toda a terra.*

*Sl 47:2*

A minha família, a meus pais e irmãos:  
pelo carinho e coragem de ter enfrentado nossa ausência  
minha eterna gratidão.

A minha filhinha Cibele Priscila:

Pelas intermináveis horas de espera  
à mamãe chegar,  
pelos sonhos e esperanças  
compartidas,  
Pela paciência e carinho;  
Fonte inesgotável de força, estímulo  
e alegria; uma conquista para ti, com  
todo amor

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Lucia Regina Durrant, pela orientação, apoio, paciência e confiança durante a realização desta tese;

Aos Senhores Membros da Banca Examinadora que com suas sugestões contribuíram em aprimorar este trabalho

À pesquisadora Científica Rosana Possenti MSc. do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/SP pela orientação, profissionalismo, apoio técnico e amizade durante o desenvolvimento da parte experimental das análises de digestibilidade.

A todo o pessoal do Laboratório de Análises Bromatológica do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa/ SP pela gentileza, apoio técnico, colaboração e amizade demonstrada durante a etapa de realização das análises químicas especialmente a Gilberto Braun, Neuza Aparecida Chaves, Carmen Lurdes Terra, Sérgio Renato Miante e Zenairde Ribero da Silva

Aos colegas e amigos do Laboratório de Taxonomia Microbiana, pela amizade, companheirismo e troca de experiência durante a realização dos testes biológicos e bioquímicos especialmente Daniela Franco, a dona Nolberta Lucas, Edilsa Rosa, Eliana Chagas, Matita Harumi, Juliana Belote, a Suelma Feijó e a Karlinha Cristina Costa, pelas correções de meu português numa parte da tese;

Ao Manuel Orrillo, pelo apoio e orientação nas análises estatísticas;

À Celina Luizar, pela generosidade, amizade e carinho;

À Adriana de Ricci, pela amizade e por contar sempre com seu apoio incondicional;

Aos irmãos da IBCU pelo incentivo e apoio na culminação deste trabalho;

À minhas amigas e ex-colegas do C. I. de Bioquímica y Nutrición da UNMSM, Lima-Perú especialmente para Inês Arnão, Raquel Oré, Doris Huertas, Silvia Suárez;; e *In Mempriam* ao Dr Leônidas Delgado Buitrón pelo apoio, estímulo e pelos bons momentos compartilhados;

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo e recursos financeiros para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras	xix
Índice de Quadros	xxi
Lista de Abreviações	xxiii
RESUMO	xxv
ABSTRACT	xxvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Resíduos Lignocelulósicos	7
2.2 Lignocelulose	12
2.2.1 Estrutura	12
2.2.2 Composição Química	15
2.2.2.1 Celulose	15
2.2.2.2 Hemicelulose	17
2.2.2.3 Lignina	18
2.2.2.4 Complexo Lignina Carboidrato (LCC)	20
2.3 Fracionamento da Lignocelulose	22
2.3.1 Pré-tratamentos Químicos	22
2.3.1.1 Tratamento com Ácido	22
2.3.1.2 Tratamento com Álcali	23
2.3.1.3 Explosão por Amônia Congelada	23
2.3.1.4 Solventes Orgânicos	23
2.3.2 Pré-tratamentos hidrotérmicos	24
2.3.2.1 Vaporização	24
2.3.2.2 Vaporização com Ácido	24
2.3.2.3 Água	24
2.3.3 Polpeamento	25
2.4 Tratamento Biológico da Lignocelulose - Biodegradação	26
2.4.1 Biodegradação da Celulose	29
2.4.2 Enzimas celulolíticas e seus substratos	31

2.4.3	Biodegradação da Hemicelulose	32
2.4.4	Enzimas Hemicelulolíticas	35
2.4.5	Biodegradação da Lignina	36
2.5	Fermentação Sólida	40
2.5.1	Requisitos Fisiológicos da SSF por Fungos	42
2.6	Proteínas Unicelulares (SCP)	47
2.7	Cogumelos	48
2.8	<i>Pleurotus</i> spp	50
2.8.1	Taxonomia de <i>Pleurotus</i> spp	51
2.8.2	Sistema Lignocelulolítico do Gênero <i>Pleurotus</i>	52
2.9	Parâmetros usados para medir o grau de degradação do substrato	54
2.9.1	Modificações Físico-Químicas	54
2.9.2	Modificações Biológicas	58
3.	MATERIAL E MÉTODOS	63
3.1	Preparação dos Inóculos	63
3.2	Substrato	64
3.3	Método de Cultivo	64
3.4	Análise Estatística dos Dados Obtidos	65
3.5	Estudo Enzimático	65
3.5.1	Extração Enzimática	65
3.5.2	Determinação de Enzimas Celulolíticas	65
3.5.2.1	Atividade de Celulase Total	66
3.5.2.2	Atividade de Endo-1,4- $\beta$ -D-Glucanase (Carboximetilcelulase)	66
	(CMase)	
3.5.2.3	Atividade de $\beta$ -Glicosidase	67
3.5.3	Determinação de Enzimas Xilanolíticas	67
3.5.3.1	Atividade de Xilanase	67
3.5.4	Determinação de Enzimas Ligninolíticas	68
3.5.4.1	Quantificação da Atividade Enzimática	68
3.5.4.2	Determinação de Lignina Peroxidase (LiP)	68

3.5.4.3 Determinação de Álcool Veratrílico (AVO)	68
3.5.4.4 Determinação de Manganês Peroxidase (MnP)	69
3.5.4.5 Determinação de Lacase	69
3.6 Estudo Químico do Substrato	70
3.6.1 Determinação de Matéria Seca	70
3.6.2 Determinação de Proteína Bruta	70
3.6.3 Determinação de Fibra por Detergente Neutro (FDN)	71
3.6.4 Determinação de Fibra por Detergente Ácido (FDA)	72
3.6.5 Determinação de Lignina	73
3.6.6 Determinação de Celulose e Hemicelulose	74
3.7 Estudo de Digestibilidade	74
3.7.1 Digestibilidade <i>in vitro</i>	74
3.7.2 Digestibilidade <i>in situ</i> com bovinos fistulados	76
3.7.2.1 Animais e tratamentos	76
3.7.2.2 Determinação da Digestibilidade <i>in situ</i>	76
4.RESULTADOS	81
4.1 Crescimento microbiano em bagaço de cana	81
4.2 Produção de Enzimas Celulolíticas por <i>Pleurotus</i> spp	81
4.2.1 Avicelase	81
4.2.2 Carboximetilcelulase	85
4.2.3 $\beta$ -Glicosidase	87
4.3 Enzima Xilanolítica	89
4.3.1 Xilanase	89
4.4 Enzimas Ligninolíticas	91
4.4.1 Atividade de Álcool Veratril Oxidase (AVO)	91
4.4.2 Atividade de Lignina Peroxidase (LiP)	93
4.4.3 Atividade de Manganês Peroxidase (MnP)	95
4.4.4 Atividade de Lacase	97
4.5 Análise Químico dos Componentes Estruturais do Bagaço de Cana	99

4.5.1 Celulose (Cel)	99
4.5.2 Hemicelulose (Hem)	101
4.5.3 Lignina (Lig)	103
4.5.4 Matéria Seca	105
4.5.5 Proteína Bruta (PB)	107
4.5.6 Fibra Detergente Neutro (FDN)	109
4.5.7 Fibra Detergente Àcido (FDA)	111
4.6 Estudo de Digestibilidade do Bagaço de Cana de Açúcar Submetido a SSF por espécies de <i>Pleurotus</i>	113
4.6.1 Digestibilidade <i>in vitro</i> da Matéria Seca	113
4.6.2 Digestibilidade <i>in situ</i>	115
5. DISCUSSÃO	121
5.1 Degradação celulolítica e xilanolítica	121
5.2 Degradação Ligninolítica	123
5.3 Componentes Estruturais do Bagaço de Cana	127
5.4 Digestibilidade “in vitro” e “in situ”	129
6. CONCLUSÕES	133
7. BIBLIOGRAFIA	135
8. APÊNDICE	151
APÊNDICE A Enzimas Celulolíticas e Xilanolíticas	153
APÊNDICE B Enzimas Ligninolíticas	157
APÊNDICE C Análise Químico do Bagaço de Cana	163
APÊNDICE D Estudo de Digestibilidade	171

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema mostrando a parede celular das plantas	13
Figura 2 Atividade de Avicelase produzidas por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i> durante SSF em bagaço de cana	83
Figura 3 Atividade de Carboximetilcelulase produzidas por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i> durante SSF em bagaço de cana	85
Figura 4 Atividade de $\beta$ -Glicosidase produzidas por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i> durante SSF em bagaço de cana	87
Figura 5 Atividade de Xilanase produzidas por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i> durante SSF em bagaço de cana	89
Figura 6 Atividade de Álcool Veratril Oxidase produzidas por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i> durante SSF em bagaço de cana	91
Figura 7 Atividade de Lignina Peroxidase produzidas por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i> durante SSF em bagaço de cana	93
Figura 8 Atividade de Manganês Peroxidase produzidas por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i> durante SSF em bagaço de cana	95
Figura 9 Atividade de Lacase produzidas por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i> durante SSF em bagaço de cana	97
Figura 10 Teor de Celulose do Bagaço de Cana de Açúcar durante SSF por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i>	99
Figura 11 Teor de Hemicelulose do Bagaço de Cana de Açúcar durante SSF por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i>	101
Figura 12 Teor de Lignina do Bagaço de Cana de Açúcar durante SSF por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i>	103
Figura 13 Teor de Matéria Seca do Bagaço de Cana de Açúcar durante SSF por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i>	105
Figura 14 Teor de Proteína Bruta do Bagaço de Cana de Açúcar durante SSF por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i>	107
Figura 15 Teor de Fibra Detergente Neutro do Bagaço de Cana de Açúcar durante SSF por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i>	109

Figura 16	Teor de Fibra Detergente Ácido do Bagaço de Cana de Açúcar durante SSF por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i>	111
Figura 17	Digestibilidade <i>In Vitro</i> do Bagaço de Cana de Açúcar durante SSF por linhagens/espécie de <i>Pleurotus</i>	113
Figura 18	Cinética da Degradação Ruminal da Matéria Seca do Bagaço de Cana Fermentado por P1 em Diferentes Tempos	119
Figura 19	Cinética da Degradação do FDN do Bagaço de Cana Fermentado por P1 em Diferentes Tempos	119

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1	Principais Enzimas Celulolíticas e seus respectivos Substratos utilizados na Determinação de suas Atividades	32
Quadro 2	Principais Enzimas Hemicelulolíticas e seus respectivos Substratos utilizados na Determinação de suas Atividades	35
Quadro 3	Principais Enzimas Ligninolíticas e seus respectivos Substratos utilizados na Determinação de suas Atividades	37
Quadro 4	Parâmetros da Digestibilidade Ruminal da Matéria Seca (MS) do Bagaço de Cana Fermentado por P1	117
Quadro 5	Parâmetros da Digestibilidade Ruminal da Fibra Detergente Neutro (FDN) do Bagaço de Cana Fermentado por P1	119

## LISTA DE ABREVIÇÕES

AVO	Álcool Veratril Oxidase
CMase	Carboximetilcelulase
DP	Grau de Polimerização
FDA	Fibra Detergente Ácido
FDN	Fibra Detergente Neutro
LiP	Lignina Peroxidase
MnP	Manganês Peroxidase
016	<i>Pleurotus ostreatusroseus</i>
016M	<i>P. ostreatusroseus</i> em meio com melaço
P1	<i>Pleurotus ostreatus</i> "tiuti"
P1M	<i>P. ostreatus</i> em meio com melaço
SCP	Proteínas Unicelulares
SSF	Fermentação Sólida
U/L	Unidades por Litro

## RESUMO

O bagaço de cana-de-açúcar com ou sem adição de melaço de cana foi submetido à Fermentação Sólida (SSF) por duas linhagens/espécies de basidiomicetos: *Pleurotus ostreatus* "tiuti" (P1 ou P1M) e *Pleurotus ostreatusroseus* (016 e 016M) durante 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, e 60 dias. Foram observados o crescimento micelial de cada linhagem e realizadas, em cada período; as determinações das atividades das enzimas lignocelulolíticas, determinações dos níveis de lignina, celulose, hemicelulose, matéria seca, proteína bruta, FDN e da digestibilidade "in vitro". Foi também determinada a digestibilidade "in situ" do bagaço fermentado por *P. "tiuti"*, por ter mostrado maior eficiência no crescimento e adaptação ao substrato bagaço de cana.

Os resultados mostraram que as duas linhagens/espécies possuem diferentes perfis metabólicos. A linhagem/espécie 016 com e sem melaço mostrou maior atividade de enzimas celulolíticas. No entanto, P1 com e sem melaço, mostrou maior atividade de enzimas ligninolíticas. Quando o meio de bagaço continha melaço foi observado uma depressão na atividade das enzimas celulolíticas e uma estimulação da atividade das enzimas ligninolíticas MnP e AVO em P1. As duas linhagens/espécie mostraram atividade de LiP.

Os dados das análises químicas estão de acordo com os perfis enzimáticos mostrados para cada linhagem/espécie, mas não houve correlação com a digestibilidade *in vitro*. Os resultados da digestibilidade *in situ* mostraram uma ótima digestibilidade da matéria seca do bagaço de cana fermentado com P1 por 45 dias.

Os resultados mostrados permitem afirmar que a SSF *P. "tiuti"* degradou mais eficientemente o bagaço de cana e também foi responsável por um maior aumento nos níveis de proteína.

Os resultados permitem afirmar que a SSF do bagaço de cana empregando

*Pleurotus ostreatus* "tiuti" é um recurso recomendado para melhorar a qualidade nutricional do mesmo.

**Palavras chave:** *Pleurotus ostreatus* "tiuti" – *Pleurotus ostreatusroseus* – Fermentação sólida – bagaço de cana-de-açúcar – enzimas linocelulolíticas – digestibilidade – *in vitro* – *in situ*.

## ABSTRACT

Sugarcane bagasse (SB) and SB plus molasses (SBM), were used as substrates for Solid State Fermentation (SSF) by two strains/species of genus *Pleurotus*: *P. ostreatus* "tiuti" (P1) and *P. ostreatusroseus* (016), for a 60 – days period. Samples were collected at each 5 – days interval up 30 days and then at the 45<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> days of incubation, and the following determinations were carried out: the lignocellulolytic activities; levels of Cellulose, Hemicellulose and Lignin; Dry Matter; Protein, Fiber Detergent neutral (FDN) and *in vitro* digestibility. Since *P. piuti* showed greater efficiency for adaptation and growth in SB *in situ* digestibility was carried out for *P. ostreatus* "tiuti" samples only.

The results showed that the two strains differed enzymatically. The strain 016 in SB or SBM produced higher cellulolytic activities whereas P1 exhibited higher ligninolytic activities. The presence of molasses had a negative effect on the cellulolytic activities but caused a stimulation on the ligninolytic activities of manganes peroxidase and vertaryl alcohol oxidase. LiP was produced by the bothstrains.

The levels of cellulose, hemicelulose and lignin are in accordance with the enzymes produced, but not with *in vitro* digestibility. However, *in situ* digestibility analysis showed a good digestibility for SB inoculated with P1 and grown for 45 days.

The results indicate that *P. "tiuti"* degrades SB more efficiently than 016, and also causes greater increase in the protein levels.

This work shows that the use of SB for SSF with *P. "tiuti"* could be recommended for improving the quality of SB.

**Key-words:** *Pleurotus ostretatus* "tiuti" – *Pleurotus ostretusroseus* – solid-state fermentation – lignocellulolytic enzymes – digestibility *in vitro* – digestibility *in situ*.

## 1. INTRODUÇÃO

O peso seco da matéria orgânica produzida anualmente por fotossíntese é estimado em 155 bilhões de toneladas; sendo dois terços do valor produzidos na Terra (RAJARATHNAM & BANO, 1991). Grande parte desta matéria orgânica fotosintetizada é constituída por material lignocelulósico, formado principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, na proporção de 45, 25 e 20%, respectivamente. Na prática, é difícil utilizar estes materiais lignocelulósicos efetivamente, devido a fatores como mudanças estacionais, quantidade, inconveniências no transporte e estocagem de todo o volume produzido. Conseqüentemente, esta biomassa em forma de resíduo agrícola se acumula em grandes quantidades causando deterioração do meio ambiente e perda de um recurso potencialmente importante (CHANDER & SINGH, 1993).

Como a população mundial cresceu muito durante os últimos anos e a agricultura tradicional não consegue suprir satisfatoriamente a demanda alimentícia, faz-se necessário uma utilização mais eficiente de todos os carboidratos disponíveis na natureza, inclusive os polissacarídeos lignificados, transformando-os em alimentos de qualidade para ruminantes e humanos (REI, 1989). Os resíduos agrícolas constituem uma rica fonte de carboidratos mas seu valor alimentício é limitado pela baixa degradabilidade. Os principais fatores que contribuem para esta baixa degradabilidade são: a lignificação, a silificação e a cristalinidade da celulose (KARUNANANDAA et alii, 1992).

A lignina, o segundo polímero natural mais abundante da Terra, constitui 15 a 30% da parede celular das Gimnospermas e Angiospermas formando uma matriz ao redor do polímero mais abundante da Terra, a celulose.

A incrustação desta matriz retarda significativamente a despolimerização da celulose, sendo que a degradação da lignina constitui um desafio importante para a ciência atualmente (GOLD & ALIC, 1993).

Durante os últimos anos, consideráveis esforços foram empregados na tentativa de melhorar a digestibilidade e a utilização industrial dos resíduos agrícolas, entre os quais, diferentes tratamentos físicos e químicos. Porém, os resultados são de limitado sucesso principalmente, pelo custo econômico. A deslignificação biológica tem recebido menor atenção apesar das vantagens serem semelhantes aos processos de hidrólise ácida-enzimática de polissacarídeos, uma vez que os processos biológicos se desenvolvem em condições brandas, são de alta produtividade, tem poucas reações cruzadas, menor demanda de energia e menor resistência à pressão e corrosão do reator (REID, 1989).

Dentre os melhores degradadores biológicos do material lignocelulósico estão os “fungos de decomposição branca” que pertencem ao grupo dos basidiomicetos sendo o mais amplamente estudado *Phanerochaete chrysosporium* (KEREM et alii, 1992). Fungos comestíveis (cogumelos) cultivados para fins comerciais como *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea* e *Pleurotus sajor-caju*, utilizam de maneira diferente os resíduos lignocelulósicos mostrando que seus perfis de enzimas lignocelulolíticas (celulases e ligninases) também são diferentes daqueles de *P. chrysosporium* (BUSWELL, 1996).

A decomposição de material lignocelulósico por microorganismos depende de seu grau de atividade lignocelulolítica exocelular do microorganismo que o capacita para decompor e metabolizar o complexo heterogêneo dos três componentes lignocelulósicos: celulose, hemicelulose e

lignina (MASAPHY & LEVANON, 1992). Assim *P. chrysosporium* utiliza mais celulose e hemicelulose que lignina, mas, como o rúmen pode digerir celulose e hemicelulose e não lignina, é necessário encontrar um fungo específico para degradá-la, já que sua degradação é complicada e ainda pouco compreendida (DAS & KARIM, 1995).

Um fungo comestível que degrada lignina de maneira muito eficiente é o basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* (CHANG & MILES, 1989). Em geral, o sistema lignocelulolítico do gênero *Pleurotus* não está bem definido e existem evidências mostrando que pode ser diferente dos outros fungos de decomposição branca, até agora estudados (WALDNER et alii, 1988; SANNIA et alii, 1991; MASAPHY & LEVANON, 1992). O mecanismo de degradação de lignina tem sido menos estudado que o de *P. chrysosporium* (KEREM & HADAR, 1993). Assim, diversos autores não têm encontrado lignina peroxidase (LiP) como componente de seu sistema lignocelulolítico (KIMURA et alii, 1990; HADAR et alii, 1993) e os esforços feitos para detectar lignina peroxidase não tem obtido sucesso (VALMASEDA et alii, 1991, KEREM et alii, 1992) seja ao nível de proteínas (WALDNER et alii, 1988) ou ao nível de DNA (KIMURA et alii, 1990). Parece que a enzima mais importante na degradação de lignina por este fungo é a lacase (SANNIA et alii, 1991; VALMASEDA et alii, 1991; KEREM et alii, 1992), mas também foi encontrado álcool veratrílico (AVO) (GUILLEN et alii, 1990; VALMASEDA et alii, 1991).

*Pleurotus* sp tem a capacidade de se desenvolver em uma ampla faixa de temperatura (15-31°C), colonizar um amplo número de resíduos lignocelulósicos, não necessita de substrato pré-formado e ainda possui grande capacidade de adaptação as mais diversas condições climáticas

(RAJARATHNAM & BANO, 1987; CHANG et alii, 1991). Culturas de *Pleurotus* sp sobre os mais variados resíduos agrícolas como palhas de diferentes cereais, cápsulas de algodão, casca de laranja, polpa de café, bagaço de cana-de-açúcar, dentre outros, foram realizados em diferentes locais sob diferentes condições, geralmente em fermentação líquida. Porém, cultura em Fermentação Sólida (SSF) foi a menos estudada (BISARIA et alii, 1987; ORTEGA et alii, 1993).

Diversos autores têm encontrado que a fermentação sólida em diferentes resíduos agrícolas aumenta sua digestibilidade e seu teor de proteínas (VALMASEDA et alii 1991), e com os corpos de frutificação de *Pleurotus* sp existe a possibilidade que os resíduos lignocelulósicos sejam convertidos num saboroso alimento para o homem, conhecido como "Ostra". Outra vantagem da fermentação sólida (SSF) é o baixo custo, já que pode utilizar resíduos agrícolas, equipamentos menos sofisticados e tecnologias mais simples ( CHANG & MILES, 1989; KEREM et alii, 1992; PAI et alii, 1995).

No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar constitui um resíduo agro-industrial importante, que em muitas ocasiões tem servido como alimento de emergência para o gado, e para que estes sejam mais e melhor utilizados devem ser submetidos a diferentes tratamentos físicos para melhorar seu valor nutritivo. Porém, com o decorrer do tempo, observou-se que os animais alimentados com este bagaço tratado começaram a perder peso, o que foi explicado pela presença de furfural gerado durante o processamento (CAIELLI, 1988).

Os fatos citados anteriormente e o crescente interesse mundial pela fermentação sólida, associado à possibilidade de emprego de uma alternativa local para utilizar este potente recurso agro-industrial, representado

pelo bagaço de cana-de-açúcar com vistas à alimentação animal, motivaram a realização deste trabalho que tem como objetivos principais:

- ◆ Submeter o bagaço de cana de açúcar a um processo de fermentação sólida (S.S.F.) por duas diferentes linhagens/espécies de *Pleurotus* (*P. ostreatus* "tiuti" e *P. ostreatusroseus*), a 30° C durante 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 dias a fim de: Observar e comparar as modificações do complexo lignocelulósico obtido pela fermentação das duas linhagens/espécies de *Pleurotus*, medindo a concentração de: celulose, hemicelulose e lignina no substrato fermentado; Avaliar as atividades das enzimas celulolíticas: (Avicelase, Carboximetilcelulase,  $\beta$ -Glucosidase e xilanase) e das enzimas ligninolíticas (Lacase, Lignina peroxidase, Manganês peroxidase e Álcool veratril oxidase);

- ◆ Adicionar melaço de cana ao substrato (bagaço de cana) e submete-lo à fermentação sólida nas mesmas condições que o bagaço de cana "in natura", verificando se existem diferenças nos parâmetros estudados (degradação do material lignocelulósico e atividade enzimática).

- ◆ Determinar a digestibilidade *in vitro* do bagaço submetido a SSF.

- ◆ Determinar a digestibilidade *in situ* dos meios de fermentação que apresentarem maior desenvolvimento micelial (determinado por observação visual) e o maior ganho de proteína bruta.

## 132. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

A produtividade de biomassa seca devido à fotossíntese de vegetais, na terra é estimada em 155 bilhões de toneladas por ano, dos quais ao redor de dois terços são produzidos nos continentes e o restante nos oceanos. A maioria do material das plantas terrestres provém das florestas (65%), porém, mais de 15% é gerado nos campos de cultivo. Mais ou menos 1,25% do total da biomassa terrestre é usado na alimentação humana, com uma perda de mais ou menos 9% durante o processamento, sendo o restante constituído de resíduos lignocelulósicos. Resíduo de cereais e legumes, de plantas como bambu, papiros, cânhamo, linho, fibras de algodão e de cana de açúcar são os de maior importância (RAJARATHNAM & BANO, 1991).

O tipo e utilidade dos resíduos lignocelulósicos em qualquer região geográfica particular dependem de fatores climáticos e ambientais, do tipo de cultura e da natureza da tecnologia local. Assim, a palha de trigo e milho são os subprodutos que prevalecem na Europa e América do Norte, enquanto que a palha de arroz é abundante na Ásia. Grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos são produzidas a cada ano nos Estados Unidos e no Reino Unido onde uma considerável quantidade deles é queimada. Igualmente, nos países asiáticos, uma boa fração da palha de arroz é queimada, outra parte enterrada ou usada na cobertura de tetos ou de alimento para o gado, enquanto a metade deste resíduo agrícola permanece sem ser usado. Numerosos e variados legumes são cultivados em diversas partes do mundo e para cada tonelada coletada, se obtém duas a três vezes de resíduo disponível. Acontece o mesmo na colheita de sementes oleaginosas que geram grandes quantidades de resíduos agrícolas que permanecem sem uso (CHANDER & SINGH, 1993).

Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), a cada ano são produzidos 2.946 milhões de toneladas de palha de cereais. Os resíduos de cereais mais importantes são os constituídos pela palha de trigo, de aveia, de centeio, de arroz e sabugo de milho (NICHOLSON, 1984).

Em geral, os resíduos agrícolas são de baixo teor alimentício, classificados como de baixa qualidade por seu alto conteúdo de fibras, baixa degradabilidade no rúmen, baixo teor de proteínas, vitaminas e minerais, mas mesmo assim representam uma rica fonte de energia cujo uso e aplicação são muito antigos, seja como alimento direto ou como componente dos alimentos, constituindo um papel importante na dieta de ruminantes (HADAR et alii, 1992).

A digestibilidade dos resíduos vegetais dependem da lignificação, silificação, cristalinidade da celulose, disponibilidade de açúcares solúveis e de compostos amino nitrogenados (LINDENFELSER et alii, 1979; NICHOLSON, 1984).

Dentre os resíduos agrícolas provenientes dos cereais, sabe-se que a palha de aveia é mais digerível que a palha de cevada e esta por sua vez, mais que a de trigo. A palha de arroz tem características especiais que a tornam diferente dos outros cereais; os caules são mais digeríveis que as folhas em oposição ao que ocorre com os outros cereais. Entretanto foi encontrado que o sabugo de milho tem a mais alta digestibilidade. Em geral, a palha de arroz contém mais sílica (10-12%) e menos lignina (6-7%), ao contrário das folhas de outros cereais que contêm 10-12% de lignina e 6-7% de sílica. Este alto conteúdo de sílica na palha de arroz pode ser absorvido em 30%, e excretado logo pela urina dos animais. As ramas de algodão e a palha de trigo apresentam uma digestibilidade de 47%. As folhas de mandioca contêm 20% de proteína bruta, mas sua digestibilidade é baixa devido ao alto teor de glicosídeos cianogênicos, (HCN) e/ou pela grande quantidade de taninos ligada a proteínas que afeta a

degradação enzimática. A palha integral de soja tem 40% de digestibilidade e a digestibilidade de sua proteína é de 30 a 40% (NICHOLSON, 1984). A palha de café também mostra baixa digestibilidade devido aos altos níveis de nitrogênio lignificado (CALZADA et alii, 1987).

Como cada vez os recursos naturais diminuem e as necessidades aumentam, existe a possibilidade de utilizar os resíduos lignocelulósicos provenientes da agricultura, do processamento agro-industrial e florestal que poderiam contribuir grandemente para preencher as necessidades de alimentos baratos, combustíveis, fertilizantes e variados compostos químicos. Geralmente as tecnologias propostas para utilizar os resíduos lignocelulósicos apresentam baixa produção e/ou uma alteração dos açúcares disponíveis no material bruto. Entre as diferentes razões para que isto ocorra estão: 1) a dificuldade de manipulação dos sólidos num sistema de processamento contínuo; 2) a formação de produtos de degradação indesejáveis; 3) a presença de substratos recalcitrantes nos processos de bioconversão (LAMPTEY et alii, 1986).

Dentre as culturas geradoras de resíduos agrícolas, a cana de açúcar se destaca por gerar diversos subprodutos que podem ser utilizados a nível industrial. Os dois principais subprodutos da industrialização da cana de açúcar com potencial de utilização são o bagaço de cana e o melaço. Por definição, o bagaço é aquele resíduo fibroso, insolúvel em água, obtido após compressão e extração do suco do colmo da cana no processo de obtenção do açúcar. Este bagaço consiste principalmente de celulose, hemicelulose e lignina. Da celulose, pode-se obter papel, da hemicelulose, furfural e seus derivados e da lignina, plásticos. O bagaço tem pouca proteína e seu TDN (Nitrogênio Digerível Total) pode ser encontrado em diversas tabelas, variando entre 26 e 46% (PATURAU, 1989). O alto conteúdo de lignina no bagaço o impede de ser digerido pelos animais, tornando-o alimento de baixa qualidade (ORTEGA et alii, 1992). As folhas e parte mais alta da planta de cana de açúcar, geralmente deixados nos

campos após a colheita do colmo representam 40% do peso total da planta e tem sido estimulada sua utilização na alimentação animal, mostrando ter um TDN de 50% (NICHOLSON, 1984).

Sendo o bagaço de cana um subproduto de baixo valor alimentício, seu custo total é incrementado pela manipulação, estocagem e transporte já que sua baixa densidade (cerca de 160 Kg/m<sup>3</sup>) e a relativa facilidade de combustão aumentam o custo de manipulação e transporte; além de sua utilização como combustível nas usinas é raro encontrar uma outra utilização imediata. Devido ao alto conteúdo de açúcar residual, umidade e microorganismos (leveduras, fungos e actinomicetos) o bagaço fermenta rapidamente com produção de álcool seguido por ácido acético e outros ácidos. Esta fermentação produz grande aumento de calor e de volume de dióxido de carbono e mudanças significativas na quantidade e qualidade do material fibroso, tendo sido recomendado a secagem ou alguns tratamentos químicos a fim de controlar o desenvolvimento da flora termófila e termotolerante (PATURAU, 1989).

O melaço é produzido durante a obtenção do açúcar, depois de repetidas cristalizações. Este xarope residual que não cristaliza sacarose é obtido por método simples. A mais importante característica do melaço é seu alto conteúdo de carboidratos, principalmente na forma de açúcares (48-56%). A matéria orgânica não constituída de açúcar é pequena e constituída por componentes do sabor e da cor. Os compostos nitrogenados expressos como proteína alcançam apenas 3,5% de sua composição e é de pouca digestibilidade, sendo que o conteúdo de vitaminas também é baixo e constituído principalmente pelas vitaminas do complexo B. Os microelementos minerais estão constituídos principalmente de cobalto, iodo, cobre, manganês e zinco. Apesar do melaço ser considerado nutricionalmente pobre tem a vantagem da boa palatabilidade e peletização e por isto é usado em rações para animais servindo como veículo na adição de outros compostos como uréia e ácido fosfórico. O melaço tem um ligeiro

efeito laxativo devido à presença de potássio, mas em altas concentrações pode causar distúrbios digestivos. Misturas de melaço e bagaço de cana têm sido usadas em certas regiões onde se produz cana, para a alimentação animal e em vários lugares constitui uma prática comum adicionar, além deste elemento, outros compostos como torta de semente de algodão e de soja com o intuito de melhorar o valor nutricional e assim encontrar uma adequada utilização do bagaço de cana; porém geralmente os resultados obtidos foram pouco satisfatórios do ponto de vista comercial (PATURAU, 1989).

No Brasil, foram produzidos 125 milhões de toneladas de açúcar de cana em 1985-1986, que geraram 31 milhões de toneladas de bagaço, dos quais 50% foram queimados para produzir energia (vapor) e eletricidade; do bagaço remanescente 100 mil toneladas foram utilizadas na indústria de papel; 140 mil toneladas na produção de furfural, um composto de grande aplicação industrial, e 140 mil toneladas para cobrir a terra e alimentação animal (CAIELLI, 1988). Em 1994, 70,9 milhões de toneladas de cana de açúcar foram produzidas no mundo, os quais renderam 170, milhões de toneladas de bagaço número que poderia ser incrementado a mais de 210 milhões de toneladas incluindo o bagaço gerado da indústria do álcool, principalmente no Brasil. Em 1996 foram relatadas 86 plantas de polpa e papel de bagaço no mundo, a maioria na América Latina, como fonte alternativa principal da madeira para produzir celulose; porém, mesmo assim, o uso do bagaço é considerado limitado, devido principalmente aos poucos conhecimentos da potencialidade desta fibra (FERNÁNDEZ, 1996). No Brasil, desde 1985, vem-se utilizando bagaço de cana hidrolisado por vapor de 20 kg/cm<sup>2</sup> durante 5 minutos liberado a pressão abruptamente no final desse período. Os resultados são muito satisfatórios no uso como componente de ração para o engorde do gado, mas as dificuldades aparecem na utilização desta técnica a nível industrial já que a operação de secagem do material aumenta muito o custo total. Diante desta dificuldade, é recomendável que esta fonte alternativa e barata de alimentação animal seja replanejada localmente (PATURAU, 1989).

## **2.2 LIGNOCELULOSE**

### **2.2.1 Estrutura**

Lignocelulose é a denominação dada a os compostos que estão intimamente relacionados à parede celular das plantas, onde a celulose esta fortemente ligada à lignina e a um outro polissacarídeo chamado comumente de hemicelulose. Este material, também conhecido como “resíduo lignocelulósico” e que pode ser definido como aquela porção do reino vegetal não utilizada apropriadamente pelo homem considerando que cada resíduo possa ter algum tipo de utilidade (CHAHAL, 1991).

A parede celular das plantas (madeira) é classificada em dois grandes grupos: madeira flexível e macia das Gimnospermas (pinho e coníferas) e a madeira dura e resistente das Angiospermas (videira, álamo, aceráceas, carvalho, etc). Elas diferem no tipo de células que as constituem. As madeiras macias têm dois tipos de células: as de fibras longas (2-5 mm) que dão resistência à madeira e são responsáveis pelo transporte de água no sentido vertical, e as células pequenas, estriadas que transportam água na direção horizontal; além disso, este tipo de madeira tem os canais de resina na direção horizontal e vertical. As madeiras duras possuem maior diversidade de células. Em geral, o crescimento em anéis das madeiras duras é composto de um arranjo de varias formas dos vasos, de fibras e células estriadas do parênquima. Estas células estão preparadas para a condução de água, dar resistência, transporte e armazenamento de nutrientes (CHAHAL, 1991).

Normalmente as células dos compostos lignocelulósicos se dispõem formando camadas onde uma delgada parede primária contorna a outra parede relativamente fina, a parede secundária (Fig. 1). A parede primária tem só 0,1 – 0,2  $\mu\text{m}$  de espessura e contém uma rede disposta ao acaso e livremente organizada de microfibrilas de celulose. A parede secundária, no entanto, é

composta por três camadas  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ . A camada mais externa da parede secundária é a camada  $S_1$  que apresenta uma estrutura de fibrilas cruzadas e com

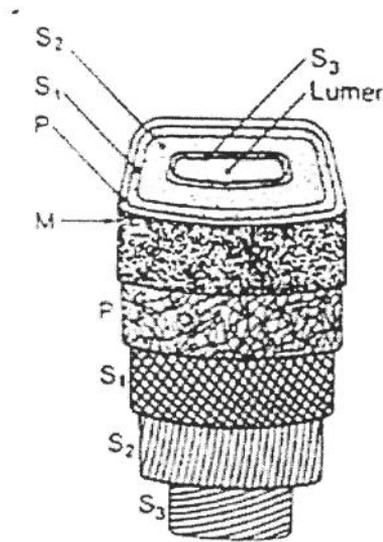


Figura. 1 Esquema mostrando a parede celular das plantas (CHAHAL, 1991).

baixo conteúdo de lignina. A camada seguinte é a  $S_2$  e constitui a porção principal da parede secundária (1–5  $\mu\text{m}$  de espessura) onde as fibrilas estão sempre orientadas no eixo principal do lúmen. Esta camada é de calibre variável e geralmente forma o volume de substâncias da parede celular. A camada  $S_3$  é bastante fina e as microfibrilas formam um eixo horizontal que contornam a camada verrugosa que é a porção mais interna da parede celular, provavelmente formada de fragmentos protoplásmicos. Nas madeiras macias ou muito duras esta camada é uma mistura heterogênea de componentes de composição desconhecida. A porção central, depois da desintegração do protoplasma com o envelhecimento é vazia e chamada de lúmen. O material intercelular chamada de lamela média (M) e as paredes primárias adjacentes (P) de duas células estão ligadas por substâncias pécicas e lignina. (CHAHAL, 1991).

É importante ressaltar que celulose, hemicelulose e lignina estão presentes em cada camada da parede celular, mas a concentração destes

varia em cada camada; assim a celulose é mais alta na subcamada S<sub>2</sub> e diminui até a lamela média onde está presente somente em pequenas quantidades, a camada S<sub>3</sub> é rica em hemicelulose mas na lamela média a lignina é o componente predominante; embora a concentração de lignina seja mais alta aqui, esta porção é extremamente fina; então a maior parte da lignina está na parede secundária (KUHAD et alii, 1997).

A palha é um material mais heterogêneo que a madeira; no entanto, a estrutura de sua parede celular tem sido menos estudada que as das fibras de madeira. As fibras das palhas derivam principalmente de células e internodos mais ou menos longos e finos, claramente pontiagudas. Além das fibras, as palhas contêm tecidos não fibrosos curtos que consistem de células epidérmicas, plaquetas, células serrilhadas e espiraladas, as quais são derivados das resinas, nódulos, etc. (KUHAD et alii, 1997).

Cada camada que compõe a parede celular consiste de microfibrilas de celulose embebidas numa mistura diferente de hemicelulose e ligninas. As moléculas de celulose nas camadas S<sub>1</sub> e S<sub>3</sub> são depositadas em hélice com relação ao plano do eixo das fibras. No entanto, aquelas da camada S<sub>2</sub> são depositadas numa série concêntrica sendo que o número delas tem correlação com os dias de crescimento das fibras. Entre cada camada da parede celular secundária, a celulose e os outros constituintes são agregados entre eles, constituindo longos e finos pacotes chamados de microfibrilas. Entre cada microfibrila as moléculas lineares de celulose são ligadas lateralmente por ligações de hidrogênio e associadas em vários graus de paralelismo; regiões que contêm moléculas altamente ordenadas são chamadas de regiões cristalinas e onde existe menor ordem são chamadas de paracristalina ou região amorfa. As microfibrilas tem cerca de 50 – 100 Å de diâmetro e consiste de um centro cristalino de celulose altamente ordenado rodeado por uma camada para-cristalina que no algodão contém principalmente moléculas de celulose, e na madeira está

constituído principalmente por moléculas de hemicelulose e lignina. As moléculas chegam a ser menos ordenadas em certos pontos das microfibrilas e alguns estudos revelam que as moléculas de celulose estão entrelaçadas em cadeias duplas como fitas, que por sua vez, é torcida como numa hélice (FUJITA & HARADA, 1991).

As fibras finas ou microfibrilas e as fibras libriformes (fibras de longitude 0,64 – 2,30 mm) estão localizadas em volta dos vasos e conectadas a outras células pelas bordas ou por simples cicatrização. Os vasos são canais finos e curtos (0,03 – 0,13 mm) que quando localizados na parte superior de cada célula, formam tubos de vários metros de comprimento. Estes vasos são mais efetivos para o transporte de água nas madeiras duras que nas fibras de madeira macia (KUHAD et alii, 1997).

### **2.2.2 Composição Química**

A biomassa lignocelulósica proveniente dos resíduos agrícolas consiste principalmente de três polímeros interligados a celulose, hemicelulose e lignina; aproximadamente a metade dessa biomassa é constituída por celulose; a hemicelulose e lignina constituem cada um quarta parte do total (BROWN, 1985). O resíduo das gramíneas contém menos celulose e lignina que a madeira e como tem menor densidade, são mais volumosos que os resíduos da madeira. O conteúdo de hemicelulose é maior nas gramíneas que nas madeiras e algumas gramíneas como a palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, tem um alto conteúdo de sílica e pouco se sabe sobre a função deste composto na bioconversão (CHAHAL, 1991).

#### **2.2.2.1 Celulose**

A celulose é o componente mais abundante da parede celular formando a matriz de suporte para a membrana celular. Este componente

químico é um homopolímero de unidades de hidroglicopirranonas repetitivas, ligadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. O número de glicoses por molécula de celulose varia desde poucas unidades (15 ou menos) a muitas unidades (10.000 a 15.000), sendo que a unidade básica da celulose é constituída por duas unidades de glicose ligadas por ligações  $\beta$ -1,4. (CHANDER & SINGH, 1993).

O tamanho da molécula de celulose é determinado pelo grau de polimerização (DP) que é o valor médio do número de unidades de monômeros. Cada unidade de glicose gira  $180^\circ$  em relação a seus vizinhos dentro do eixo principal da cadeia, sendo que esta rotação de resíduos adjacentes e as ligações  $\beta$ -1,4 conferem à celulose uma rígida estrutura em espiral. A abundância de grupos hidroxilas e a tendência a se formarem ligações de hidrogênio inter e intramolecular, resultam na formação de agregados lineares que atribuem resistência às plantas e a insolubilidade da celulose a solventes comuns, particularmente à água (FUJITA HARADA, 1991).

A celulose nativa cristaliza imediatamente após sua biossíntese, e contém regiões cristalinas e amorfas. Nas zonas cristalinas, que são altamente ordenadas, encontram-se dispersas as zonas amorfas que são menos ordenadas, e onde os grupos hidroxilas estão mais disponíveis para reagir. As cadeias de moléculas de celulose são agrupadas em feixes de quase 30 para formar as microfibrilas, e aproximadamente 100 microfibrilas formam as fibrilas, que são estabilizadas lateralmente por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das cadeias adjacentes, e chegam a ser tão resistentes, que têm sido considerados mais fortes que o aço do tamanho correspondente desta, contribuindo desta maneira significativamente à resistência da madeira. O arranjo das moléculas de celulose em feixes de fibrilas ocorre de maneira muito regular chegando a ter uma difração cristalina característica de raios X.

A resistência da celulose nativa à hidrólises enzimáticas, deve-se à suas propriedades intrínsecas e também à associação com lignina e polissacarídeos como hemicelulose e pectina, que impedem o acesso de enzimas celulolíticas. Foi encontrado que a degradabilidade da celulose por uma flora mista do rúmen é inversamente proporcional à cristalinidade do substrato. No entanto, o grau de cristalinidade não é demasiado importante em determinar a susceptibilidade à degradação enzimática da celulose, sendo mais importante considerar o grau de turgescência (inchaço) da estrutura fibrilar e o volume dos poros entre as fibrilas (COUGHLAN, 1990).

As fibrilas de celulose contornando a célula em arranjo paralelo regular em camadas, são cimentadas ou ligadas pela matriz de um outro polímero, a hemicelulose (CHANDER & SINGH, 1993).

#### **2.2.2.2 Hemicelulose**

Dependendo da espécie vegetal analisada cerca de 20 a 30% do peso seco é constituído pela hemicelulose e assim como a celulose, a hemicelulose mostra uma variedade de estrutura e composição. São polímeros homogêneos ou heterogêneos, lineares e/ou ramificados, compostos principalmente de três hexoses: glicose, manose e galactose, e de duas pentoses: xilose e arabinose, junto com o ácido urônico. Três grupos de hemicelulose bem definidos podem ser identificados: 1) Xilanas, que têm um esqueleto básico composto de unidades D - xilopiranosas ligadas por  $\beta$ -1,4 glucosídico, com ligações laterais para arabinose, ácido 4-O-metilglucorônico e ácido arabino glucorônico; 2) Mananas, que são compostas de ligações das unidades de  $\beta$ -1,4-glucomanas e D-manopiranosas que são parcialmente substituídas por unidades de  $\alpha$ -galactose e unidades de acetil; 3) Galactomananas, semelhantes as mananas, identificadas pelo alto conteúdo de galactose (CHANDER & SINGH, 1993; OLSSON & HAHN-HÅGERDAL, 1996).

A maior parte da hemicelulose que existe na natureza está constituída pelas xilanas e são encontradas nas plantas anuais, nas árvores decíduas e em pequena quantidade nas coníferas. As xilanas tendem a ser adsorvidas entre a celulose e a se agregar a outros componentes celulósicos provavelmente como resultado das interações das ligações de hidrogênio. As xilanas desempenham uma função maior na coesão da parede celular já que quando elas são removidas das fibras da madeira delignificadas se produz um significativo aumento na porosidade da fibra. Existem evidências que indicam que a celulose é protegida do ataque enzimático pelas xilanas e mananas (KUHAD et alii, 1997).

### **2.2.2.3 LIGNINA**

Lignina é um nome genérico para um grupo diverso de polímeros tridimensionais de álcoois aromáticos, que associados à celulose e a hemicelulose, confere a estrutura rígida às plantas vasculares. Este composto preenche os espaços entre as fibrilas de celulose, hemicelulose e pectina, ligando os componentes da parede celular (HIGUCHI, 1990 e KIRK citado por CHANDER & SINGH, 1993).

O peso molecular da lignina pode ser de 100 KDa ou mais. Uma considerável parte da atividade fotossintética das plantas é desviada para a conversão do dióxido de carbono em lignina. A lignina é encontrada em altas concentrações na lamela média da parede secundária da parede celular das plantas; este composto desenvolve importantes funções para as plantas: é um estabilizador das radiações UV, um antioxidante e um agente ligante das camadas intercelulares das plantas, conferindo-lhes resistência mecânica. Além disso, também protege as plantas e madeiras, em particular do ataque de microrganismos. Como composto hidrófobo, este polímero retarda a permeabilidade da água no tecido condutor do xilema, desempenhando uma

função importante no transporte interno de água, nutrientes e metabólicos nas plantas (KUHAD et alii, 1997).

Quimicamente, a lignina é um polímero heterogêneo complexo de unidades de fenilpropano, ligadas por ligações éter e carbono-carbono. O éter arilglicerol- $\beta$ -aril é a ligação inter fenil-propano mais abundante (45%), seguido das fenilcurmaran (14%), dicril-propano (15%), resinol (13%), bifenil (25%) e éter difenil (5%); a maioria dessas ligações são não hidrossolúveis. É importante caracterizar as ligninas para determinar a proporção de guaiacil, siringil e unidade *p*-hidroxifenil com essa subestrutura de lignina (TANAHASHI & HIGUCHI, 1988).

Os complexos polímeros aromáticos de lignina são classificados em três grupos baseados nas suas unidades estruturais monoméricas: 1) guaiacil-lignina, presente em coníferas, licopódios e samambaias; são compostos de um polímero desidrogenado do álcool coniferil; 2) guaiacilsiringil-lignina, composto de uma mistura de polímeros desidrogenados, onde existe igual quantidade dos álcoois coniferil e sinapil, presente nas angiospermas; 3) guaiacilsiringil-*p*-hidroxifenilignina, encontrado nas ervas, composto de uma mistura de polímero desidrogenado de álcool coniferil, sinapil, *p*-cumaril, e ácido cumárico que é esterificado com o grupo  $\gamma$ -hidroxil das cadeias laterais da lignina. Nos polímeros de lignina, as unidades estruturais relacionadas ao álcool *p*-coumaril(I), álcool coniferil(II) e álcool sinapil(III), são importantes precursores da biossíntese da lignina via complexo processo de desidrogenação enzimática; no polímero de lignina também estão presentes o seu correspondente elemento estrutural: *p*-hidroxifenil (H) guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente. As ligninas são classificadas em concordância com a distribuição destes três elementos (TANASHI & HIGUCHI, 1988).

As ligninas das madeiras macias (Gimnospermas) são chamadas de guaiacil lignina por constituírem um produto da condensação do álcool coniferil, apresentando pequenas quantidades de *p*-hidroxifenil e resíduos de seringil. A lignina das angiospermas (madeiras duras) pertence à classe guaiacil-siringil e apresenta copolímeros dos álcoois coniferil e sinapil. A proporção entre as unidades monoméricas varia de 4:1 a 1:1. Nas gramíneas e plantas não madeireiras, como por exemplo, a cana de açúcar, as ligninas são mais complexas na sua estrutura química, sendo constituídas por três unidades principais: guaiacil-propano, siringil-propano e hidroxifenil-propano. (BOMINATHAN & REDDY, 1992).

Por métodos convencionais de isolamento e clivagem, é muito difícil estudar a estrutura da lignina, havendo várias razões para este impasse. As ligninas têm estrutura irregular, sem nenhum agrupamento químico específico; não têm ligações que se repetem a intervalos regulares que sejam idênticos e hidrossolúveis; a influência de ligações do tipo C-C e diaril éter são difíceis de clivar, por isso as ligninas não podem ser eficientemente desagregadas sendo difícil sua extração sem que sejam modificadas. O melhor método para compreender a estrutura da lignina é seguindo os caminhos de sua biossíntese. A conversão de lignina marcada, ( $^{14}\text{C}$  a  $^{14}\text{CO}_2$ ), tem sido o método mais utilizado. Basicamente, a lignina é derivada da co-polimerização de radicais livres de três álcoois precursores: o álcool *p*-hidroxicinamil (cumaril), o álcool 4-hidroxil-3-metoxicinamil (coniferil) e o álcool 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamil (sinapil) (CHANDER & SINGH, 1993).

#### **2.2.2.4 Complexo Lignina Carboidrato (LCC)**

A lignina está altamente ligada à celulose e hemicelulose na parede celular das plantas constituindo os complexos lignina-carboidrato (LCC) da parede celular das Gimnospermas, Angiospermas e das gramíneas podendo ser isoladas como compostos solúveis em água e separadas por filtração em gel em 3

frações. O composto de menor peso molecular consiste principalmente de carboidrato e os outros dois componentes maiores são constituídos principalmente por lignina. As ligações lignina-carboidrato parecem existir nas frações de lignina de maior peso molecular e são insolúveis em água. A porção de carboidratos dos LCC de madeiras brandas consiste principalmente de galactomanana, arabino-4- $\theta$ -metilglucuronoxilana e arabinogalactana ligado à lignina na posição benzil. Entretanto, a porção de carboidratos dos LCC das madeiras duras e das gramíneas é constituída exclusivamente de 4- $\theta$ -metilglucoronoxilana e arabino-4-metilglucoconoroxilana, respectivamente. Muitos e diferentes tipos de ligações LC (lignina-carboidrato) têm sido propostos, mas existe maior evidência que sejam ligações éter e éster. As ligações éster (CO-O-C) se apresentam entre o grupo carboxila do ácido urônico da hemicelulose e o grupo benzil da lignina. Alguns estão presentes como grupos acetil laterais na hemicelulose, outros estão entre ácidos urônico e ligninas e ainda outros aparecem entre cadeias de hemicelulose. No entanto, muitos grupos de ácidos urônicos podem estar esterificados entre os polímeros de xilana. Alguns estudos revelam que arabinoglucoxilan está ligada à lignina na posição O-2 e O-3 das unidades de xilose e que a posição das ligações nas subunidades de lignina são na posição  $\alpha$  ou  $\beta$  conjugada do fenilpropano ou unidades propano. Ésteres do ácido *p*-cumarico na lignina da cana-de-açúcar e do ácido *p*-hidroxibenzóico da lignina do álamo, estão esterificados à lignina na posição  $\alpha$  do fenilpropano. Substâncias pécticas também desempenham uma função importante na ligação da lignina à hemicelulose. Os ácidos *p*-cumarico e ferúlico são bifuncionais, capazes de formar ligações éster ou éter por meio da reação de seus grupos carboxila ou fenólicos, respectivamente. O ácido *p*-cumárico está associado principalmente à lignina. Por outro lado, o ácido ferúlico está esterificado principalmente com hemicelulose; nas gramíneas o ácido ferúlico está esterificado com os carboidratos e eterificado com a lignina. Mesmo depois de muitas pesquisas destinadas a verificar se as ligações são lignina-celulose ou lignina-hemicelulose, as controvérsias ainda persistem sendo as evidências mais

fortes a favor da ligação lignina-hemicelulose (JEFFRIES, 1990; ARGYROPOULOS & MENACHEM, 1997).

## 2.3 FRACIONAMENTO DA LIGNOCELULOSE

Para se desenvolver um efetivo pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos devem ser consideradas suas duas maiores limitações que impedem a verdadeira utilização da celulose: 1) redução da cristalinidade da celulose, controlando a formação de produtos de decomposição do açúcar; e 2) diminuição da barreira de lignina (LAMPTEY et alii, 1986). Então, os pré-tratamentos dos lignocelulósicos devem incluir a remoção de lignina, solubilização da hemicelulose e quebra da cristalinidade da celulose e/ou aumento dos poros da mesma (REID, 1989).

### 2.3.1 Pré-tratamentos Químicos

Para aumentar o tamanho dos poros nos materiais lignocelulósicos, pode-se solubilizar lignina e/ou hemicelulose e /ou aumentar a área de superfície, utilizando-se ácidos diluídos, álcalis, peróxidos e solventes orgânicos (WEIL et alii, 1994).

#### 2.3.1.1 Tratamento com Ácido

Nos tratamentos com ácido geralmente tem sido utilizado  $H_2SO_4$  numa concentração de 0,3 a 1,1 % v/v. Também tem se utilizado  $H_3PO_4$ , sendo que o principal efeito deste tratamento é a hidrólise da hemicelulose e conseqüentemente também a lignina se solubilizada; no entanto, esta é recondensada formando um polímero de lignina alterada. Outro efeito é o aumento do volume dos poros e da área de superfície na molécula de celulose, mas que demonstra pouco efeito sobre o índice de cristalinidade da celulose. Como este

tratamento é realizado em alta temperatura, a celulose amorfa é removida deixando a fração cristalina mais evidente (WEIL et alii, 1994). Um outro tratamento ácido utilizado é a mistura de H<sub>2</sub>O/HCl, 100: 0,0625 para cada 0,33 g de serragem de pinho, produzindo resíduo sólido, que só contém 8% de lignina e 91% de celulose com um total de sólidos de 35% (WEIL et alii, 1994). A alta temperatura e pressão utilizadas na hidrólise ácida resultam numa significativa degradação dos produtos (LAMPTEY et alii, 1986).

### **2.3.1.2 Tratamento com Álcali**

Os álcalis (NaOH) clivam as fibras de celulose nativa e causando modificação e solubilização de grande parte da lignina e hemicelulose, além do aumento do índice de cristalinidade da celulose o que diminui sua capacidade de conversão à glicose por meios enzimáticos. O tratamento com peróxido alcalino mostra uma moderada remoção de lignina e hemicelulose, com inchamento e aumento do poro da celulose, e diminuição do índice de cristalinidade (WEIL et alii, 1994).

### **2.3.1.3 Explosão por Amônia Congelada**

O processo de explosão com amônia congelada (AFEX), usa amônia líquida sob pressão moderada (15 atm) e temperaturas brandas (50 a 80° C). A lignina afeta a capacidade da amônia líquida penetrar no material celulósico e preserva a celulose. Geralmente o material tratado com AFEX é submetido à hidrólise enzimática, produzindo glicose em alto grau de pureza (WEIL et alii, 1994).

### **2.3.1.4 Solventes Orgânicos**

Geralmente os solventes orgânicos removem e produzem turgência do substrato celulósico. Tem-se utilizado n-propilamina em madeira e o resultado é a obtenção de uma polpa com baixo índice de cristalinidade e alta taxa de conversão enzimática à glicose; porém, este composto pode também estar

inibindo a celulase. Outro solvente orgânico empregado nestes tratamentos de resíduos lignocelulósicos é o etileno diamina (EDA); com este tratamento a celulose mostrou um ligeiro aumento do índice de cristalinidade (WEIL et alii, 1994).

### **2.3.2 Pré-tratamentos hidrotérmicos**

#### **2.3.2.1 Vaporização**

Diversos vegetais têm sido submetidos à explosão por vaporização a 25 - 65 Psig e à temperatura de 200 a 240°C em intervalos de tempo que varia de 30 segundos a 20 minutos. Como resultado obtém-se pouca recuperação de matéria seca, indicando que ocorreu uma auto hidrólise e degradação do açúcar, ainda que se tenha alta conversão enzimática de celulose a glicose (WEIL et alii, 1994).

#### **2.3.2.2 Vaporização com Ácido**

A adição de SO<sub>2</sub> ao pré-tratamento de vaporização, o qual se difunde como ácido sulfuroso (HSO<sub>3</sub>) no material tratado e gerando subsequente H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> melhora a recuperação do material seco. Esta alta recuperação pode ser obtida pela baixa temperatura empregada, que reduz a perda de celulose por hidrólise, permitindo que a celulose remanescente seja mais facilmente degradada por hidrólise enzimática (WEILL et alii, 1994).

#### **2.3.2.3 Água**

A hemicelulose pode ser removida por tratamentos hidrotérmicos. A hemicelulose obtida é hidrolisada enzimaticamente para originar xilose. Usando calor e água líquida comprimida por 10 a 15 minutos e com temperaturas de 200 a 230°C, obter-se-á 40 a 60% de solubilização do material herbáceo, 10 a 20% do total de celulose e 35 a 40% de lignina. A hemicelulose é completamente solubilizada gerando açúcares monoméricos (WEIL et alii, 1994).

É importante considerar o controle do pH nos pré-tratamentos, pois mudanças repentinas podem gerar grande susceptibilidade à hidrólise enzimática e evitar também a formação de produtos de degradação de monossacarídeos, furfural e hidroximetil furfural, os quais interferem com a hidrólise enzimática da celulose. Muito material hidrocelulósico é usado na forma não fracionada (WEIL et alii, 1994).

### **2.3.3 Polpeamento**

O polpeamento é um processo geralmente dividido em duas classes: o mecânico e o químico. Cada classe produz fibras com características substancialmente diferentes e a eleição do processo mais adequado depende da aplicação final da polpa e do material cru. O polpeamento mecânico é um processo que depende do uso da força mecânica para separar as fibras da madeira da qual se obtém o material lignocelulósico moído, que é um produto usado na indústria têxtil ou de papel, mas requer alto consumo de energia. O polpeamento químico é um processo onde se emprega substância química como sulfeto (kraft) ou sulfito para degradar e dissolver as ligninas da parede celular das madeiras. Neste tipo de polpeamento a lamela média lignificada e localizada entre as fibras da madeira é removida em condições altamente alcalinas e a alta temperatura. Este tipo de tratamento requer reciclagem e tratamento dos resíduos químicos (AKHTAR, et alii, 1997).

O processo "Kraft" é o mais usado e a hemicelulose é retida numa forma modificada e a lignina convertida a um produto solúvel sem valor significativo. O resíduo de lignina industrial, produzido no polpeamento químico, tem sido considerado uma rica fonte de compostos aromáticos, como os fenóis geralmente utilizado como emulsão estabilizante no processamento de óleos, e cimento; mas, mesmo assim, não representa um produto de alto valor comercial.

Na realidade, existem muitos métodos de pré-tratamento e em todos é obtida a celulose com alta proporção de hemicelulose (WEIL et alii, 1994).

## **2.4 TRATAMENTO BIOLÓGICO DA LIGNOCELULOSE – BIODEGRADAÇÃO**

A solubilização dos polímeros que compõem o material lignocelulósico é a chave dos processos biológicos e tudo é feito por microorganismos.

Os processos biológicos estão relacionados com o rompimento dos polímeros e diminuição da cristalinidade da celulose, deixando-a mais acessível à ação da celulase, à despolimerização da hemicelulose e à solubilização da lignina. O pré-tratamento é comum nos diferentes tipos de tratamentos que sofrem os materiais lignocelulósicos, mas os métodos biológicos são competitivos em relação aos métodos físicos e químicos, (ou complementares a eles), pois os métodos biológicos operam a baixas temperaturas e pressão, utilizam materiais baratos e ainda oferecem a possibilidade de operar em pequena escala. A desvantagem dos métodos biológicos é que geralmente o tempo de tratamento é muito longo (BRODA, 1992).

Existem pelo menos três processos biológicos tradicionalmente utilizados que degradam lignocelulose. O primeiro processo está relacionado com a alimentação animal onde a lignocelulose constitui o maior componente em forma de pasto, forragem e palha; sua composição varia com as diferentes espécies vegetais e com o ciclo de vida da planta. Utilizado, assim, como alimento, a celulose contida no material lignocelulósico é degradada pelos microrganismos presentes no trato digestivo do animal e utilizada como glicose; a hemicelulose tem um papel nutricional escassamente definido e a lignina, componente recalcitrante à degradação microbiana, constitui uma barreira física

para a extração e utilização dos outros constituintes do material lignocelulósico das plantas (BRODA, 1992). Um outro processo biológico tradicionalmente utilizado é o da produção de biogás, praticado por séculos na China (FERRERO citado por BRODA, 1992). O terceiro processo é a produção de cogumelos num sistema de fermentação sólida; mas, o maior problema encontrado neste processo está relacionado à fisiologia do microrganismo e a proteção contra as doenças (FLEGG citado por BRODA, 1992).

Assim, a madeira e outros materiais lignocelulósicos são degradados por uma variedade de fungos e bactérias. A arquitetura e composição química do material lignocelulósico determinam a resistência à degradação pelo microrganismo. As bactérias geralmente degradam lentamente a madeira e a degradação é realizada em sua superfície, com alto índice de umidade. Como elas não tem a capacidade de penetrar nas células vegetais, geralmente invadem junto com os fungos, formando colônias e logo entram em contato com o conteúdo celular atacando o parênquima da parede celular. As bactérias do rúmen são os maiores degradadores da parede celular e as espécies mais estudadas são *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *R. flaviciens*. Estas bactérias possuem uma bateria completa de enzimas degradadoras de polissacarídeos além da capacidade de se aderir às fibras. A maioria dos fungos que tem a capacidade de produzir enzimas degradadoras do material lignocelulósico pertence ao grupo dos Ascomicetos, Deuteromicetos e Basidiomicetos. Os fungos que vivem sobre a madeira degradam um ou mais componentes da mesma, causando três tipos de decomposição: decomposição branda ("soft rot fungi"), decomposição parda ("brown rot fungi") e decomposição branca ("white rot fungi"). Os fungos de decomposição branda como *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* (*reesei*), *Fusarium oxysporium* e *Penicillium janthilenum* e muitos outros, atacam eficientemente carboidratos, mas a degradação de lignina é limitada. Os fungos causadores da decomposição parda "brown rot" mais estudados por sua atividade celulolítica são *Coniophora puteana*, *Lanzites trabeum*, *Poria placenta* e *Tyromices*

*palustris*. Este grupo de fungos parece ter um mecanismo de degradação diferente daqueles fungos de decomposição branda e dos fungos de decomposição branca. Estes fungos têm preferência por celulose e hemicelulose sendo a degradação da lignina limitada. Os fungos de decomposição parda produzem endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, mas não produzem exoglucanases, não existindo cooperação sinérgica para degradar a celulose cristalina. Além disso, parece que radicais hidroxílicos (OH) contribuem significativamente para a degradação inicial da madeira. Estes fungos causam rápida e intensa degradação da celulose inicialmente; as hifas se localizam no lúmen e penetram nas células adjacentes por aberturas existentes ou fazendo cavidades na parede celular, atacando principalmente a camada S2 da parede celular secundária, sendo que as outras camadas são menos atacadas devido a presença de um conteúdo maior de lignina (KUHAD et alii, 1997).

O grupo de fungos causadores de decomposição branca é heterogêneo e tem a capacidade de degradar lignina assim como outros componentes lignocelulósicos. Pela capacidade que este grupo de fungo têm de degradar lignina da parede celular das plantas, são indicados para possível uso na indústria, onde a lignina e/ou outros componentes fenólicos precisam ser modificados ou removidos. A maneira como estes microorganismos degradam os componentes da parede celular são variáveis, alguns degradam todos os componentes simultaneamente de forma não seletiva, outros de forma seletiva e outros combinando a forma seletiva ou não seletiva em diferentes regiões da mesma planta. Os fatores que determinam as diferentes formas e intensidade de degradação são ainda inexplicáveis. Os fungos de degradação branca crescem em todos os tipos de vegetais, sendo que a hifa atinge o lúmen celular, coloniza primeiro o raio das células do parênquima e logo penetra de célula a célula através dos buracos já existentes ou pelos buracos que vão formando diretamente. O fungo de decomposição branca mais estudado foi denominado, inicialmente, como *Chrysosporium lignorum*, posteriormente como *Sporotrichum pulverulentum* e finalmente como *Phanerochaete chrysosporium*, onde tem sido

caracterizados pelo menos cinco endoglucanases, três exoglucanases e duas  $\beta$ -glicosidases. Outros fungos mais estudados que pertencem a este grupo são *Trametes versicolor*, *Dichomitus squalens*, *Phlebia radiata*, *Heteroboscideum annosum*, *Phellinus pini*, *Cyathus stercoreus*, *Pleurotus ostreatus*, etc. Os fungos anaeróbios de decomposição branca que habitam o rúmen têm um sistema celulolítico muito ativo e a  $\beta$ -glicosidase é a enzima mais eficiente. A composição do sistema celulolítico que degrada celulose cristalina é constituída de várias enzimas arranjadas num complexo chamado de celulosoma. O fungo do rúmen mais conhecido é *Neocallimastix frontalis* (KUHAD et alii, 1997).

#### 2.4.1 Biodegradação da Celulose

Como a parede celular dos vegetais é de natureza complexa, são necessárias diferentes enzimas para sua degradação; a celulose, uma fonte mais abundante do que o amido para a obtenção de açúcares representa um complexo problema devido a sua cristalinidade e a sua mistura com hemicelulose e lignina (BRODA, 1992).

A maioria dos trabalhos sobre biodegradação da celulose foi realizada com o fungo filamentosso *Trichoderma reesei*. O sistema celulolítico deste microorganismo é complexo composto de pelo menos oito proteínas que atuam sinergicamente, sujeitas a controles complicados (EVELEIGH citado por BRODA, 1992); produz cinco ou mais endo  $\beta$ -glucanases que convertem a celulose cristalina a oligodextrina; também, pelo menos duas celobiohidrolases que convertem a celulose a celodextrina e celobiose. Ambas as classes de enzimas estão sujeitas à inibição pelo produto final, a celobiose. Por último, a celobiase converte celodextrina e celobiose em glicose e sua ação é inibida por glicose. O complexo enzimático total também é sujeito à supressão catabólica por glicose. Outros fungos estudados não mostraram atividade celulolítica tão atraente como o *Trichoderma reesei* (BRODA, 1992).

Em geral o mecanismo mais aceito na degradação da celulose por microorganismos é a ação sinérgica de pelo menos três tipos maiores de enzimas hidrolíticas: 1) Endoglucanases (endo-1,4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohidrolase, E.C.3.2.1.4), que atacam desordenadamente as cadeias de celulose e divide as ligações 1,4- $\beta$ -glicosídica; 2) Exoglucanases, que geralmente são celobiohidrolases (exo-1,4- $\beta$ -D-glucan-4-celobiohidrolase, E.C.3.2.1.91), que liberam celobiose ou, em alguns casos, glicose do terminal não redutor da celulose e 3) 1,4- $\beta$ -D-glucosidases (E.C.3.2.21), que catalisam a hidrólise celodextrinas das solúveis em água assim como alquil, aril  $\beta$  glicosídeos (CHANDER & SINGH, 1993; KUHAD et alii, 1997).

A produção de celulases parece controlada por mecanismos de indução e repressão na qual a celulose induz a degradação e a presença de glicose, causa a inibição catabólica. A maioria das celulases bacterianas e fúngicas são glicoproteínas com o açúcar ligado à asparagina, serina e treonina. O conteúdo de carboidrato das celulases varia de 1 a 10%, sendo a manose o açúcar principal, mas existindo também outros tipos como glicose, galactose, xilose, N-acetil glicosamina e galactosamina. Endogluconases que hidrolisam ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas se apresentam em três formas diferentes: EG I, EG II e EGIII. As Celobiohidrolases (CBH), exoenzimas que quebram a celulose a partir do terminal não redutor da cadeia, tem ação muito limitada sobre celuloses substituídas como carboximetil celulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC) e se apresentam sob duas formas imunologicamente diferentes: CBH I e CBH II, diferenciadas entre elas pela quantidade de carboidrato aderido à proteína de sua molécula. Estas diferenças moleculares são refletidas no seu modo de ação: CBH I liga geralmente regiões cristalinas enquanto que CBH II liga ambas regiões, cristalinas e amorfas (KUHAD et alii, 1997).

## 2.4.2 Enzimas celulolíticas e seus substratos

O número de substratos celulósicos utilizados para a determinação de atividade de celulases é amplo, conforme mostrado no Quadro 1. Muitos substratos celulósicos, bastante utilizados encontram-se disponíveis comercialmente, destacando-se o papel de filtro, avicel, sigmacel, solka floc carboximetilcelulose e hidroximetilcelulose; tais substratos comerciais são usados nos estudos de atividade de celulases sem nenhum tratamento prévio (WOOD, 1988).

Como regra geral, as endoglucanases não têm atividade para degradar celulosas cristalinas do tipo algodão e avicel, mas hidrolisam celulosas amorfas e substratos solúveis. A avicel ou celulose microcristalina é um produto obtido após o tratamento das fibras de celulose com ácido clorídrico 2,5 M, aquecido a 80°C por 4 horas, lavado com água e neutralizado com amônia, diluído e lavado outra vez e logo secado, obtendo-se um produto altamente cristalino com um DP (grau de polimerização) entre 100 e 250, denominado hidrocélulose e conhecido comercialmente como Avicel. Este produto é 47% cristalino e como possui uma cadeia curta é usado para avaliar glucanases (COUGHLAM, 1990). Carboximetilcelulose (CMC), derivado celulósico, é um polímero linear solúvel em água e que encontra-se como ácido livre, como sal de sódio ou como uma mistura de ambos. Este composto é amplamente usado na indústria alimentícia como agente dispersante em sucos de frutas e para melhorar a estrutura de sorvetes; para combater a dispepsia, etc; além disso, é hidrolisado pelas enzimas endoglucanases que só degradam celulosas amorfas ou solúveis (WOOD, 1988).

Para medir atividade de exoglucanases numa mistura de enzimas celulolíticas, é usado os heterobiósidos *p*-Nitrofenil- $\beta$ -D-celobiose (*p*-NPC) ou *p*-Nitrofenil- $\beta$ -D-lactósido, como substratos seletivos. As exoglucanases dividem as unidades de celobioses a partir do terminal não redutor das cadeias de

**Quadro 1. Principais Enzimas Celulolíticas e seus respectivos Substratos utilizados na Determinação de suas Atividades**

Enzima	Substrato	Produto/Característica
Celulase total	Papel de filtro/Avicel, Celulose seca, Agar celulose, 14C-celulose	Açúcares redutores, Liberação de cor, Clarificação de agar
Endoglucanase	Carboximetil celulose Hidroxietil celulose	Diminuição da Viscosidade dos açúcares
Exoglucanase	Celulose amorfa <i>p</i> -Nitrofenil- $\beta$ -lactósido <i>p</i> -Nitrofenil- $\beta$ -celobioside	Açúcares redutores <i>p</i> -Nitrofenol
$\beta$ -Glicosidase	Celobiose <i>p</i> -Nitrofenil- $\beta$ -D-glicoside 4-Metilumbeliferil- $\beta$ -glicoside	Glicose <i>p</i> -Nitrofenol Metilumbeliferone
Celobiose:quinone oxidoreductase	Quinonas redutíveis como 2,6-Diclorofenol-indofenol, 3-Metil-5-t-butil-benzoquinona na presença de celobiose ou lactose	Diminuição da absorvidade
Celobiose fosforilase	Celobiose	Glicose-1-P

Fonte: KUHAD et alii 1997

celuloses especificamente na ligação aglucônica (entre *p*-Nitrofenil e a porção de carboidrato) e não sobre ligação holosídica (entre as duas unidades de glicose) na celobiose. Atividade de exoglucanases misturada com endoglucanases pode ser determinada usando celulose amorfa, sendo que o número de unidades de endoglucanases na mistura de enzimas é determinada por método viscosimétrico. O método geralmente empregado para medir  $\beta$ -glicosidases inclui medidas da liberação de glicose, de celobiose ou de *p*-Nitrofenol ou de *p*-Nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranoside (pNPG) (KUHAD et alii, 1997).

### 2.4.3 Biodegradação de Hemicelulose

Xilose e manose formam o esqueleto principal dos polímeros da hemicelulose nas plantas e devido a sua estrutura mais complexa que a celulose requer vários tipos diferentes de enzimas para sua degradação e modificação, sendo que as duas maiores enzimas degradadoras de hemicelulose

são: a endo-1,4- $\beta$ -D-xilanase e endo-1,4- $\beta$ -D-mananase. O polímero xilana é o recurso renovável mais abundante dos componentes da parede celular das plantas e estruturalmente é uma mistura de compostos que para sua degradação enzimática até seus monômeros requer uma bateria de enzimas, dentre as quais as principais são  $\beta$ -1,4-endoxilanase (EC 3.2.1.8) e  $\beta$ -xilosidase (EC 3.2.1.37). As enzimas que atuam removendo os substituintes laterais das heteroxilanas são:  $\alpha$ -glucuronidase (EC 3.2.1.??);  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) e acetilestearase (EC 3.1.1.6); os substituintes laterais geralmente representam obstáculos estéricos para a formação do complexo enzima-substrato, limitando a hidrólise do substrato, requerendo a ação sinérgica de diferentes componentes do sistema enzimático para sua degradação. As enzimas xilanolíticas são importantes porque a biodegradação de xilanas fornece um recurso imediato de energia metabolizável, para a degradação dos componentes da parede celular e para a sua utilização mais integral, tal como na degradação das xilanas durante a germinação da cevada e para a digestão da vegetação dietária (CHANDER & SINGH, 1993; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

A enzima  $\beta$ -1,4- Endoxilanase (1,4- $\beta$ -D-xilan xilohidrolase; EC 3.2.1.8) cliva as ligações glicosídicas do esqueleto heteroxilana resultando na diminuição do DP do substrato. O ataque ao substrato não é feito ao acaso e as ligações a serem hidrolisadas dependem da natureza do substrato (exemplo: comprimento e grau de ramificação do substrato e a presença de substituintes). Durante o início da hidrólise da xilana os principais produtos formados são xilooligossacarídeos, e à medida que ocorre a hidrólise, estes oligossacarídeos geram xilotriose, xilobiose e Xilose. (KUHAD et alii, 1997; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

$\beta$ -D-Xilosidase ( $\beta$ -D-xilosidase xilohidrolase; EC 3.2.1.37) são exoglicosidases que hidrolisam xilooligossacarídeos curtos e xilobiose de terminal não redutor para liberar xilose. As  $\beta$ -xilosidases verdadeiras são capazes

de clivar substratos artificiais como *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-xilosido  $\beta$ -Xilosidase e há sido encontrada em bactérias e fungos, apresentando-se como proteínas monoméricas ou diméricas de peso molecular alto entre 60 e 360 kDa.

$\alpha$ -D-Glucoranidasas (EC 3.2.1.?) hidrolisam as ligações entre ácido glucorônico e resíduos de xilose na glucoronoxilana; devido a sua fácil perda de atividade em preparações fúngicas, pouco tem sido descrito, apesar do papel que desempenha na biodegradação da xilana. As cinco enzimas que têm sido purificadas mostraram um peso molecular acima de 100 kDa e a especificidade de substrato difere de acordo com a fonte enzimática. Esta enzima é ativa entre fragmentos de glucoronoxilana que resulta da hidrólise de xilana com endoxilanase (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

Existem dois tipos de arabinofuranosidasas: a)  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) que é uma enzima exo-atuante, que hidrolisa grupos  $\alpha$ -L-furanosil não redutores de  $\alpha$ -L-furanosídios, arabinanas, arabinoxilanas e arabinogalactanas e é também ativa entre os *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabifuranosídios e sobre arabinos ramificados e b) A enzima endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinase (EC 3.2.1.99) que só é ativa em arabinas lineares. Poucas arabinosidasas têm sido isoladas e caracterizadas apesar de ter um papel importante na hidrólise da xilana; a maioria das arabinosidasas estudadas são do tipo exo-atuante, de tamanho que pode chegar até 495 kDa e são encontradas nas formas mono -, di -, tetra -, hexa - e octaméricas (KUHAD et alii, 1997; SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

Acetil Estearase ou Acetilxilana Esterase (EC 3.1.1.6), remove os substituintes *O*-acetil das posições C-2 e C-3 dos resíduos de xilose na acetilxilana. A produção desta enzima por fungos e bactérias, só foi detectada em 1985, devido à perda de substratos adequados durante tratamento com álcalis, já que a maioria das xilanas altamente acetiladas eram deacetiladas; por esta razão,

pouco se sabe acerca de suas propriedades físico-químicas (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997).

#### 2.4.4 Enzimas Hemicelulolíticas

O Quadro 2 ilustra a maioria das enzimas hemicelulolíticas encontradas em fungos e/ou bactérias, com seus respectivos substratos e produtos finais que são medidos para determinar a atividade enzimática de cada uma.

A atividade da endoxilanase é geralmente determinada medindo-se o aumento de açúcares redutores liberados a partir da xilana como substrato xilanas. No entanto, existem muitos fatores que podem causar variação na determinação de xilanase e xilosidase como, por exemplo, a diluição da enzima, tipo de substrato, a disponibilidade de xilo-oligossacarídeos no substrato, etc. A medida da atividade das xilanases depende das variações no modo de ação

**Quadro 2 . Principais Enzimas Hemicelulolíticas e seus respectivos Substratos utilizados na Determinação de suas Atividades**

Enzima	Substrato	Produto/Característica
D-Xilanase	Xilana	Açúcares redutores
$\beta$ -Xilosidase	<i>p</i> -Nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosido Metil- $\beta$ -xilanopiranoside Xilobiose	<i>p</i> -Nitrofenol Xilosa
$\alpha$ -Arabinosidases	<i>p</i> -Nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase Fenil- $\alpha$ -L-arabifuranoside	<i>p</i> -Nitrofenol Açúcares redutores
$\alpha$ -Glucuronosidase	2-O-(Ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirano- xiluronico-xilobiose	Ácido urônico
Estereases	<i>p</i> -Nitrofenil acetate Hemicelulose de vidoeiro $\alpha$ -naftil acetato Metilester de ácido ferúlico e cumárico	<i>p</i> -nitrofenol ácido acético $\alpha$ -Naftol Ácido ferúlico Ácido <i>p</i> -cumárico
D-Mannanases	Galactomanana de leguminosas	Açúcares redutores
$\beta$ -Manosidase	<i>p</i> -Nitrofenil- $\beta$ -D-Mannopiranosido 1,4- $\beta$ -Mannoligosacarídios	<i>p</i> -Nitrofenol Manosa
$\alpha$ -Galactosidase	<i>p</i> -Nitrofenil- $\alpha$ -D-Galactopiranosido Melibiose Rafinose	<i>p</i> -Nitrofenol Açúcares redutores

Fonte: KUHAD et alii, 1997

das diversas xilanases provenientes de diferentes fontes e da heterogeneidade das xilanas de diversas origens. Os substratos *p*-Nitrofenil- $\beta$ -D-xilanopiranosido e metil- $\beta$ -D-xilanopiranosido são comumente usados para a determinação da atividade de  $\beta$ -xilosidase. *p*-Nitrofenol e xilosa respectivamente, liberados pela ação desta enzima sobre esses substratos são determinados imediatamente..

#### 2.4.5 Biodegradação da Lignina

Apesar da lignina ser uma rica fonte de carbono, não é um bom substrato para o crescimento de microrganismos que metabolizam lignina como uma única fonte alternativa de energia/carbono (BOOMINATHAN & REDDY, 1992). A maioria dos fungos de decomposição branca degrada os tecidos vegetais mediante um ataque simultâneo à lignina, celulose e hemicelulose, produzindo enzimas oxidativas extracelulares dentre as quais destacam-se a Lignina peroxidase (LiP), a Manganês peroxidase (MnP) e a Lacase. O Quadro 3 mostra estas enzimas com seus respectivos substratos e o comprimento de onda aos quais são detectados. A regulação da produção individual de enzimas e degradação de ligninas é um fenômeno complexo, resultados obtidos nas condições de laboratório não podem ser facilmente reproduzidos no processo de degeneração da parede celular do tecido vegetal (KUHAD et alii, 1997).

Há principalmente dois problemas na degradação da lignina: 1) a lignina “in natura” está intimamente ligada a polímeros, provavelmente por ligações covalentes. Qualquer lignina purificada é diferente da encontrada no material lignocelulósico natural. A lignina industrial obtida no processo de polpeamento sofre modificações químicas substanciais; 2) a lignina purificada é insuficiente para servir de substrato para o crescimento de microrganismos, pois precisa de alguma outra fonte de carbono como co-substrato, por exemplo, glicose (BRODA, 1992).

**Quadro 3. Principais Enzimas Ligninolíticas e seus respectivos Substratos utilizados na Determinação de suas Atividades**

Enzima	Substrato	Característica
Lignina peroxidase	Veratril alcool, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Medido a 310 nm
Manganês peroxidase	Vanilil acetona Vermelho de fenol MBTH e DMAB H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Medido a 336 nm Medido a 610 nm Medido a 590 nm
Lacase	Siringaldazine ABTS MBTH e DMAB	Medido a 525 nm Medido a 436 nm Medido a 590 nm

Fonte: KUHAD et alii, 1997

Há principalmente dois problemas na degradação da lignina: 1) a lignina "in natura" está intimamente ligada a polímeros, provavelmente por ligações covalentes. Qualquer lignina purificada é diferente da encontrada no material lignocelulósico natural. A lignina industrial obtida no processo de polpeamento sofre modificações químicas substanciais; 2) a lignina purificada é insuficiente para servir de substrato para o crescimento de microrganismos, pois precisa de alguma outra fonte de carbono como co-substrato, por exemplo, glicose (BRODA, 1992).

Na natureza, a solubilização de lignina permite ao microrganismo degradante ter acesso aos carboidratos, e o investimento energético na solubilização da mesma pelo organismo é bastante alto. O microrganismo mais estudado por degradar lignina o *Phanerochaete chrysosporium*, só passa a degradar lignina quando outras fontes de carbono e nitrogênio estiveram esgotadas (KEYSER et alii citado por BRODA, 1992).

No complexo sistema enzimático ligninolítico, as enzimas peroxidases (LIP e MnP) e lacase são definidas como fenol oxidases. As reações catalisadas por estas enzimas são semelhantes, pois oxidam compostos fenólicos

gerando radicais fenois, enquanto que os compostos não fenólicos são oxidados ao correspondente radical cátion. Assim, os compostos fenólicos das ligninas são oxidados por fenol oxidases; outros diferentes compostos, que não são fenólicos, e que se encontram conformando parte da molécula de lignina são decompostos por outras enzimas diferentes. A estrutura cristalográfica de LiP e MnP de *P. chrysosporium* tem sido estudada a diferentes resoluções, revelando que estas apresentam uma estrutura helicoidal com um sítio catalítico heme e que contém pontes dissulfeto e dois íons de cálcio estruturais importantes para manter o sítio ativo da enzima. A família da Lignina peroxidase (LiP) contém múltiplas isoenzimas com valores de pI entre 3,3 a 4,7 e massa molecular entre 38.000 e 43.000 (BOOMINATHAN & REDDY, 1992; KUHAD et alii, 1997).

Lignina peroxidase (LiP) (ligninase, EC 1.11.1.14), parece constituir o maior componente do sistema ligninolítico de *P. chrysosporium*. Esta enzima catalisa uma variedade de reações, e o mecanismo essencial de oxidação desta enzima parece ser peroxidativo, clivando as ligações éter  $\beta$ -O-4 e as ligações entre  $C\alpha$  e  $C\beta$  em compostos dímeros de lignina. Também catalisa a decarboxilação de ácidos fenilacéticos, a oxidação de  $C\alpha$  de álcoois aromáticos a compostos  $C\alpha$ -oxo, e as reações de hidroxilação, de formação de quinonas e abertura de anéis aromáticos. A geração de substratos fenólicos durante a demetoxilação e a clivagem do éter, explica a repolimerização da lignina em reações com LiP. A oxidação de compostos fenólicos causa inibição de LiP (KUHAD et alii, 1997).

Manganês peroxidase (MnP) constitui outra família de proteínas heme, extracelular, de quatro a seis ou mais peroxidases dependente do manganês, com o pI variando entre 4,2 a 4,9. São glicoproteínas com uma massa molecular de aproximadamente 46 kDa, ativadas por lactato, o qual provavelmente atua como quelante de Mn (III) formando complexos estáveis com alto potencial

redox que, por sua vez, oxida fenóis a radicais fenoxi (BOOMINATHAN & REDDY, 1992).

Outra enzima que participa na degradação da lignina é a Lacase (Polifenol oxidase) (E.C.1.10.3.2). Esta enzima é produzida principalmente pelos fungos de decomposição branca. As lacases são glicoproteínas e geralmente contém quatro íons de cobre e cada um parece ter uma importante função no mecanismo catalítico. Esta enzima é uma verdadeira fenol-oxidase com ampla especificidade para compostos aromáticos, contendo grupos hidroxilas e aminas; oxida fenóis e subestruturas fenólicas pela abstração de um elétron com formação de um radical que pode repolimerizar ou continuar a despolimerização. A lacase catalisa reações de demetoxilação de unidades fenólicas terminais, podendo degradar  $\beta$ -dímeros,  $\beta$ -O-4 dímeros via clivagem aril-alquil oxidação do  $C\alpha$  e clivagem do  $C\alpha$ - $C\beta$ ; também foi demonstrado que lacase cliva os anéis aromáticos de maneira semelhante a LiP (KUHAD et alii, 1997). BOURBONNAIS & PAICE (1990) demonstraram que lacase também oxida subestruturas de lignina não fenólicas na presença de um mediador redox como o corante 2,2'-azinobis(3-etiltiazoline-6-sulfonato) (ABTS) este mediador parece prevenir a repolimerização da lignina. Lacase e outras fenol oxidases atuam em cooperação com outras enzimas; lacase constituiria parte do sistema metabólico que facilita a utilização de pequenos fragmentos de lignina para degradá-los intracelularmente. A reação de lacase com grandes frações de lignosulfonados, na presença de glicose, produz mais despolimerização que polimerização (KUHAD et alii, 1997). É possível que a lacase, cause demetilação inicial dos anéis difenol e a porção quinona, deixada após a demetilação, para que possa ser reduzida a compostos catecol, os quais são substratos conhecidos das oxigenases que clivam estes anéis. A função primária de lacase explicaria seu rápido aparecimento e indicaria a dependência desta enzima para a degradação de lignina (HIGUCHI, 1990).

Nas culturas de *Pleurotus* sp uma outra enzima foi encontrada, a Álcool veratrílico oxidase (VAO) que oxida alfa álcoois aromáticos saturados e desempenha um papel chave na transferência de elétrons entre ligninas peroxidases e lignina. Esta enzima é produzida durante o metabolismo primário do fungo (BURBONNAIS & PAICE, 1988).

## 2.5 FERMENTAÇÃO SÓLIDA

A fermentação de substrato sólido (SSF) é simplesmente definida como um processo por meio do qual um substrato insolúvel é fermentado com suficiente umidade, mas sem água livre (CHAHAL, 1991). Este processo, descreve a transformação microbiológica de materiais biológicos em seu estado natural e contrasta com a fermentação líquida (LSF) ou submersa, que é realizada em soluções diluídas ou em suspensão (YOUNG et alii citado por TENGEDY, 1985). Na LSF o substrato é solubilizado ou suspenso como finas partículas num grande volume de água, sendo que a diferença entre SSF e LSF está no fato de que na SSF o crescimento microbiano e os produtos formados são produzidos na superfície do material sólido com baixo conteúdo de umidade. Tem sido observado ao microscópio óptico que os organismos não só se desenvolvem na superfície do substrato, como que penetram no interior da célula até o lúmen preenchendo os espaços intercelulares, mostrando com isso um íntimo contato ou associação entre o microrganismo e o substrato (CHAHAL, 1991).

Muitos microrganismos podem crescer sobre substrato sólido, mas o crescimento sobre superfícies sólidas é uma propriedade típica dos fungos filamentosos que degradam matéria orgânica. Os fungos filamentosos podem crescer na ausência de água livre, enquanto que outros microrganismos como leveduras e bactérias sempre requerem água livre. A produção de fungos por SSF é o processo microbiológico mais antigo conhecido pelo homem e está

relacionado ao processo natural da vida dos fungos filamentosos (MOON-YOU & CHAHAL citados por TENGERDY, 1985; WEILAND, 1988).

O processo de fermentação sólida é usado amplamente na preparação de alimentos orientais tradicionais como no processo de obtenção do "koji", onde os grãos de soja são fermentados por fungos. Na agricultura é utilizada para a ensilagem e outras fermentações ácido-lácticas anaeróbias, adubação e cultura de fungos. Além disso, alguns processos industriais são realizados em SSF para a produção de enzimas, produtos químicos, álcool e outros (WEILAND, 1988).

O atrativo da SSF está no seguinte: a) na sua simplicidade e sua grande semelhança ao ambiente natural do microrganismo; b) não precisa que grandes quantidades de água sejam adicionadas, no pequeno volume dos fermentadores; c) as manipulações são menos custosas e o custo é mínimo para a remoção de água ao final da fermentação; d) fácil areação devido ao ar que circula livremente entre as partículas de substrato e porque a camada de líquido cobrindo as partículas de substrato, têm uma superfície muito extensa comparada a seu volume; e) baixo custo para recuperar e secar o material obtido; f) diminuição de custos pela eliminação do tratamento do efluente; g) ambiente menos favorável para o desenvolvimento de bactérias, diminuindo o custo por contaminação (REID, 1989).

Todas estas vantagens da SSF podem pesar mais que as desvantagens constituídas pela diminuição da produção, lentidão da fermentação e a dificuldade de controlar todo o processo (TENGERDY, 1985).

### 2.5.1. Requisitos Fisiológicos da SSF por Fungos

Para operar eficientemente o sistema SSF deve existir condição adequada para desenvolvimento da colonização e da degradação do substrato lignocelulósico pelo fungo. Por sua vez, as condições poderiam diminuir a degradação de carboidratos (REID, 1989).

#### Esterilização

Materiais lignocelulósicos naturais geralmente carregam uma pesada carga de microorganismos que germinam e crescem rapidamente quando o substrato é umedecido que poderia inibir a colonização do mesmo pelo fungo a ser cultivado. Desafortunadamente, não se encontrou um fungo delignificante altamente competitivo. Alguns fungos de decomposição branca como *Pleurotus* sp e *Lentinus edodes* são os únicos encontrados até agora que excluem outros fungos do substrato que eles colonizam, mas a maioria é incapaz de repelir o invasor (REID, 1989).

Os colonizadores secundários consomem os polissacarídeos liberados durante o processo e podem produzir metabólitos daninho, como micotoxinas e pigmentos que interferem na utilização do material delignificado, sendo então absolutamente necessário suprimir a microflora indígena antes da incubação, e desta maneira, impedir a fermentação auxênica. Diversos tratamentos são feitos no substrato para impedir o desenvolvimento de microflora indígena, entre eles o aumento da pressão atmosférica, autoclavagem, ambiente anaeróbio e alta temperatura (REID, 1989).

#### Tamanho da Partícula

A diminuição do tamanho das partículas do substrato sólido aumenta a superfície, facilita o desenvolvimento da hifa e penetração do ar até o centro das partículas, acarretando aumento da densidade do empacotamento, que

por sua vez aumenta a quantidade de material no fermentador, diminuindo, porém o tamanho dos canais interparticulares através dos quais circulariam gases. Assim, é necessário, um substrato com partículas de tamanho adequado que permita a circulação de ar, sendo que partículas de 1 a 8 mm não afetam o desenvolvimento de vários fungos (ZADRAZIL & BRUNNERT, 1981).

### **Índice de Umidade**

O índice de umidade é um parâmetro fundamental para a regulação e otimização do processo da SSF, uma vez que a umidade influi muito no crescimento microbiano, na atividade enzimática e no acesso ao substrato regulando, assim, a formação dos produtos. O excesso de umidade pode preencher os espaços interpartículas, inibindo a circulação de ar e a transferência de calor, favorecendo a compactação do substrato e a contaminação por bactérias que só crescem no SSF, quando os níveis de umidade estão acima de 50%. Baixo índice de umidade no meio de SSF inibe o crescimento do micélio fúngico, reduz a atividade enzimática e o acesso a nutrientes devido ao baixo inchaço do substrato, como também promove a rápida esporulação do fungo, o que limita o seu crescimento (WEILAND, 1988; LAUKEVICS et alii, citado por REID, 1989).

O nível de umidade comumente utilizado na SSF excede a capacidade de saturação do substrato e provavelmente produz uma fina camada de água livre sobre a superfície das fibras. O teor ideal de água encontrado para degradar palha por vários fungos de decomposição branca foi de 3 g de água por grama de palha; no entanto, existem variações significativas entre espécies. Em geral os fungos podem digerir a palha numa proporção de água/palha de 1:1 a 10:1 (ZADRAZIL & BRUNNERT, 1981). Para deslignificação ótima da palha, tem-se encontrado que o conteúdo de água do substrato deve estar entre 60 e 80%. Dentro deste limite de umidade o controle da administração de oxigênio e remoção de dióxido de carbono é uma tarefa difícil, devido à forte dependência do volume da fase gasosa no conteúdo de água entre o substrato (WEILAND, 1988).

## Aeração

A degradação de lignina é um processo oxidativo, e assim, quando o ar é substituído por atmosfera de oxigênio estimula-se a degradação de lignina em muitos fungos que crescem em palha ou madeira (REID, 1989).

Níveis muito alto ou muito baixo de O<sub>2</sub> inibem a degradação de lignina (KAMRA & ZADRAZIL, 1986). É importante a distribuição uniforme de ar no interior do substrato e isto vai depender da forma de empacotamento do substrato e da forma de crescimento do fungo (SKRYABIN, citado por REID, 1989). Relatos demonstram que a distribuição de oxigênio na superfície do micélio na SSF é constante, diminuindo de forma gradativa no interior do "pellet" de micélio-substrato, como consequência do metabolismo celular e da limitada difusão do mesmo. Assim, a concentração de produtos do metabolismo celular, principalmente de dióxido de carbono, é maior no interior do conjunto micélio-substrato, sendo importante considerar o tamanho das partículas do substrato para prevenir o acúmulo de produtos indesejáveis e permitir um adequado fluxo de gases e nutrientes (WEILAND, 1988).

Foi encontrado que o crescimento de *Pleurotus sajor-caju* sobre palha produz um aumento de resistência ao fluxo de ar, pois o micélio ocupa os espaços entre as partículas de substrato (ZADRAZIL, citado por REID, 1989).

## pH

A maioria dos fungos de decomposição branca cresce melhor a pH ácido, entre 4 e 5. Geralmente os fungos acidificam o substrato lignocelulósico a níveis que provavelmente sejam parcialmente inibidores para seu crescimento. As vezes o controle do pH da SSF pode ser obtido adicionando amônia no substrato (BURROWS et alii citado por REID, 1989).

## Temperatura

A maioria dos fungos são mesófilos com temperatura ativa de 15 a 35°C, sendo que alguns fungos são termófilos moderados, como *P. chrysosporium*. Outras espécies diminuem o processo de lignificação, quando a temperatura aumenta, como é o caso do *Pleurotus eringeyi* (ZADRAZIL & BRUNNERT, 1981). O controle da temperatura é um fator importante na SSF para otimizar o processo de deslignificação. No início da fermentação é necessário fornecer calor para obtenção de temperatura ótima de desenvolvimento do fungo. Durante o decorrer da mesma, é necessário remover o excesso de calor produzido a fim de manter a temperatura ótima. Na SSF o controle da temperatura é uma tarefa difícil devido à transferência de calor entre a superfície e o interior do substrato, que é muito reduzida por causa do baixo conteúdo de água, da alta porosidade do material sólido e do estado estacionário, ou da baixa capacidade de misturar a cultura. O controle da temperatura pode ser realizado reciclando gás para esfriar ou aquecer a fase gasosa, ou mudando o fluxo de aeração ou a composição gasosa; mas, estas alternativas para manter a temperatura, geram outros problemas que poderiam levar à perda de água no meio por evaporação, que induz a esporulação do microorganismo ou a perda de aeração que geraria condições de anaerobiose para o microorganismo. Então a melhor técnica para controlar a temperatura depende do tipo de microorganismo, tipo de reator e o tipo de substrato (WEILAND, 1988; REID, 1989).

## Tempo

A deslignificação é um processo competitivo entre degradação de lignina e de carboidratos pelos fungos. Parece que, conforme a lignina é removida e os polissacarídeos são mais expostos à hidrólise enzimática, a proporção de carboidratos tende a aumentar; em conseqüência, há um tempo ótimo de incubação, porém a produção de polissacarídeos digeríveis diminui ou declina porém, a degradação de lignina continua (REID, 1989). A remoção de lignina, mais seletiva durante os primeiros estágios, logo diminui; vários estudos

que confirmaram este fato (AGOSIN & ODIER, 1985). Tem-se observado uma queda inicial na digestibilidade da palha, sendo que os componentes, facilmente digeríveis, são consumidos pelo fungo durante a colonização, antes que a degradação de lignina se inicie e aumente a digestibilidade. Para conseguir o máximo de digestibilidade na palha, geralmente são requeridos 3 a 4 semanas (ZADRAZIL & BRUNNERT, 1981).

### **Adição de nutrientes**

Os materiais lignocelulósicos fornecem um meio completo para a maioria dos fungos degradadores de lignina e a suplementação com nutrientes é geralmente desnecessária. Na maioria dos casos, a adição de nitrogênio é contra indicada, somente sendo necessário a adição de nutrientes em casos específicos (REID, 1989).

### **Mistura**

A mistura do substrato sólido promove a transferência de massa e calor, o que resulta num processo mais uniforme. Isto melhora o suplemento de oxigênio ao microorganismo e a remoção do dióxido de carbono dos espaços vazios do substrato sólido, porque as partículas sólidas individuais são mais freqüentemente expostas à atmosfera do fermentador. Através da mistura previne-se o superaquecimento localizado, devido à evolução do calor microbiano, como uma consequência da melhora da transferência de calor, pode-se contribuir na distribuição de aditivos como água, no controle da umidade ou de sais, na suplementação de nutrientes. Por outro lado, a mistura influencia na morfologia do microorganismo o que pode resultar em mudança no metabolismo, diminuição na produção ou no fracasso total do processo da SSF (se o processo de mistura quebra as pontas das hifas miceliais). A sensibilidade a este tipo de "stress" varia com as diferentes espécies e deve ser testado antes de aplicar numa determinada espécie (WEILAND, 1988).

## 2.6 PROTEÍNAS UNICELULARES (SCP)

Proteína unicelular (SCP, Single-cell protein) é um termo genérico usado para designar a proteína bruta ou refinada procedente de organismos unicelulares, ou pluricelulares como bactérias, leveduras, fungos e algas. As células destes microrganismos podem ser utilizadas na alimentação humana pelo seu alto teor de proteínas, carboidratos, gorduras e minerais, já que as proteínas convencionais e tradicionais não são suficientes para sustentar a demanda cada vez maior (BISARIA & MADAN, 1983). A produção de proteínas unicelulares (SCP) tem sido motivo de muitas pesquisas e esforços, com a finalidade de aumentar a quantia dos alimentos protéicos no mundo (REID, 1989).

A maioria dos microrganismos não podem atacar a celulose cristalina e aqueles que a degradam, por sua vez, não podem degradar lignina ou a degradam muito pouco. A maioria dos microrganismos que utiliza e degrada lignina são os fungos de decomposição branca e a maioria deles são, no sentido mais amplo da palavra, os cogumelos, cujo habitat natural não é a madeira (KURTZMAN citado por BISARIA & MADAN, 1983).

Os cogumelos constituem os mais antigos alimentos de proteína unicelular do homem e foram produzidos nas primeiras fermentações sólidas. Atualmente, o cultivo de cogumelo representa a maior indústria fermentativa, onde os resíduos lignocelulósicos são convertidos em produtos úteis. Muita pesquisa está sendo direcionada à conversão de lignocelulósicos à açúcares e combustíveis (etanol, metanol), solventes (acetona, butanol), alimento animal e outros (BISARIA & GHOSE, citados por BISARIA E MADAN, 1983).

Uma outra possibilidade da utilização dos resíduos agrícolas é mediante SSF para a conversão em SCP como alimento animal, aumentando a digestibilidade "in vitro", sendo especialmente importante em países em

desenvolvimento devido à baixa tecnologia, ao baixo custo de secagem do produto final e à abundância de resíduos agrícolas. Assim, foi encontrado que a palha de trigo submetida a SSF por 120 dias com *Stropharia rugosannulata* ou *Pleurotus cornucopiae*, tem sua digestibilidade "in vitro" aumentada entre 60 e 70% fato também observado quando *Pleurotus ostreatus* cresceu em palha de trigo em SSF durante 50 dias, aumentando a hidrólise com celulase em 70%. Não é prático produzir simultaneamente cogumelos de *Pleurotus* e que a palha residual altamente delignificada por SSF tenha o seu valor protéico aumentado (CHAHAL, 1991).

## 2.7 COGUMELOS

Os fungos de decomposição branca podem degradar os maiores componentes do material lignocelulósico e são considerados os principais agentes de degradação da lignina (BUSWELL & ODIER, 1987; HADAR et alii, 1992).

Como a lignina é um polímero insolúvel, é complicado e difícil elucidar o mecanismo de sua oxidação por análise dos produtos de degradação. Ensaio com *P. chrysosporium* demonstraram que a multiplicidade de reações oxidantes são catalisadas por um sistema degradativo de lignina (HIGUCHI, 1990; BUSWELL & ODIER, 1987 & GOLD & ALIC, 1993).

Desde os primeiros estudos com *P. chrysosporium* percebeu-se que a degradação de lignina é um processo oxidativo não específico e que a lignina é degradada por este microrganismo unicamente durante o metabolismo secundário (idiofático), iniciado quando no meio de cultura torna-se escasso o nitrogênio, carbono ou enxofre, sendo que a limitação de nitrogênio é a mais usada nos experimentos (GOLD & ALIC, 1993).

Entre 1983 e 1984 duas enzimas extracelulares, a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP), foram descobertas em *P. chrysosporium* e são consideradas os maiores componentes do sistema degradativo de lignina deste organismo, tendo sido purificadas e caracterizadas bioquimicamente de maneira intensa (GOLD & ALIC, 1993). Outros fungos degradadores produzem corpos frutíferos comestíveis (cogumelos) e podem ser usados diretamente para converter resíduos lignocelulósicos em alimento humano. Normalmente, a maioria dos processos comercialmente viáveis para a bioconversão de resíduos lignocelulósicos é destinado a fornecer substrato para o crescimento de corpos de frutificação de fungos comestíveis (REID, 1989).

Os principais gêneros utilizados para consumo humano são: *Agaricus*, *Lentinus*, *Volvariella* e *Pleurotus*. Na Europa, o organismo de maior interesse é o *Agaricus bisporus*; na China e no Japão é usada ampla variedade de cogumelos, especialmente o cogumelo "ostra" (*Pleurotus ostreatus*) e o "shiitake" (*Lentinus edodes*). Os corpos frutíferos destes cogumelos são ricas fontes de proteínas (CHANDER & SINGH, 1993). O fungo mais amplamente cultivado, o *Agaricus bisporus*, representa 75% do total da produção mundial de cogumelos e utiliza como substrato para seu crescimento palha de vegetais pré-tratadas (WOOD citado por CHANDER & SINGH, 1993).

Outros fungos como o *Pleurotus sp* utilizam resíduos lignocelulósicos com pouco ou nenhum pré-tratamento e a descoberta de seu crescimento rápido facilitou o caminho para sua produção comercial em grande escala (SMITH et alii, citado por CHANDER & SINGH, 1993). *Pleurotus sp* está amplamente distribuído no sul da Europa e área Central e norte da África (RAJARATHNAM & BANO, 1987).

## 2.8 *Pleurotus* spp

O termo *Pleurotus* vem do grego e significa “orelha” ou “margem”. As espécies de *Pleurotus* sp estão restritas a um grupo de fungos superiores (Basidiomicetos) caracterizados pelos corpos de frutificação com o pedúnculo excêntrico aderido ao píleo, o qual se abre como uma ostra durante a morfogênese, e por causa disto são chamados de “cogumelos ostras”. Na natureza são encontrados principalmente como saprófitos, pois crescem sobre troncos de madeira e estão dotados da capacidade de segregar um amplo espectro de enzimas hidrolíticas e oxidantes (HONG E NANGUNG; HONG; ULEZLO et alii; TOYAMA & OGAWA; DANGULUS & BONE; MOLITORS; RAHARATHNAM et alii; MADAN & BISARIA citados por RAJARATHNAM & BANO, 1987).

As espécies do gênero *Pleurotus* sp têm a capacidade de decompor os resíduos lignocelulósicos nativos, melhorando o conteúdo protéico e em consequência, o nível nutricional, sendo empregado diretamente na alimentação animal (WOOD citado por CHANDER & SINGH, 1993).

Os resíduos lignocelulósicos imprópriamente utilizados, poderiam ser reciclados para produzir biomassa comestível (corpos de frutificação) de *Pleurotus* sp, que são de cor atrativa e sabor delicioso. Por outro lado, o substrato degradado oferece um amplo espectro de potenciais aplicações, destacando-se entre elas as seguintes: uma forma degradada para alimentação de ruminantes, para a produção de biogás, como adubo de jardins, para a produção de enzimas sacarificantes, etc. A vantagem deste gênero é que cresce numa ampla faixa de temperatura que vai de 15 a 31°C, e têm a capacidade de colonizar um amplo número de resíduos lignocelulósicos, como palha de cereais, serragem, resíduos de papel, palha de bananeira, palha e sabugo de milho,

resíduos da planta de algodão, madeira, bagaço de cana, etc. (BANO & RAJARATHNAM, 1988).

Além de *Pleurotus* sp não precisar de substrato pré-formado para seu crescimento, tem grande capacidade de adaptação ecológica às condições climáticas e de colonizar diversas plantas superiores, o que explicaria sua ampla distribuição no mundo. Esta grande plasticidade de *Pleurotus* sp oferece um grande raio de ação para sua exploração com diversos propósitos biológicos (BANO & RAJARATHNAM, 1988; CHANG & MILES, 1989).

### 2.8.1 Taxonomia de *Pleurotus* spp

Este gênero é classificado dentro da família Agaricacea, caracterizado pelo himênio com lamelas (DYKSTRA & ALTAMURA, citado por RAJARATHNAM & BANO, 1987).

Existe uma grande confusão na identificação das espécies do gênero *Pleurotus*, pois a mesma espécie mostra diferentes requerimentos climáticos para seu crescimento, tendo sido muito difícil caracterizar e identificar espécies baseadas na sua morfologia. A direção da iluminação determina a natureza do pedúnculo, seja este central, excêntrico ou lateral; iluminação pobre, temperatura e umidade alta e/ou ventilação insuficiente, causa alongamento dos pedúnculos, píleo mais ou menos infundiliformes e/ou mais ou menos lobados, com as margens que se enrolam mais ao interior (RAJARATHNAM & BANO, 1987).

Na ausência de características confiáveis, tanto macroscópicas como microscópicas, tem-se empregado o teste do entrecruzamento ("mating") para ajudar na sua classificação. Dessa forma encontrou-se que entre dez linhagens estudadas, nove delas pertenciam a mesma

espécie, não formavam dicariontes, mas produziam esporos viáveis com incompatibilidade de fatores genéticos (RAJARATHNAM & BANO, 1987).

### 2.8.2 Sistema Lignocelulolítico do Gênero *Pleurotus*

A decomposição do material lignocelulósico é dependente do grau de atividade de enzimas lignocelulolíticas extracelulares que o micélio produz, para decompor e metabolizar os complexos heterogêneos dos três componentes lignocelulósicos (KIRK, citado por MASAPHY & LEVANON, 1992). A degradação da celulose pelo grupo de fungos de decomposição branca ao qual pertence *Pleurotus* sp, é realizada por três principais enzimas: exoglucanases, endoglucanases e  $\beta$ -glucosidases (LJUNGDAHL & ERIKSON, citado por MASAPHY & LEVANON, 1992).

Quando *Pleurotus* sp cresce sobre substrato lignocelulósico em SSF, produz celulase e xilanase em pouca quantidade comparado à *Trichoderma reesei* ou *Aspergillus niger* (MADAN & BISARIA, 1983 e VELTER citado por MASAPHY & LEVANON, 1992). As enzimas degradadoras de polissacarídeos foram mais estudadas em SSF de Ascomycetos do que em Basidiomycetos, mas VALMASEDA et alii (1991) encontraram que *P. ostreatus* apresentava alta produção de xilanase

O sistema ligninolítico de *Pleurotus* sp não está bem definido, mas existem indicações de que poderia ser diferente dos outros fungos de "degradação branca" (WALDNER et alii, 1988; SANNIA et alii, 1991 e MASAPHY & LEVANON, 1992), uma vez que o mecanismo de degradação de lignina por *Pleurotus* sp tem sido significativamente menos estudado que o de *P. chrysosporum* (KEREM & HADAR, 1993).

Ao estudar o sistema enzimático de degradação de lignina durante a SSF por *Pleurotus* sp, diversos autores não encontraram lignina peroxidase (KEREM & HADAR, 1993). Esta observação concorda com estudos mais específicos como o de WALDNER et alii (1988), que não encontraram lignina peroxidase ao nível de proteína, e KIMURA et alii (1990) não a detectaram a nível de DNA.

A enzima ligninolítica que mostra maior atividade no gênero *Pleurotus* é lacase, e a maior atividade desta foi observada entre o 6° e 8° dias do início da SSF (PLATT et alii, 1984; KEREM et alii, 1992 e VALMASEDA et alii, 1991). A lacase iniciaria a degradação de lignina, clivando as cadeias e anéis aromáticos na porção fenólica da lignina (PLATT et alii, 1984).

Os níveis relativamente altos de lacase encontrados nos SSF por *Pleurotus* sp limitariam a degradação da lignina da madeira; porém, são importantes na biodegradação da lignina com alto teor de fenóis livres, como a lignina de palha de trigo e outros cereais (LAMPIERRE & MONTES citados por VALMASEDA et alii, 1991).

Pesquisando outras enzimas que participariam na biodegradação de lignina por *Pleurotus* sp, foi encontrada Veratril álcool oxidase (VAO) por BOURBONNAIS & PAICE, 1988, confirmado depois por GUILLEN et alii, 1990; SANNIA, 1991, e VALMASEDA et alii, 1991. Esta enzima estaria participando na oxidação de álcoois aromáticos a aldeídos e na redução de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (BOURBONNAIS & PAICE, 1988); KIM et alii em 1986 achou atividade de polifenol-oxidase que é capaz de oxidar dihidroxifenilalanina (DOPA).

Já que se tem demonstrado que o valor nutricional dos resíduos lignocelulósicos melhora quando tratados por SSF utilizando espécies ligninolíticas como *Pleurotus* sp, novos estudos sobre a natureza das enzimas que

participam na degradação da lignina são necessários para estabelecer sua participação em condições de SSF (VALMASEDA et alii, 1991).

## **2.9 Parâmetros utilizados para medir o grau de degradação do substrato**

### **2.9.1 Modificações Físico-Químicas**

#### **Perda de matéria orgânica**

Durante o crescimento do fungo se perde CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O devido a sua própria atividade metabólica (RAJARATHNAM & BANO, 1987). A perda da matéria orgânica é determinada pesando-se a amostra no início e no final do período de incubação do fungo (ZADRAZIL, 1980). A quantidade de substrato seco perdido durante a SSF é um importante resultado que, freqüentemente, é omitido (REID, 1989).

#### **Solubilidade do substrato**

A solubilidade do substrato é um critério usado para avaliar o grau de decomposição de um substrato e liberação de substâncias solúveis na água, como açúcares, por exemplo, (ZADRAZIL, 1985). Parece que alguns fungos começam a crescer imediatamente depois da incubação, primeiro utilizando os açúcares livres do substrato para logo começarem a utilizar polissacarídeos, demonstrado pela liberação de enzimas celulolíticas (PLATT et alii, 1981). Entre os açúcares estudados a arabinose e a xilose são os que mais aumentam durante a SSF (AGOSIN et alii, 1985).

#### **Produção de Biomassa**

O grau de degradação de substrato aumenta com a produção de biomassa fúngica. A análise da massa fúngica na SSF é estimada

pelo conteúdo de quitina ou glucosamina presente no micélio, já que a parede celular fúngica é constituída desta matéria (AGOSIN et alii, 1985; RAJARATHNAM & BANO, 1989).

## pH

Em geral o pH do substrato diminui durante sua degradação. No caso do *Pleurotus* sp, uma das razões da queda do pH do meio, é a secreção de ácido oxálico. A ausência de queda de pH indicaria a finalização do crescimento do microorganismo (RAJARATHNAM & BANO, 1989).

## Nitrogênio e Proteínas

O conteúdo de aminoácidos aumenta continuamente desde o início do crescimento até o início da frutificação. Também se observa o aumento de peptídeos desde o início do crescimento até o final da colheita, o que indicaria degradação do substrato (RAJARATHNAM & BANO, 1989).

A quantidade de nitrogênio no substrato também aumenta durante a SSF, este aumento de nitrogênio no substrato tem sido atribuído à presença de bactérias fixadoras de nitrogênio sobre o micélio, porém no caso de *Pleurotus* sp seu próprio micélio estaria fixando nitrogênio ambiental (ORTEGA et alii, 1992). Além do aumento de aminoácidos também se percebe um aumento de proteína bruta, que indicaria a capacidade do fungo para decompor compostos nitrogenados não protéicos, provavelmente compostos lignoprotéicos incorporando-os dentro de sua própria proteína (HADAR et alii, 1992).

## Componentes lignocelulósicos

Os fungos degradam diferentes quantidades de celulose, hemicelulose e lignina do substrato. RYPÁCEK citado por ZADRAZIL, 1985 classificou os fungos de decomposição branca em três grupos: o primeiro grupo decompõe principalmente pentoses e celulose, seguido por lignina; o segundo

grupo decompõe primeiro lignina e logo depois celulose e pentoses; e o terceiro grupo decompõe os três componentes lignocelulósicos simultaneamente.

A seqüência de decomposição dos polímeros varia com a temperatura e outras condições de fermentação (ZADRAZIL & BRUNNERT, 1981). Assim, em *Trametes hirsuta* foi encontrado uma correlação positiva entre temperatura e decomposição de substrato, enquanto que nos fungos *Abortiporus biennis*, *Ganoderma aplanatum* e *Pleurotus serotium* a decomposição do substrato foi diminuída na medida que aumentava a temperatura do meio. Por outro lado, não foi observado nenhuma influência da temperatura na decomposição do substrato com *Lentinus betulina*. Mas, *Ganoderma applanatum*, *Pleurotus serotinus* e *Pleurotus ostreatus* degradam menos lignina à 30°C que à 25°C (ZADRAZIL & BRUNNERT, 1981).

Diferentes espécies de *Pleurotus* degradam quantidades variáveis de celulose, hemicelulose e lignina, e em geral, é mais pronunciada a propriedade lignilolítica e a tendência de degradar mais hemicelulose que celulose (RAJARATHNAM & BANO, 1989).

O conteúdo de fenóis diminui durante o crescimento e frutificação do fungo em SSF, indicando com isto sua oxidação e eventual decomposição. A atividade hidrolítica de enzimas que catalisam a quebra de celulose e hemicelulose é inibida por monômeros fenólicos e compostos aromáticos em geral, presentes no substrato (AKIM & RIGSBI; BORNEMAN et alii; MARTIN & AKIM, citados por BUSWELL & ERIKSON, 1994). Existe a possibilidade de compostos fenólicos inibirem bactérias celulolíticas presentes no rúmen animal (AGOSIN & ODIER, 1985).

Para quantificar lignina no substrato no início e no final da SSF, são preferidos os métodos químicos. Com a quantificação da lignina

obtemos o grau de sua degradação microbiana ou enzimática, enquanto que o uso de  $^{14}\text{C}$  permite observar melhor a degradação biológica de lignina. O método Goering Van Soest, é amplamente empregado para analisar cereais, forragens e ingredientes alimentícios com alto conteúdo de proteína e outros componentes não lignocelulósicos. As amostras são pré-tratadas com detergente ácido para remover proteínas, hemicelulose e outros componentes da celulose; a lignina é determinada pelo método de Klason (KIRK & OBST, 1988). Um outro método utilizado na determinação de lignina faz uso do corante floroglucinol e a posterior solubilização do complexo corado. Esta metodologia proposta por GARCIA & LATGÉ (citado por REID 1989), mas o floroglucinol reage com os grupos coniferil aldeído tornando-o inadequado para medir biodegradação de lignina (REID, 1989). Outra determinação espectrofotométrica, específica, para medir lignina em meios lignocelulósicos, foi proposta por JANSHEKAR et alii (1981). Este método serve para medir diferentes compostos aromáticos da lignina, mudando o comprimento de onda. A vantagem é que usa de dioxano ou álcalis ou algum outro solvente que não contenha grupos reagentes, requer pequenas quantidades de amostra, praticamente não é observada interferência de outras substâncias e tem boa reprodutividade.

A caracterização química da lignina degradada é comumente usada para examinar a estrutura de lignina degradada parcialmente e para comparar lignina modificada microbiologicamente com a lignina nativa (POMETTO & CRAWFORD, 1988).

## 2.9.2 Modificações Biológicas

### A. Atividade Enzimática

#### - Carbohidrases

Tem se dado muita atenção às principais enzimas envolvidas na degradação de lignocelulose, particularmente as celulases, xilanases e mais recentemente as peroxidases (JEFFRIES, 1990).

As pesquisas realizadas sobre a solubilização do complexo lignina-carboidrato por atividade microbiana, têm mostrado que celulases, hemicelulases, esterases e talvez peroxidases, estão correlacionadas com a solubilização da lignina. A quantidade de carboidrato remanescente sobre a lignina pode, após a digestão com hemicelulases e celulases, ser medido pela análise de açúcares (JEFFRIES, 1990).

Diferentes trabalhos apontam que os glicosídeos poderiam estar relacionados à biodegradação de lignina. O consumo de lignina é mais rápido quando o meio contém polissacarídeos, do que quando só existem monossacarídeos. Em meios contendo xilana ou holocelulose, o álcool veratrílico foi totalmente transformado em veratril-O- $\beta$ -D-xilosidase, o qual desaparece rapidamente do meio, concluindo-se que o veratril aldeído foi primeiro reduzido a veratril álcool, a seguir glicosilado e finalmente consumido. No entanto, a importância dos carboidratos na assimilação dos produtos de degradação da lignina só foi encontrado recentemente (JEFFRIES, 1990).

Uma das primeiras enzimas relacionadas à biodegradação de lignina foi uma celobiase: quinona oxido-redutase (CBQase). Esta enzima cataliza a redução de uma quinona e simultaneamente a oxidação de celobiose (WESTERMARK & ERICKSSON citados por JEFFRIES, 1990). A CBQase sintetizada por *P. chrysosporium* se liga muito fracamente à celulose

microcristalina e tal ligação não bloqueia a sua capacidade de oxidar celobiose, comprovando-se que os sítios catalíticos e de ligação são distintos (RENGANATHAN citado por JEFFRIES, 1990).

A glicosilação serviria também para detoxificar os produtos de degradação da lignina. Álcool veratril e álcool vanilil, por exemplo, são tóxicos para o crescimento de *C. versicolor* e *T. palustris*; sendo a toxicidade dos glicosídeos destes compostos altamente reduzida pela glicosilação (KONDO & IMAMURA citados por JEFFRIES, 1990). Também a presença de grupo glicosil mostrou prevenir a polimerização de álcool vanilil pela enzima fenol oxidase e poderia prevenir a repolimerização por lacase (JEFFRIES, 1990).

Acetil xilana esterase atua de maneira cooperativa com endoxilanasas para degradar xilanas (BIELEY citado por JEFFRIES, 1990); no entanto, esta enzima não está relacionada à quebra de ligações lignocelulósicas, já que os grupos acetil ésteres são grupamentos terminais (JEFFRIES, 1990).

#### - Ligninases

Foi estabelecido que a lignina é clivada por um sistema enzimático não específico dos fungos de decomposição branca ("white rot fungi"). A propriedade das enzimas ligninolíticas tem sido relativamente estudada sobre modelos de substrato de lignina, embora as informações sejam insuficientes em relação à ação de enzimas do complexo ligninolítico sobre a lignina, devido à falta de métodos sensíveis, seletivos e de monitoramento do mecanismo de ação destas enzimas. Todos os métodos utilizados são geralmente trabalhosos ou desinformativos e comparando-se os métodos conhecidos mais acessíveis para determinar a ação de enzimas ligninolíticas sobre a lignina, verificou-se que os métodos espectrofotométricos seriam os mais recomendados para determinar os produtos de oxidação da lignina (BEKKER & SINITSYN, 1993).

## B. Digestibilidade

Quando o propósito da deslignificação é o aumento e a acessibilidade de polissacarídeos à hidrólise enzimática *in vivo*, como no rúmen, a medida da digestibilidade mostra o sucesso do processo. Para animais ruminantes, os dados mais definitivos provem de alimentar o animal por um grande período de tempo, medindo o ganho de peso e materiais indigeríveis nas fezes. O benefício nutricional num animal, por um determinado alimento, está sujeito a diversos fatores, inclusive ao sabor, capacidade de permanência no rúmen e toxicidade do alimento para os microorganismos do rúmen, além de suscetibilidade dos polissacarídeos à hidrólise enzimática. Todos esses fatores podem ser afetados durante a deslignificação biológica. Com isto, as provas alimentares tornam-se dispendiosas, e requerem grande quantidade de material tratado, somente podendo ser usadas quando o processo de tratamento está bem desenvolvido (REID, 1989).

A digestão dos substratos com celulasas e hemicelulasas fúngicas é mais simples para medir a suscetibilidade da hidrólise enzimática e tem-se encontrado boa correlação de digestibilidade de rúmen *in vitro* e *in vivo*, com digestibilidade por celulase (REID, 1989). Usando celulase, dois são os métodos mais conhecidos para determinar a digestibilidade *in vitro* dos materiais delignificados biologicamente: o método de TILLEY et alii (1963) que usa fluido de rúmen ao invés da celulase comercial, e o método de ROUGHAM et alii (1972) que usa pepsina comercial antes de submeter o substrato à ação da celulase comercial (RAJARATHNAM & BANO, 1989).

A digestibilidade no rúmen pode também ser estimada suspendendo as amostras em um saquinho de náilon poroso dentro do rúmen de um animal fistulado ou incubando a amostra a ser testada em um tubo com um inoculo do rúmen do animal fistulado, para a obtenção do valor do IVRD (In Vitro

Rúmen Digestibility). Em qualquer dos casos expostos, a digestibilidade é medida como a solubilização do substrato. Estas técnicas medem a suscetibilidade do material à digestão pelos microorganismos do rúmen, mas requer um animal fistulado (REID, 1989).

A metodologia de colocar amostras de alimentos no rúmen através de sacos é relativamente antiga e é conhecida como degradabilidade *in situ* que tem como objetivo estudar a desintegração de alimentos. Os sacos eram inicialmente confeccionados em seda bastante fina e introduzidos através de fístula no rúmen de carneiros adultos. Atualmente, esta técnica usa sacos de náilon e é bastante utilizada e amplamente aceita, já que é relativamente rápida na determinação da taxa de degradação dos alimentos no rúmen permitindo estimar a degradabilidade efetiva e corrigindo, pela taxa de passagem, os valores da degradação potencial. Com este método mede-se o desaparecimento dos componentes dos alimentos após serem incubados no rúmen, em sacos de náilon, durante diferentes períodos, admitindo-se que esse desaparecimento é sinônimo de degradação, embora os alimentos não sejam submetidos à salivagem. Apesar da metodologia ser muito utilizada, existem variações entre os resultados de diferentes laboratórios, que podem ser explicados por: aspecto físico dos sacos, tipo de material, tamanho do poro do tecido utilizado, o preparo da amostra, secagem e moagem, peso da amostra por área de saco, incubação ruminal, local dentro do rúmen, tamanho do cabo e contaminação dos sacos e seus resíduos, efeito animal e efeito da dieta. Contudo, a técnica *in situ* pode ser uma poderosa ferramenta para estudar os efeitos associativos sobre os valores de degradabilidade dos alimentos porque parece ser mais sensível às trocas na composição da dieta (POSSENTI, 1998).

A digestibilidade da FDN é um importante parâmetro de qualidade de uma forragem, já que esta varia amplamente em sua degradabilidade no rúmen, influenciando na produção do animal. Mesmo que o gado

requeria de FDN na sua dieta, o excesso de FDN limita a ingestão voluntária do alimento por preenchimento físico do rúmen (OBA & ALLEN, 1999).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Preparação dos Inóculos

Foram utilizadas duas linhagens/espécies do gênero *Pleurotus*: 1) *Pleurotus ostreatus* que foi isolada no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana do Departamento de Ciências de Alimentos, FEA/UNICAMP, seguindo a metodologia de BORSINI & SCURTI, (1972) a partir de corpos de frutificação obtidos nos supermercados de Campinas com o nome de "Pleurotus tiuti" os que foram identificados como P1; 2) *Pleurotus ostreatusroseus*, SING (CCB 016, origem São Paulo) doado ao Laboratório pela coleção de culturas de Basidiomicetos da seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica de São Paulo - S.P., identificados com o número 016.

Os micélios fúngicos foram cultivados em placas de petri contendo meio PDA (Potato Dextrose Agar) a 30°C por aproximadamente 10 dias, até a total colonização. Pequenos quadrados com área de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> do meio de cultura com os micélios a serem utilizados, foram transferidos em câmara de fluxo laminar para frascos de vidro de 500mL preparados de acordo com o procedimento descrito por CHANG & MILES (1989). Os frascos de vidro continham 50 g de grãos de trigo, previamente fervidos com 3 vezes seu volume de água durante 15 minutos, a seguir a água era escorrida, ainda quente os grãos de trigo foram misturados com carbonato de cálcio a 1% (p/p) e autoclavados a 121°C por 30 minutos. Os frascos foram então inoculados e incubados a 30°C por 15 dias, para serem utilizados como inóculo para o substrato numa concentração de 6% (p/p).

### 3.2 Substrato

Bagaço de cana de açúcar obtido na usina Santa Marta, Cosmópolis – SP, foi utilizado como substrato. O mesmo foi seco e peneirado para eliminar o excesso de pó e então umedecido com 75 % p/p de água e misturado a 2% de seu peso seco com carbonato de cálcio. No caso de substrato com melaço, este foi dissolvido numa concentração de 0,5% (v/v) em água e as amostras identificadas como P1M e 016M respectivamente. Uma vez umedecido em água e com ou sem melaço foram cobertos com filme plástico nas vasilhas de preparo e guardados sob refrigeração durante toda a noite a fim de permitir uma melhor penetração da água. Depois, foram distribuídas as amostras de  $50g \pm 0,05g$  em saquinhos de polipropileno 200 x 320 mm e espessura de 0,08 mm. As embalagens foram fechadas com barbantes e autoclavadas durante 30 minutos a  $120^{\circ}C$ .

### 3.3 Método de Cultivo

Depois de autoclavados e esfriados, os saquinhos contendo o bagaço de cana foram inoculados com os fungos que cresceram nos grãos de trigo nos vidros (item 3.1). A inoculação foi feita numa câmara de fluxo laminar e a concentração utilizada de inóculo de cada linhagem foi a mesma indicada no item 3.1. As culturas foram incubadas a  $30^{\circ} C$  por 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 dias de incubação. Após cada período três tipos de ensaios foram realizados: a) Enzimático, b) Químico e c) Digestibilidade. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que os saquinhos utilizados em cada tipo de estudo foram selecionados de maneira aleatória.

Os estudos químicos e de digestibilidade foram realizados no Laboratório de Bromatologia do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa - S. P.

### 3.4 Análise Estatística dos Dados Obtidos

Foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para analisar os resultados das atividades das enzimas lignocelulolíticas, das análises químicas e da digestibilidade *in vitro*. Para analisar os resultados da digestibilidade *in situ* empregou-se o teste de Tukey para comparação de médias.

### 3.5 Estudo Enzimático

#### 3.5.1 Extração Enzimática

Para a extração de enzimas, após os respectivos períodos de incubação, o bagaço de cana colonizado foi diluído com 200 mL de água destilada, agitado a 200 rpm por 10 min, para homogeneizar a suspensão e centrifugado a 10000g/15min para a separação da parte líquida. O sobrenadante foi filtrado a vácuo através de lâ de vidro e os extratos guardados a -20°C até o momento de serem analisados (KEREM et alii, 1992).

#### 3.5.2 Determinação de Enzimas Celulolíticas

A determinação de avicelase e carboximetilcelulase foi realizada através da quantificação de açúcares redutores pelo método do reagente ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) proposto por MILLER (1959). Este método possui sensibilidade na faixa de 0,1 a 1,0 g/L de açúcar redutor e consiste na adição de uma alíquota de 2 mL da solução do reagente DNS aos tubos de reação onde se encontra 2 mL da solução com os açúcares redutores. Os tubos são incubados em banho de água a 100° C por 5 minutos. A reação é paralisada pela transferência imediata dos tubos para banho de água gelada, a absorvâncias foi medida 550nm. Para a determinação da concentração do açúcar redutor, foi construído uma curva padrão com a solução do açúcar a ser

determinado. Quando a atividade celulolítica foi estudada, utilizou-se glicose como padrão, principal açúcar resultante da ação das celulasas. Para determinar a atividade de xilanase, a curva de calibração foi construída empregando xilose que é o principal açúcar resultante da atividade das xilanases.

O reagente do DNS foi preparado dissolvendo em 1,4 L de água nos seguintes compostos:

Ácido 3,5-dinitrosalicílico	10,6 g
NaOH	19,8 g
KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> (Tartarato duplo de sódio e potássio)	306,0 g
Fenol	7,6 g
Bissulfito de sódio	8,3 g

### 3.5.2.1 Atividade de Celulase Total (Avicelase)

A determinação foi feita seguindo a metodologia de REGINATO (1992). Foi misturado 1,0 mL de uma solução 1,0% de avicel, em tampão acetato 0,05 M pH 5, pré-incubados em banho-maria a 50° C por 10 min, a 1,0 mL de caldo de cultivo filtrado pré-incubado em banho-maria a 50° C . A mistura foi incubada por 30 min em banho-maria a 50°C e os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do DNS. Paralelamente foram preparados o branco da enzima com 1,0 mL de enzima inativada e 1 mL de água destilada.

### 3.5.2.2 Atividade de Endo-1,4-β-D-Glucanase (Carboximetilcelulase) (CMCase)

Foi medida a atividade de carboximetilcelulase seguindo a metodologia de REGINATO (1992) A 1,0 mL de uma solução 1,0% de

carboximetilcelulose (CMC) em tampão acetato 0,05 M pH 5 pré-incubado em banho-maria a 50° C por 10 min, foi adicionado 1,0 mL de caldo de cultivo filtrado. A mistura foi incubada por 30 min em banho-maria a 50°C; os açúcares liberados foram determinados pelo método do DNS (item 3.5.2). Paralelamente foram preparados os brancos respectivos como no item 3.5.2.1

### 3.5.2.3 Atividade de $\beta$ -glicosidase

Usou-se o método recomendado por JAFELICE et alii (1990). Este método utiliza *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo como substrato para a determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidase.

Para determinar a atividade da enzima, foi utilizado 1,0 mL do substrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo 5mM em tampão acetato 0,05 M pH 5,0 foram incubados 0,5 mL do extrato enzimático por 15 minutos a 50°C. A reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de bicarbonato de sódio 1,0 M e o *p*-nitrofenol liberado, teve sua absorbância lida a 410 nm e comparado com uma curva de calibração com *p*-nitrofenol. Uma unidade de atividade  $\beta$ -glicosidase corresponde à quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por minuto.

## 3.5.3 Determinação de Enzimas Xilanolíticas

### 3.5.3.1 Atividade de Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada utilizando o método recomendado por KHANDKE et alii (1989). Foi usado xilana (Birchwood, Sigma-X0502) como substrato. A mistura de reação continha 0,5 mL do caldo de cultivo filtrado e 0,5 mL de uma solução de xilana em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Após 30 min de incubação a 50°C os açúcares liberados foram determinados pelo método do DNS (item 3.5.2). Uma unidade de atividade

xilanase corresponde a quantidade de enzima que libera 1 $\mu$ mol de açúcares redutores, expressos como xilose, a partir de xilana, por minuto.

### 3.5.4 Determinação de Enzimas Ligninolíticas

#### 3.5.4.1 Quantificação da Atividade Enzimática

A quantificação da atividade das enzimas ligninolíticas foi realizada empregando-se a seguinte equação:

$$\{(A/E) / (R.t)\} \times 10^6 = U/L, \text{ onde:}$$

A = Absorvância

E= Coeficiente de Extinção Molar

R = Quantidade de Caldo Enzimático utilizado (mL)

t = Tempo de Reação (minutos)

#### 3.5.4.2 Determinação de Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade de lignina peroxidase (LiP) foi determinada de acordo com TIEN & KIRK (1984) através da oxidação de álcool veratrílico ( $\epsilon_{310} = 9.300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). A mistura de reação continha 0,6 mL de sobrenadante filtrado; 0,2 mL de álcool veratrílico 2mM em tampão tartarato de sódio 0,4 M (pH 3,0), e por último foi adicionado 0,2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2,0 mM. O aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm. A atividade de LiP foi expressa em U/L.

#### 3.5.4.3 Determinação de Álcool Veratrílico Oxidase (AVO)

A atividade de AVO foi determinada da mesma forma que LiP, com exceção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  que foi omitido do meio de reação. A atividade de AVO foi expressa em U/L.

#### 3.5.4.4 Determinação de Manganês-Peroxidase (MnP)

A atividade de peroxidase é dependente de Mn(II). (MnP) foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol e medida a 610 nm ( $\epsilon_{610} = 4.460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). A mistura de reação (1,0 mL) continha 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M, 0,05 mL de  $\text{MnSO}_4$  2,0 mM, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,5 mL de sobrenadante filtrado, 0,05 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2,0 mM em tampão succinato de sódio 0,2M (pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura foi incubada a 30° C durante 5 min e a reação foi interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH 2,0 N. A atividade de MnP foi expressa em U/L. Essa determinação segue a descrição de KUWAHARA et alii (1984).

#### 3.5.4.5 Determinação de Lacase

A atividade de fenol oxidase, medida como lacase, foi determinada espectrofotometricamente pela oxidação de siringaldazina ou o-dianisidina, que foram usados como substratos enzimáticos, segundo a metodologia modificada de SZKLARZ et alii (1989).

A mistura de reação para oxidar siringaldazina até sua forma de quinona foi acompanhada por 10 minutos a 525 nm ( $\epsilon_{525} = 65000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) e continha 0,6 mL de sobrenadante filtrado, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), 0,1 mL de solução de siringaldazina 1,0 mM em etanol e 0,1 mL de água destilada.

A mistura de reação para oxidar a o-dianisidina foi preparada da mesma forma como para siringaldazina, usou-se 1,0 mM de o-dianisidina em água destilada. A velocidade da reação foi acompanhada por 10 minutos a 460nm ( $\epsilon_{460} = 29.400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). A atividade de lacase foi expressa em U/L.

### 3.6 Estudo Químico do Substrato

Este estudo foi realizado no substrato fermentado (item 3.3) e seco.

#### 3.6.1 Determinação de Matéria Seca

Foi determinada segundo a metodologia do A.O.A.C. (1960). Para determinar a matéria seca, utilizou-se discos de alumínio previamente lavados com álcool etílico que uma vez secos foram pesados em balança analítica. Sobre os discos pesou-se aproximadamente 1 g de amostra e deixou-se em estufa a 105°C durante 12 horas. Os discos foram transferidos para um dessecador, até atingir a temperatura ambiente a seguir, os discos foram pesados em balança analítica. O percentual da matéria seca foi calculado de acordo com a seguinte expressão.

Calculo do % de matéria Seca:

$$\frac{(\text{Peso do disco} + \text{Peso da amostra seca}) - \text{Peso do disco} \times 100}{\text{Peso da amostra antes de seca}}$$

#### 3.6.2 Determinação de Proteína Bruta

Usou-se o Método de Kjeldahl através da metodologia descrita em SILVA (1998).

A 2,0 g da amostra foram adicionados 2 cm de fio de cobre metálico, 11 g de sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 25 mL de ácido sulfúrico comercial. A seguir a mistura foi levada ao bloco digestor por 2 horas, durante este tempo se foi girando o balão para que todo o material orgânico fosse digerido; após a digestão aguardou-se +/- 15 minutos, para que o balão esfria-se, evitando a liberação de vapores tóxicos ao adicionar-se água. Vagarosamente, 200 mL de

água destilada foram adicionados, colocou-se na saída do destilador um erlenmeyer contendo 100 mL de ácido bórico a 4% e os indicadores vermelho de metilo (0,1%) e bromocresol (0,1%). Foram colocados nos balões 5 pedaços de zinco granulado e adicionados em seguida a 60 mL de soda a 60%, as paredes foram lavadas com um pouco de água destilada e imediatamente acoplados. Foi deixado destilar por 45 minutos. O destilado foi então, titulado com ácido clorídrico 0,1428 N e a porcentagem de proteína bruta foi calculado seguindo a seguinte expressão:

$$\% \text{ de Nitrogênio} = \frac{\text{Vol.gasto de HCl} \times N \times F.\text{correção N} \times P.N \text{ do nitrogênio} \times 100}{\text{Peso da amostra}}$$

$$\text{PM do nitrogênio} = 0,1428$$

$$\% \text{ proteína bruta} = \% \text{ de nitrogênio} \times 6,25$$

### 3.6.3 Determinação de Fibra Detergente Neutro (FDN)

O método foi segundo Van Soest descrito em SILVA (1998). Este método utiliza detergente neutro para a determinação das paredes celulares, e constitui um processo rápido para a determinação da fibra total em alimentos, parecendo dividir a matéria seca bastante próximo do ponto que separa os constituintes nutricionais solúveis e disponíveis daqueles incompletamente disponíveis ou dependentes da fermentação microbiana. Este método é empregado para alimentos que possuem baixo teor de proteínas e alto em fibras.

Pesou-se aproximadamente 1,0 g de amostra moída e passada pela peneira de 1 mm, colocada num béquer Berzelius para refluxo. A seguir foram adicionados pela ordem os seguintes reagentes: 100 mL de solução detergente neutra, 2 mL de decahidronaftaleno e 0,5 g de sulfito de sódio anidro.

A suspensão foi aquecida até ferver, entre 5 a 10 minutos. Foi mantido a fervura a um nível constante evitando a formação de espuma e refluxado por 60 minutos. O material do béquer foi agitado para suspender os sólidos e logo vertido num cadinho previamente pesado e colocados num conjunto de filtragem. A filtragem foi realizada a vácuo e as amostras lavadas com um mínimo de água quente a 80°C; estas lavagens foram repetidas e seguidas por duas lavagens com acetona, também usando vácuo para filtrar.

As amostras foram secadas a 105°C durante a noite, esfriadas num dessecador eficiente e pesadas. O resíduo que sobrou no cadinho considerou-se fibra detergente neutra.

Cálculo do % de FDN:

$$\frac{(\text{Peso do cadinho} + \text{FDN}) - \text{Peso do cadinho}}{\text{Peso da amostra}} \times 100$$

#### **3.6.4 Determinação de Fibra Detergente Ácido (FDA)**

Usou-se o método de Van Soest descrito em SILVA (1998). Este é um método rápido para determinar a lignocelulose em alimentos, mas o resíduo também inclui a sílica. A diferença entre FDN e FDA é a estimativa de hemicelulose, embora esta diferença também inclua alguma proteína ligada às paredes celulares. A FDA é utilizada como fase preparatória para a determinação de lignina.

Foi pesado 1,0 g de amostra no recipiente adequado para refluxo, adicionado 100 mL de solução detergente ácido e 2 mL de decahidronaftaleno colocada para ferver, apenas começou ferver abaixou-se a temperatura a fim de evitar formação de espuma depois de refluxar por 60 minutos foi filtrado num cadinho previamente pesado e colocado num conjunto de filtrar, usando sucção suave foi lavado duas vezes com água quente e logo com

acetona até não mais remoção de cor, quebrando aglomerados de material, de maneira que o solvente tomasse contato com todas as partículas da fibra. Os cadinhos contendo o material foram levados a uma estufa a 105°C por uma noite, esfriados num dessecador a temperatura ambiente e pesados.

Calculo do % de FDA:

$$\frac{(\text{Peso do cadinho} + \text{fibra} - \text{Peso do cadinho}) \times 100}{\text{Peso da amostra}}$$

### 3.6.5 Determinação de Lignina

Foi realizado segundo a metodologia de Van Soest descrito em SILVA (1998). Este método utiliza a FDA como fase preparatória; o detergente ácido remove as proteínas e outros materiais solúveis no ácido que interferem na determinação da lignina. O princípio deste método baseia-se no fato que o resíduo de FDA está constituído principalmente por lignina visto que a celulose foi dissolvida pelo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%. O resíduo remanescente estará constituído principalmente por lignina e cinzas insolúveis em ácido; no entanto, se as amostras contém altas quantias de cutina, será medida como lignina.

Os cadinhos contendo os resíduos de FDA foram colocados numa bandeja de vidro mantendo-se um dos lados da bandeja 2 cm mais elevado a fim de permitir que o ácido drene dos cadinhos. Os cadinhos foram cobertos com ácido sulfúrico a 72%, gelado (5°C) e misturado com um bastão de vidro até formar uma pasta macia, rompendo todos os aglomerados. Os cadinhos foram preenchidos com ácido até a metade do volume e misturados com o bastão de vidro e sem deixar drenar totalmente se enchia novamente com o ácido misturando cada vez. Três adições de ácido foram suficientes deixando os cadinhos a 20-23°C por 3 horas e em seguida filtrado a vácuo todo o ácido. O resíduo foi lavado e filtrado com água quente até a retirada total do ácido. Os

cadinhos foram deixados a secar por uma noite a 100°C e pesados. Calculou-se o teor de lignina pela perda de peso da fibra em detergente ácido.

### **3.6.6 Determinação de Celulose e Hemicelulose**

Para calcular a celulose utilizou-se os cadinhos com os resíduos que resultaram da determinação de lignina. Os cadinhos foram calcinados em mufla a 500°C por 3 horas, deixados esfriar até 250°C e transferido para um dissecador até esfriar a temperatura ambiente. Calcula-se a porcentagem de celulose pela diferença nas pesagens antes e depois da incineração.

O teor de hemicelulose foi obtido pela diferença de valores de FDN e FDA.

## **3.7 Estudo de Digestibilidade**

### **3.7.1 Digestibilidade *in vitro***

A digestibilidade *in vitro* da matéria seca foi determinada de acordo com TILLEY & TERRY (1963).

Foi pesada 0,5 g de amostra e colocada em tubo de vidro onde foi adicionado 2,0 mL de água destilada para umedecer a amostra verificando-se o pH que deveria estar entre 6,2 a 7, e logo adicionou-se a solução tampão com o líquido ruminal preparado da seguinte maneira: num frasco de fundo redondo de 5 litros, foi adicionado 1,0 mL de cloreto de cálcio por litro de água destilada, o frasco é colocado na manta aquecedora a 39° C onde se fez borbulhar CO<sub>2</sub> a baixa intensidade. Adicionou-se a este balão uma parte de líquido ruminal para cada 4 partes de solução tampão e se deixou borbulhando

CO<sub>2</sub> durante 10 minutos. Com o uso de um dispensador foi colocado 50 mL da mistura de solução tampão com o líquido ruminal a cada tubo de vidro com as amostras e também aos brancos; os tubos foram fechados imediatamente com a rolha contendo a válvula de bunsen e colocados no banho-maria com temperatura regulada a 39° C; os tubos foram girados vagarosamente lateralmente, assegurando que todas as partículas sejam umedecidas pelo meio de cultura, a operação de revirar os tubos foi repetida duas vezes no primeiro dia de incubação e três no segundo dia; após 48 horas de incubação, os tubos são revirados e as rolhas retiradas e as eventuais partículas aderidas à rolha lavadas para dentro usando um mínimo de água; verificou-se o pH de alguns tubos ao acaso que deveria ser menor que 7,1; se o pH fosse encontrado fora deste limite o ensaio seria descartado; logo, foram adicionados 6 mL de HCl 20% aos tubos, da seguinte forma: os dois primeiros mililitros, um de cada vez revirando os tubos com cuidado e os outros 4 mililitros, foram adicionados de uma vez só, também revirando os tubos com cuidado, em seguida foi adicionado 2,0 mL de pepsina 5%, agitado vigorosamente e voltando ao banho-maria a 39° C; repetindo o reviramento dos tubos duas vezes no primeiro dia e três no segundo dia; após 46 horas de digestão com pepsina, o conteúdo dos tubos foram transferidos aos cadinhos de vidro com filtro (previamente secos e tarados); o resíduo dos tubos foi lavado com água destilada quente, para dentro dos cadinhos. Os cadinhos foram colocados em estufa a 105° C para secar durante toda a noite; na manhã seguinte foram colocados em dissecador por 1 hora para esfriar e logo foram pesados.

$$\text{Cálculo da DIVMS} = \frac{(\text{g de MS da amostra}) - (\text{g de MS residual da amostra} - \text{g de MS do branco})}{\text{g de MS da amostra}}$$

### 3.7.2 Digestibilidade *in situ* com bovinos fistulados

#### 3.7.2.1 Animais e tratamentos.

Foram utilizados quatro bovinos machos, castrados, com peso médio de 600 kg, e de aproximadamente 6 anos, da raça Holandesa Vermelha e Branca, portadores de cânulas ruminais com 10 cm de diâmetro e 8 cm de espessura. Antes do experimento os animais foram pesados, vacinados e vermifugados para endo e ectoparasitas. As dietas atenderam às exigências protéicas e energéticas, conforme o NRC (1989). O ensaio de digestibilidade *in situ* teve um período pré-experimental com adaptação dos animais ao novo alimento. Os bovinos receberam diariamente 60 g de sal mineral que foram mantidos em cocho separado e disponível todo o tempo, enquanto que as rações foram oferecidas duas vezes ao dia, uma às 8 horas e outra às 16 horas. As instalações que albergaram os animais estavam dotadas de baias individuais com cochos de madeira e bebedouro automático e cada baia possuía uma área de 45,5 m<sup>2</sup>, sendo que 17,5 m<sup>2</sup> era coberta e 6 m<sup>2</sup> descoberta, ambas com piso de cimento e o restante, chão de terra batida. O local era bem arejado e ventilado, proporcionando uma temperatura ambiente agradável e relativamente constante no decorrer do dia.

#### 3.7.2.2 Determinação da Digestibilidade *in situ*

Foi realizado o estudo de digestibilidade *in situ* no bagaço de cana submetida a SSF por *Pleurotus* "tiuti" (P1) em virtude deste ter mostrado, pela simples observação, um melhor crescimento de micélio e também um maior aumento do conteúdo de proteína bruta. Foram utilizadas amostras de zero, 15, 30 e 45 dias de fermentação; estas foram imediatamente congeladas após colheita e depois secas por liofilização.

A digestibilidade da matéria seca (MS) e da Fibra Detergente Neutra (FDN), foram medidas através da técnica de sacos de náilon *in situ* conforme descrição de MEHREZ & ØRSKOV (1977).

Os sacos utilizados para incubação do alimento no rúmen foram confeccionados em tecido de náilon com porosidade de 50  $\mu$ , medindo 10 x 19 cm. Juntamente com as amostras de alimento, foram colocadas duas esferas de vidro, com peso de aproximadamente 7 g, que tinham a função de manter os sacos submersos no conteúdo ruminal.

As amostras liofilizadas foram submetidas a digestibilidade *in situ*, foram distribuídas como segue: Os sacos de náilon previamente secos em estufa a 65° C durante 24 horas foram colocados em dissecador, identificados e pesados em balança analítica de precisão, colocando-se aproximadamente 7,0 g e em triplicata de cada tipo de amostra de bagaço de cana fermentado sem nenhum processo de moagem. Depois cada saco foi amarrado com barbante de náilon e colocados no rúmen presos à cânula ruminal através de um fio de náilon com comprimento de 50 cm, permitindo sua livre movimentação no interior do rúmen. Os tempos de incubação foram: zero, 6, 24, 48, 72 e 96 horas; após a retirada dos sacos, nos tempos pré-determinados, os mesmos foram lavados em água corrente, sem jato, manualmente comprimidos, tantas vezes quanto necessário, até que o líquido da lavagem fluísse incolor e em seguida colocados em estufa a 65° C por 72 horas . A digestibilidade do tempo zero foi tomada mergulhando-se os sacos num recipiente contendo água a temperatura de 39° C durante 10 minutos, conforme CUMMINS et alii, 1983. Os sacos, quando retirados da estufa, foram pesados para determinar o peso das amostras não degradadas, posteriormente moídas em micro moinho com peineira de 20 mesh e encaminhadas ao laboratório para a realização das análises Bromatológicas.

A degradabilidade de matéria seca foram medidas através da diferença de pesagens dos sacos antes e após a incubação com base na amostra seca a 65° C por 72 horas.

Os cálculos foram feitos utilizando-se a seguinte fórmula :

$$DgMs\% = 100 \times \frac{[1 - (PSPI - PSV)]}{(PSAI - PSV)}$$

Onde : DgMs% = Porcentagem de degradabilidade da MS;

PSPI = Peso do saco pós-incubação;

PSAI = Peso do saco antes da incubação;

PSV = Peso do saco vazio.

A degradabilidade da FDN foi calculada através da mesma fórmula , sendo que a diferença entre peso do saco antes da incubação e o peso do saco vazio foram multiplicados pelas respectivas porcentagens de FDN, dividendo o resultado por cem.

Os dados de degradabilidade da MS e FDN foram processados usando o modelo matemático proposto por ØRSKOV & McDONALD (1979):

$$p = a + b (1 - e^{-ct})$$

Onde "p" é a quantidade de nutriente degradada no tempo (t), "a" é a intersecção da curva do tempo zero e representa a fração rapidamente solúvel em água; "b" é a fração potencialmente degradável no interior do rúmen e "c" é a taxa de degradação por hora da fração "b".

As constantes "a", "b" e "c" da equação exponencial foram utilizadas para calcular a degradabilidade potencial (a + b), representada pela

quantidade que pode se solubilizar ou degradar dentro do rúmen, se o tempo não for fator limitante, e a degradabilidade efetiva (P), representa a quantidade de alimento realmente degradado, definida pelo tempo na qual o mesmo está presente no rúmen (ØRSKOV et alii, 1980).

A degradabilidade efetiva (P) é calculada segundo a equação:

$$P = a + \frac{b \cdot c}{c + k}$$

Onde “k” representa a taxa de passagem do rúmen por hora e segundo ØRSKOV et alii (1980) pode variar de 0,01 a 0,1 de acordo com o tipo de dieta e categoria do animal.

Para o ajuste dos modelos, utilizou-se o procedimento estatístico NLIN do software SAS, 1990.

## 4 . RESULTADOS

### 4.1 Crescimento microbiano em bagaço de cana

Conforme observação visual, o crescimento micelial foi diferente para as duas linhagens/espécies estudadas. Enquanto *Pleurotus ostreatus* “tiuti” (P1) mostrou um desenvolvimento eficiente, com uma vigorosa massa micelial independente da adição de melaço no meio de cultura de bagaço de cana e nas condições descritas em Material e Métodos, nos experimentos com a linhagem/espécie *Pleurotus ostreatusroseus* (016) foi observado um desenvolvimento lento com uma massa micelial bastante pobre.

### 4.2 Produção de Enzimas Celulolíticas por *Pleurotus* spp

(Apêndice A)

#### 4.2.1 Avicelase

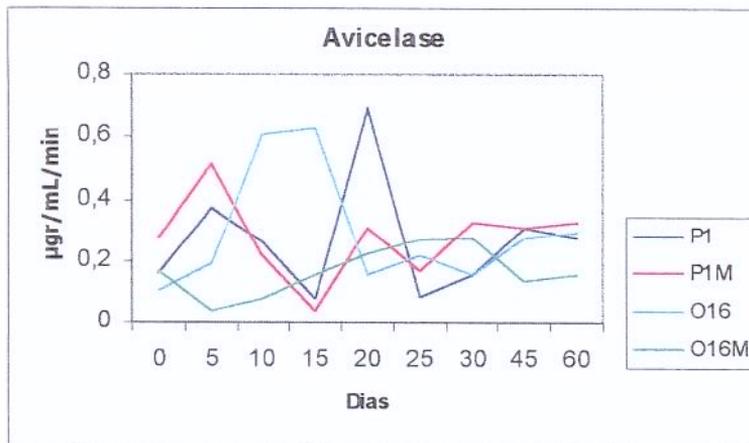
Conforme mostrado na Figura 2 e na Tabela 1 do Apêndice A, encontramos que *Pleurotus ostreatus* “tiuti” cultivado em meio de bagaço de cana com e sem melaço (P1 e P1M), apresentou perfis de atividade da enzima avicelase semelhantes. Em ambas condições o fungo manifesta dois picos de maior atividade; um após 05 dias e outro após 20 dias de cultivo, sendo que o grupo P1 (sem melaço) mostra o maior pico aos 20 dias, no entanto o grupo P1M (com melaço) aos 20 dias manifestou uma atividade de quase a metade de P1.

A atividade desta enzima no fungo *Pleurotus ostreatusroseus* em meio sem melaço (016), iniciou-se a partir do 5º dia de fermentação e manteve-se quase constante até o 20º dia; enquanto que, quando o meio continha

melaço (016M) a atividade desta enzima manteve-se baixa durante quase todo o experimento.

Os resultados estatísticos mostram diferença significativa na produção desta enzima só após 30 dias de fermentação quando, comparou-se P1 e P1M e de P1M com 016M.

**Figura 2. Atividades de Avicelase produzidas por linhagens/espécie de *Pleurotus* durante SSF em bagaço de cana**

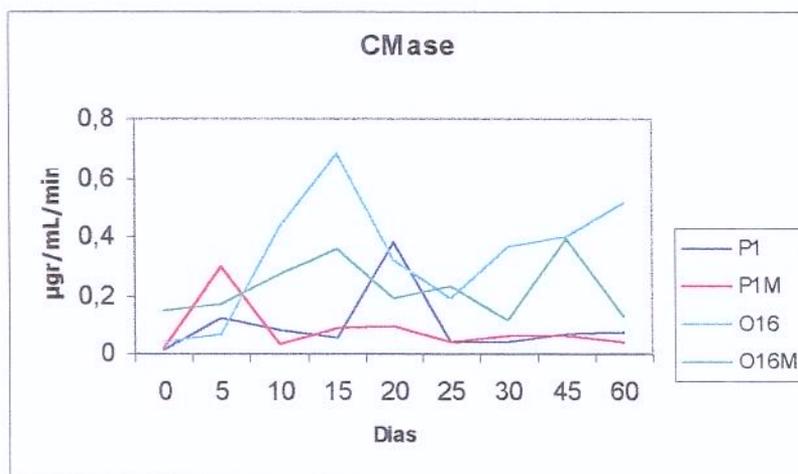


P1 = Linhagem P1 em bagaço de cana  
P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
O16 = Linhagem O16 em bagaço de cana  
O16M = Linhagem O16 em bagaço de cana + melaço  
 $\mu\text{gr/mL/min}$  = microgramas de glicose liberada/mL/minuto

#### 4.2.2 Carboximetilcelulose

Os resultados da atividade da enzima carboximetilcelulose são mostrados na Figura 3 e na Tabela 2 do Apêndice A. Os perfis são semelhantes entre si nos grupos da mesma linhagem/espécie de fungo, mas, encontrou-se diferença altamente significativa ( $p = 0,02$ ) entre as duas linhagens estudadas sendo que 016 com e sem melaço mostra maior atividade desta enzima. Apesar de que os perfis enzimáticos manifestaram diminuição da atividade quando foi adicionado melaço ao meio de cultura, estatisticamente não se encontrou diferença significativa.

**Figura 3. Atividades de Carboximetilcelulase produzidas por linhagens/espécie de *Pleurotus* durante SSF em bagaço de cana**

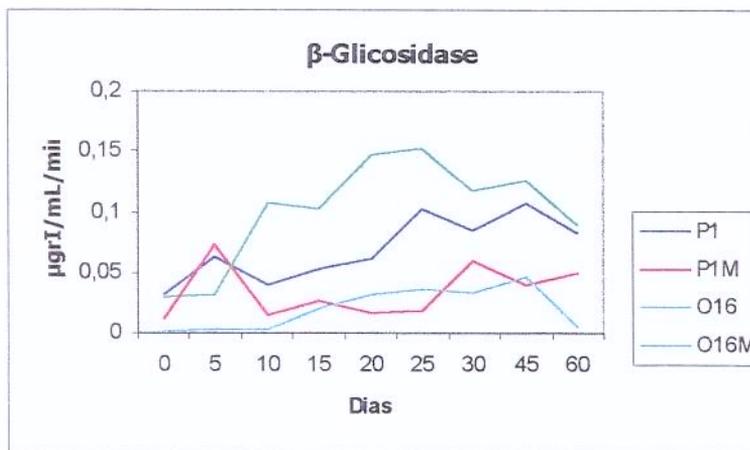


P1 = Linhagem P1 em bagaço de cana  
 P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
 O16 = Linhagem O16 em bagaço de cana  
 O16M = em bagaço de cana + melaço  
 µgr/mL/min = microgramas de glicose liberada/mL/minuto

### 4.2.3 $\beta$ -Glicosidase

De acordo com a Figura 4, as atividades de  $\beta$ -glicosidase nos quatro grupos de estudo (P1, P1M, O16, O16M) foi muito baixa, quando comparada com as demais atividades celulolíticas e os resultados das análises estatísticas (Apêndice A, Tabela 3) mostra diferenças significativa entre os quatro perfis de atividade, assim, em P1 o melão deprime a atividade desta enzima e em O16 ao contrário a adição de melão atua estimulando a atividade desta enzima.

**Figura 4. Atividades de  $\beta$ - Glicosidase produzidas por linhagens/espécie de *Pleurotus* durante SSF em bagaço de cana**



P1 = Linhagem P1 em bagaço de cana  
 P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melão  
 O16 = Linhagem O16 em bagaço de cana  
 O16M = Linhagem O16 em bagaço de cana + melão  
 $\mu\text{grI/mL/min}$  = microgramas de nitrofenol liberada/mL/minuto

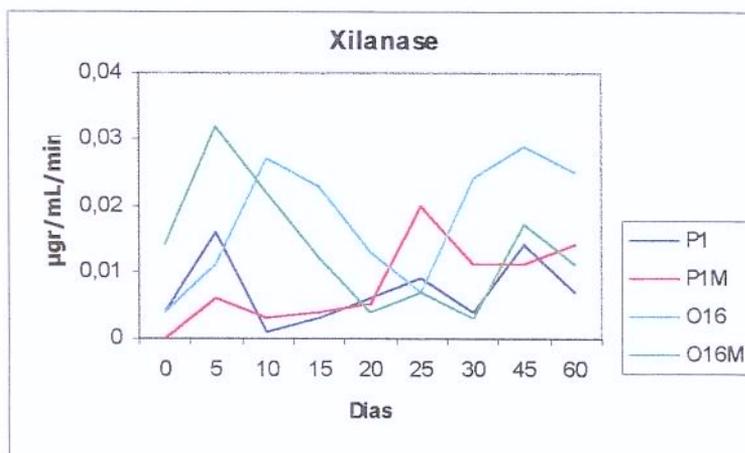
### 4.3 Enzima Xilanolítica

(Apêndice A)

#### 4.3.1 Xilanase

Na Figura 5 observamos que o perfil de atividade desta enzima nas duas espécies de fungos é semelhante e que os picos maiores manifestaram-se entre os 5º e 10º dias de fermentação. Encontra-se, também que o maior nível de atividade foi obtido com a linhagem/espécie 016 com e sem melaço. Quando se comparou P1 com 016 (Tabela 4, Apêndice A) esta diferença se revelou estatisticamente significativa  $p = 0,05$  entre os dias 30 e 60. Comparado-se 016 com 016M encontrou-se diferença significativa entre os dias 30 a 60 onde 016, aumentou dramaticamente a atividade desta enzima enquanto que 016M permaneceu baixa. Este resultado sugere que o melaço estaria reprimindo a atividade desta enzima.

**Figura 5. Atividades de Xilanase produzidas por linhagens/espécie de *Pleurotus* durante SSF em bagaço de cana**

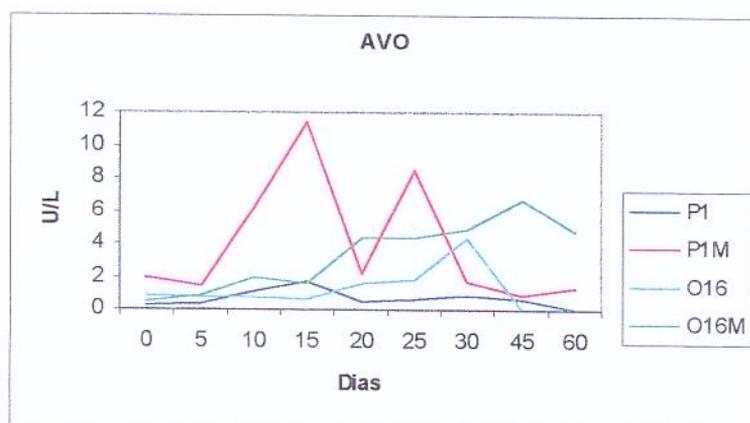


P1 = Linhagem P1 em bagaço de cana  
 P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
 O16 = Linhagem O16 em bagaço de cana  
 O16M = Linhagem O16 em bagaço de cana + melaço  
 µgr/mL/min = microgramas de xilana liberada/mL/minuto

#### 4.4.1 Atividade de Álcool Veratril Oxidase (AVO)

A Figura 6 mostra que a maior atividade de AVO foi encontrada nos experimentos com adição de melaço (P1M e O16M), porém, o experimento P1M mostrou dois picos de atividade máxima, um aos 15 e outro aos 25 dias de incubação, enquanto que O16 M, teve um incremento constante e progressivo até o 45º dia. A análise estatística (Tabela 5 – Apêndice B) revelou que P1M tem uma diferença altamente significativa ( $p=0,002$ ) quando comparado a P1, pelo que se pode inferir que a atividade desta enzima é dramaticamente estimulada pela presença de melaço no meio.

**Figura 6. Atividades de Álcool Veratril Oxidase produzidas por linhagens/espécie de *Pleurotus* durante SSF em bagaço de cana**

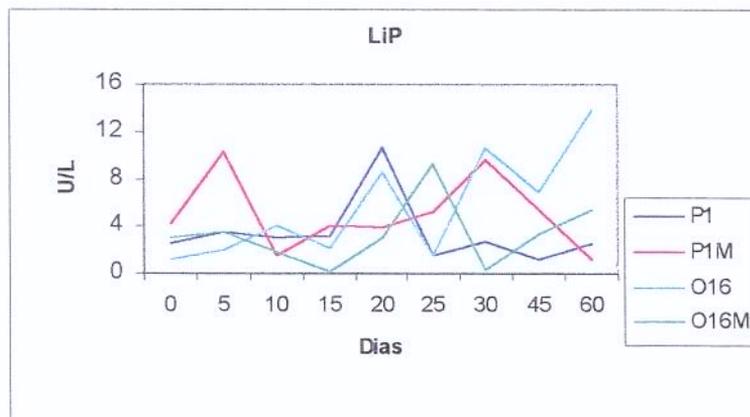


P1 = Linhagem P1 em bagaço de cana  
 P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
 O16 = Linhagem O16 em bagaço de cana  
 O16M = Linhagem O16 em bagaço de cana + melaço  
 U/L= Unidades de Enzima/Litro de caldo filtrado

#### 4.4.2 Atividade de Lignina Peroxidase (LiP)

Na Figura 7 observou-se que os perfis de atividade de LiP de P1 e 016 são semelhantes entre os dias 15<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> dias de fermentação, mas, depois do 30<sup>o</sup> dia do experimento, os perfis enzimáticos se diferenciam o que se refletiu estatisticamente ( $p=0,050$ ) (Tabela 6 do Apêndice B). A adição de melaço a P1 não modificou a atividade enzimática de maneira estatisticamente significativa em relação ao meio sem melaço, mas, P1M apresentou dois picos de atividades máximas, o primeiro, no 5<sup>o</sup> dia de fermentação e um outro pico que só se manifesta depois de 30 dias de fermentação. 016M teve um perfil enzimático diferente, estatisticamente significativo, de 016 ( $p=0,050$ ) com um pico só no 25<sup>o</sup> dia do experimento. Então, as duas linhagens reagem de maneira diferente à presença de melaço sendo mais significativa em *P. ostreatusroseus*, para esta enzima.

**Figura 7. Atividades Lignina Peroxidase produzidas por linhagens/espécie de *Pleurotus* durante SSF em bagaço de cana**

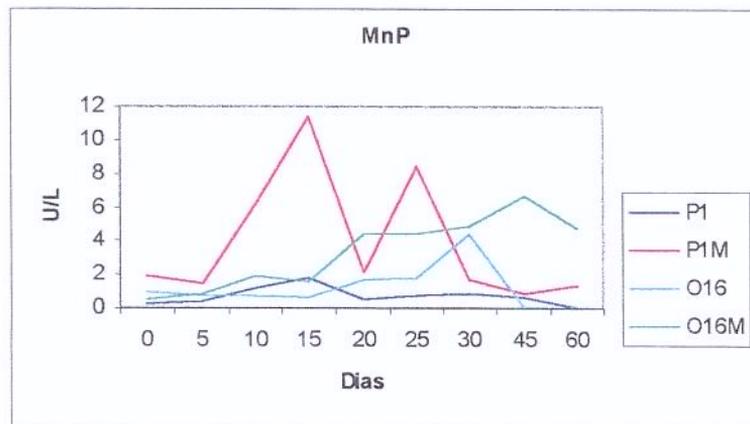


P1 = Linhagem P1 em bagaço de cana  
P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
016 = Linhagem 016 em bagaço de cana  
016M = Linhagem 016 em bagaço de cana + melaço  
U/L = Unidades de Enzima/Litro de caldo filtrado

#### 4.4.3 Atividade de Manganês Peroxidase (MnP)

Na Figura 8 observou-se que os perfis de atividade de MnP *Pleurotus ostreatus* "tiuti" na presença e ausência de melaço (P1M e P1), tinham diferença altamente significativa ( $p=0,002$ ) Tabela 7 Apêndice B). P1 e P1M no 15º dia mostraram seu maior pico de atividade, sendo que o pico apresentado por P1M relativamente mais alto, e além deste pico, P1M apresentou outro pico aos 25 dias do experimento. O16, assim como P1 mostraram uma atividade muito baixa quando comparado a O16M e P1. Esta diferença foi altamente significativa ( $p=0,031$ ), sendo mais evidente entre os 30 e 60 dias de fermentação. P1M e O16M também mostraram diferença significativa revelando que nas duas linhagens, a adição de melaço estimulou a produção de MnP mas, de maneira diferente.

**Figura 8. Atividades Manganês Peroxidase produzidas por linhagens/espécie de *Pleurotus* durante SSF em bagaço de cana**



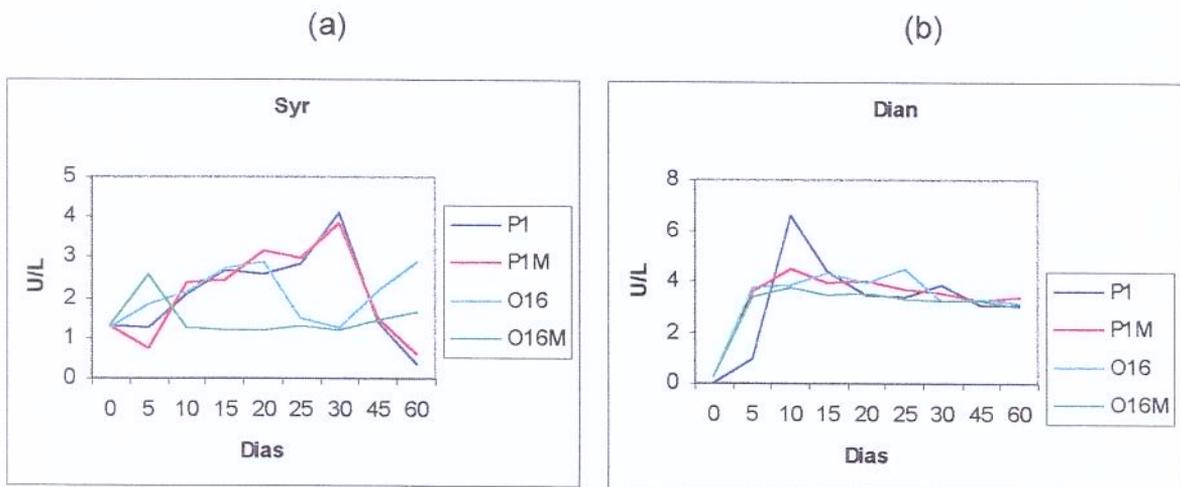
P1 = Linhagem P1 em bagaço de cana  
P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
O16 = Linhagem O16 em bagaço de cana  
O16M = Linhagem O16 em bagaço de cana + melaço  
U/L= Unidades de Enzima/Litro de caldo filtrado

#### 4.4.4 Atividade de Lacase

Quando a atividade de lacase foi medida usando-se como substrato siringaldazina, mostrado na Figura 9(a), Tabela 8 Apêndice B, observou-se um incremento constante da atividade desta enzima a partir do 5º dia de fermentação na linhagem P1, tanto na presença como na ausência de melaço mostrando sua maior atividade entre os dias 25 e 30, enquanto que 016 começou a manifestar sua atividade a partir do 10º até o 20º dia de fermentação para então diminuir entre os dias 25 e 30. Já em 016M quase não foi observada uma atividade significativa.

Quando a atividade de lacase foi avaliada com dianisidina, mostrado na Figura 9(b), Tabela 9 do Apêndice B observou-se que só P1 mostrou um pico de atividade bem definido no 10º dia, mas, sem diferença significativa, enquanto que P1M, 016 e 016M mantiveram um nível de atividade baixo, semelhante e constante desde o 5º dia até o final do experimento.

**Figura 9. Atividades Lacase produzidas por linhagens/espécie de *Pleurotus* durante SSF em Bagaço de Cana de Açúcar**



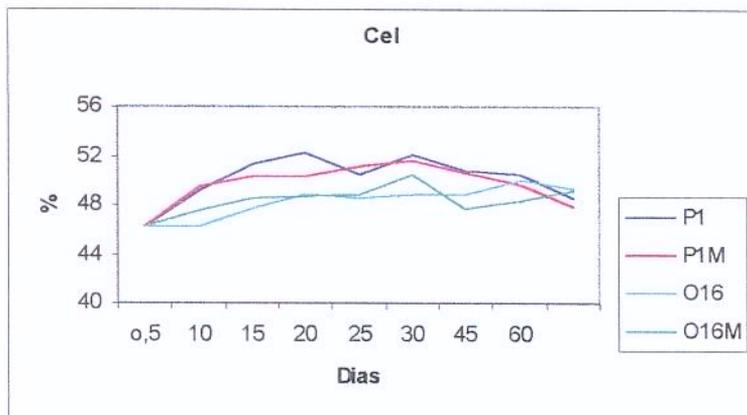
P1 = Linhagem P1 em bagaço de cana  
 P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
 O16 = Linhagem O16 em bagaço de cana  
 O16M = Linhagem O16 em bagaço de cana + melaço  
 U/L = Unidades de Enzima/Litro de caldo filtrado

## 4.5 Análises Químico dos Componentes Estruturais do Bagaço de Cana (Apêndice C)

### 4.5.1 Celulose (Cel)

Comparando-se as concentrações de celulose no bagaço com e sem melaço, submetido a SSF por as duas linhagens de *Pleurotus* durante 60 dias, observou-se um ligeiro aumento na concentração deste composto nos quatro grupos estudados (P1, P1M 016 e 016M), que é mais acentuada para P1 e P1M como são mostrados na Figura 10 e na Tabela 10 do Apêndice C. P1 e P1M seguem um perfil sem diferenças significativas entre eles, mas, quando se compara P1 com 016 com e sem melaço encontrou-se diferenças estatisticamente significativas ( $P=0,019$ ).

**Figura 10. Teor de Celulose do Bagaço de Cana de Açúcar durante SSF por linhagens/espécies de *Pleurotus***

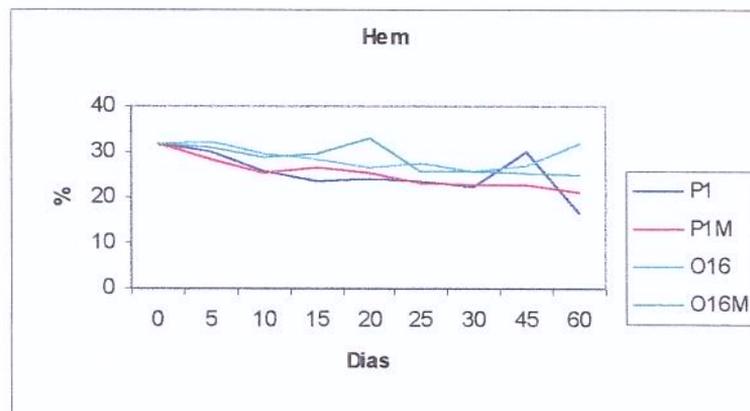


P1 = Linhagem P1 em bagaço de cana  
 P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
 O16 = Linhagem O16 em bagaço de cana  
 O16M = Linhagem O16 em bagaço de cana + melaço

#### 4.5.2 Hemicelulose (Hem)

Os teores de hemicelulose do bagaço de cana submetido a SSF pela linhagem P1 diminuíram durante os 60 dias do experimento em quase 50% de seu valor inicial, e em P1M a diminuição foi de 34% como mostrado na Figura 11 e na Tabela 11 do Apêndice C. A linhagem 016 não mostrou alteração significativa em relação ao valor inicial e 016M manifestou uma diminuição de 16% em relação ao tempo zero.

**Figura 11. Teor de Hemicelulose do Bagaço de Cana de Açúcar durante SSF por linhagens/espécies de *Pleurotus***

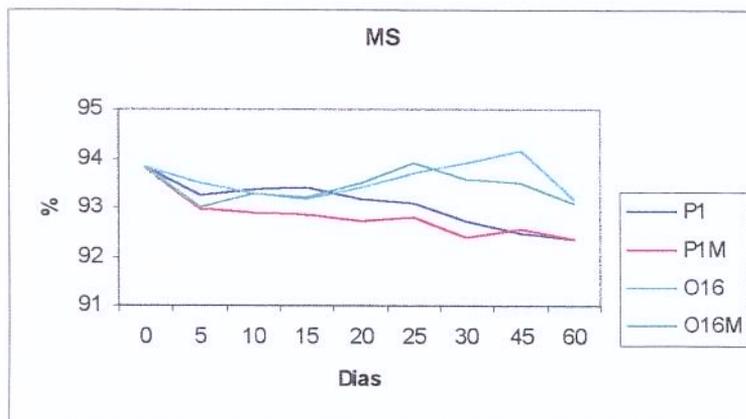


P1=Linhagem P1 em bagaço de cana  
P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
016 = Linhagem 016 em bagaço de cana  
016M = Linhagem 016 em bagaço de cana + melaço

#### 4.5.4 Matéria Seca (MS)

Após 60 dias de fermentação foi muito pouca a alteração dos valores da matéria seca do bagaço de cana com ou sem melaço, submetido a SSF por *P. ostreatus* 'tiuti". P1 e P1M mostraram no final do experimento ter diminuído 2,15% e 2,17% respectivamente. Quando *P. ostreatus roseus* fermentou bagaço de cana com e sem melaço encontrou-se que a diminuição da matéria seca foi de 1,28%, quase a metade de o que se observou em P1, mostrando que esta linhagem foi mais eficiente na degradação da matéria seca. Os resultados estão mostrados na Figura 13 e na Tabela 13 do Apêndice C. Na tabela 13 do Apêndice C também podemos observar que a adição de melaço ao bagaço de cana estimulou a degradação da matéria seca de maneira significativa ( $p=0,050$ ) entre os dias 15 e 25 de fermentação por P1; pudemos demonstrar também, que P1 e 016 com e sem melaço degradaram a matéria seca de maneira significativamente diferente.

**Figura 13. Teor de Matéria Seca do Bagaço de Cana de Açúcar durante SSF por linhagens/espécies de *Pleurotus***

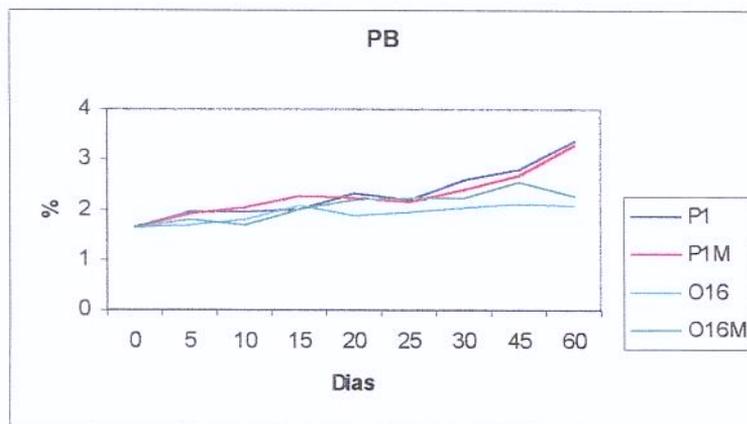


P1=Linhagem P1 em bagaço de cana  
 P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
 O16 = Linhagem O16 em bagaço de cana  
 O16M = Linhagem O16 em bagaço de cana + melaço

#### 4.5.5 Proteína Bruta (PB)

Nos experimentos com *P. ostreatus* "tiuti" (P1 e P1M) observou-se um incremento contínuo da concentração de proteína bruta no bagaço de cana submetido a SSF, este incremento de proteína chegou a mais do 100% em relação ao valor inicial. Quando o bagaço de cana com e sem melaço foi fermentado por *P.ostreatusroseus* (016 e 016M) o incremento de proteína foi algo menor, chegando apenas a 27% em 016 e 41% em 016M. Estes resultados sugerem que a adição de melaço contribuiu para a melhoria na biossíntese de proteína bruta por este microrganismo. Estes resultados aparecem na Figura 14 e na Tabela 14 do Apêndice C. A Tabela 14 mostra também os resultados das análises estatísticas e só se encontrou diferença significativa quando comparado P1 e 016 com 016M.

**Figura 14. Teor de Proteína Bruta do Bagaço de Cana de Açúcar Durante SSF por linhagens/espécies de *Pleurotus***

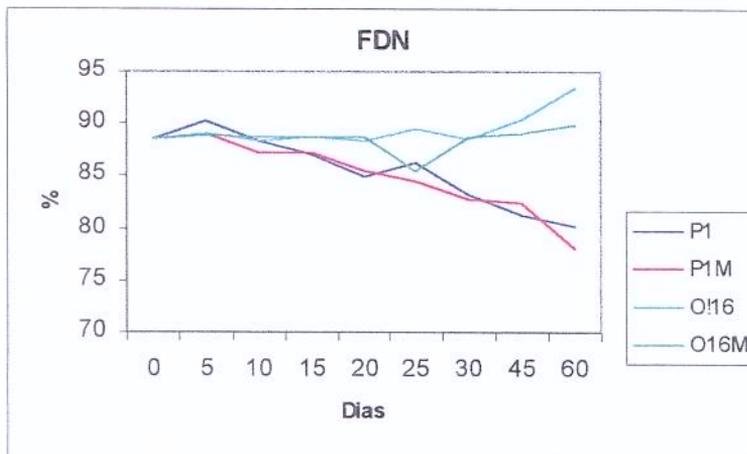


P1=Linhagem em P1 bagaço de cana  
 P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
 016 = Linhagem 016 em bagaço de cana  
 016M = Linhagem 016 em bagaço de cana + melaço

#### 4.5.6 Fibra Detergente Neutro (FDN)

Na Figura 15 observa-se a evolução dos teores de FDN no bagaço com e sem melaço fermentado com *P. "tiuti"* e *P. ostreatusroseus*. O bagaço fermentado com *P. ostreatus* "tiuti" mostrou uma diminuição do nível de FDN. Considerando-se os valores de FDN no tempo zero e aos 60 dias de fermentação obteve-se uma diminuição de 9,5% no grupo P1 e 11,86% no grupo P1M. No bagaço fermentado por *P. ostreatusroseus* verificou-se um ligeiro incremento do valor de FDN. A Tabela 15 do Apêndice C mostra os valores de FDN obtidos nos experimentos e a análises estatísticas onde se verificou que existe diferença significativa na concentração de FDN no bagaço fermentado pelas duas espécies de fungos.

**Figura 15. Teor de Fibra Detergente Neutro do Bagaço de Cana de Açúcar Durante SSF por linhagens/espécies de *Pleurotus***

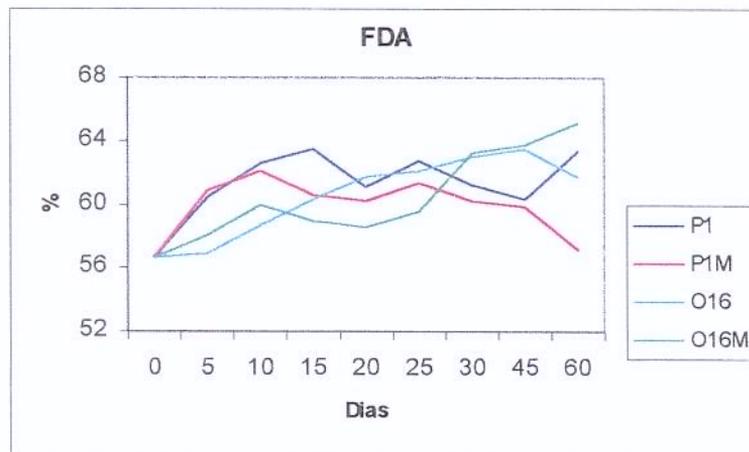


P1=Linhagem P1 em bagaço de cana  
P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
O16 = Linhagem O16 em bagaço de cana  
O16M = Linhagem O16 em bagaço de cana + melaço

#### 4.5.7 Fibra Detergente Ácido (FDA)

Os valores dos teores de FDA durante SSF por linhagens/espécie de *Pleurotus* estão mostrados na Figura 16. Observou-se uma tendência a incrementar os valores deste item nos 4 grupos em estudo, sendo mais evidente nos grupos sem melaço (P1 e O16) quando comparou-se aos grupos com melaço (P1M e O16M) respectivamente. Esta diferença no aumento dos valores de FDA mostrou diferença mais significativa entre os dias 15 e 25 de SSF como mostrado na Tabela 16 do Apêndice C.

**Figura 16. Teor de Fibra Detergente Ácido do Bagaço de Cana de Açúcar Durante SSF por linhagens/espécies de *Pleurotus***



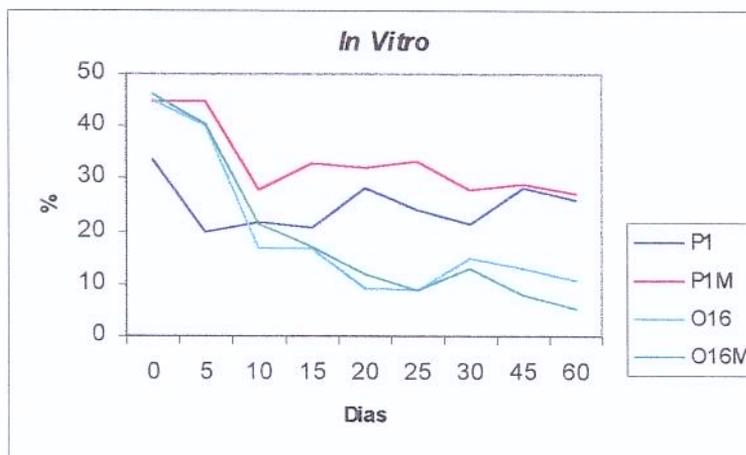
P1=Linhagem P1 em bagaço de cana  
P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
O16 = Linhagem O16 em bagaço de cana  
O16M = Linhagem O16 em bagaço de cana + melaço

## 4.6 Estudo de Digestibilidade do Bagaço de Cana de Açúcar Submetido a SSF por espécies de *Pleurotus* (Apêndice D)

### 4.6.1 Digestibilidade *in vitro* da Matéria Seca

Observou-se que nos quatro casos em estudo, a digestibilidade *in vitro* (Figura 17) diminuiu de maneira significativa ( $p=0,017$ ) como mostrado na Tabela 17 do Apêndice C. A diminuição da digestibilidade mais alta foi no grupo 016 com e sem melaço; o bagaço de cana com e sem melaço fermentado por *P. ostreatus* "tiuti" mostrou menor tendência à diminuição da digestibilidade mas nos quatro grupos encontrou-se os resultados com alto desvio padrão.

**Figura 17. Digestibilidade *In Vitro* do Bagaço de Cana de Açúcar durante SSF por linhagens/espécies de *Pleurotus***



P1 = Linhagem P1 em bagaço de cana  
P1M = Linhagem P1 em bagaço de cana + melaço  
O16 = Linhagem O16 em bagaço de cana  
O16M = Linhagem O16 em bagaço de cana + melaço

#### 4.6.2 Digestibilidade *In Situ*

Os resultados de digestibilidade *in situ* do bagaço de cana de açúcar submetido a SSF por *Pleurotus* “tiuti” são apresentados nos Quadros 4 e 5 e nas Figuras 18 e 19.

No Quadro 4, são apresentados os valores médios obtidos da digestibilidade ruminal da matéria seca para as seguintes frações: A (fração solúvel em água); B (fração potencialmente degradável no interior do rúmen); C (taxa de degradação por hora da fração B) e DP (degradação Potencial) e De (Degradação Efetiva para a taxa de passagem ruminal de 2% /hora). Estes valores refere-se à matéria seca do bagaço de cana sem inóculo e inoculado com *P. ostreatus* “tiuti” (P1) e fermentado nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias. A fração A apresentou um aumento dos valores médios; esta maior solubilidade se refletiu nas taxas maiores de degradação efetiva para o bagaço inoculado por 45 dias. A Figura 18 e a Tabela 18 do Apêndice D mostram a porcentagem de degradação ruminal relacionada às horas de incubação ruminal verifica-se então, que a digestibilidade ruminal da matéria seca foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ) no bagaço incubado por 45 dias.

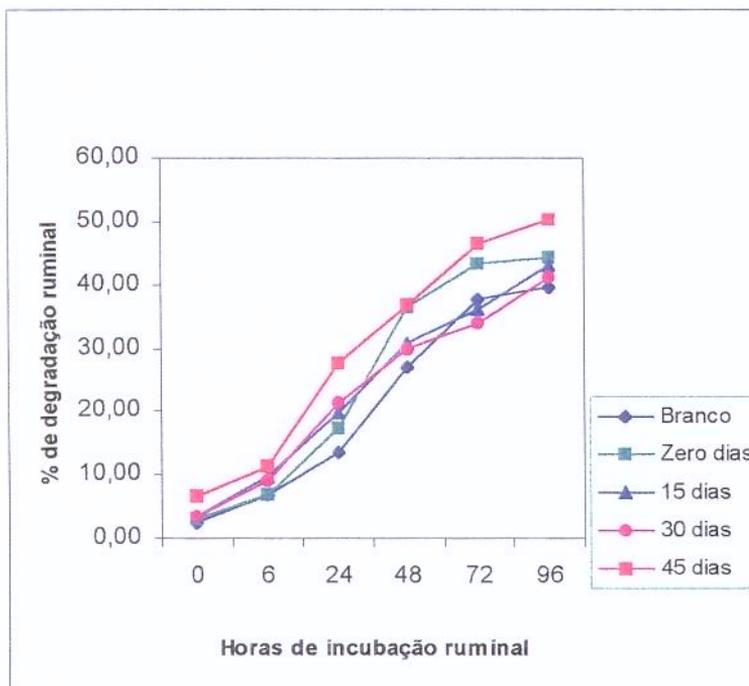
No Quadro 5 são apresentados os valores médios obtidos da digestibilidade ruminal da fibra detergente neutro (FDN) para as mesmas frações e condições indicadas no Quadro 4. Observou-se aqui que a solubilidade da fração A para FDN foi igual para os tempos 0, 15 e 30 dias de incubação, mas, foi significativamente menor após 45 dias (0,52%) e ainda significativamente menor que a do bagaço sem inóculo (1,81%). A Figura 19 e a Tabela 19 do Apêndice D mostram a digestibilidade da fibra detergente neutro (FDN) nos diferentes tempos de incubação ruminal.

**Quadro 4. Parâmetros da Digestibilidade Ruminal da Matéria Seca (MS) do Bagaço de cana fermentado por P1.**

Tempo de Fermentação (Dias)	Parâmetros da cinética ruminal				
	A <sup>1</sup> %	B <sup>2</sup> %	C <sup>3</sup> %h <sup>-1</sup>	DP <sup>4</sup> %	2%/HORA Deg.efetiva <sup>5</sup>
Branco	1,66 <sup>c</sup>	54,99	0,010	56,65	22,88 <sup>c</sup>
Zero	2,24 <sup>c</sup>	61,05	0,018	63,29	27,39 <sup>b</sup>
15	4,20 <sup>b</sup>	48,71	0,016	52,91	25,91 <sup>b</sup>
30	3,87 <sup>b</sup>	41,88	0,020	45,75	24,96 <sup>bc</sup>
45	6,13 <sup>a</sup>	54,59	0,010	60,73	32,01 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem pelo teste de Tuckey (P<0,05); 1 Fração solúvel; 2 fração potencialmente degradável; 3. taxa de degradação da fração potencialmente degradável; 4. Degradação potencial - Dp = (A+B); 5. Degradação efetiva para a taxa de passagem 2%/hora

**Figura 18. Cinética da Degradação Ruminal da Matéria Seca do Bagaço de Cana Fermentado por P1 em Diferentes Tempos**

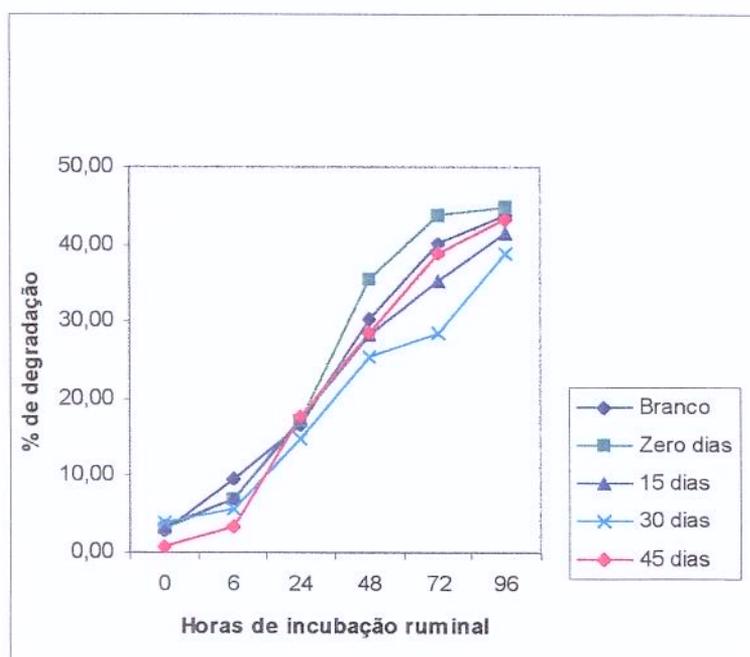


**Quadro 5 . Parâmetros da Digestibilidade Ruminal da Fibra Detergente Neutra (FDN) do Bagaço de Cana Fermentado com P1.**

Tempo de Fermentação (Dias)	Parâmetros da cinética ruminal				
	A <sup>1</sup> %	B <sup>2</sup> %	C <sup>3</sup> %h <sup>-1</sup>	DP <sup>4</sup> %	2%/HORA Deg.efetiva <sup>5</sup>
Branco	1,81 <sup>b</sup>	55,94 <sup>a</sup>	0,017	57,75 <sup>a</sup>	27,31 <sup>a</sup>
Zero	3,22 <sup>a</sup>	60,88 <sup>a</sup>	0,010	64,11 <sup>a</sup>	28,29 <sup>a</sup>
15	3,18 <sup>a</sup>	56,73 <sup>a</sup>	0,012	59,92 <sup>a</sup>	23,74 <sup>a</sup>
30	3,47 <sup>a</sup>	57,61 <sup>a</sup>	0,013	61,08 <sup>a</sup>	24,03 <sup>a</sup>
45	0,52 <sup>c</sup>	25,26 <sup>b</sup>	0,010	25,78 <sup>b</sup>	13,49 <sup>b</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas colunas diferem pelo teste de Tuckey (P<0,05); 1 Fração solúvel; 2 fração potencialmente degradável; 3. taxa de degradação da fração potencialmente degradável; 4. Degradação potencial - Dp = (A+B); 5. Degradação efetiva para a taxa de passagem 2%/hora

**Figura 19. Cinética da Degradação Ruminal do FDN do Bagaço de Cana Fermentado por P1 em Diferentes Tempos**



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Degradação Celulolítica e Xilanolítica

A espécie *P. ostreatusroseus* (016) foi mais eficiente na produção de enzimas celulolíticas e xilanolítica conforme mostrado nas Figuras 2, 3 e 5. Nas duas linhagens/espécie a enzima  $\beta$ -glicosidase manifestou um nível consideravelmente baixo de atividade enzimática (Figura 4). A adição de melão ao bagaço de cana de açúcar deprimiu significativamente a atividade das enzimas celulolíticas e xilanolítica (Figuras 2, 3 e 5).

Os baixos níveis da enzima  $\beta$ -glicosidase encontrados neste trabalho parecem ser característica do gênero *Pleurotus*. Assim, RAI & SAXENA (1990) observaram que *P. sajor caju*, quando crescido em palha de arroz, manifestou baixa atividade desta enzima. BUSWELL et alii (1996), pesquisou a presença  $\beta$ -glicosidase em meio de cultura líquido cultivado com *P. sajor caju*, encontrando baixa produção da mesma, comentando que a maior atividade desta enzima encontrava-se no extrato da hifa fungal e não no sobrenadante como foi medido neste experimento. KUMARAN et alii (1997), verificaram que quando *Pleurotus sajor-caju* degradou subprodutos da palmeira *Metroxylon sagu*, a atividade desta enzima também foi muito baixa.

A baixa produção de enzimas celulolíticas parece ser uma característica do gênero *Pleurotus*. VALMASEDA et alii (1991) encontraram que a atividade de enzimas celulolíticas esteve praticamente ausente em *P. ostreatus* ao degradar palha de trigo. As atividades das enzimas celulolíticas seguem um perfil caracterizado por um pico de duração rápida para em seguida decrescer. A literatura explica que a diminuição de atividade se deve a um repressor catabólico do sistema enzimático celulolítico (YANG et alii citado por ORIARAN et alii, 1989; FROST & MOSS, 1987). ASIEGBU et alii (1996),

encontraram que *P. sajor-caju* removeu 3% dos polissacarídeos e 4.4% de hemicelulose em serragem de madeira.

Relacionando-se as atividades das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas de cada linhagem em estudo com os resultados das análises de celulose e hemicelulose encontrou-se que não houve uma correlação significativa entre atividade destas enzimas e a degradação de celulose e hemicelulose, inclusive foi observado aumento na concentração de celulose. Quando se relaciona a atividade de xilanase e a concentração de hemicelulose se observa que a maior degradação ocorreu nos tratamentos com *Pleurotus ostreatus* "tiuti" (P1 e P1M), onde a atividade de xilanase foi menor que com *P. ostreatusroseus* (016). Nos ensaios com *P. "tiuti"* houve perda de cerca 50% de hemicelulose em relação a seu valor inicial. Isto está de acordo com a literatura reporta, uma vez que *Pleurotus ostreatus* degrada preferencialmente hemicelulose (STREETER et alii, 1982; TSANG et alii, 1987). VALMASEDA et alii (1991), também encontraram altos níveis de xilanase em *P. ostreatus*. Em geral, parece que o gênero *Pleurotus* degrada preferencialmente lignina antes que celulose (ORTEGA et alii, 1993; KUMARAN et alii, 1997; BARRASA et alii, 1998). Neste trabalho confirmou-se os resultados encontrados por ORTEGA et alii (1993); KEREM & HADAR (1995) e KUMARAN et alii (1997), que observaram que durante a fermentação de diversos substratos lignocelulósicos com *Pleurotus*, proporção de celulose aumenta enquanto a de lignina diminui.

YANG et alii (citado por ORIARAN et alii 1989) encontraram que a adição de 35% de glicose em meio de cultura basal, suprimiu o ataque dos polissacarídios da madeira em duas semanas, sem afetar significativamente a degradação de lignina por *P. chrysosporium*. ORIARAN et alii (1989), encontraram que o meio suplementado com 2% de glicose diminui a degradação de hemicelulose por *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* e *Phanerochaete chrysosporium* em diferentes tipos de madeiras. Isto explicaria a

diminuição das atividades das enzimas celulolíticas (avicelase, carboximetilcelulase) quando adicionamos melaço (P1M e 016M) ao meio de crescimento; em quanto, que a atividade da enzimas  $\beta$ -glicosidase e hemicelulolítica parecem ser mais influenciadas pelas características da linhagens/espécie, pois os resultados sugere que a atividade de  $\beta$ -glicosidase e xilanase em 016 foi estimulada com a adição de melaço.

## 5.2 Degradação Ligninolítica

Observando-se os perfis de atividade das enzimas ligninolíticas (Figuras 6 a 10) verificou-se que todas iniciaram suas atividades a partir do 5<sup>o</sup> dia de fermentação com seus picos máximos entre os 5<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> dias. A atividade de lacase quando foi determinada usando  $\theta$ -dianisidina como substrato, mostrou um perfil quase constante durante os 60 dias deste experimento de SSF depois de ter manifestado alta atividade nos primeiros dias. A atividade de lacase usando siringaldazina como substrato mostrou incremento constante em P1 e P1M até alcançar seu pico máximo aos 30 dias de fermentação. As diversas enzimas ligninolíticas estudadas apresentaram suas atividades máximas em diferentes tempos de fermentação, sugerindo que cada enzima estaria degradando a lignina de maneira diferente ou talvez ocorrendo uma seqüência na degradação do bagaço de cana.

Diferentes trabalhos da literatura mostram a capacidade de fungos do gênero *Pleurotus* produzir quase todas as enzimas ligninolíticas (ASIEGBU et alii, 1996; BARRASA et alii, 1998; RUIZ-DUEÑAS et alii, 1998; CAMELO et alii, 1998; GIARDINI et alii, 1998; PALMIERI et alii, 1998), em *Pleurotus sajor-caju* foi encontrado que produz as enzimas MnP, AVO e lacase em meio líquido não tendo manifestado a presença de LiP (BUSWELL et alii, 1996) diversos pesquisadores não detectaram atividade de LiP no gênero *Pleurotus*, até

que, AKHMEDOVA (1996) (citado por CAMELO et alii, 1998) informou tê-la encontrado em *P. ostreatus* crescendo em meio sólido. Provavelmente, a não detecção desta enzima pode estar na sua inibição por compostos de baixo peso molecular presentes no meio de cultura (CAMELO et alii, 1998). *P. eringii* produz enzimas peroxidases tanto em culturas líquidas como em sólidas e parece que as condições de crescimento do fungo determinam os diferentes perfis de atividade enzimática e que a vantagem das peroxidases produzidas pelo gênero *Pleurotus* comparada a aquelas produzidas por *P. chrysosporium* é sua resistência a altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CAMELO et alii, 1998).

Comparando isoladamente a atividade ligninolítica de cada enzima com os níveis de lignina encontrados em cada etapa da fermentação no substrato, não se encontrou nenhuma correlação pois só observou-se significativa diminuição da lignina a partir do 20º dia no grupo P1 e P1M. As atividades de AVO, LiP e MnP tiveram seus picos de máxima atividade antes de esse período, sendo que o pico máximo de lacase (medida com siringaldazina) ocorreu aos 30 dias de fermentação. A linhagem/espécie 016, que não mostrou atividade destas enzimas teve níveis de degradação de lignina quase nulos.

ORTEGA et alii (1993) estudando a degradação de palha de cana de açúcar por duas linhagens, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* spp, compararam a atividade de lacase com a degradação de lignina e afirmaram que qualquer correlação não é clara uma vez que a degradação de lignina só foi significativa após 10 dias de fermentação e que a atividade de lacase só se manifestou mais tarde.

O processo de biodegradação de lignina pelos fungos de degradação branca, inclui um sistema de formação de radicais sobre os monômeros de lignina, onde participam peroxidases, lacases e queladores de metais de baixo peso molecular como glicopeptídios. Assim, lacase e MnP só

oxidam grupos fenólicos livres no entanto LiP é capaz de oxidar diretamente estruturas não fenólicas. Além disso, não só a oxidação determina a biodegradação de lignina como também outros fatores como a natureza química da lignina, os grupos fenólicos presentes, a proporção de siringil a guaiacil, o estado físico do meio de cultura e a acessibilidade aos oxidantes determinados por outros componentes da parede celular (KUREK et alii, 1998). A proximidade da hifa de *Pleurotus eryngii* à parede celular da palha de trigo a ser degradada, tem sugerido que o ataque enzimático implica contato e que as perfurações encontradas na parede celular estariam relacionadas à presença de enzimas, pois na fermentação sólida se observa a perda da arquitetura dos componentes poliméricos da parede celular, o que permite a penetração da enzima aril álcool oxidase, porém a lacase só é capaz de penetrar em paredes celulares altamente degradadas com erosões (BARRASA et alii, 1998). Isto explicaria porque a degradação da lignina só se manifesta depois de passado vários dias de iniciada as atividades das outras enzimas ligninolíticas e porque ORTEGA et alii (1993) não encontraram correlação entre atividade de lacase e degradação de lignina, já que como vemos no processo de degradação de lignina estariam participando as outras enzimas ligninolíticas, que se encarregariam de abrir o caminho para a atuação da lacase, que só se apresenta quando o substrato lignocelulósico está parcialmente degradado.

A cinética da degradação de lignina por *P. ostreatus* é diferente da cinética observada de sua degradação por *P. chrysosporium*; foi observado que o processo de mineralização da  $^{14}\text{C}$ -lignina a  $^{14}\text{CO}_2$  por *P. chrysosporium* é 2,5 vezes mais rápido que em *P. ostreatus* e parece que o processo de degradação de lignina em *P. ostreatus* é dependente de lacase que poderia atuar detoxificando compostos no substrato e oxidando grupos fenólicos como uma enzima de iniciação, envolvida na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos da porção fenólica da lignina. Encontrou-se que a atividade de lacase é alta desde o início da degradação da lignina e foi diminuindo até um nível

estável, enquanto a degradação de lignina permanecia constante o que sugeriu que outras enzimas de natureza oxidativa estariam degradando lignina tal como veratril álcool oxidase que apareceu a partir do 20º dia de fermentação (KEREM et alii, 1992).

A adição de diferentes fontes de carboidratos no meio de cultura sólido com diferentes fungos lignocelulolíticos tem mostrado incrementar o processo de delignificação. Assim ERIKSON & KIRK (citado por ORIARAN et alii, 1989) sugeriram que glicose proveria uma fonte de carboidrato de fácil metabolização para degradar lignina, protegendo as fibras de celulose e hemicelulose da degradação pelos microrganismos. ASIEGBU et alii (1996b) quando adicionaram 10% de farelo de arroz ou concentrados para bois como fonte de carboidrato em meio constituído por serragem de “espruce” (*Picea sitchensis*), para ser degradado por diferentes fungos de maneira independente ou em co-cultivo encontraram que a delignificação se incrementa com a adição destas fontes de carboidratos em *T. versicolor*, *P. chrysosporium* e *P. sajor-caju*; também tem sido indicado que em *T. versicolor* e em outros fungos, a produção de lacase é reprimida pela adição de diferentes açúcares (HAIDER & GRABER, 1967 citados por SCHLOSSER et alii, 1997)

*Bjerkandera adusta* produz LIP, MnP e lacase cujas atividades aumentam à medida que se incrementa gradualmente os níveis de glicose, alcançando seu máximo valor a 20g/L, acima desta concentração as atividades destas enzimas diminui. Parece que quando há baixa concentração de glicose, esta é usada somente para o crescimento microbiano sem produção de enzimas degradadoras e à altas concentrações de glicose parece que parte da via metabólica de produção de enzimas ligninolíticas é inibida (NAKAMURA et alii, 1998).

Neste trabalho observou-se que a produção de AVO e MnP foi estimulada pela adição de melaço no meio de cultura nas duas linhagens/espécies, no entanto LiP e lacase manifestam suas atividades independentes da adição de melaço.

### 5.3 Componentes Estruturais do Bagaço de Cana

Os valores da concentração de celulose (Fig. 11, Apêndice C) quase que não foram modificados, contrastando com o observado por ASIEGBU et alii (1996a) que informaram que *P. sajor-caju* e *T. versicolor* secretam lacase que estimula as atividades de celulasas e  $\beta$ -glicosidases e estas estimulam a depolimerização de celulose; contrastando com as linhagens que não segregam lacase nas quais ocorre repressão das  $\beta$ -glicosidase e endoglucanases. TSANG et alii (1987) reportaram que no processo de fermentação de palha de trigo, por *Pleurotus* spp, perdia-se grande proporção de celulose, hemicelulose e lignina, sendo que a hemicelulose sofria a mais alta perda. STREETER et alii (1982), também encontraram que *P. ostreatus* decompõe mais hemicelulose que os outros componentes estruturais, e que diferentes linhagens de *Pleurotus* fermentando resíduos de cana de açúcar degradavam significativamente todos os componentes estruturais mais especialmente hemicelulose alcançando entre 27% a 74% de degradação (ORTEGA, et alii, 1992). KEWAIRAMANI et alii (1988) observaram que *Pleurotus sajor-caju* cultivado em bagaço de cana degradava mais seletivamente hemicelulose e lignina que celulose; o que concorda com o que foi obtido neste trabalho uma vez que as duas linhagens/espécies estudadas, tanto na presença como na ausência de melaço degradaram hemicelulose entre 22% e 47% sendo o valor mais alto de degradação obtido por P1 sem adição de melaço. BUSWELL et alii (1996) reportaram que a baixa despolimerização de celulose por diferentes cogumelos, entre eles *P. sajor-caju* ao degradar farelo de trigo, deve-se aos altos níveis de açúcares redutores encontrados no meio de cultura. Esta baixa despolimerização de celulose encontrado neste trabalho

poderia influir na digestibilidade do bagaço de cana já que alguns autores observaram que o tratamento de forragens com celulases hidrolíticas aumentavam a disponibilidade de carboidratos solúveis aumentando a digestibilidade no entanto outros autores encontraram que não existe efeito algum sobre a fração fibrosa menos degradável ou matéria orgânica constituinte da parede celular (ASIEGBU, et alii, 1996b).

A perda de lignina revela a característica do gênero *Pleurotus*, apontada em toda a bibliografia consultada, de ser preferencialmente ligninolítico e de fácil adaptação para crescer numa variedade de resíduos agrícolas de diferentes composições. As atividades das enzimas ligninolíticas encontradas neste trabalho estariam correlacionadas com a degradação deste componente recalcitrante da parede celular, provavelmente até chegar a sua completa mineralização ou a repolimerização da mesma como parece ter acontecido com a linhagem/espécie 016 onde se observa que apesar de ter mostrado atividade ligninolítica mostra um incremento dos níveis de lignina durante o processo de fermentação.

Em relação à matéria seca não foi encontrada variação significativa durante o desenvolvimento do experimento. KAMRA & ZADRAZIL (1985) observaram pequena perda da matéria seca durante os primeiros dias depois da inoculação, provavelmente pela utilização de carboidratos solúveis do meio. Após o crescimento primário inicia-se a degradação do complexo lignocelulósico e provavelmente biossíntese de outros componentes.

No meio quando se utilizou a linhagem P1 os níveis de proteína foram incrementados em quase 200% de seu valor original. Vários autores têm registrado um aumento no conteúdo de nitrogênio em substratos fermentados por *Pleurotus* e ORTEGA et alii (1992) encontra um ligeiro balanço positivo de nitrogênio em algumas linhagens de *Pleurotus* sugerindo que este

microrganismo poderia ter a capacidade de fixar nitrogênio. WOOD (1988) reportou que a lacase é responsável por 2% da proteína celular do micélio, e que esta enzima poderia atuar como um reservatório extracelular de nitrogênio.

#### 5.4 Digestibilidade “in vitro” e “in situ”

No estudo de digestibilidade *in vitro* de bagaço de cana tratado com *Polyporus hirsutus* e *Pleurotus sajor-caju* observou-se degradação máxima de lignina e aumento da digestibilidade *in vitro* quando o agente era *P. hirsutus*, mas, o aumento da disponibilidade de nutrientes não poderia ser tão boa como com *P. sajor-caju*, que é uma linhagem/espécie que mostra preferência por degradar hemicelulose e lignina o que aumenta a disponibilidade de nutrientes dos produtos fermentados, mas esta alta degradação de lignina não resultou na melhora da digestibilidade *in vitro*, que poderia ser devido à alta perda de carboidratos em relação à degradação de lignina (KEWAIRAMANI et alii, 1988).

A digestibilidade *in vitro* diminuiu durante os 60 dias do desenvolvimento deste experimento, sendo que a diminuição maior foi observada quando se utilizou a linhagem/espécie 016 (Figura 18, Apêndice D), o que está relacionado ao que foi revelado pela produção de enzimas e pelo desenvolvimento microbiano desta linhagem/espécie. Este trabalho mostrou também que P1 teve uma alta queda da digestibilidade no início dos primeiros 10 dias de fermentação o que concorda com o encontrado KEWAIRAMANI et alii (1986) que explicaram que o bagaço de cana tratado por diferentes fungos mostrou depressão na digestibilidade *in vitro* durante os primeiros 10 dias de fermentação, comparado ao bagaço não tratado, porém a digestibilidade logo aumenta com taxa constante conforme a fermentação avança. Esta queda na digestibilidade do início da fermentação observada em P1 estaria relacionada ao crescimento primário do fungo, que utiliza os carboidratos solúveis do meio; depois do crescimento primário começa a degradação da lignina e celulose e a digestibilidade aumentou

um pouco, mas sempre se observou que a digestibilidade foi menor que a encontrada no tempo zero.

A digestibilidade do FDN é um importante parâmetro de qualidade de um alimento para ruminantes, porque a digestibilidade deste varia amplamente no rúmen o que influencia na performance do desenvolvimento do animal. Mesmo que o gado precise de uma certa quantidade de FDN na sua dieta para máxima produtividade, excesso dietário de FDN limita a ingestão voluntária, devido ao preenchimento físico do rúmen. Então, medidas de digestibilidade da FDN *in vitro* e *in situ* são os melhores indicadores do potencial de uma determinada forragem (OBA & ALLEN, 1999).

Mas, KITESSA et alii (1999) indicaram que a digestibilidade *in vitro* não é uma técnica adequada para predizer a digestibilidade de amostras volumosas e de baixa qualidade nutricional e sim para amostras com alto conteúdo de amido. Isto poderia explicar em parte o desvio padrão alto encontrado nos resultados de digestibilidade *in vitro* que também é influenciado pela qualidade da população microbiana do fluido ruminal usado no procedimento, que já não tiveram mais a capacidade de mudar gradualmente para uma população de espécies altamente fibrolíticas para poder degradar o bagaço de cana de açúcar.

O tratamento de “grama das bermudas” (bermudagrass) com enzimas fibrolíticas não teve nenhum efeito sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca ou sobre a digestibilidade da FDN em 48 horas de incubação. Outros autores têm reportado que o tratamento de gramíneas, leguminosas ou mistura das duas forragens com enzimas fibrolíticas e inoculação com microrganismos produziu efeitos inconsistentes sobre a digestibilidade da matéria seca ou fibra; no entanto outros afirmam que o tratamento da forragem com microrganismos melhora a digestibilidade da matéria seca e do FDN (MANDEBVU et alii, 1999).

Os parâmetros cinéticos da digestão ruminal (*in situ*) da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar tratado com P1 (*Pleurotus ostreatus* "tuiti") por 0, 15, 30 e 45 dias, revela aumento da fração solúvel (A) conforme aumenta os dias de fermentação o que estaria revelando que com a degradação de hemicelulose e lignina, os polissacarídeos do bagaço de cana degradado ficariam expostos ao ataque da flora microbiana do rúmen, paralelamente, o incremento de proteína no meio contribuiriam em elevar o potencial de degradação que se manifestou no seu valor máximo aos 45 dias de fermentação. Por outro lado o resultado dos parâmetros cinético da digestão ruminal da FDN contradiz o obtido com a matéria seca, já que o valor da fração solúvel (A) e do potencial de degradação (DP) aos 15 e 30 dias é semelhante ao do tempo zero de fermentação, caindo a um nível muito baixo em 45 dias. O valor quase estável desde o tempo zero até os 30 dias pode estar influenciado pela presença de sacarose e outros materiais solúveis entre as fibras de bagaço e ao final dos 45 dias só ter fibra insolúvel com baixo potencial de degradação. Este fato explicaria a falta de correlação entre digestibilidade do FDN e o teor de lignina. Diversos autores têm mostrado que compostos fenólicos de baixo peso molecular, tais como vanilina, ácido p-cumárico e ácido ferúlico influenciam inibindo a digestão *in vitro*, deprimindo a adesão microbiana ao substrato, no entanto foi observado que substâncias de baixo peso molecular não interferem na digestibilidade *in situ*, já que elas podem ser utilizadas pela microflora do rúmen ou rapidamente ser difundido através do tracto digestivo (DESCHAMPS et alii, 1996). ASIEGBU et alii (1996) também observaram que não existe correlação entre a aparente redução de lignina com a digestibilidade do substrato serragem de espruce fermentado por *Pleurotus sajor-caju*.

VITTI et alii (1999) comentam que parte do desaparecimento da matéria seca durante a digestibilidade *in situ* de amostras de bagaço de cana irradiado por elétrons, deve-se à perda de finas partículas através dos saquinhos de náilon colocados dentro do rúmen e não à solubilização *per se* e propõem que

a melhor técnica para avaliar o efeito dos tratamentos sobre o bagaço seria a digestibilidade *in vitro* antes que a digestibilidade *in situ*, já que os resultados mostraram perdas substanciais como consequência da redução das partículas tratadas. Fato semelhante pode ter ocorrido neste estudo, já que observou-se que o bagaço tratado por SSF forma um pó bastante fino pela degradação sofrida, mas os tratamentos foram iguais para todos os tempos de fermentação, inclusive para o branco e observou-se que a digestibilidade *in situ* melhorou com o tempo de tratamento. MOLINA et alii (1999) encontraram que a digestibilidade *in situ* da matéria seca de diferentes variedades de cana-de-açúcar integral (caule e folhas), alcançam um valor aproximado 52,6 % semelhante ao obtido com o bagaço de cana fermentado por 45 dias, o que significa que a SSF melhora a qualidade nutricional do bagaço de cana até um nível semelhante à cana-de-açúcar integral.

## 6. CONCLUSÕES

1. As linhagens *Pleurotus* “tiuti” (P1) e *Pleurotus ostreatusroseus* (016) revelaram ter requerimentos metabólicos diferentes, conforme observado no seu crescimento e degradação do bagaço de cana. *P. ostreatus* “tiuti”, utilizou eficientemente bagaço de cana de açúcar como substrato para seu crescimento, apresentando intenso crescimento micelial e produção de enzimas lignocelulolíticas; *P. ostreatusroseus* mostrou um crescimento e produção de enzimas mais baixo;

2. *Pleurotus ostreatus* “tiuti” relacionou-se mais às características do gênero encontradas na literatura em relação a produção enzimática sendo mais hemicelulolítica e lignilítica. No entanto *P. ostreatusroseus* mostrou ter maior atividade celulolítica;

3. Foi encontrado que *P. ostreatus* “tiuti” e *P. ostreatusroseus* produzem lignina peroxidase (LiP) em condições de SSF deste experimento;

4. O melaço de cana adicionado ao meio de SSF estimulou a produção de enzimas lignilíticas (AVO e MnP) e deprimiu a maioria das atividade de enzimas celulolíticas;

5. É necessário um longo período de fermentação (60 dias ou mais) para conseguir maior revelação da atividade das enzimas ligninolíticas;

6. O bagaço de cana submetido a SSF por linhagens de *Pleurotus* spp melhora seu nível de proteína bruta;

7. Os estudos de digestibilidade “in vitro” não revelam uma melhora na digestibilidade do bagaço de cana submetido a SSF por *Pleurotus* spp e não são explicados pelas análises químicas realizadas;

8. A digestibilidade *in situ* revelou que a SSF por *Pleurotus ostreatus* “tiuti”, melhora a digestibilidade da matéria seca do bagaço de cana-de-açúcar;

9. O aumento da digestibilidade da matéria seca revelada pela digestibilidade *in situ*, estaria relacionada ao aumento do nível de proteína e de polissacarídeos expostos, depois da degradação da lignina, mas a diminuição da digestibilidade do FDN encontrada neste trabalho não puderam ser explicadas;

10. O bagaço de cana submetido a SSF por *Pleurotus ostreatus* “tiuti” aumenta seu nível de proteína, mas, não chega aos valores mínimos de manutenção (6%), então pode ser considerado como um material volumoso para alimentação de ruminantes;

11. As fermentações sólida empregando basidiomicetos constituem um ótimo recurso para melhorar a qualidade, não só do bagaço de cana como também de outros subprodutos agro-industriais. *Pleurotus ostreatus* “tiuti” é um fungo com alta performance nesta tarefa. Porém, são necessários outros estudos complementares para definir a razão da baixa digestibilidade *in situ* do FDN e de como aplicar o recurso da SSF em grandes volumes de resíduos lignocelulósicos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- A.O.A.C. Official Methods of Analysis. **Association of Official Analytical Chemists**. 10<sup>th</sup> Edition. Published by the Association of Official Agricultural Chemist. P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington 4, D.C., 1980.
- AGOSIN, E. & ODIER, E. Solid-state fermentation lignin degradation and resulting digestibility of wheat straw fermented by selected white-rot fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **21**: 397 -403, 1985.
- AGOSIN, E.; MONTES, B. & ODIER, E. Structural changes in wheat straw components during decay by lignin - degrading white-rot fungi in relation to improvement of digestibility for ruminants. **J. Sci. Food Agric.**, **36** : 925-35, 1985.
- AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R. A. & KIRK, T.K. Fungal delignification and biomechanical pulping of wood In: ERIKSSON, K.-E. L., ed. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. **Advances in Bioch. Eng. Biotech.**, **57**: 159 – 195, 1997.
- ARGYROPOULOS, D. S. & MENACHEN, S. B. Lignin In: ERIKSSON, K.-E. L., ed. **Biotechnology in the pulp and paper industry. Advances in Bioch. Eng. Biotech.**, **57**: 127 – 157, 1997.
- ASIEGBU, F.O.; PATERSON, A. & SMITH, J.E. Inhibition of cellulose saccharification and glycolignin-attacking enzymes of five lignocellulose-degrading fungi by ferulic acid. **World J. Microbiol. Biotech.**, **12**: 16-21, 1996a.

- ASIEGBU, F.O.; PATERSON, A. & SMITH, J.E. The effects of co-fungal cultures and supplementation with carbohydrate adjuncts on lignin biodegradation and substrates digestibility. . **World J. Microbiol. Biotech.**, **12**: 273-279, 1996b.
- BANO, Z. & RAJARATHNAM, S. Pleurotus mushrooms. Part II. Chemical composition nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. **CRC. Food Sc. Nutr.**, **27**: 87 – 158, 1988.
- BARRASA, J.M.; ESCASO, V.; GUTIÉRREZ, A.; MUÑOZ, C.; MARTÍNEZ, M.J.; MARTINEZ, A.T. TEM localization of aril-alcohol oxidase, lacase and extracellular glucan of *Pleurotus eryngii* during wheat straw degradation under solid state fermentation conditions. **Biotechnol. in the pulp and paper industry**. 7<sup>th</sup> International Conference. Vancouver, B59-B62, 1998.
- BEKKER, E. G. & SINITSYN, A. P. Comparative methods of investigating the action of lignolytic enzymes of lignin. **Appl. Bioch. Microbiol.**, **29**(2):183-90, 1993.
- BISARIA, R. & MADAN, M. Mushrooms: Potencial Protein source from cellulosic residues. **Enzym. Microbiol, Technol.**, **5**: 251-259, 1983.
- BISARIA, R.; MADAN, M. & BISARIA, V. S. Biological efficiency and nutritive value of *Pleurotus sajor caju* cultivated on different agro wastes. **Biol. Wast.**, **19**(4): 239-55, 1987.
- BOOMINATHAN, K. & REDDY, C. A. Fungal Degradation of Lignin: Biotechnological Applications. In: ARORA, D. K.; ELANDER, R. P. & MUKERJI, K.G. eds. **Handbook of Applied Mycology**, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel e Hong Kong; vol. 4, pag. 763 – 822, 1992.

- BORSINI, G. & SCURTI, J.C. La Coltivazione del Fungo Prataiuolo. Ed. Edagricole, Italia. Pag. 19 – 21, 1972.
- BOURBONNAIS, R. & PAICE, M. Oxidation of non-phenolic Substrates: a expanded role for laccase in lignin-biodegradation. **FEBS Lett.**, **267**: 99 – 102, 1990.
- BOURBONNAIS, R. & PAICE, M. Veratryl alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochem. J.**, **255**: 445-50, 1988.
- BRODA, P. Biotechnology en the degradation and utilization of lignocellulose. **Biodegrad.**, **3**: 219-38, 1992.
- BROWN, A. Reviews of lignin in biomass. **J. Appl. Bioch.**, **7**: 371-87, 1985.
- BUSWELL, J. A. & ODIER, E. Lignin Biodegradation. **CRC Crit. Ver. Biotech.**, **6**: 1- 63, 1987.
- BUSWELL, J. A. & ERIKSSON, K.E.L. Effect of lignin-related phenols and their methylated derivatives on the growth of light white-rot fungi. **Worl. J. Microbiol. Biotechnol.**, **10**: 169-74, 1994.
- BUSWELL, J. A. ; CAI, Y. J.; S. T. ; PEBERDY, J.F. FU, S.Y. & YU, S. H Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, **12**: 537-42, 1996.

- CAIELLI, E. L. Case study - Brazil. Sugar cane. In: **Sugar cane as feed**. Edit Sansowey, R., Artes & Preston, T. R., FAO. Pags. 100-5, 1988.
- CARAMELO, L.; MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T. A study of ligninolytic peroxidase in *Pleurotus eryngii* using  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -methylthiobutyric acid and different lignin model compounds. **Biotechnol. in the pulp and paper industry**. 7<sup>th</sup> International Conference. Vancouver, B123-B126, 1998.
- CALZADA, J. F. de LEÓN, R.; de ARRIOLA, M.C. & ROLZ, C. Growth of mushrooms on wheat straw and coffee pulp: strain selection. **Biol. Wast.**, **20**: 217-26, 1987.
- CHAHAL, D. S. Lignocellulosic Wastes: Biological Conversion. In: MARTIN, A. M. eds. **Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products**. Elsevier Science Publishers Ltd., England. Pg. 373 – 400, 1991.
- CHANDER, K. R. & SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: current and future prospects. **Crit. Rev. Biotech.**, **13 (2)**: 151 -172, 1993.
- CHANG, S. T. & MILES, P. G. **Edible mushrooms and their cultivation**. C.R.C. Press., Inc., 1989.
- CLARK, T.; FLINN, P. C. & McGOWAN, A. Low-cost pepsin-cellulose assays for prediction of digestibility of herbage. **Grass Forag. Sci.**, **37**: 147-50, 1982.
- COUGHLAN, M. P. Cellulose Degradation by Fungi. In: FOGARTY W. M. & KELLY, C. T. eds. **Microbial Enzyme and Biotechnology**. Edited by Elsevier Applied Science. London & New York. Pg. 1-36, 1990.

- CUMMINS, K. A.; NOCEK, J. E. ; POLAN, C. E. & HERBEIN, J. H. Nitrogen degradability and microbial protein synthesis in calves fed diets of varying degradability defined the bag technique. **J. Dairy Sci.**, **66** (11): 2356- 2364, 1983.
- DAS, P. & KARIM, M.N. Mass balance and thermodynamic description of solid state fermentation of lignocellulosic by *Pleurotus ostreatus* for animal feed. **J. Ind. Microbiol.**, **15**: 25-31, 1995.
- DESCHAMPS, F.C.; RAMOS, L.P. & FONTANA, J. D. Pretreatment of sugar cane bagasse for enhanced ruminal digestion. **Appl. Biochem. Biotech.**, **57/58**: 171-182, 1996.
- FERNANDEZ, N. Pulp and paper development from sugar cane bagasse. Third International Non – Wood Fiber Pulping and papermaking Conference. Beijing, P.R. China. Internat. Acad. Publish. **Proceeding** (vol 1) October, 15-18, 1996.
- FROST, G.M. & MOSS, D.A. Production of enzymes by fermentation. In: REHN, H.J. & REED, G. **Biotechnology : Enzyme Technology**. Welheim :VCH.vol 7a. Pgs. 65 - 144, 1987.
- FUJITA, M. & HARADA, H. Ultraestructura and formation of wood cell wall. In: HON, D. N. S. & SHIRAISHI, N. **Wood and Cellulosic Chemistry**, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, Pag. 3 - 58, 1991.
- GIARDINA, P.; PALMIERI, G.; CENNAMO, G.; FARACO, V.; FONTANELLA, B.; IACCARINO, M. & SANNIA, G. Protein and gene structure of a blue laccase

from *Pleurotus ostreatus* **Biotechnol. in the pulp and paper industry**. 7<sup>th</sup> International Conference. Vancouver, B191-B194, 1998.

GOLD, M. H. & ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiol.Rev.**, **57** : 605 - 622, 1993.

GUILLEN, F.; MARTÍNEZ, A.T. & MARTÍNEZ, M. J. Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngei*. **Appl. Microbiol.Biotech.**, **32**: 465-69, 1990.

HADAR, Y.; KEREM, Z & GODORECKI, B. Biodegradation of lignocellulosic agricultural waste by *Pleurotus ostreatus*. **J. Biotechnol.**, **30** : 133 - 9, 1993.

HADAR, Y.; KEREM, Z.; GODORECK, B. & AROON, O. Utilization of lignocellulosic waste by the edible mushroom, *Pleurotus*. **Biodegrad.**,**3**: 189-205, 1992.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry : biosynthesis and biodegradation. **Wood. Sci. Technol**, **24**:23-63, 1990.

JAFELICE, L. R. S.; WISEMAN, A. & GOLDFARB, P. Exocelular and intracelular  $\beta$ -glucosidase produced in ligninolytic culture of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochem. Soc. Trans.**, **13**: 644, 1990.

JANSHEKAR, H.; BROWN, C. & FIECHTER, A. Determination biodegraded lignin by ultraviolet spectrofotometry. **Chim. Acta**, **130**: 81-91, 1981.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. **Biodegrad**, **1**: 163-70, 1990.

- KAMRA, D. N. & ZADRAZIL, F. Influence of gaseous phase, light and substrate pretreatment on fruit-body formation, lignin degradation and "in vitro" digestibility of wheat straw fermented with *Pleurotus* spp. **Agricult. Wast.**, **18**: 1-17, 1986.
- KARUNANADAA, K. ; FALES, S. L. ; VARGA, G. A. & ROYSE . D. J. Chemical composition and biodegradability of crop residues colonized by white-rot fungi. **J. Sci. Food Agric.**, **60**: 105-112, 1992.
- KEREM, Z. & HADAR, Y. Chemically defined solid-state fermentation of *Pleurotus ostreatus*. **Enzym. Microbiol. Technol.**, **15**: 785-90, 1993.
- KEREM. Z.; FRIESEM, D. & HADAR, Y. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environm. Microbiol.** **58(4)**: 1121-7, 1992.
- KEWAIRAMANI, N.; KAMRA, D.N.; LALL, D. & PATHAK, N.N. Bioconversion of sugarcane bagasse with white rot fungi. **Biotech. Lett.**, **10**: 369-372, 1988.
- KHANDKE, K. M.; VITHAYATHIL, P. J. & MURTHY, S. K. Purification of xylanase,  $\beta$ -glucosidase, endocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. **Arch. Biochem. Biophys.**, **274**: 491, 1989.
- KIMURA, Y.; ASADA, J. & KUWAHARA, N. Screening of basidiomycetes for lignin peroxidase genes using a DNA probe. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **32**: 436- 42,1990.

- KIRK, K. & OBST, J.R. Lignin determination. In WOOD, W.A. & KELLOGG, S.T. eds. Biomass. Part B : Lignin, pectin and chitin. **Methods. Enzymol.**, **161**: 87-101, 1988.
- KITESSA, S.; FLINN, P. C. & IRISH, G.G. Comparison of methods used to predict the *in vivo* digestibility of feeds in ruminants. **Aust. J. Agric. Res.**, **50**: 825 – 41, 1999.
- KUHAD, R. C.; SINGH, A. & ERIKSSON, K. -E. L. Microorganism and enzyme involved in the degradation of plant Fiber cell walls. In: ERIKSSON, K.-E. L., ed. **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Advanc. Bioch. Eng. Biotech.**, **57**: 45 – 125, 1997.
- KUMARAN, S. SASTRY, C.A. & VIKINESWARY, S. Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. **World. J. Microbiol. Biotech.** **13**: 43 -49, 1997.
- KUWAHARA, M. ; GLENN J.K. ; MORGAN, M. A. & GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from lininolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Lett.**, **169**: 247-50, 1984.
- KUREK, B.; MARTINEZ-INIGO, M.A.; HAMES, B.R.; LEQUART, B.; LAPIERRE, C. & MONTES, B. Structural features of lignin determining its biodegradation *in vitro* and *in situ* by oxidative enzymes and related systems. **Biotechnlog. in the pulp and paper industry. 7<sup>th</sup> International Conference.** Vancouver, B95-B98, 1998.
- LAMPTEY, J.; MOO-YOUNG, M. & ROBINSON, C. W. Pretreatment of Lignocellulosics for bioconversion Applications: Process Options. In: MOO-

- YOUNG, M.; HASNAIN, S. & LAMPTEY, J. eds. - **Biotechnology and Renewable Energy**. Elsevier Applied Science Published, London & New York. Pags. 46 – 56, 1986.
- LINDENFELSER, R.W.; DETROY, R. W.; RAMSTACK, J. & WORDEN, K. A. Biological modification of the lignin and cellulose component of wheat straw by *Pleurotus ostreatus*. **Dev. Ind. Microbiol.**, **20**: 541-51, 1979.
- MADAN, M. & BISARIA , R. Cellulolytic enzymes from an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **Biotechnol. Lett.**, **5(9)**: 601-4, 1983.
- MANDEBVU, P.; WEST, J.W.; FROETSCHER, M.A.; HATFIELD, R.D.; GATES, R.N. & HILL, G.M. Effect of enzyme or microbial treatment of bermudagrass forages before ensiling on cell wall composition, end products of silage fermentation and *in situ* digestion kinetics. **Animal Feed Sc. Technol.**; **77**: 317-329, 1999.
- MASAPHY, S. & LEVANON, D. The effect of lignocellulolytic activity of *Pleurotus pulmonaris* in submerged culture. **Appl. Microbial. Biotechnol.**, **36**: 828-32, 1992.
- MEHREZ, A. Z.; ØRSKOV, E. R. A study of the artificial fibre bag technique of determining the digestibility of feeds in the rumen. **J. Agric. Sci.**, **88** (3): 645 – 650, 1977.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, **31** (3) : 426 – 28, 1959.

- MOLINA, A.; LEAL, P.P.; VERA, N.; MILANES, N.; PEDROSO, D.; TORRES, V.; TRABA, J. & TUERO, O. Evaluación del valor forrajero de variedades industriales de caña de azúcar. Digestibilidad *in situ*. **Rev. Cubana Ciencia Agric.** **33**: 387-392, 1999.
- NAKAMURA, Y.; SAWADA, T.; GODLIVING, M. & KUWAHARA, M. Effects of operational conditions on lignin-degrading enzyme production by white rot basidiomycetes. **Biotechnol. in the pulp and paper industry**. 7<sup>th</sup> International Conference. Vancouver, B127-B130, 1998.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC – NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. Nutrient Requirement of Dairy Cattle revised edition, National Academy Press, Washington, D. C. 1989.
- NICHOLSON, J. W. G. Digestibility, nutritive value and feed intake. In: SUNSTOL, F. & OWEN, eds. **Straw and other fibrous by products as feed**. Edited by Elsevier Science Publishers, Pgs.340- 371, 1984.
- OBA, M. & ALLEN, M.S. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. **J. Dairy Sci.**, **82**: 589-596, 1999.
- OKAMURA, K. Structure of Cellulose. In: HON, D. N. S. & SHIRAISHI, N. **Wood and Cellulosic Chemistry**, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, pag. 89 -111, 1991.
- OLSSON, L. & HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates for Ethanol Production. **Enz. Microb. Tech.**, **18**: 312 – 31, 1996.

- ORIAN, T. P.; LABOSKY, P & ROYSE, D.J. Lignin degradation capabilities of *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Wood Fiber Sc.**, **21**: 183 -192 , 1989.
- ØRSKOV, E. R. ; HOVEL, F. D.; MOULD, F. Uso de la técnica de la bolsa de nylon para la evaluación de los alimentos. **Prod. Anim. Trop.** **5** ( 3) : 213 – 233, 1980.
- ØRSKOV, E. R. ; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **J. Agric. Sci.**, **92** ( 2): 499 – 503, 1979.
- ORTEGA, G. M. ; MARTÍNEZ, E. O. ; BETANCOURT, A. E. ; GONZÁLES, A. E. & OTERO, A. Bioconversion of sugar cane crop residues with white-rot fungi *Pleurotus* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, **8**: 402-5, 1992.
- ORTEGA, G. M.; MARTÍNEZ, E. O.; GONZÁLES, A. E.; BETANCOURT, D. & OTERO, M. A. Enzyme activities and substrate degradation during white rot fungi growth on sugar-cane straw in a solid state fermentation. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, **9**: 210-12, 1993.
- PAI, M.; CALVO, A. M.; TERRÓN, M.C. & GONZÁLES, A. E. Solid state fermentation of sugarcane bagasse with *Flammulina velutipes* and *Trametes versicolor*. **World J. Microbiol. Biotech.** **11**: 541-545, 1995.
- PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; ZOCCHI, I.; SANNIA, G. Manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnol. in the pulp and paper industry**. 7<sup>th</sup> International Conference. Vancouver, B253-B256, 1998.

- PATURAU, J. M. **By-products of the cane sugar industry. An introduction to their industrial utilization.** Elsevier Sc. Publish. Comp. Inc., New York, 1989.
- PLATT, M. W. ; CHET, I. & HENIS, Y. Lignocellulose degradation during growth of the Mushroom *Pleurotus* sp. "Florida" on cotton straw. **Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **13**: 194-5, 1981.
- PLATT, M. W.; HADAR, Y. & CHET, I. Fungal activities involved in lignocellulose degradation by *Pleurotus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **20**: 150 - 54, 1984.
- POMETTO, A. L. & CRAWFORD, D.L. Gas-liquid chromatography of aromatics fragments from lignin degradation. In: WOOD,W.A. & KELLOG, S.T., eds. **Biomass**, part B . Lignin, pectin and chitin, **Method. Enzym.**, **161**: 175-82, 1988.
- POSSENTI. R. A. **Valor Nutritivo do Grão de Milho através da degradabilidade "in situ" e Digestibilidade (aparente) com Ruminantes.** Pirassununga, S.P., 1998, 93pg. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP.
- RAI, R.D. & SAXENA, S Extra cellular enzymes and nonstructural components during growth of *Pleurotus sajor-caju* on rice straw. **Mushr. J. Trop.** **10**: 79 - 73, 1990.
- RAJARATHNAM, S. & BANO, Z. Biological utilization of edible fruiting fungi. In: ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G. & MARTH, H. eds. **Handbook of Applied Mycology.** Vol 3 : **Food and feeds.** Edited by Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong, pg. 241 – 291, 1991.

- RAJARATHNAM, S. & BANO, Z. Pleurotus, Mushrooms. Part I A . Morphology , life cycle taxonomy, breeding and cultivation .**CRC Food Sc. Nutr.**, **26(2)**: 157 –311, 1987.
- RAJARATHNAM, S. & BANO, Z. Pleurotus mushrooms. Part III . Biotransformations of natural lignocellulosic waste: commercial applications and implications. **CRC Food Sc. Nutr.**, **28**: 31-113, 1989.
- REGINATO, V. **Estudo das enzimas produzidas por *Trichoderma longibrachiatum* responsáveis pela degradação de materiais celulósicos**. Tese de Mestrado, Campinas, S. P., 1992. 147 pgs. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- REID, I. A. Solid-state fermentation for biological delignification. **Enzym. Microbiol. Technol.**, **11**: 786-803, 1989.
- RUIZ-DUEÑAS, J.; MARTÍNEZ, M.J. & MARTÍNEZ, T.A. Gene and protein structure of a MnP from *Pleurotus eringii* exhibiting Mn-independent activity on aromatic substrates. **Biotechnol. in the pulp and paper industry**. 7<sup>th</sup> International Conference. Vancouver, B119-B122, 1998.
- SANNIA, G.; LIMONE, P.; COCCA, E.; BUONOCORE, F.; NITTI, G. & GIARDINA, P. Purification and characterization of veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Biochim. Biophys. Acta**, **1073**: 114 -9, 1991.
- SAS. SAS/STAT Users's guide: version 6., 4. ed Cary ,1990.

- SCHLOSSER, D.; GREY, R. & FRITSCH, W. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **47**: 412 - 418, 1997.
- SILVA, D.J. Análise de Alimentos. **Métodos químicos e biológicos**. Impresso na Univ. Federal de Minas Gerais, 1989
- SKLARZ, G. D. ; ANTIBUS, R. K. ; SINSABAUGH, R. L. & LINKINS, A. Production of Fenoloxidasas and Peroxidases by Wood rotting Fungi. **Mycol.**, **81**: 234-40: 1989.
- STREETER, C. L.; CONWAY, K.E.; HORN, G.W. HORN, G.W. & MADER, T.L. Nutritional evaluation of wheat straw incubated with the edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*. **J. Anim. Sci.** **54**: 183-188, 1982.
- SUNNA, A. & ANTRANIKIAN, G. Xilanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotech.**, **17** (1): 39 – 67, 1997.
- SUURNÄKKI, A.; TENKANEN, M.; BUCHERT, J. & VIKARI, L. Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. In: ERIKSSON, K.-E. L., ed. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. **Advances in Bioch. Eng. Biotech.**, **57**:45 – 125,1997.
- TANAHASHI, M. & HIGUCHI, T. Chemical degradation methods for characterization of lignins. In: WOOD. W.A. & KELLOG, S. eds **Methods in Enzymology**. Biomass, part B : lignins, pectins and chitin. Ed. T. vol 161 part B Academic Press. Inc, pg 188, 1988.

- TENGERDY, R. Solid Substrate Fermentation. **Trends Biotech.**,**3(4)**:96-99, 1985.
- TIEN, M. KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete Chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **81**: 2280-84, 1984.
- TILLEY, J.M.A. & TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Br. Grassland Soc.** **18**:104-111, 1963.
- TSANG, L. J.; REID, I. D. & COXWORTH, E. C. Delignification of wheat straw by *Pleurotus* spp. under mushroom growing conditions. **Appl. Environ. Microbiol.** **53**: 1304-1306, 1987.
- VALMASEDA, M.; MARTINEZ, M.J. & MARTINEZ, A.T. Kinetics of wheat straw solid -state fermentation with *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus* lignin and polysaccharides alteration and production of related enzymatic activities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **35**: 817 - 23, 1991.
- VITTI, D.M.S.S.; ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C.; del MASTRO, N. L.; MAURICIO, R.; OWEN, E. & MOULD F. Misleading relationships between *in situ* rumen dry matter disappearance, chemical analyses and *in vitro* gas production and digestibility, of sugarcane bagasse treated with varying levels of electron irradiation and ammonia. **Animal Feed Sc. Tech.** **79**: 145 -153, 1999.

- WALDNER, R.; LEISOLA, M.S.A. & FIECHTER, R. Comparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi. **Appl. Microbiol. Biotech.**, **29**: 400 - 7, 1988.
- WEIL, J.; WETGATE, P.; KOHLMANN, K. & LADISH, M.R. Cellulose, pretreatments of lignocellulosic substrates. **Enzym. Microbiol. Technol.**, **16**: 1002-4, 1994.
- WEILAND, P. Principles of Solid State Fermentation. In: ZADRAZIL, F. & REINIGER, P. eds. **Treatment of Cellulosics with White rot fungi**. Elsevier Applied Sc., London & New York, 1988. Pgs. 64 – 76.
- WOOD, T. M. Preparation of Crystalline, amorphous, and Dyed Cellulose and Hemicellulose. In: WOOD, W.A. & KELLOGG, S.T. eds. Biomass. Part A: Cellulose and Hemicellulose. **Methods. Enzymol.**, **160**: 87-101, 1988.
- ZADRAZIL, F. Screening of fungi for lignin decomposition and conversion of straw into feed. **Angew. Botanik.**, **59**: 433-52, 1985.
- ZADRAZIL, F. & BRUNNERT, H. Investigation of physical parameters important for the solid state fermentation of straw by white rot fungi. **Eurp. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **11**: 183-8, 1981.
- ZADRAZIL, F. Conversion of different plant waste into feed by basidiomycetes. **Eurp. J. Appl. Microbiol. Biotech.**, **9**: 243-48, 1980.

## **8. Apêndice**

# APÊNDICE A Enzimas Celulolíticas e Xilanolítica

## Tabela 1. AVICELASE

Atividade Enzimática: (Glicose µgr/mL/min)					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M vs 016M
0	0,161±0,03	0,276±0,018	0,103±0,024	0,165±0,021	p = 0,169 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,127 N.S.	p=0,037 ≠
5	0,37±0,031	0,514±0,014	0,195±0,064	0,038±0,017					
10	0,26±0,013	0,216±0,065	0,607±0,13	0,0750,087					
15	0,076±0,003	0,036±0,041	0,628±0,20	0,155±0,045	p = 0,887 N.S.	p = 0,827 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,513 N.S.
20	0,694±0,002	0,309±0,150	0,154±0,09	0,221±0,011					
25	0,083±0,001	0,165±0,097	0,219±0,08	0,271±0,029					
30	0,153±0,008	0,329±0,074	0,154±0,24	0,273±0,050	p = 0,06 ≠	p = 0,050 ≠	p=0,827 N.S.	p=0,191 N.S.	p=0,037 ≠
45	0,307±0,03	0,309±0,036	0,278±0,030	0,134±0,038					
60	0,278±	0,329±0,0256	0,293±0,054	0,154±0,042					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,178	N.S.		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p =0,453 N.S.	p=0,757 N.S.	p=0,145 N.S.	0,037 ≠

p ≥ 0,05 Não Signicativo (N.S.); ≠ Existe diferença; ± Desvio Padrão

## Tabela 2. Carboximetilcelulase

Atividade Enzimática (Glicose µgr/mL/mi)					Resultado das Análises Estadística (Análise Estatístico de Kruskal-wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M vs 016M
0	0,012±0,002	0,019±0,007	0,041±0,005	0,148±0,043	p = 0,460 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,513 N.S.
5	0,123±0,09	0,301±0,09	0,068±0,02	0,169±0,098					
10	0,084±0,03	0,035±0,01	0,432±0,08	0,273±0,087					
15	0,056±0,006	0,088±0,02	0,687±0,1	0,362±0,066	p = 0,192 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,275 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,050 N.S.
20	0,379±0,09	0,096±0,03	0,318±0,09	0,189±0,034					
25	0,041±0,008	0,044±0,008	0,192±0,07	0,23±0,012					
30	0,038±0,002	0,058±0,02	0,368±0,09	0,115±0,022	p = 0,0,827 N.S.	p =0,513 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,127 N.S.	p=0,050 ≠
45	0,069±0,03	0,058±0,01	0,398±0,15	0,391±0,21					
60	0,074±0,009	0,044±0,009	0,512±0,12	0,13±0,012					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,002	≠		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p =0,895 N.S.	p=0,022 ≠	p=0,171 N.S.	p=0,003 ≠

P ≥ 0,05 Não Signicativo (N.S.); ≠ Existe diferença ± Desvio Padrão

**Tabela 3. β-Glicosidase**

Atividade Enzimática: (Nitrofenol: µgr/mL/min)					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M v s 016M
0	0,031±0,003	0,012±0,003	0,002±0,003	0,03±0,004	p=0,077 N.S.	p=0,009 ≠	p=0,002 ≠	p=0,050 ≠	p=0,275 N.S.
5	0,063±0,007	0,073±0,003	0,004±0,001	0,030±,0,00					
10	0,04±0,015	0,015±0,002	0,004±0,002	0,108±0,007					
15	0,053±0,022	0,026±0,002	0,020±0,008	0,102±0,008	p = 0,021 ≠	p =0,513 ≠	p=0,050 ≠	p=0,050 ≠	p=0,050 ≠
20	0,061±0,013	0,017±0,009	0,031±0,006	0,147±0,09					
25	0,102±0,018	0,019±0,007	0,037±0,002	0,152±0,07					
30	0,084±0,039	0,059±0,009	0,033±0,001	0,118±0,9	p = 0,019 ≠	p = 0,050 ≠	p=0,050 ≠	p=0,050 ≠	p=0,050 ≠
45	0,107±0,008	0,0390±0,006	0,047±0,009	0,126±0,06					
60	0,083±0,01	0,049±0,002	0,005±0,004	0,09±0,009					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,0,00	N.S.	≠	Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p=0,009 ≠	p=0,002 ≠	p=0,004 ≠	0,004 ≠

p ≥ 0,05 Não Signicativo (N.S.); ≠ Existe diferença ± Desvio Padrão

**Tabela 4. Xilanase**

Atividade Enzimática: (xilana: µgr/mL/min)					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M v s 016M
0	0,004±0,001	0	0,004±0,002	0,014±0,001	p = 0,123 N.S.	p=0,513 N.S.	p = 0,383 N.S.	p=0,275 N.S.	p=0,050 ≠
5	0,016±0,087	0,006±0,005	0,011±0,007	0,032±0,01					
10	0,001±0,009	0,003±0,008	0,027±0,006	0,022±0,01					
15	0,003±0,006	0,004±0,001	0,023±0,008	0,012±0,0004	p = 0,390 N.S.	p = 0,827 N.S.	p=0,127 N.S.	p=0,191 N.S.	p=1,0 N.S.
20	0,006±0,003	0,005±0,004	0,013±0,008	0,004±0,0024					
25	0,009±0,003	0,02±0,01	0,007±0,02	0,007±0,0017					
30	0,004±0,002	0,011±0,009	0,024±0,006	0,003±0,001	p = 0,088 N.S.	p = 0,383 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,050 ≠	p=0,827 N.S.
45	0,014±0,003	0,011±0,008	0,029±0,005	0,017±0,009					
60	0,007±0,021	0,014±0,01	0,025±0,015	0,011±0,001					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,041	≠		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p =0,791 N.S.	p=0,017 ≠	p=0,251 N.S.	0,186 N.S.

p ≥ 0,05 Não Signicativo (N.S.); ≠ Existe diferença; ± Desvio Padrão

## APÊNDICE B Enzima Ligninolíticas

Tabela 5. Álcool Veratril Oxidase (AVO)

Atividade Enzimática: (U/L)					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M v s 016M
0	0,239±0,17	1,882±0,65	0,905±0,24	0,466±0,13	p = 0,119 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,513 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,191 N.S.
5	0,317±0,11	1,452±0,45	0,708±0,17	0,824±0,23					
10	1,135±0,15	6,218±0,69	0,708±0,09	1,882±0,09					
15	1,729±0,0,17	11,397±1,44	0,585±0,13	1,595±0,91	p = 0,079 N.S.	p =0,050 ≠	p=0,513 N.S.	p=0,275 N.S.	p=0,275 N.S.
20	0,457±0,65	2,159±0,9	1,613±0,078	4,355±1,53					
25	0,654±0,15	8,458±0,95	1,828±0,56	4,355±1,02					
30	0,806±0,29	1,666±0,73	4,355±0,93	4,82±0,97	p = 0,054 ≠	p =0,050 ≠	p=0,827 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,050 ≠
45	0,627±0,35	0,878±0,14	0	6,63±1,44					
60	0	1,326±0,96	0	4,695±0,96					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,002	≠		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p =0,002 ≠	p=0,402 N.S.	p=0,031 ≠	p=0,860 N.S.

p ≥ 0,05 Não Signicativo (N.S.); ≠ Existe diferença ± Desvio Padrão

Tabela 6. Lignina Peroxidase (LiP)

Atividade Enzimática: (U/L)					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M v s 016M
0	2,482±0,4	4,193±0,6	1,236±0,12	3,10±0,024	p =0,727 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,513
5	3,473±0,13	10,20,74±0,7	2,076±0,28	3,55±1,55					
10	2,971±0,65	1,547±0,30	4,092±0,30	1,88±0,92					
15	3,22±0,17	4,104±0,0	2,154±0,76	0,215±0,07	p = 0,789 N.S.	p =0,513 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,513 N.S.
20	10,682±0,32	3,91±0,1,35	8,665±2,05	3,073±0,97					
25	1,565±0,15	5,197±0,97	1,508±0,97	9,316±2,34					
30	2,665±0,45	9,519±0,78	10,52±0,2	0,344±0,4	p =0,083 N.S.	p =0,275 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,050 ≠	p=0,275 N.S.
45	1,192±0,36	5,463±0,68	6,83±0,7	3,292±2,33					
60	2,476±0,96	1,236±0,89	13,84±0,9	5,385±2,4					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,411	N.S.		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p =0,123 N.S.	p=0,566 N.S.	p=0,354 N.S.	0,123 N.S.

p ≥ 0,05 Não Signicativo (N.S.); ≠ Existe diferença; ± Desvio Padrão

Tabela 7. Manganês Permanganato (MnP)

Atividade Enzimática: (U/L)					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M v s 016M
0	0,239±0,22	1,882±0,4	0,905±0,23	0,466±0,1	p = 0,119 N.S.	p=0,050 ≠	p= 0,513 N.S.	p=0,827 N.S	p=0,191 N.S
5	0,317±0,13	1,4502±0,2	0,708±0,09	0,824±0,37					
10	1,135±0,07	6,218±0,89	0,708±0,21	1,882±0,45					
15	1,729±0,00	11,39±2,74	0,585±0,078	1,595±0,9	p = 0,079 N.S.	p = 0,050 ≠	p=0,513 N.S.	p=0,275 N.S.	p=0,050 ≠
20	0,457±0,22	2,159±0,98	1,613±0,84	4,355±1,45					
25	0,654±0,09	8,458±1,23	1,828±0,65	4,358±0,25					
30	0,806±0	1,666±0,47	4,355±0,46	4,82±0,79	p = 0,054 ≠	p = 0,050 ≠	p=0,827 N.S	p=0,050 ≠	p=0,050 ≠
45	0,627±0,09	0,878±0,03	0,00	6,63±0,9					
60	0,00±0,0	1,326±0,78	0,00	4,695±2,0					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,002	≠		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p =0,002 ≠	p=0,402 N.S	p=0,031 ≠	p=0,860 N.S.

p ≥ 0,05 Não Signicativo (N.S.); ≠ Existe diferença; ± Desvio Padrão

Tabela 8. Lacase: Siringaldazina

Atividade Enzimática: (U/L)					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M v s 016M
0	1,292±0,1	1,3±0,7	1,247±0,29	1,28±0,087	p =0,814 N.S.	p=0,513 N.S.	p= 0,827 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,827 N.S.
5	1,254±0,28	0,76±0,056	1,854±0,10	2,55±0,208					
10	2,092±0,21	2,39±0,057	2,14±0,37	1,22±0,26					
15	2,673±0,78	2,44±0,29	2,706±0,47	1,188±0,12	p =0,078 N.S.	p = 0,513 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,050 ≠
20	2,57±0,45	3,146±1,31	2,856±0,13	1,164±0,13					
25	2,836±0,76	2,995±0,37	1,465±0,19	1,275±0,10					
30	4,1±0,22	3,86±0,123	1,23±0,47	1,17±0,20	p = 0,910 N.S.	p = 0,827 N.S.	p=0,827 N.S	p=0,275 N.S	p=0,827 N.S.
45	1,39±0,08	1,49±0,042	2,18±0,95	1,442±0,54					
60	0,344±0,22	0,603±0,085	2,869±0,83	1,634±0,34					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,364	N.S.		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p =0,508 N.S.	p=0,825 N.S.	p=0,103 N.S.	p=0,234 N.S.

p ≥ 0,05 Não Signicativo (N.S.); ≠ Existe diferença; ± Desvio Padrão

Tabela 9. Lacase: Dianisidina

Atividade Enzimática: UI/L					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M v s 016M
0	0	0,22±0,3	0,218±0,007	0,202±0,05	p = 0,789 N.S.	p=0,513 N.S.	p= 0,827 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,275 N.S.
5	0,907±0,2	3,63±0,20	3,775±0,20	3,363±0,15					
10	6,608±0,07	4,49±0,32	3,81±0,32	3,767±0,72					
15	4,427±0,38	3,953±0,30	4,28±0,68	3,455±0,56					
20	3,428±0,51	3,971±0,13	3,95±0,023	3,55±0,64	p = 0,155 N.S.	p =0,513 N.S.	p=0,275 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,050 ≠
25	3,371±0,44	3,659±1,04	4,47±0,62	3,327±0,13					
30	3,812±0,054	3,546±0,45	3,225±0,28	3,185±0,64	p = 0,367 N.S.	p = 0,513 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,081 N.S.
45	3,038±0,39	3,25±0,58	3,327±0,076	3,25±0,35					
60	3,04±0,76	3,363±0,52	3,151±0,46	2,95±0,14					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,233	N.S.						
					Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p =0,234 N.S.	p=0,566 N.S.	p=0,217 N.S.	p=0,025 ≠

p ≥ 0,05 Não Significativo (N.S.); ≠ Existe diferença; ± Desvio Padrão

## APÊNDICE C. Análise Químico do Bagaço de Cana

### Tabela 10. Celulose

%					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M v s 016M
0	46,2±0,71	46,2±1,5	46,2±	46,2±1,74	p = 0,155 N.S.	p=0,827 N.S.	p= 0,127 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,127 N.S.
5	49,10,9283±	49,523±0,84	46,256±	47,53±0,18					
10	51,3130,30±	50,307±0,18	47,613±	48,453±0,17					
15	52,326±0,92	50,207±1,35	48,846±	48,607±1,82	p = 0,049 ≠	p = 0,275 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,827 N.S.	p=0,127 N.S.
20	50,493±0,17	51,077±0,37	48,453±	48,823±10,31					
25	52,15±0,24	51,633±0,96	48,805±	50,403±0,98					
30	50,77±0,27	50,583±0,09	48,856±	47,733±2,57	p = 0,320 N.S.	p = 0,513 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,127 N.S.	p=0,275 N.S.
45	50,433±0,054	49,566±0,33	49,943±	48,353±2,19					
60	48,55±0,73	47,796±0,85	49,38±	49,195±0,31					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,007	≠		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p = 0,453 N.S.	p=0,019 ≠	p=0,427 N.S.	p=0,019 ≠

p ≥ 0,05 Não Significativo (N.S.); ≠ Existe diferença; ± Desvio Padrão

### Tabela 11. Hemicelulose\*

%					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M v s 016M
0	31,752	31,752	31,752	31,752	p = 0,740 N.S.	p= 0,663 N.S.	p= 0,827 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,383 N.S.
5	29,792	28,277	32,07	30,763					
10	25,714	25,103	29,71	28,757					
15	23,564	26,563	28,403	29,687	p = 0,054 ≠	p = 0,513 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,513 N.S.	p=0,127 N.S.
20	23,83	25,236	26,736	33,083					
25	23,503	23,113	27,475	25,86					
30	22,004	22,597	25,567	25,44	p = 0,121 N.S.	p = 0,827 N.S.	p=0,375 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,050 ≠
45	29,874	22,494	26,877	25,277					
60	16,702	20,85±	31,757	24,67±					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,033	≠		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p = 0,791 N.S.	p=0,064 ≠	p=0,48 N.S.	P=0,043 ≠

\*Hemicelulose foi obtida pela diferença de medias de FDN e FDA,, p ≥ 0,05 N.S.= Não Significativo  
≠ Existe diferença Significativa; ± Desvio Padrão

Tabela 12. Lignina

%					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M vs 016M
0	10,20±0,49	10,20±0,43	10,20±0,024	10,20±0,23	p = 0,155 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,127 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,275 N.S.
5	10,97±0,31	10,78±0,33	10,63±1,65	10,13±0,37					
10	10,98±1,04	10,87±0,31	10,36±0,45	10,86±1,44					
15	10,48±0,05	10,20±0,39	10,58±0,7	11,21±0,35	p = 0,083 N.S.	p = 0,275 N.S.	p=0,050 =	p=0,275 N.S.	p=0,127 N.S.
20	9,8±0,36	9,49±0,31	12,38±0,11	11,76±0,33					
25	9,93±0,46	8,88±1,57	12,41±0,66	11,50±1,8					
30	9,49±0,27	8,58±0,05	13,16±6,79	12,91±0,19	p = 0,027 =	p = 0,275 N.S.	p=0,050 =	p=0,827 N.S.	p=0,050 =
45	8,68±0,07	9,37±0,17	12,82±0,05	12,81±0,41					
60	8,71±0,22	8,27±0,36	11,52±3,11	12,55±0,41					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,011	≠		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p =0,508 N.S.	p=0,025 ≠	p=0,825 N.S.	0,012 ≠

p ≥ 0,05 Não Significativo (N.S.); ≠ Existe diferença; ± Desvio Padrão

Tabela 13. Matéria Seca

%					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M vs 016M
0	93,83±0,073	93,83±0,26	93,83±0,07	93,82±0,11	p = 0,340 N.S.	p=0,127 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,275 ≠
5	93,23±0,05	92,96±0,07	93,50±0,06	93,0±0,05					
10	93,35±0,035	92,87±0,10	93,27±0,159	93,28±0,19					
15	93,40±0,09	92,83±0,10	93,18±0,10	93,19±0,11	p = 0,085 N.S.	p = 0,050 ≠	p=0,663 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,050 ≠
20	93,17±0,38	92,71±0,11	93,40±0,19	93,48±0,17					
25	93,07±0,14	92,81±0,19	93,68±0,028	93,90±0,21					
30	92,70±0,12	92,39±0,24	93,88±0,095	93,58±0,16	p = 0,035 ≠	p = 0,827 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,275 N.S.	p=0,050 ≠
45	92,48±0,098	92,56±0,06	94,13±0,036	93,50±0,24					
60	92,33±0,11	92,35±0,11	93,17±0,113	93,07±0,09					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,004	≠		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p =0,145 N.S.	p=0,158 N.S.	p=0,596 N.S.	p=0,001 ≠

p ≥ 0,05 Não Significativo (N.S.); ≠ Existe diferença; ± Desvio Padrão

Tabela 14. Proteína Bruta

%					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M v s 016M
0	1,62±0,18	1,62±0,1	1,62±0,095	1,62±0,23	p = 0,402 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,127 N.S.	p=0,663 N.S.	p=0,513 N.S.
5	1,97±0,09	1,92±0,06	1,70±0,27	1,82±0,20					
10	1,98±0,05	2,04±0,05	1,80±0,15	1,67±0,27					
15	2,02±1,15	2,30±0,19	2,07±0,05	2,00±0,25	p = 0,313 N.S.	p = 0,827 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,127 N.S.	p=0,513 N.S.
20	2,32±0,08	2,22±0,99	1,90±0,11	2,21±0,19					
25	2,18±0,09	2,16±0,15	1,960,042	2,24±0,03					
30	2,59±0,026	2,42±0,07	2,03±0,075	2,25±0,05	p = 0,031 ≠	p = 0,513 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,050 ≠	p=0,127 N.S.
45	2,82±0,081	2,67±0,08	2,14±0,242	2,58±0,40					
60	3,37±0,21	3,28±0,24	2,08±0,12	2,30±1,13					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,189	N.S.		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p = 0,965 N.S.	p=0,123 N.S.	p=0,186 N.S.	p=0,427 N.S.

p ≥ 0,05 Não Significativo (N.S.); ≠ Existe diferença; ± Desvio Padrão

Tabela 15. Fibra Detergente Neutro (FDN)

%					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M v s 016M
0	88,44±1,56	88,44±0,89	88,44±0,53	88,44±0,81	p = 0,679 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,275 N.S.	p=0,827 N.S.
5	90,23±0,53	89,10,615±	89,04±0,36	88,86±0,90					
10	88,30±1,29	87,16±0,28	88,40±0,41	88,68±0,30					
15	87,05±1,76	87,12±0,46	88,72±0,81	88,66±0,75	p = 0,085 N.S.	p = 0,827 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,275 N.S.	p=0,127 N.S.
20	84,86±1,61	85,37±0,63	88,40±0,64	88,64±0,37					
25	86,16±0,18	84,45±0,46	89,55±0,50	85,38±7,27					
30	83,17±0,67	82,78±0,44	88,59±0,57	88,70±0,27	p = 0,038 ≠	p = 0,827 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,513 ≠	P0,050 ≠
45	81,21±0,58	82,34±2,82	90,35±0,73	88,04±1,026					
60	80,04±0,30	78,00±0,92	93,45±0,93	89,77±0,58					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,002	≠		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p = 0,825 N.S.	p=0,007 ≠	p=0,251 N.S.	p=0,012 ≠

p ≥ 0,05 Não Significativo (N.S.); ≠ Existe diferença; ± Desvio Padrão

Tabela 16. Fibra Detergente Ácido (FDA)

%					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M vs 016M
0	56,69±1,25	56,69±1,73	56,69±0,47	56,69±1,75	p = 0,219 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,127 N.S.	p=0,827 N.S.	p=0,127 N.S.
5	60,44±0,62	60,87±1,00	56,97±1,198	58,1±0,74					
10	62,58±1,06	62,06±0,168	58,70±0,17	59,92±1,47					
15	63,48±0,96	60,56±0,95	60,32±0,33	58,97±2,1	p = 0,045 ≠	p = 0,127 N.S.	p=0,275 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,050 ≠
20	61,03±0,64	60,14±2,02	61,67±0,20	58,56±10,12					
25	62,66±0,59	61,34±0,97	62,07±0,81	59,52±1,63					
30	61,16±0,27	60,18±0,135	63,02±0,58	63,26±0,77	p = 0,038 N.S.	p = 0,050 ≠	p=0,275 N.S.	p=0,127 N.S.	p=0,050 ≠
45	60,33±0,097	59,84±0,39	63,47±0,64	63,67±0,66					
60	63,33±0,26	57,15±0,41	61,69±1,75	65,10±0,67					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,443	N.S.		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p = 0,071 N.S.	p=0,453 N.S.	p=0,757 N.S.	p=0,627 N.S.

p ≥ 0,05 Não Significativo (N.S.); ≠ Existe diferença; ± Desvio Padrão

# APÊNDICE D Estudo de Digestibilidade

## Tabela 17. Digestibilidade *in vitro* da Matéria Seca

%					Resultado das Análises Estatístico (Análise Não-paramétrico de Kruskal-Wallis)				
Dias de Fermentação	P1	P1M	016	016M	Comparação por blocos de tempo entre os tratamentos	Comparação entre Tratamentos			
						P1vsP1M	P1vs016	016 vs 016M	P1M vs 016M
0	33,43±1,08	44,50±0	44,93±1,19	46,33±1,5	p = 0,516 N.S.	p=0,127 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,513 N.S.	p=0,827 N.S.
5	20,00±0,94	44,50±1,67	40,11±2,17	40,34±3,46					
10	21,76±3,95	27,87±1,48	16,73±1,05	21,42±0,51					
15	20,72±1,73	32,87±5,81	16,75±1,12	17,33±1,28	p =0,025 ≠	p =0,050 ≠	p=0,050 ≠	p=0,827 N.S.	p=0,050 ≠
20	28,34±1,41	32,14±1,31	9,20±0,37	11,65±2,41					
25	24,20±2,24	33,13±1,64	8,76±2,19	8,61±0,26					
30	21,24±1,37	27,90±4,83	14,77±1,57	12,85±1,42	p =0,027 ≠	p =0,275 N.S.	p=0,050 ≠	p=0,127 N.S.	p=0,050 ≠
45	28,20±1,12	29,08±1,44	13,14±1,9	7,92±7,25					
60	25,94±0,82	27,16±1,01	10,83±1,71	5,50±0,12					
Comparação entre os 4 tratamentos no total de tempo	p =	0,017	≠		Comparação Geral entre dupla de Tratamentos no Total do Tempo	p =0,015 ≠	p=0,047 ≠	p=0,757 N.S.	p=0,031 ≠

p ≥ 0,05 Não Significativo (N.S.); ≠ Existe diferença

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**Tabela 18. Cinética da Digestibilidade *in situ* (%) da Matéria Seca**

Horas de Digestão	Tempo de SSF				
	Branco	Zero dias	15 dias	30 dias	45 dias
0	2,49	3,2	3,3	3,31	6,58
6	7,04	6,86	9,88	9,03	11,23
24	13,39	17,22	19,9	21,48	27,69
48	27,11	36,39	30,66	29,84	36,82
72	37,66	43,38	36,24	33,97	46,54
96	39,71	44,34	42,91	41,30	50,15

**Tabela 19. Cinética da Digestibilidade *in situ* (%) do FDN**

Horas de Digestão	Tempo de SSF				
	Branco	Zero dias	15 dias	30 dias	45 dias
0	2,96	3,22	3,37	3,78	0,81
6	9,68	6,92	6,88	5,72	3,42
24	16,62	17,21	17,27	14,66	17,63
48	30,24	35,59	28,19	25,26	28,52
72	40,22	43,84	35,12	28,58	38,92
96	43,89	44,7	41,55	38,75	43,34