



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**MÁRCIA JAQUELINE MENDONÇA MACIEL**

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES LIGNOCELULOLÍTICOS E PRODUÇÃO DE  
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**MANAUS – AM**

**2016**

**MÁRCIA JAQUELINE MENDONÇA MACIEL**

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES LIGNOCELULOLÍTICOS E PRODUÇÃO DE  
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio**

**MANAUS – AM**

**2016**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M152c Maciel, Márcia Jaqueline Mendonça  
Caracterização de genes lignocelulolíticos e produção de etanol de segunda geração / Márcia Jaqueline Mendonça Maciel. 2016  
70 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Rudi Emerson de Lima Procópio  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Leveduras. 2. Bagaço de cana-de-açúcar. 3. Enzimas lignocelulolíticas. 4. Basidiomicetos. I. Procópio, Rudi Emerson de Lima II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

"A essência da vida é andar para frente,  
sem possibilidade de fazer ou intentar marcha ré.  
Na realidade, a vida é uma rua de sentido único."  
Agatha Christie

## AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o suporte e amor incondicional, minha mãe, meu pai e irmãs, por sempre acreditarem em meu potencial fazendo o possível para me ajudar a alcançar meus objetivos. Em especial ao meu marido Daniel que acompanha toda a minha vida acadêmica e me dá o suporte e amor para que eu continue.

Ao Prof. Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio por sua confiança e orientação na pesquisa, e pela dedicação sempre presente nesta jornada.

À Prof. Dra. Helena Camarão Telles Ribeiro pela amizade, e mesmo de longe demonstrou apoio incondicional.

Aos colegas de laboratório do CBA que me receberam de bom grado e muito me ajudaram no andamento da pesquisa.

À amiga Dolores Fonseca que me ajudou cedendo gentilmente os fungos, e ao amigo Andrey Damasceno que sempre estava disponível para ajudar e trocar ideias.

Às minhas amigas Gabriela, Sarah, Isabel, Ticianne e Séfora pela amizade e apoio sempre presentes.

À Universidade do Estado do Amazonas por me deixar retornar aos laboratórios para realizar parte da pesquisa.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia por ceder os laboratórios para a execução de grande parte deste trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas pela minha formação desde a graduação, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e ao corpo docente pelos conhecimentos compartilhados.

À banca por se dispor a avaliar e contribuir com esta tese.

Obrigada!

## RESUMO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e chega a produzir toneladas por ano, e cada tonelada gera aproximadamente 140 kg de bagaço no processo. Parte deste bagaço é queimado para gerar energia elétrica nas usinas. O excesso deste resíduo causa problemas ambientais e de armazenamento. O bagaço de cana-de-açúcar pode ser uma das matérias-primas para a produção do etanol de segunda geração, devido à sua disponibilidade e composição lignocelulósica. O uso deste resíduo necessita de pré-tratamento para que sua estrutura seja quebrada e a celulose, e a hemicelulose fiquem expostas para fermentação. Para transformar os açúcares em etanol é necessária a seleção apropriada de leveduras. As enzimas lignocelulolíticas são as mais eficientes em degradar madeira e materiais lignocelulósicos dentre elas: lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, todas produzidas por fungos basidiomicetos. Assim, este trabalho teve como objetivo verificar a produção de etanol por leveduras selvagens isoladas de animais ruminantes e verificar os genes das enzimas lignocelulósicas de fungos basidiomicetos para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Para avaliar a capacidade fermentativa das leveduras CBA-524 e CBA-519 e *Pichia stipitis* CBS6054, foram inoculadas primeiro em meios sintéticos contendo D-xilose e D-glicose, e depois em meio hidrolisado de bagaço de cana de açúcar, produzido pela hidrólise ácida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1%. A levedura CBA-524 foi identificada como *Meyerozyma guilliermondi* e CBA-519 como *Pichia kudriavzevii*, e produziram 3,01 g/L e 3,05 g/L etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana respectivamente. As leveduras identificadas mostraram uma boa produção de bioetanol de segunda geração. Os fungos basidiomicetos *Hexagonia glabra*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes sp.* e *Pleurotus sp.* tiveram seus genes produtores de enzimas lignocelulolíticas sequenciados e comparados no GenBank. Os quatro fungos (*Hexagonia glabra* UEA, *Pycnoporus sanguineus* UEA, *Trametes sp* UEA e *Pleurotus sp* UEA) amplificaram o gene de lacase, mas com baixa similaridade. Foi possível identificar dois genes de lignina peroxidase nos fungos *Trametes sp* UEA *Pleurotus sp* UEA.

Palavras-chave: Leveduras; Bagaço de cana-de-açúcar; Enzimas lignocelulolíticas; Basidiomicetos.

## ABSTRACT

Brazil is the largest producer of sugarcane in the world and produces up to tons per year, and each ton produces approximately 140 kg of bagasse in the process. Part of this bagasse is burned to generate electricity in power plants. The excess of this waste causes environmental and storage problems. Bagasse of sugarcane can be a raw material of second generation ethanol, due to its availability and lignocellulosic composition. The use of this residue needs to pre-treatment so that their structure need to be broken and the cellulose, hemicellulose and lignin are exposed to hydrolysis, and the sugars available for fermentation. lignocellulosic enzymes are the most efficient in degrading wood and lignocellulosic materials, among them: laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase, all produced by fungi basidiomycetes. This work aimed to verify the production of ethanol by wild yeast taken from ruminant animals and verify the genes of lignocellulosic enzymes of fungi basidiomycetes for the hydrolysis of sugarcane bagasse. To evaluate the fermentative capacity of the CBA-524 yeast and CBA-519 and *Pichia stipitis*, they were first inoculated in synthetic media containing D-xylose and D-glucose, and then hydrolyzed through sugarcane bagasse, produced by acid hydrolysis 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The basidiomycete fungi *Hexagonia glabra*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes sp.* and *Pleurotus sp.* had their lignocellulosic enzymes genes sequenced and compared in GenBank. The CBA-524 and CBA-519 yeasts were identified as *Meyerozyma guilliermondii* and *Pichia kudriavzevii*, respectively, they produced ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate. The four fungi (*Hexagonia glabra* UEA, *Pycnoporus sanguineus* UEA, *Trametes sp.* UEA and *Pleurotus sp.* UEA) amplified the laccase gene, but with low similarity. The identified yeasts showed good production of second generation bioethanol.

Keywords: Yeasts; Sugarcane bagasse; Lignocellulosic enzymes; Basidiomycetes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Fluxograma da produção de açúcar e etanol de cana	19
<b>Figura 02.</b> Estrutura da madeira	20
<b>Figura 03.</b> Placa contendo o fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	29
<b>Figura 04.</b> Fungos após 7 dias de crescimento sob agitação	30
<b>Figura 05.</b> Amplificação dos genes de Lacase, Manganês peroxidase e Lignina peroxidase, de basidiomicetos <i>Hexagonia glabra</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Trametes sp</i> e <i>Pleurotus sp</i> .	35
<b>Figura 06.</b> Árvore filogenética contendo 10 sequências do GenBank e os dois fungos amplificados <i>Trametes sp</i> UEA e <i>Pleurotus sp</i> UEA, o dendograma gerado utilizando o CLC Sequence Viewer 7.	36
<b>Figura 07.</b> Árvore filogenética contendo 10 sequências do gene da lacase obtidas do GenBank e os quatro fungos amplificados ( <i>Hexagonia glabra</i> UEA, <i>Pycnoporus sanguineus</i> UEA, <i>Trametes sp</i> UEA e <i>Pleurotus sp</i> UEA), o dendograma gerado utilizando o CLC Sequence Viewer 7.	39
<b>Figura 08.</b> Alinhamento das 10 sequências de lacase do GeneBank com maior similaridade as dos fungos <i>Hexagonia glabra</i> UEA, <i>Pycnoporus sanguineus</i> UEA, <i>Trametes sp</i> UEA e <i>Pleurotus sp</i> UEA, utilizando o CLC Sequence Viewer 7.	39
<b>Figura 09.</b> Árvore filogenética contendo as sequências das leveduras CBA-524 CBA-519 e sequências de linhagens depositadas no NCBI.	42
<b>Figura 10.</b> Média da produção de álcool por leveduras em meio de D-xilose e D-glucose	44
<b>Figura 11.</b> Produção de álcool por <i>Pichia stipitis</i> em meio hidrolisado no fermentador	44
<b>Figura 12.</b> Produção de álcool por <i>Pichia kudriavzevii</i> em meio hidrolisado no fermentador	45
<b>Figura 13.</b> Produção de álcool por <i>Meyerozyma guilliermondii</i> em meio hidrolisado no fermentador	46
<b>Figura 14.</b> Etanol produzido por <i>Pichia stipitis</i> coletada a cada 24 horas de fermentação	49
<b>Figura 15.</b> Etanol produzido por <i>Pichia kudriavzevii</i> coletada a cada 24 horas de fermentação	50
<b>Figura 16.</b> Etanol produzido por <i>Meyerozyma guilliermondii</i> coletada a cada 24 horas de fermentação	51



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Composição Média do Bagaço de Cana-de-Açúcar	18
<b>Tabela 02.</b> Enzimas ligninolíticas produzidas por fungos de podridão branca mostrando o EC (Enzyme Commission Numbers), esquema de classificação numérica das enzimas, as reações que catalisam e os respectivos fungos.	24
<b>Tabela 03.</b> Primers utilizados para amplificar os genes das enzimas lignocelulolíticas	31
<b>Tabela 04.</b> Efeito de sacarificação e co-fermentação de açúcar residual durante a produção de etanol utilizando diferentes leveduras.	47
<b>Tabela 05.</b> Comparação da produção de etanol utilizando leveduras recentemente isoladas e a <i>P. stipitis</i> CBS6054.	52

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 01.** Gene de lignina peroxidase de *T. versicolor* (Coriolus) 495278 com maior similaridade encontrada no GenBank e as duas sequencias obtidas abaixo. 37
- Quadro 02.** Gene de lacase de *Coriolus versicolor* 2598856 com maior similaridade encontrado no GenBank, região conservada e utilizada para identificação, esta sublinhada. 40

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
REVISÃO DE LITERATURA .....	16
História do etanol no Brasil .....	16
Industrialização da cana-de-açúcar .....	16
Proálcool .....	17
O etanol como combustível .....	18
Cana de açúcar no futuro da matriz energética.....	19
Materiais lignocelulósicos .....	21
Enzimas.....	24
Lacase .....	26
Lignina Peroxidase - LiP .....	27
Manganês Peroxidase - MnP .....	27
Aplicações Biotecnológicas .....	28
OBJETIVOS.....	30
Objetivo geral .....	30
Objetivos específicos .....	30
MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
Repicagem dos fungos .....	31
Extração de DNA.....	31
Amplificação e sequenciamento dos genes .....	32
Leveduras utilizadas na fermentação .....	33
Identificação molecular .....	33
Meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar .....	34
Método de quantificação de açúcar redutor .....	34
Verificação da produção de álcool no destilador eletrônico .....	35

Produção e quantificação de etanol .....	35
Crescimento das leveduras.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
Lignina peroxidase.....	37
Lacase .....	40
Produção de etanol de segunda geração.....	43
Identificação molecular das leveduras .....	43
Crescimento das leveduras.....	44
Produção de álcool em D-glicose e D-xilose .....	44
Produção de álcool em meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar .....	45
Cromatografia líquida de alta eficiência .....	49
CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS .....	57



## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e conta com 15,7 % de oferta energética no país (ÚNICA, 2016). O etanol é utilizado principalmente junto à gasolina para suprir a demanda dos automóveis, principalmente depois da criação dos carros flex, que utilizam os dois combustíveis.

A busca por novas fontes de energia menos dependentes de petróleo é necessária para o desenvolvimento de processos alternativos, que empregam fontes de energia sustentáveis e materiais renováveis, sendo que uma delas o bagaço da cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar é utilizada no Brasil desde a época da colonização e é o principal produto agrícola brasileiro. Da sua industrialização tem-se diversos produtos como: o álcool, o açúcar, o vinhoto e o bagaço (LIMA et al., 2001). O bagaço de cana-de-açúcar, é um resíduo gerado pela produção de etanol, é considerada uma matéria-prima lignocelulósica, que é usada para a geração de energia na própria linha de produção, e apesar disso ainda há excedente ao final do processo (SANTOS et al., 2012). Após a retirada da sacarose, o bagaço ainda possui matéria orgânica, composta em sua maior parte por celulose, cerca de 30%, seguida de hemicelulose e lignina (CARVALHO et al., 2006). O álcool obtido a partir de bagaço do cana-de-açúcar é chamado de etanol de segunda geração ou etanol lignocelulósico, onde a produção de etanol da lignocelulose é feita com tecnologias ainda em fase de aperfeiçoamento (PACHECO, 2011).

O material lignocelulósico depende de metodologias específicas para ser aproveitado, sendo elas químicas ou enzimáticas (GOMES et al., 2015). Dentre as metodologias, a enzimática ainda está em fase de aperfeiçoamento e consiste no uso de micro-organismos específicos que possam gerar enzimas com maior eficiência degradativa. As enzimas lignocelulósicas podem ser encontradas em micro-organismos que se desenvolvem em materiais lignocelulósicos em decomposição e em animais ruminantes, que se alimentam de matéria vegetal (CASSA-BARBOSA et al., 2015).

Os principais micro-organismos utilizados na produção industrial de etanol são as leveduras e as bactérias, sendo a *Saccharomyces cerevisiae*, e a *Zymomonas mobilis* as mais eficientes produtoras descritas (SANTOS et al., 2012; CHI e AMEBORY, 2000). Apesar da alta taxa de conversão de açúcar em etanol, *S. cerevisiae* não é capaz de utilizar a celulose, sendo a levedura mais usada para este fim a *Pichia stipitis* (ARSLAN; EKEN-SARACOGLU, 2010). Os fungos basidiomicetos, que são excelentes produtores de enzimas lignocelulósicas, podem ser usados na degradação do

complexo lignocelulósico do bagaço de cana-de-açúcar (POMPEU, 2010), mas a sua taxa de conversão em etanol é muito pequena.

O processo de hidrólise enzimática do bagaço é uma etapa a ser alcançada, e para que seja mais facilmente fermentado pelas leveduras e seu produto alcançado, novas enzimas devem ser buscadas. Os fungos do filo Basidiomycota atuam na deterioração da madeira, decompondo a matéria orgânica, dinamizando a ciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres (TUOMELA et al., 2000), por isso são excelentes candidatos a fornecer novas enzimas a serem utilizadas no processo de conversão de material lignocelulósico em etanol.

A investigação de novas cepas microbianas é necessária ao processo de produção do etanol, sendo assim este trabalho teve como objetivo verificar a produção de etanol por leveduras selvagens retiradas de animais ruminantes e verificar os genes das enzimas lignocelulósicas de fungos basidiomicetos que poderão ajudar na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

## REVISÃO DE LITERATURA

### **História do etanol no Brasil**

Na antiguidade já se tem notícias sobre a cana-de-açúcar: na Nova Guiné (HORII, 2004) o homem teve o primeiro contato com a planta, depois ela foi para a Índia, onde consta no “Atharvaveda”, o livro dos vedas, além disso, a palavra açúcar vem de “shakkar”, em sânscrito, língua antiga da Índia (UDOP, 2016; OLIMPIO, 2014). O Ocidente teve contato com a cana-de-açúcar na época das cruzadas, depois houve o início de seu cultivo no Egito, pelos árabes, dando origem ao caldo clarificado da planta e o processamento considerado muito moderno para a época (UDOP, 2016). No século XV os portugueses e espanhóis introduziram as mudas em diversas colônias, na América têm-se relatos de que foram trazidas por Cristóvão Colombo (HUMBERT, 1968).

Biomassa foi a fonte dominante de energia desde o início da civilização, sucede que a biomassa é no fundo uma forma de energia solar, e, portanto renovável em contraste com os combustíveis fósseis. Nenhuma outra tecnologia teve até agora tanto sucesso quanto a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar no Brasil. Etanol é um excelente substituto da gasolina e o trabalho pioneiro realizado no país nesta área desde o início do século XX – e, sobretudo depois de 1975- comprova amplamente a excelência dessa rota tecnológica (GOLDEMBERG, 2009).

### **Industrialização da cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar é conhecida há quase 500 anos como matéria-prima do açúcar e do álcool, e desde a evolução dos automóveis que utilizam etanol, este combustível tem sido produzido cada vez mais, no Brasil é produzido em larga escala competindo com combustíveis fósseis (SOUZA et al., 2014). A cana-de-açúcar é o principal tipo de biomassa energética por causa de seus números representados pela produção no país e pelas mais de 350 indústrias de açúcar e álcool, e com cerca de 1 milhão de empregos em todo o Brasil (CONAB, 2016). As indústrias do setor sucroalcooleiro, desde a sua implantação, desenvolveram instalações próprias para geração de energia, reduzindo a dependência de fontes externas de termoeletricas e hidrelétricas, devido a problemas



como, custo e inconsistência na distribuição. Forçando o aproveitamento de resíduos para geração de energia, no qual bagaço resultante da etapa de moagem, serve como combustível para as usinas, sendo transportado em esteiras para sua queima e geração de energia (DANTAS, 2009).

O etanol conhecido como sendo de primeira geração é aquele produzido a partir do açúcar e já está com o processo bem consolidado, o etanol de segunda geração aproveita materiais ou resíduos lignocelulósicos. Mesmo com a grande oferta de matéria-prima algumas questões tem que ser levadas em consideração, como: preços de matéria-prima e abastecimento, produção de alimentos, área agrícola, água usada no processo, uso de insumos agrícolas, entre outros fatores (KUMAR; MURTHY, 2011).

Com a industrialização da cana-de-açúcar se obtém como produtos o açúcar, o álcool, o vinhoto e o bagaço. A agricultura, como parte de seu processo, também produz centenas de toneladas de resíduos lignocelulósicos, e no Brasil temos como abundante resíduo, o bagaço de cana-de-açúcar. (BRASIL, 2011). Quando comparado com outros resíduos, o bagaço oferece algumas vantagens, pois após sua hidrólise ele oferece uma grande quantidade de pentoses tais como xilose e arabinose (HERNANDEZ-SALAS et al., 2009). O bagaço de cana-de-açúcar é uma fonte para produção de etanol de segunda geração, e por ser um aproveitamento de resíduos e não competir com outras culturas, não há a redução da oferta de alimentos.

## **Proálcool**

O Proálcool, Programa Nacional do Álcool, é o maior programa comercial de utilização de biomassa para produção de energia no mundo. Esse programa foi responsável por expandir a cultura de cana-de-açúcar no Brasil. Foi uma iniciativa de grande sucesso mundial, na substituição de derivados de petróleo no setor automotivo, mediante o uso do álcool como combustível único nos veículos movidos à álcool hidratado. Além disso, o etanol de primeira geração da cana-de-açúcar e de milho tem processos bem estabelecidos atualmente, mas o processamento do milho tem mais etapas devido às características do grão (amido) e custo mais elevado de produção (PRUDENTE et al., 2010; FERREIRA-LEITÃO et al., 2010).

Em 1975, numa tentativa de amenizar o problema energético, o Proálcool foi criado pelo governo brasileiro com o objetivo de reduzir a importação de petróleo. Naquela época o mundo vivia o primeiro choque do petróleo. O Brasil comprava 80%

do petróleo consumido e com a alta de preços entre 1973 e 1974, o país teve que enfrentar o crescimento da importação que passou de US\$ 600 milhões para mais de US\$ 22 bilhões (CENBIO, 2016). A baixa dos preços do petróleo tornou o álcool pouco competitivo, exigindo subsídios para a manutenção do programa. O álcool tem sido reconhecido na comunidade internacional como uma das possíveis soluções aos problemas ambientais, e como um dos melhores candidatos a ser apoiados com políticas de financiamento (Mecanismos de Desenvolvimento Limpo - MDL), segundo o estabelecido no Protocolo de Quioto (PROÁLCOOL – MCT).

### **O etanol como combustível**

A consolidação do etanol como combustível do futuro deve passar pelo desafio de aumentar ainda mais a produtividade deste, sem aumentar o seu custo e de forma que sua cultura não avance sobre outras culturas agrícolas, o que impactaria a produção de alimento. Neste sentido a utilização da biomassa lignocelulósica vem sendo amplamente estudada para a produção do etanol chamado de segunda geração, ou Bioetanol como é também conhecido, devido à sua grande disponibilidade, baixo custo e à grande quantidade de açúcares fermentescíveis, embora não prontamente disponíveis (MIYAFUJI et al., 2003).

Pré-tratamentos químicos e/ou enzimáticos são necessários para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, fornecendo carboidratos (hexoses e pentoses), que posteriormente podem ser convertidos a etanol por micro-organismos fermentadores (GOUVEIA et al., 2009). Dentre os pré-tratamentos, que visam desorganizar o complexo lignocelulósico, o pré-tratamento ácido tem se mostrado uma alternativa interessante, pois além de desestruturar o complexo, provoca a hidrólise da hemicelulose, o que resulta em uma fração líquida contendo, no caso do bagaço de cana, majoritariamente a xilose (FILHO, 2008). Após o pré-tratamento, o líquido contendo o hidrolisado hemicelulósico é separado de um resíduo sólido, composto fundamentalmente de celulose e lignina, denominado de celulignina. A neutralização do pH, seguida de uma etapa de deslignificação do resíduo sólido gerado é necessária quando se vislumbra a hidrólise enzimática, a fim de se aumentar a acessibilidade da celulose ao ataque catalítico. (SANTOS et al., 2012; CASSA-BARBOSA, 2015).

A busca de micro-organismos fermentadores de xilose, açúcar mais abundante proveniente da fração hemicelulósica, é um dos maiores desafios da biotecnologia moderna; uma vez que se faz necessária a eficiente e integral conversão dos carboidratos potenciais oriundos de materiais lignocelulósicos. No entanto, uma limitação ao potencial de *Z. mobilis* para a produção industrial de etanol é a sua capacidade de utilizar apenas a glicose, frutose ou sacarose como fonte de energia (YANASE et al., 2005) assim como a *S. cerevisiae*. Há uma grande variedade de leveduras capazes de fermentar hexoses, mas poucas espécies podem produzir etanol de xilose com equivalência econômica à fermentação de hexose. (AGBOGBO et al., 2006).

### **Cana de açúcar no futuro da matriz energética**

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tem grande importância econômica no Brasil, sendo produzidas mais de 588 milhões de toneladas por safra (CONAB, 2016), para produção de açúcar e etanol como pode ser visto na figura 01. Com toda essa produção há uma grande quantidade de resíduos gerados, dentre eles o bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço da planta é obtido após a colheita e moagem para obtenção do caldo. Esse bagaço muitas vezes é utilizado para geração de energia dentro das próprias usinas. Uma tonelada de cana-de-açúcar pode gerar até 280 kg de bagaço, e além de gerar energia elétrica ele pode ser usado também como ração animal, juntamente com as leveduras que foram utilizadas no processo de fermentação do caldo, o bagaço pode ser utilizado também para fabricação de papel e na indústria química e farmacêutica na síntese de compostos orgânicos (VITTI, 1998; RIPOLI; RIPOLI, 2004).

O bagaço da cana, além de ser usado como fonte energética é utilizado também como matéria-prima na indústria de papel, papelão, na fabricação de aglomerado, na indústria química, como material alternativo na construção civil, como ração animal e na produção de biomassa microbiana. Mesmo assim há ainda um excedente deste resíduo que não é totalmente utilizado, causando sérios problemas de estocagem e poluição ambiental (BOTÃO; LACAVA, 2003; MACHADO, 2000).

A composição química do bagaço da cana-de-açúcar (Tabela 01) varia de acordo com diversos fatores, entre eles, o tipo de cana, o tipo de solo, as técnicas de colheita e até o manuseio (CARVALHO et al., 2006).

**Tabela 01** – Composição Média do Bagaço de Cana-de-Açúcar

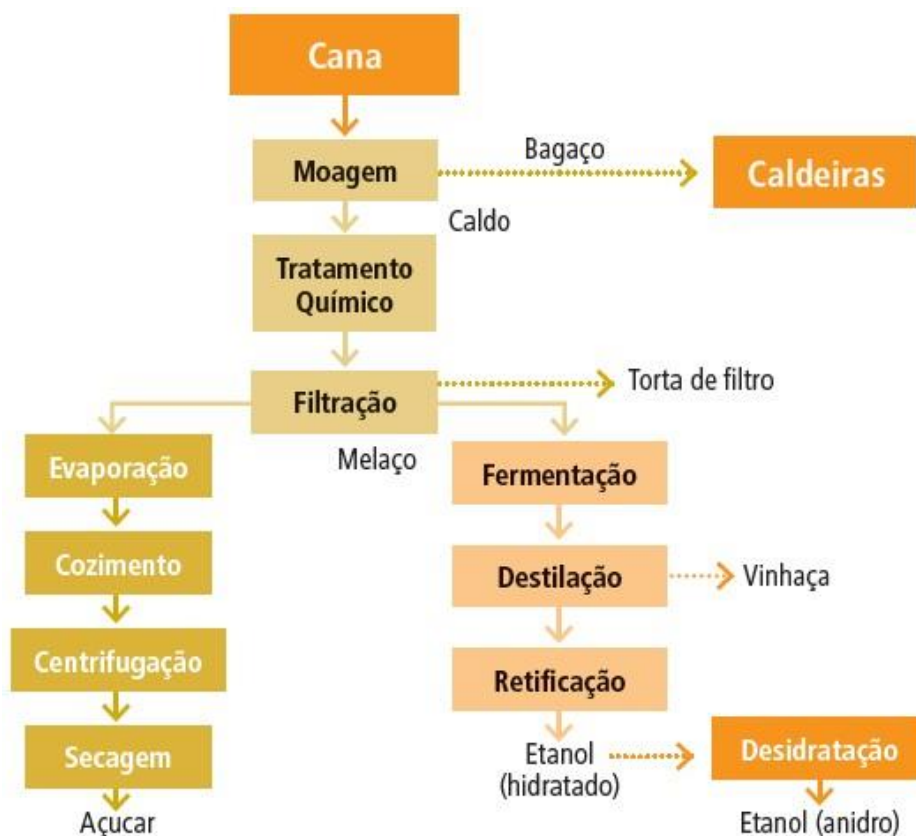
<b>Composição Química Média dos Elementos do Bagaço de Cana-de-Açúcar</b>			
Carbono	Oxigênio	Hidrogênio	Nitrogênio
39,7 – 49%	40 - 46%	5,5 - 7,4%	0 - 0,3%

<b>Composição Média da Fibra de Bagaço da Cana-de-Açúcar</b>		
Celulose	Hemicelulose	Lignina
26,6 – 54,3%	14,3 – 24,4%	25,7 – 29,7%

Fonte: CARVALHO et al., (2006)

O bagaço da cana subproduto da indústria sucroalcooleira, apesar dos inúmeros empregos deste resíduo em diferentes setores e áreas da indústria brasileira, hoje tem sido alvo de vários estudos visando utilizar todo seu potencial, para produção de bioetanol. Sendo uma alternativa atraente para diminuir o uso de combustíveis fósseis. O bioetanol, obtido de materiais lignocelulósicos, como o bagaço da cana-de-açúcar, tem sido estudado há alguns anos, mas a sua produção em escala industrial ainda não se tornou possível, mas estudos têm sido cada vez mais realizados para que ele seja produzido em grande escala (BALAT et al., 2008). Na figura 01 a produção do etanol de primeira geração pode ser observada. O bagaço é o primeiro resíduo do processo, após a moagem da planta, e todo material lignocelulósico pode ser destinado às caldeiras para geração de energia, o que não impede de ser utilizado para outros fins.



**Figura 01.** Fluxograma da produção de açúcar e etanol de cana

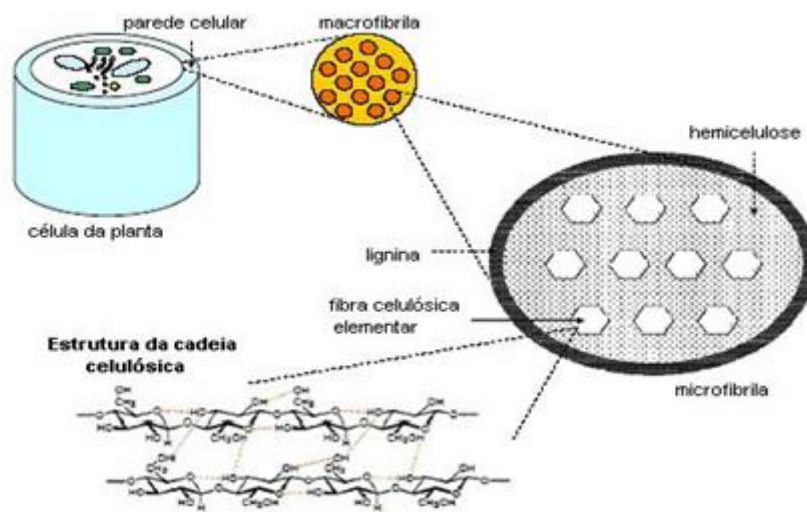
Fonte: PORTAL DO BIOGÁS (2015)

### Materiais lignocelulósicos

A biomassa lignocelulósica apresenta uma variedade de opções, pois pode ser encontrada em quase todo o mundo, principalmente em resíduos agroindustriais, e uma das aplicações biotecnológicas, é a produção de bioetanol. A biomassa lignocelulósica é agrupada em seis categorias: culturas energéticas, resíduos agroindustriais, resíduos de corte, resíduos de indústria, recursos florestais e resíduos urbanos (HUANG, 2014). De acordo com Tomas-Pejo et al. (2012), o uso de materiais lignocelulósicos geram alguns compostos derivados da celulose, da hemicelulose e da lignina durante o pré-tratamento, e podem estar presentes na fermentação. Por isso leveduras capazes de utilizar a xilose, que constitui até 40% do material lignocelulósico, são necessárias para o sucesso da fermentação. Isso não ocorre com a levedura *S. cerevisiae* (EBRINGEROVÁ et al, 2013).

A celulose e a hemicelulose são compostas de polímeros de hidratos de carbono, e as formas de converter esses carboidratos em açúcares fermentáveis é a hidrólise ácida

e a enzimática (CANILHA et al., 2012). A composição dos três elementos é variável conforme o tipo de planta, é importante saber quanto de celulose, lignina e hemicelulose a planta de interesse possui para que o tipo de degradação seja mais adequado (CARVALHO et al., 2009). Na figura 02 podemos observar um esquema da estrutura da madeira, onde as três frações poliméricas se unem tornando-se resistentes a ataques microbianos (JEFFRIES, 1990). A celulose se encontra envolta pela lignina, conferindo força e flexibilidade ao tecido, e a hemicelulose se encontra entre as duas outras partes, todas elas compostas de sacarídeos que conferem resistência a ataques químicos e físicos (SZENGYEL, 2000).



**Figura 02.** Estrutura da madeira (Fonte: ZHANG, 2008)

A madeira é composta de material produzido por células de uma árvore, ela serve para sustentar a copa e transportar água e nutrientes da raiz às folhas, além de manter as reservas da planta (KLOCK, 2000). A madeira pode sofrer degradação natural por diversos fatores: água, luz solar, insetos e micro-organismos. A água aumenta a umidade e quantidade de oxigênio na madeira, deixando um ambiente propício a fungos aeróbios, que se alimentam da madeira através da produção de enzimas lignocelulolíticas (SANTOS et al., 2012). A degradação da lignina da madeira na natureza é realizada de forma mais eficiente pelos fungos quando comparada com outros micro-organismos, sendo eles então os principais responsáveis pela degradação deste polímero. Os fungos degradam a madeira secretando celulases, hemicelulases e lignases ou enzimas lignocelulolíticas. A madeira é constituída de quatro partes:

celulose, hemicelulose, lignina e extrativos. O tipo de degradação resulta em três tipos de podridão: a podridão mole, a podridão marrom e a podridão branca. A podridão branca é a mais eficiente quando se trata de decomposição da madeira, existindo inúmeras espécies de fungos que a fazem, sendo a maioria deles basidiomicetos (ALONSO et al., 2007; ABREU et al., 2001).

### **Fungos filamentosos**

Fungos filamentosos, especialmente os basidiomicetos de podridão branca são eficientes degradadores de biopolímeros de paredes de plantas devido a produção de uma bateria de enzimas extracelulares, como celulasas, hemicelulasas e lignases. Os fungos basidiomicetos representam uma fonte de enzimas com potenciais aplicações devido à sua elevada atividade lignocelulósica (QUIROZ-CASTAÑEDA et al., 2011).

Resíduos agroindustriais de indústrias alimentícias constituem uma ampla fonte de recursos renováveis para conversão microbiana em diferentes produtos com valor agregado. Os fungos de podridão branca do grupo dos basidiomicetos têm um potencial adequado para crescer em substratos lignocelulósicos devido à sua produção enzimática. As principais enzimas hidrolíticas são a endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (EC 3.2.1.4), exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (EC 3.2.1.91), e xilanase (EC 3.2.1.8). Esses fungos secretam uma ou mais enzimas extracelulares que são essenciais para a degradação da lignina: lignina peroxidase (EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (EC 1.11.1.13), e lacase (EC 1.10.3.2) (ELISASHVILI et al., 2009).

Estas enzimas de basidiomicetos degradadores de lignina são de fundamental importância para a eficiente bioconversão de resíduos de plantas, e elas são promissoras pela grande variedade de aplicações biotecnológicas incluindo as indústrias de polpa de papel, comidas, bebidas, têxteis, biorremediação, cosméticos e agricultura e bioquímica analítica (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007). A aplicação de enzimas lignocelulósicas em tecnologias industriais e ambientais, incluindo o conceito moderno de biorefinarias integradas (KAMM; KAMM, 2004) requer uma quantidade significativa destas enzimas a baixo custo. Muitos organismos recombinantes eficientemente produzem várias enzimas industriais, a alta expressão de lacases e peroxidases em sistemas heterólogos não tem sido alcançadas ainda, e elas ainda têm que ser obtidas de fontes naturais. Acima de tudo, enzimas lignocelulolíticas de alguns basidiomicetos são formadas no metabolismo secundário, portanto, é importante descobrir micro-organismos que efetivamente

secretam estas enzimas no metabolismo primário. Consequentemente o aumento da demanda por enzimas degradadoras de lignina tem sido intensificadas, por pesquisas em fungos com notáveis atividades enzimáticas. Recentemente, muitas espécies de fungos de degradação branca têm sido estudadas do ponto de vista básico e aplicado, alguns deles têm mostrado um alto potencial na produção de grupos de enzimas oxidativas e hidrolíticas (MACHUCA; FERRAZ, 2001; GALHAUP et al., 2002; ELISASHVILI et al., 2006, 2008; PAPINUTTI; FORCHIASSIN, 2007; OSMA et al., 2007; LEVIN et al., 2008).

Pesquisas adicionais usando resíduos lignocelulósicos como substrato para crescimento fúngico tem se mostrado promissor desde que alguns contenham concentrações significativas de carboidratos solúveis e indutores para a síntese de enzimas assegurando a eficiente produção de enzimas lignocelulolíticas (MACHUCA; FERRAZ, 2001; ROSALES et al., 2002, 2005; KAPICH et al., 2004; KACHLISHVILI et al., 2006; SONGULASHVILI et al., 2006; ELISASHVILI, 2009).

## **Enzimas**

As enzimas são catalisadores biológicos de natureza proteica que intervêm em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis, as quais elas aceleram por ativação específica, permanecendo intactas após cada ciclo de reação. Como no modelo chave-fechadura. Elas permitem atingir rapidamente o estado de equilíbrio da reação sem modificá-lo. As enzimas são as peças chaves na biotecnologia e na bioindústria. São elas que, na engenharia microbiológica catalisam as reações metabólicas acionadas, e asseguram a sua regulação. Da mesma forma, elas levaram a engenharia genética a realizar modificações nos genes de alguns micro-organismos, com vistas a torná-los aptos à biossíntese de metabólitos de interesse (RICHARD, 1985).

A parede celular rígida dos fungos não os tornam capazes de absorver micro-organismos ou outras partículas, e para tal os fungos secretam enzimas através do micélio sobre a fonte de alimento e absorvem pequenas moléculas que são disponíveis (RAVEN, 2001). As enzimas de micro-organismos são conhecidas por terem uma vasta aplicabilidade, e por isso são muito usadas nas indústrias. A demanda para estas enzimas têm aumentado à medida que soluções sustentáveis precisem ser encontradas e os micro-organismos são fonte essencial (ADRIO; DEMAIN, 2005; JOHANNES;



ZHAO, 2006; KUMAR; SINGH, 2013). As enzimas podem ser selecionadas geneticamente e quimicamente modificadas para melhorar as suas propriedades fundamentais: estabilidade, especificidade de substrato e atividade específica. No entanto existem inconvenientes para a utilização, certas enzimas requerem cofatores. Várias abordagens como a reciclagem de cofator e utilização de células inteiras podem resolver este problema. Cerca de 150 processos industriais utilizam enzimas ou catalisadores de células microbianas inteiras (DEMAIN; ADRIANO, 2008; ADRIANO; DEMAIN, 2014; JOHNSON, 2013).

Os fungos são organismos únicos capazes de degradar a lignocelulose, a fonte mais abundante de carbono terrestre. Além de sua importância no ciclo do carbono, estes fungos têm chamado a atenção para a conversão da parede celular das plantas de baixo peso molecular, a produtos de alto valor, como o xilitol (MUSSATO; ROBERTO, 2004). Muitos fungos eficientes pertencem à ordem Polyporales, os fungos de podridão branca podem degradar polissacarídeos da parede celular, como a celulose e a hemicelulose, e também polímero mais recalcitrante, a lignina (NIEMENMAA et al., 2008, YELLE et al., 2008, YELLE et al., 2011). A degradação pelos fungos através das enzimas é maior na decomposição de folhas e madeira, e tende a diminuir nas fases posteriores de decomposição quando as bactérias tornam-se mais dominantes. Fungos utilizam as moléculas simples e complexas como alimentos, através da secreção de uma variedade de enzimas extracelulares (REDLAK et al., 2001; ZIFCAKOVA et al., 2011). Estas enzimas degradam proteínas vegetais, celulose, hemicelulose, amido, e os compostos de origem animal, tais como quitina (MARCOTTE et al., 2001). A lacase e polifenol oxidase são as enzimas ligninocelulolíticas envolvidas na degradação da lignina, bem como vários compostos aromáticos xenobióticos (POINTING, 2001; BURKE; CAIRNEY, 2002, WANG et al., 2014).

A degradação da lignina da madeira na natureza é realizada de forma mais eficiente pelos fungos quando comparada com outros micro-organismos, sendo eles então os principais responsáveis pela degradação deste polímero. O tipo de degradação resulta em três tipos de podridão: a podridão mole, a podridão marrom e a podridão branca. A podridão branca é a mais eficiente quando se trata de decomposição da madeira, existindo inúmeras espécies de fungos que a fazem, sendo a maioria deles basidiomicetos (KIRK, 1983). Os fungos da podridão branca produzem várias enzimas extracelulares envolvidas na degradação da lignina, incluindo lignina-peroxidase, manganês peroxidase, lacase, e oxidases que geram o peróxido de hidrogênio necessário

para a atividade da peroxidase (Tabela 02). Diferentes combinações de enzimas são produzidas por fungos que degradam a lignina, o que sugere que há mais do que uma estratégia bem sucedida para a biodegradação de lignina (HATAKKA 1994; LEVIN et al., 2002).

**Tabela 02** - Enzimas ligninolíticas produzidas por fungos de podridão branca mostrando o EC (Enzyme Commission Numbers), esquema de classificação numérica das enzimas, as reações que catalisam e os respectivos fungos.

<b>Enzima</b>	<b>Nº EC</b>	<b>Reações catalisadas</b>	<b>Fungo</b>
Lacase	1.10.3.2	Oxidação de fenol	<i>Trametes versicolor</i>
Lignina peroxidase	1.11.1.14	Polimerização de fenol	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Manganês peroxidase	1.11.1.13	Oxidação de fenol; Oxida $Mn^{2+}$ a $Mn^{3+}$	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Celobiose-quinona oxireductase	1.1.5.1	Redução de quinona; Degradação de celobiose	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Aril álcool oxidase	1.1.3.7	Produção de $H_2O_2$	<i>Pleurotus sabor-caju</i>
Glioxal oxidase	1.2.3.5	Produção de $H_2O_2$	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Manganês independente de peroxidase	1.11.1.7	Atividade em substratos aromáticos	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Versátil peroxidase	1.11.1.16	Oxida $Mn^{2+}$ ; Potencial alto redox em componentes aromáticos	<i>Pleurotus sp.</i>
Celobiose desidrogenase	1.1.99.18	Degradação de lignina; Une o sistema hidrolítico e oxidativo; Dispõe manganês (MnII) para MnP através da redução do precipitado da oxidação do manganês ( $MnO_2$ )	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>

Fonte: MACIEL et al., (2010)

## **Lacase**

Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, lacases fúngicas estão recebendo grande atenção em várias aplicações industriais como deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes, síntese de produtos químicos e medicinais, e remediação de solos e águas contaminadas. (SCHNEIDER et al., 1999; DURÁN et al., 2002; MAYER; STAPLES, 2002). A lacase contém tipicamente 15-30 % de hidratos de carbono, tem geralmente um ponto isoelétrico ácido e tem uma massa molecular de 60-90 kDa . A lacase é codificada por uma família de genes e produzido sob a forma de várias

isoenzimas. Alguns são constitutivamente expressos, os outros são expressos após indução por compostos aromáticos relevantes para a lignina, tais como a lignina kraft, xilidina, álcool veratrílico, etc. (GIANFREDA et al., 1999; DEKKER et al., 2001).

### **Lignina Peroxidase - LiP**

Essas enzimas são principais componentes do sistema envolvido na degradação de lignina por micro-organismo. Desde sua descoberta, LiP tem sido extensamente caracterizada molecular e bioquimicamente (GOLD; ALIC, 1993; CHIVUKULA et al., 1995; JOHJIMA et al., 1999; SUGIURA et al., 2003). No processo de degradação da lignina, LiP é inicialmente oxidada pelo  $H_2O_2$  e oxida núcleos aromáticos da molécula de lignina (fenólicos e não fenólicos), gerando radicais catiônicos. Estes reagem espontaneamente com  $H_2O$  e com oxigênio molecular, gerando uma “combustão enzimática” onde ligações C-C e C-O são quebradas, despolimerizando a lignina e abrindo os anéis aromáticos (KIRK et al., 1978).

### **Manganês Peroxidase - MnP**

A atuação de MnP durante a peroxidação lipídica está envolvida na degradação de compostos xenobióticos recalcitrantes. Assim, a avaliação da capacidade de culturas fúngicas para promover a peroxidação lipídica é de grande importância. O estímulo da peroxidação de ácidos graxos insaturados com concomitante produção de radicais lipídicos é reconhecido como atividade pró-oxidante (KAPICH et al., 2005).

A degradação microbiana de lignina exerce um papel essencial na ciclagem do carbono e a função dos micro-organismos, que são em sua maioria os fungos, é fundamental para as biotecnologias emergentes tal como a polpagem biomecânica, o branqueamento enzimático de polpas e a degradação de poluentes orgânicos (WHITELEY; LEE, 2006; BAJPAI et al., 2004; RAMOS et al., 2004; MARDONES et al., 2006).

## Aplicações Biotecnológicas

A biotecnologia é uma área de investigação que explora sistemas biológicos, microbianos ou de culturas vegetais e animais, visando a obtenção de produtos de interesse industrial. Devido aos micro-organismos apresentarem crescimento rápido, menor custo e espaço para crescimento, possibilitando maior controle dos processos operacionais, há mais vantagens no seu uso, principalmente nos processos fermentativos (DEMAIN, 1996). A maioria dos processos biotecnológicos utilizando fungos baseia-se nos seus produtos metabólicos como: fermentação, enzimas e polissacarídeos, que podem ser utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Além dessas utilizações estas enzimas são utilizadas na biodegradação de compostos xenobióticos, como, por exemplo, na biorremediação de solos contaminados e no tratamento de efluentes da indústria papelreira e têxtil (MATEUS; OKINO, 1998).

O aproveitamento da biomassa vegetal residual como fonte de energia renovável diminui uma parte da utilização de combustíveis fósseis, que têm contribuído para impactos negativos no meio ambiente. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e derivados, o que torna o processo de produção de etanol mais viável. O etanol já é produzido no país, e o processo é integrado à produção do açúcar, diminuindo assim os custos de ambos os processos (CAMARGO, 2007).

Para obtenção do etanol de segunda geração é necessária a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, para que seja liberado os açúcares das porções celulósicas e hemicelulósicas da planta. O uso deste hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar deve ser feita por micro-organismos fermentativos, como as leveduras. As leveduras são os micro-organismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Bactérias também são viáveis na produção do etanol, mas economicamente as leveduras são mais utilizadas (LIMA et al., 2001).

O gênero *Saccharomyces* é um dos grupos de micro-organismos mais estudados pela comunidade científica, devido sua importância industrial. A ampla aplicação desses micro-organismos na indústria de biotecnologia, aumenta o interesse nesse gênero. Esta levedura tem sido relatada como agente de transformação desde 1800 (ANDRIETTA et al, 2006). Mas infelizmente a *Saccharomyces* é incapaz de fermentar o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol.

Outros gêneros de leveduras têm sido bastante estudados na fermentação de bagaço de cana-de-açúcar, e têm se mostrado promissores como a *Pichia stipitis*

(CANILHA, 2010), *Candida guilliermondii* (SCHIRMER-MICHEL, 2009), *Pichia kudriavzevii* (YUANGSAARD, 2013), entre outros gêneros. A completa utilização do substrato é um dos pré-requisitos para tornar o processo do etanol lignocelulósico economicamente competitivo. Uma das alternativas é adaptar novas leveduras que naturalmente utilizam material lignocelulósico no processo de fermentação, e modificá-las geneticamente com genes provenientes de fungos, melhorando assim a taxa de conversão do etanol lignocelulósico, a identificação de novos genes degradadores de material lignocelulósico que possam disponibilizar a celulose e hemicelulose, tem se mostrado uma estratégia promissora, diversos trabalhos tem mostrado o potencial de expressar genes de Lacase de *Trametes* sp (HONG et al., 2007), *Trametes versicolor* (CALLAGHAN et al., 2002 ) em *Pichia pastoris* e *Pichia methanolica* (GUO et al., 2006), de *Polyporus grammacephalus* em *Pichia pastoris* (HUANG et al., 2011) de *Pleurotus ostreatus* em *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* (PEZZELLA et al., 2009).

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Identificar genes de enzimas ligninocelulolíticas de basidiomicetos, e produzir etanol a partir de hemicelulose.

### Objetivos específicos

- Identificar genes de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase de fungos basidiomicetos *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes* sp., *Pleurotus* sp. e *Hexagonia glabra* da coleção de cultura da UEA.
- Produzir etanol a partir do meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando as leveduras CBA-524 e CBA- 519.

## MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi conduzida nos Laboratórios de Microbiologia e Fermentação do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA.

### Repicagem dos fungos

Os fungos utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, estando depositados na sua coleção. São eles: *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus sp.*, *Trametes sp. 1*, *Trametes sp. 2* e *Hexagonia glabra*.

Os fungos foram reativados em câmara de fluxo laminar, em placas contendo meio de cultura BDA (batata dextrose ágar), depois foram mantidos em BOD a 28 °C por 7 dias ou até o crescimento total na placa.

### Extração de DNA

Para extração de DNA, os fungos foram crescidos em 50 mL de BD (200 g de batata 20 g de dextrose; 1 L de água e pH 6,0) por 7 dias a 28°C a 150 rpm. A extração de DNA foi realizada de acordo com Mendes (2008).

O micélio foi filtrado e macerado com o auxílio do nitrogênio líquido. Aproximadamente 200 mg do macerado foi transferido para 1 mL de tampão de extração (SDS 1%, EDTA 25mM, NaCl 250mM e Tris-HCL 200mM [pH 8,0]), incubado por 20 min a 65°C e centrifugado a 10.000 g (Centrifuge 5400, Eppendorf) por 10 min a 4°C. O sobrenadante (~800 µL) foi transferido para tubo contendo 1 volume de fenol, homogeneizado e centrifugado por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 1 volume de fenol:clorofórmio (1:1 vol/vol), homogeneizado e centrifugado por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 1 volume de clorofórmio, homogeneizado e centrifugado. Para precipitação do DNA, o sobrenadante foi novamente coletado, transferido para novo tubo e adicionado 0,6 volume de isopropanos, então, o tubo foi homogeneizado e incubado por 10 min a 4°C. A suspensão foi centrifugada por 15 min e o sobrenadante descartado. O precipitado de DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70%, centrifugado, o etanol foi descartado. O precipitado seco a 37°C. Finalmente o DNA foi

ressuspendido em 50  $\mu\text{L}$  de água ultra pura (Milli-Q) autoclavada. O DNA genômico total foi quantificado por meio de comparação com marcador Lambda (fago  $\lambda$  - Invitrogen) em gel de agarose 1,0% a  $3\text{V cm}^{-1}$  e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Amplificação e sequenciamento dos genes

Para amplificação e sequenciamento dos genes de Lacase Lignina peroxidase e Manganês peroxidase, os DNAs dos isolados de *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes sp.*, *Pleurotus sp.* e *Hexagonia glabra*, foram amplificados em termociclador PTC-200 DNA Engine Cycler (Bio Rad), programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 min a  $94^{\circ}\text{C}$ , seguido de 30 ciclos de 20 seg a  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 seg  $50^{\circ}\text{C}$  e 1 min a  $72^{\circ}\text{C}$ ; após os ciclos, uma extensão final de 5 min a  $72^{\circ}\text{C}$ . Os iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação estão listados na tabela 3. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50  $\mu\text{L}$ , contendo tampão 1X (KCl 50mM), Tris-HCl 20mM [pH8,4],  $\text{MgCl}_2$  3,7 mM, dNTP 1mM (de cada), Taq DNA polimerase  $0,05\text{U } \mu\text{l}^{-1}$  (Invitrogen),  $0,4\mu\text{M}$  de cada primers e aproximadamente 3 ng de DNA. O produto de PCR foi observado em gel de agarose 2,0% a  $3\text{V cm}^{-1}$ , juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 1kb plus (Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídio e fotodocumentado em luz UV. Posteriormente os produtos de PCR foram purificados com kits PureLink (Invitrogen), para o sequenciamento.

**Tabela 03.** *Primers* utilizados para amplificar os genes das enzimas lignocelulolíticas.

Gene	Primer	Referências
Lacases	LccF 5 – CA(T/C) TGG CA(T/C) GGN TT(T/C) TT(T/C) CA) - 3; LccR 5 – (A/G)TG (A/G)CT (A/G)TG (A/G)TA CCA (A/G)AA(G/A/T/C)GT – 3	D'Souza et al. 1996
Lignina peroxidase	LipF 5 – (G/C)C(G/T/C) AAC AT(T/C) GG(T/C) CT(T/C) GAC GA - 3; LipR 5 – TC(G/C) A(G/T/C)G AAG AAC TG(G/C) G(A/T)G TC – 3	Reddy & D'Souza 1998
Manganês peroxidase	MnpF 5 – G(A/C)(G/A) ATG GCC TTC (A/G)(A/G)T TC(T/C)T - 3; MnpR 5– TTA (G/T)GC AGG (G/A)CC (G/A)T(T/C) GAA CT- 3	Bogan et al. 1996

Para o sequenciamento dos genes foi utilizado o kit Big Dye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Life Technologies). O volume total das reações foi de 20  $\mu\text{L}$  (4  $\mu\text{L}$  de Ready Reaction Premix 2.5X, 2  $\mu\text{L}$  de BigDye, Sequencing Buffer



5X, 3,2 pmol de primer, 4 ng DNA, e água Milli-Q). As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-200 DNA Engine Cycler (Bio Rad) com uma desnaturação inicial de 96 °C por 1 min e 25 ciclos de: 96 °C por 10 seg, 50 °C por 5 seg e 60 °C por 2 min. Para purificação, foi adicionado 5 µL de EDTA 125 mM e 60 µL de etanol 100%, as amostras foram homogeneizada e incubadas por 15 min a temperatura ambiente, em seguida centrifugadas a 16.000 g a 4 °C por 45 min. Descartado o sobrenadante novamente adicionado 60 µL de etanol 70%, centrifugadas a 16.000g a 4 °C por 15 min e resuspendido no tampão de aplicação.

A determinação das sequências foi realizada pelo analisador de sequências 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies) do Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA, onde as configurações do aparelho seguiram as recomendações do fabricante. As sequências obtidas foram analisadas através do programa SeqMan™ II (DNA Star Inc.). Foram utilizadas as sequências com padrão de qualidade *phred* maior que 20. Os arquivos no formato FASTA foram avaliados por meio de um “*script*” computacional, que separa as sequencias FASTA de melhor qualidade e maior tamanho de pares de bases (pb). Para o agrupamento das sequencias utilizou-se o programa CAP3. As comparações dos arquivos foram realizadas com banco de dados do GenBank (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1997), configurado na opção “blastn e blastp” para o desenho dos *primers* foi utilizado o Primer-BLAST. Para a construção da filogenia foi utilizado software CLC Sequence Viewer 7 (<http://www.clcbio.com/>).

## **Leveduras utilizadas na fermentação**

### **Identificação molecular**

A identificação molecular foi procedida com as leveduras CBA-524 e CBA-519 selecionadas nos trabalho de Cassa-Barbosa (2012).

A extração de DNA total foi realizada de acordo com método descrito acima. A região amplificada compreendeu parte da região 18S, as regiões não codificadoras ITS-1 e ITS-2, bem como a região 5.8S (completas) e parte do DNA ribossomal 26S. Os *primers* utilizados foram ITS-1(CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG) e ITS-4 (TCC

TCC GCT TAT TGA TAT GC). O sequenciamento foi realizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano (USP).

As sequências foram comparadas com o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) através do algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Com base nas sequências, uma árvore filogenética foi construída pelo método de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-joining*) e com teste de filogenia *bootstrap* com 1000 réplicas, utilizando-se o programa MEGA 5 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*: <http://www.megasoftware.net>).

Para compor a árvore filogenética, foram inseridas: sequências relativas às leveduras isoladas e selecionadas, e alguns padrões obtidos no banco do NCBI.

As leveduras utilizadas na fermentação foram as CBA-524 CBA-519, isoladas de fezes de bovinos e que apresentaram bom crescimento em xilose e arabinose (CASSA-BARBOSA et al., 2015), e como padrão foi utilizada a levedura *Pichia stipitis* CBS6054. Todas foram repicadas e mantidas em BOD a 28 °C em meio de cultura BDA.

### **Meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**

O bagaço de cana-de-açúcar foi seco em estufa e triturado em moinho de facas. A hidrólise ácida do bagaço foi realizada utilizando-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1% na proporção de 250 mL para cada 50 g de bagaço por 24 horas.

A autoclavagem do material foi feita a 121 °C por 40 min. Depois foi feita a prensagem do material em uma prensa de 15 toneladas. O caldo resultante da prensagem foi neutralizado com CaOH até atingir o pH 5,0. O meio foi filtrado à vácuo utilizando-se papel filtro.

Para utilizar o meio hidrolisado a 50% foram adicionadas a solução de sais e ácido cítrico (40 mL/L), extrato de levedura e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,1 g/L).

### **Método de quantificação de açúcar redutor**

O método de ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959) busca quantificar a quantidade de açúcar redutor da amostra do meio de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado. Uma amostra de 20 µL de meio de cultura é diluída em 180 µL de

água destilada adicionando 300 µL de DNS, a mistura é fervida por 5 minutos e a amostra é lida no espectrofotômetro (Femto – 600 plus) à absorvância de 540 nm.

### **Verificação da produção de álcool no destilador eletrônico**

Uma amostra de 100 mL foi retirada de cada experimento, adicionou-se 5 mL de Ca(OH)<sub>2</sub> e 3 gotas de anti-espumante, a mistura foi colocada no destilador eletrônico (Destilador Eletrônico Enoquímico - Gibertini), depois foi vertida no balão volumétrico de 100 mL, quando a mistura ficava abaixo dos 100 mL se adicionava água destilada até completar este volume. A amostra era então colocada no freezer até sua temperatura atingir 20 °C, então utilizava-se o alcoolômetro para medir a quantidade de álcool produzido.

### **Produção e quantificação de etanol**

A fermentação foi realizada num frasco de 5 L do fermentador Bioflo 110 (New Brunswick), contendo 3L de meio composto por o hidrolisado a 30 ° C, 100 rpm e a pH 5,0. As frações foram recolhidas para cada 24 horas. *Pichia stipitis* CBS 6054 foi utilizadas como padrão em todos os testes, usando o meio hidrolisado.

Etanol e monossacarídeos (glicose e xilose) foram determinadas por HPLC (RID -10 Shimadzu e Rezex RPM-Monosaccharide Pb + New coluna 300x7,8 mm), equipado com detector de índice de refração. As amostras foram filtradas através de uma membrana de 0,22 micron e injetadas num volume de 0,6 mL / min com o sistema de água. A duração da corrida foi de 30 minutos. Etanol e açúcares padrões foram injetados e os seus tempos de retenção foram comparados com os picos das amostras. O teor de etanol e açúcar nas amostras, foram quantificadas a partir das curvas de calibrações, após diferentes diluições injetadas no HPLC.

### **Crescimento das leveduras**

As leveduras *Pichia stipitis* CBS 6054, *Pichia kudriavzevii* CBA-519 e *Meyerozyma guilliermondii* CBA-524 foram transferidas previamente por 12 horas em 10 mL do meio de cultura a 80% do hidrolisado em um tubo de ensaio. Para verificar seu crescimento, as leveduras depois de 12 horas de crescimento foram inoculadas em placas, em triplicata cada, contendo ágar Sabouraud para a contagem das colônias.

A contagem das colônias nas placas foram feitas a cada 12 horas, totalizando 96 horas, ou seja, 8 contagens. As placas que excederam o crescimento e impossibilitaram a contagem, foram refeitas a partir de sua prévia diluição.

Após o ensaio inicial de contagem das leveduras, *P. kudriavzevii* CBA-519 e *M. guilliermondii* CBA-524 foram inoculadas em fermentador para produção de etanol em meio hidrolisado de cana-de-açúcar (50%) , de onde foram retiradas alíquotas a cada 24 horas, 100 µL de meio fermentado foram inoculados em placas de ágar Sabouraud para uma nova contagem das células.

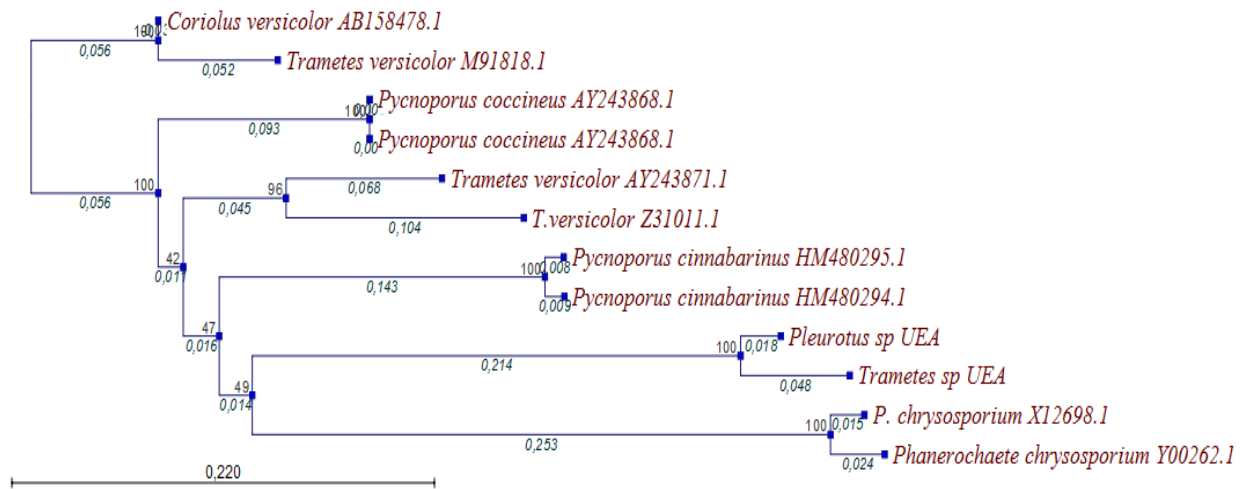
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O melhor aproveitamento de substratos lignocelulósicos tornará o etanol de segunda geração economicamente viável. A utilização principalmente da celulose e hemicelulose requer a liberação destes constituintes da lignina, para serem utilizados na fermentação. Foi possível amplificar os genes de lacase e lignina, o gene de lacase foi possível amplificar nos quatros basidiomicetos *Hexagonia glabra*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes sp.* e *Pleurotus sp.* O gene de manganês peroxidase não foi possível amplificar, possivelmente devido o gene dos fungos não apresentar similaridade com o *primer* utilizado. O gene de lignina peroxidase foi possível amplificar somente em *Trametes sp.* e *Pleurotus sp.*

O processo de liberação da lignina dos outros componentes tem sido uma das etapas a ser alcançada, principalmente da hemicelulose, que uma vez obtida pode ser facilmente fermentada. A degradação da lignina é atribuída principalmente às espécies de fungos relacionados na maior parte ao filo Basidiomycota. Fungos que degradam a lignina têm sido amplamente estudados devido à suas aplicações biotecnológicas, lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase são as primeiras enzimas a serem expressa no catabolismo da lignina (JANUSZ et al., 2013).

### **Lignina peroxidase**

A degradação da parede vegetal é um processo complexo, que envolve sinergismo entre uma variedade de sistemas enzimáticos, devido a associação entre a celulose e a lignina. A lignina envolve a celulose e hemicelulose que compõe a parede celular, sem a degradação da lignina se torna difícil a utilização da celulose e hemicelulose pelos fungos. Devido a hidrofobicidade e a natureza complexa da estrutura da lignina este composto não é facilmente degradado, sendo responsável pela degradação as enzimas hidrolíticas manganês peroxidase e lignina peroxidase e lacases (WAN; LI, 2012). Poucos genes tem sido encontrado no GenBank de Lignina peroxidase, e com baixa similaridade, como pode ser visto na figura 06.



**Figura 06.** Árvore filogenética contendo 10 sequências do GenBank e os dois fungos amplificados *Trametes* sp UEA e *Pleurotus* sp UEA, o dendograma gerado utilizando o CLC Sequence Viewer 7.

Análise do gene da Lignina peroxidase mais similar encontrada no GeneBank revelou 333 aminoácidos, a região adjacente em relação ao códon de iniciação da tradução (5' -ATG) é representado por variantes da sequência de consenso conservada em fungos filamentosos (5' -CAMMATGNC, em que M = A ou C; N = A, C, G ou T) (BALANCE, 1986). O gene do *T. versicolor* Z31011.1 são compostos por 7 éxons. A região conservada do gene que foi utilizada para amplificação esta sublinhado, o gene Lignina peroxidase de *T. versicolor* Z31011.1 contém 1478 bp. A região promotora do gene consiste de uma sequência TATA na posição - 69 bp antes do códon de iniciação como pode ser visto no quadro 1.

**Quadro 1.** Gene de lignina peroxidase de *T.versicolor* (Coriolus) 495278 com maior similaridade encontrada no GeneBank e as duas sequências obtidas a baixo.

```

acactgtgtatgtttcacgtccaactttttctctgcctcagctgacatgTATAaaagcagggcgacattggggacagtcttcagag
cactcaagcctcagtcctcctcagttccagctcgac1.ATGGCTTTCAAGTCTCTTCTTTCTTCGCTCTCGGTCATTGGAGCGCTC
CAGGGCGCGAACGgtgcgtagaaggtggcggtctccgcgcagacagtgcatctttgtgcagcactactgacccacattatcttctag
2.CCGCGTTGACCCGCGCTGCGTTGCCCGACGGCGTGAACACCGCTACCAACCGCGCGTGCCTGACGCTCTTCGCTGTCCGCGA
GGATCTCCAGCAGAACCTGTTCCACGGCGGTCTTCGACGGCTGAGGCGCACGAGTCTCTCCGTCTGACCTCCACGACGCATCG
CCATCTCCCCGCTCTCGAGGCCAGGGCATCTTCGGgtacgctgaatagatttctgccctagctgaatgtattaaccggcatat
gctgttcag3.TGGTGGTGGTGCAGCGCTCCATCGCATCTTCCCCGAGATCGAGACCAACTTCCACCCCAACATTGGTCTCGAC
GAGATCATCGAGCTCCAGAAGCCGTTTCATCGCCGTCACAACATCTCCGTGCGCGACTTgtgagtaccgggtgcgaaaccatgatcg
> acattgtactaattcgtcgatgag4.CATCCAATTTCGTTGGTGCATCGGTGCCCTCGAAGTGCAGCGGGTGTCTCCAGCTCGCCGC
TTTTCGTCGGCCGCAAGGACGCCACCAGCCGCCCCGACGGCCTCGTCCCCGAGCCGTTCCACACGCCCGACCAGATCTTCGACC
GTCTCGCCGACGCGTCCCAGGGCGAGTTCGACCCCATCTGACCGTGTGGCTCCTGACCCGCGCACACCGTTGCTGCTGCCAAGCAT
GTCGACCCGACCAAGTCCGGCTGCGTTCGACTCCACCCCGAGCTCTGGGACACCCAGTTCCTTCGAGACCCAGCTCCGCGG
CACGAGCTTCCCCGGCTCCGGCGGCAACCAGGGCGAGGTTCGAGTCTCCCTTTCGCGGGCGAGATGCGTCTCCAGTCCGACCCACCA
TCGCTCGCGACTCCCGCACGGCATGCGAGTGGCAGTCTGTCGACAAACCAGCCGGAAGGCTCAGCAGATGTTCCAGTTCGTGTTTC
CAGCACCTTTCATCTTCGGCCAGGACATCAACACGCTCGTTCGACTGCAGTGAAGTgtacgctgcaccattcttccgattcgtg
ccccctgtaacagccactaactgcccacatgatatag5.GTCCCCATCCCGGCTGACCCCTCAGGGCCACACGCACCTTCCCCGCTGGCC
TGAGCAACGCCGACATCGAGCAGGCTgtgagcacaatctagtctcctgcgcgactacacttcaactgacccattcgcctatag6.TGC
GCCGAGACACCCCTTCCCAACCTTCCCCACCGACCCCGGACCAAGACCGCGTTCGCCCCGTTgtaagtttccacaaccgatatact
tgtctccacgattcaacgagccttccactag7.CCCCAAGCCCCCTGCGCCCGGAAGTAAgggtttccaggacctaacatcgcg
tctctcggttatggtcgcgcgaggcc
Primer
Forward length 20 Tm 60.67 GC 55.00% Seq GTTCCAGCTCGACATGGCTT
Reverse length 22 Tm 59.36 GC 50.00% Seq AGGTCTGGAACCCCTACTTC

Trametes sp UEA
TKTTTTAAAGCCAAGCTAACATCCTGCCGAACTSTCGTTGCGATTGTGGTGTCTGCCACCAGTTACAGAAAATGWACTGAAAATATG
TGCAGTATTCATTGCGGTTGATGGMGGGKTGTCSAATTGCCCTGGTGCACCTCAACTCACCAGTTCGTCGGGACGCRGGACGCCACTCA
CCTCTCCCCAGASGGTCTGTCCCCGAACCGTTTACACMWSRACCAAATATTTCCGCTCTCTGACGCTTCAACGGGRCGTTTCGCGG
TCATCAAACCGTGKGGSTCTCRCCGCACACACSGTCTGCCGCRACRACGTRACCCAACTGTTCCCGYTCGCATTARAYTCSACCCCC
SGCCTCTTCGACTCCAGTTCTTCYTSRAA

Pleurotus sp UEA
AGCTTTTAAGACCCCCCAACCATCCTGCSGCMACSTMGTTGCKGAYTTGWGGTKTCTGCCAMCAGCTCACAGAGGATGTRC
TGAARAAYRTKAGTATTCATTCCCGTTGTTGGCGGCTGTCAAATTCCTGGTGCACCTCAACTCACCAGTTCGTCGGACGCGC
GGACGCCACTCAGCCGCGTCCCCAGASGGYCTTGTCCSGAACCGTTCACACAAGCGACAGATATTTKCCCGTCTCTCTGACGC
TTCGAACGGCGCGTTCGGCGWMATCCAACCGTGTGGYTCTCRCCGYACACACKGTCGCTCGGSRACGACGTCACCCCAACTG
WTCCYGGYTCCGATTARAYTCSACCCCCRGCCCTCTTCGACTCCAGTTCYTTCTKSRAA

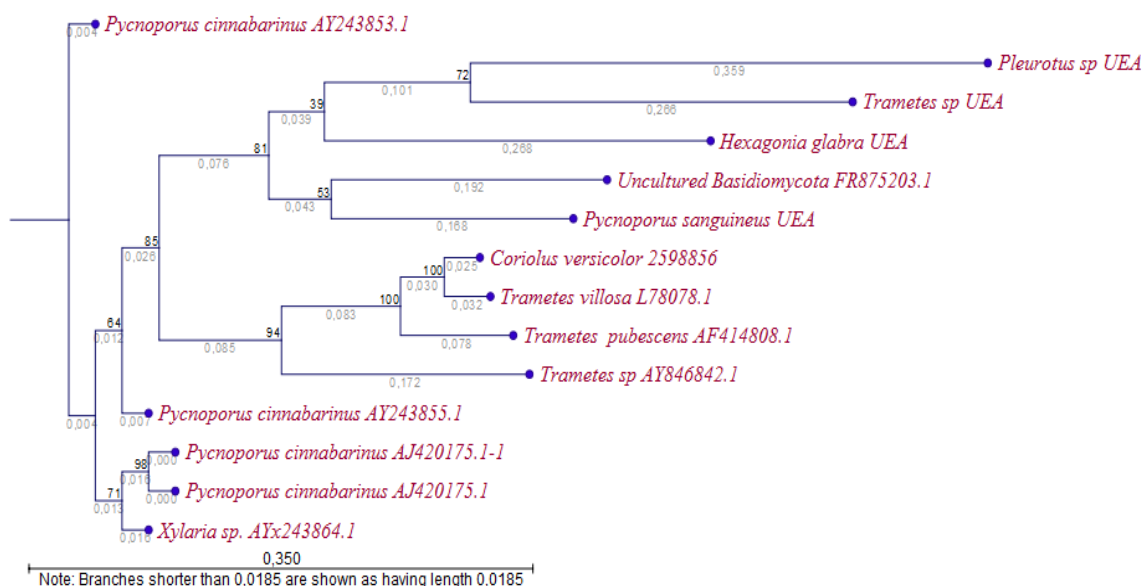
```

Os principais genes Lignina peroxidase de basidiomicetos estudados são de *Trametes versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium* com uma homologia entre eles de 55-60% na sequência de aminoácidos (BLACK; REDDY, 1991), os genes de *T. versicolor* apresentam 6 pequenos introns de 49 a 64pb, codificando de 341 a 346 aminoácidos (BLACK; REDDY, 1991; JONSSON; NYMAN, 1992). Os de *P. chrysosporium* apresentam de 8 a 9 introns de 50 a 59pb (NAIDU et al., 1990). Recentes trabalhos tem mostrado a importância dos fungos como *Cylindrocladium sp.* and *Aspergillus sp.* na degradação da lignina para uso industrial (ZHOU et al., 2014). O interesse nestes fungos tem aumentado e o gênero *Trametes* tem sido um dos principais fungos estudados (ASGHER et al., 2012; KNEZEVIC et al., 2013).

## Lacase

A hidrólise tem sido a etapa mais difícil de ser alcançada, portanto a sacarificação eficiente e a disponibilização da celulose e hemicelulose representam um passo significativo para utilização da celulose e hemicelulose (BARCELOS et al., 2013). A enzima lacase tem sido fundamental para este processo de deslignificação, facilitando o acesso a estes açúcares (RYU et al., 2013). Os fungos têm sido os principais micro-organismos produtores de lacase capazes de degradar lignina de plantas (CHAURASIA et al., 2015).

Vários genes de lacases foram caracterizados nos últimos anos, estes foram os que apresentaram maior similaridade com os fungos da UEA, *Trametes* sp AY846842.1 (XIAO et al., 2006); *T. pubescens* AF414808.1 (GALHAUP et al., 2002); *T. villosa* L78078.1 (YAVER; GOLIGHTLY, 1996) e *Coriolus versicolor* 2598856 (MIKUNI; MOROHOSHI, 1997) estes genes de lacase codificam proteínas isofórmicas compostas por 520 a 550 aminoácidos e incluem peptídeo de 20 aminoácidos, os genes avaliados mostraram baixa similaridade (Figura7), e como pode ser visto na região conservada do gene na figura 08, utilizado para o alinhamento. A sequência com maior similaridade encontrada foi do *C. versicolor* (Quadro 2).



**Figura 07.** Árvore filogenética contendo 10 sequências do gene da lacase obtidas do GenBank e os quatro fungos amplificados (*H. glabra* UEA, *P. sanguineus* UEA, *Trametes* sp UEA e *Pleurotus* sp UEA), o dendograma gerado utilizando o CLC Sequence Viewer 7.



**Quadro 02.** Gene de lacase de *Coriolus versicolor* 2598856 com maior similaridade encontrado no GeneBank, região conservada e utilizada para identificação, esta sublinhada.

```

>gi|2598856: Coriolus versicolor
cgtcgcagttaggtgatgcagcgggtcggctccgcgctatTTTTgacgtctggccagctatcctttgcccgcgectccgtaecgect
caggcgctctcgttcgctataggTATAaatccctcagcttcagagcgtcgatcctcatcccacagacatccgttccagctcttc
tcgtagcgcattctctagccgcccagcctccgcttttcgTTTTaaac1ATGGGCAAGTTTCACTCCTTCGTGAACGTCGTCCGCC
CTCAGTCTTTCCCTTGAGCGGTCTGTGTTCGGCGCCATGGGGCCCGTCACCGACTTGACTATCTCTAACGCCGATGTTACGCCCT
GACGGCATTACTCGTGTCTGTCTCCGCGGGCGGCTCTCCCCGGCCCCCTCATTACCGGCAACAAGtgagacctctgct
agctcccttgtagctgcaccgttactaaagtcgcgctttgctgcaaacag2GGGGACGAATTCAGATCAATGTCATCGACA
ACCTGACCAACAGACCATGTTGAAGTCGACCACAATCgtaaggtggttctcccaagattaagcccgtcgttactcgaagtg
tggtgtag3CACTGGCATGGTATCTTCCAGGCCGGCACCAACTGGGCGAGACGGCGGGCCTTCGTGAACCAAGTGCCTATCGC
AACGGGCAACTCGTTCCTGTACGACTTTACCGTTCCTGATCAGGCCGtgagtttacaaccgcccctttctgctcactctg
acgcgcgctgattag4GCACTTTCTGGTACCACAGCCACTGTCCACCAAGTACTGTGACGGCCTGCGGGTCTCTGGTGG
TCTACGACCCCGACGATCCCAACGCGTCTCTCTATGAGCTCGATGACGgtgagagagctactcgtggacttgatgatgtgctc
tcatgctccctgcag5ATACCACGGTTATTACGCTCGCGGACTGGTATCACACTGCGGCAAGCTGGGCCCTGCCTTCCCGtga
gtctactattcctcgtctgtaacgttagggaccaccgctgatacagagctaccag6CGCGGGACCGGATAGCGTCTTGATCA
ACGGTCTTGGTGGTTCCTCCGCTGATGGAGGAGGACGACGAACCTCACCGTATCACCGTACGCAAGGCAACGgtgagtc
gcatgagctggtttcaatagcgaatattgacaggtccatggttatectag7GTACCCTTCCGCTTGTGTGATCTCGTGGAC
CCCAACTTACAGTTCCTCGATCGACGGGCACAACATGACCATCATCGAGGTGGACGGCTCAACCACGAGGCCTTGGACGTCGAT
TCCATTACAGATCTTTGCGGGCAGCGGTACTCCTTCATAgtaagcttccctcgcctcgtggtatataccgcccgtctgctcaca
gaggtcttatatgcag8CTCAACGCCAACAGTCCATCGACAACACTACTGGATCCGCGCGATCCCAACACCGGCACCACCGA
CACCACGGGCGCGTGAACCTGCCATCTGCGCTACGACACCGCCGAAGACATGAGCCTACGACCAACGCGACCCACCTCCGT
CATCCCTCTCACCGAGACGGATCTGGTCCCGCTCGACAACCCCTGCGGCTCCCGGTGACCCCCAGGTTGGCGGTGTGACCTGGC
TATGAGTCTTGACTTCTCCTTCTGtgagtataacagtaactccgcgcagttcgcctattcagcgggaatatcattcag9AACGGT
TCCAACCTTCTTACATTAACAACGAGACCTTCGTCCCGCCACAGTGCCCGTGTCTCTGCAGATTTTGTAGCGGTGCGCAGGACGCG
GCGAGCCTGCTCCCCAACGGCAGTGTCTACACACTGCCTTCGAACTCCATTGAGATCTCGTTCCCCATCATCACCCACGAGGT
GCTCTGAACGCGCCCGGTGCTCCGACCCGTTCCATCTCCACGGTgtaagtccttgccttctcctcagtgctcgtcctccatgacg
tccgctgatcccacatatcccagtgagcag10CACACCTTCTCGGTGGTGGCAGCGCCGGAAGCTCGACCTTCAACTACGCCA
ACCCAGTCCGCGGGACACCGTCACTGACTGGTAACCTTGGCGACAACGTCACATCCGCTTACGgtaagtccttctccgagcc
ctccgctcgtgtccgctgagcgtgaacaccccccaccgtgctgctgagcag11ACCGACAACCCGGGCCGTTGGTTCCT
CCACTGCCACATCGACTTCCACCTGGACGCGGGCTTCGCCATCGTCTTTGCGGAGGACACTGCGGACACCGCGTCCGCGAATCC
CGTTCCTAgtacgtgctggtgagctctttctgcccgttcagggcgctgatcgtgccttctcctcgtgagc12CGGCGTGGAGC
GATTTGTGCCCACTTACGATGCTTTGGACTCGTCCGACCTCTGATcgacgagcttgaaggctgaagcagctgcggtcaattc
tcgtacacactttactcgcacattcattttgtttggc
Forward 11..31 length 21 Tm 59.67 GC 47.62% Seq CCTCCGCTTTCGTTTTCAACA
Reverse2276..2295 length 20 Tm 59.83 GC 55.00% Seq CCTCAAGCTCGTCGATCA
PCR 2,285pb

```

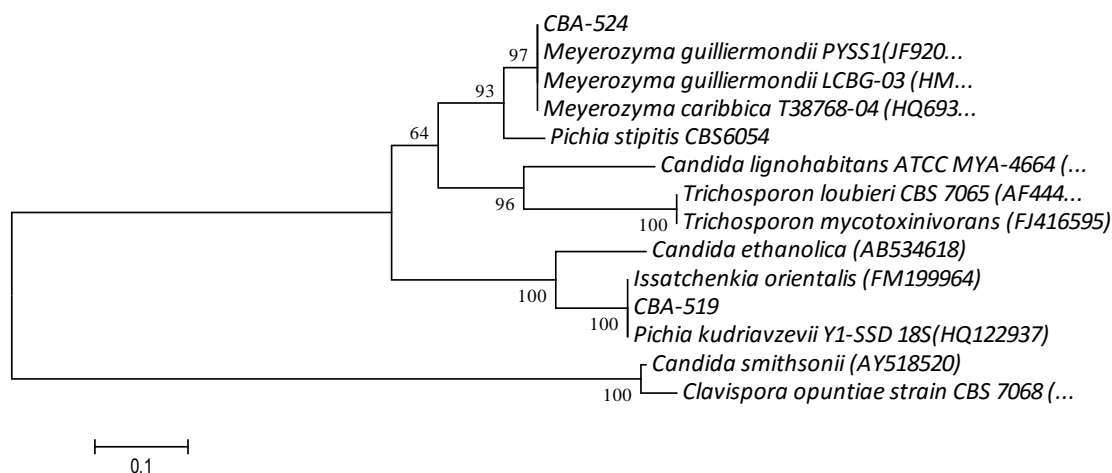
A filogenia do gene lacase não segue rigorosamente a filogenia das espécies a que permanecem, estas enzimas podem ter evoluído de acordo com o estilo de vida das espécies de fungos ou correspondentes para outro fator desconhecido (HOEGGER et al., 2006) mostrando uma alta diversidade deste gene (LYONS et al., 2013). Sequências de aminoácidos de lacase do gênero *Pycnoporus* mostrou até 95% de semelhança, apesar de sua origem partir de espécies isoladas em diferentes continentes (UZAN et al., 2010), ao passo que um alinhamento de sequências de aminoácido da lacase de *Pleurotus eryngii* exibe apenas cerca de 57% semelhanças (RODRIGUEZ-PORRATA et al., 2008). Todas as regiões do promotor de lacase identificados contem sequências TATA necessárias para iniciar a transcrição (JANUSZ et al., 2013).

A maioria das sequências de íntrons nos genes de lacase em determinados Basidiomycetes e Ascomycetes parecem ser conservadas pela distribuição de íntrons ao longo do gene, as sequências de aminoácidos são aspectos fundamentais utilizados para enzimas serem agrupadas em subfamílias (KIISKINEN, 2004) na caracterização dos íntrons, são formados entre 50-90 pb com um número médio de íntrons de 8-13, contendo de 520 a 550 aminoácidos, sendo os mais conhecidos e estudados: *Trametes hirsuta*, gene 2134 pb, 11 éxons e 10 íntrons (REBRIKOV et al., 2006); *Coriolus versicolor* 526 aminoácidos 11 íntrons, peptídeo sinal com 23 aminoácidos e com 70% homologia com outras lacases (MIKUNI; MOROHOSHI, 1997); *Pleurotus ostreatus* gene 2929 bp 19 íntrons codificando 533 aminoácidos e um peptídeo sinal de 23 aminoácidos (OKAMOTO et al., 2003); *Trametes* sp gene: 2,052 pb e 8 íntrons (HONG et al., 2007); *Pycnoporus cinnabarinus* gene: 2,390 bp e 10 íntrons (EGGERT et al., 1998); *Pleurotus ostreatus* gene: 2,592 bp e 19 íntrons (GIARDINA et al., 1995) *Pycnoporus cinnabarinus* gene: 2840 bp, 498 aminoácidos e peptídeo sinal de 23 aminoácidos, e alta similaridade (75%) com *Trametes villosa* (TEMP et al., 1999); *Ganoderma weberianum* gene: 2160pb codificando 520 aminoácidos e 9 íntrons (ZHOU et al., 2014) *Phytophthora capsici* gene: 1683 bp codificando 560 aminoácidos e peptídeo sinal de 23 aminoácidos (LI et al., 2014); *Trametes* sp. gene: 1563 bp codificando 499 aminoácidos e peptídeo sinal de 21 aminoácidos (FAN et al., 2011).

## Produção de etanol de segunda geração

### Identificação molecular das leveduras

Através da comparação das sequências no NCBI, as leveduras utilizadas tiveram similaridade com *Meyerozyma guilliermondii* o isolado CBA-524 e *Pichia kudriavzevii* o isolado CBA-519, como pode ser visto na Figura 09.



**Figura 09.** Árvore filogenética contendo as sequências das leveduras CBA-524 CBA-519 e sequências de linhagens depositadas no NCBI.

As leveduras selecionadas foram agrupadas junto com as espécies de *Meyerozyma* e *Pichia*, cujas sequências estão depositadas no NCBI. A porcentagem de identificação das sequências com as depositadas variou entre 99 e 100%. O gênero *Meyerozyma* é uma reclassificação de do gênero *Pichia*. Portanto, estes microorganismos foram conhecidos até pouco tempo como *Pichia guilliermondii* e *Pichia caribbica*. Estes resultados de isolamento coincidem com outros referentes ao isolamento de *Meyerozyma caribbica* e diferentes espécies associadas ao grupo filogenético de *M. guilliermondii*. *M. caribbica* também pode ser utilizada na sacarificação do hidrolisado hemicelulósico, aumentando o rendimento na liberação de açúcares fermentáveis (SAUCEDO-LUNA et al., 2011).

O isolado CBA-519 agrupou-se junto com *Pichia kudriavzevii* (*Issatchenkia orientalis*). Existem relatos de produção de etanol celulósico (hidrolisado lignocelulósico enriquecido em glicose) com a levedura termotolerante *Pichia kudriavzevii* em diversos estados de estresse, como altas temperaturas (40 a 43°C), elevadas concentrações de ácido sulfúrico e sal (sulfato de cálcio – gerado pela neutralização de hidrolisado). As fontes consistiram em hidrolisados lignocelulósicos

diversos, a exemplo de talos e palha de algodão, com diversos tratamentos, incluindo hidrólise enzimática com celulases (CASSA-BARBOSA, 2012).

### **Crescimento das leveduras**

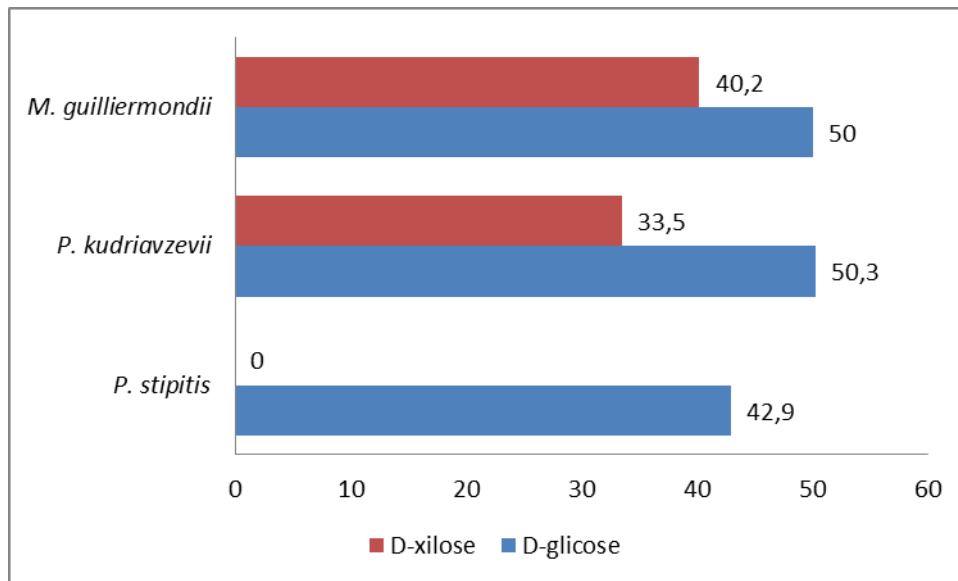
As leveduras *Pichia stipitis*, *Pichia kudriavzevii* e *Meyerozyma guilliermondii* cresceram por 24 horas no meio de cultura hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, depois foram inoculadas em ágar sabouraud para contagem de suas células em placas, após a sua diluição seriada.

A levedura *Pichia stipitis*, usada como padrão, teve maior crescimento às 48 horas com  $1,0 \times 10^7$  UFC, e menor resultado às 12 horas com  $2,67 \times 10^4$  UFC, *Pichia kudriavzevii* obteve desenvolvimento apenas após 24 horas de inoculação, com  $9,0 \times 10^2$  UFC, não apresentando crescimento nos outros horários testados. A levedura *Meyerozyma guilliermondii* obteve um ótimo crescimento, precisando a amostra ser diluída para posterior contagem das placas. Seu crescimento foi em 48 horas de incubação, e menor em 12.

Comparando as três leveduras e suas unidades formadoras de colônia (UFC.  $10^4$ ) observou-se que *M. guilliermondii* e a *P. stipitis* tiveram crescimento em todos os horários testados, ao contrário de *P. kudriavzevii*, que obteve um pico apenas após 24 horas de inoculação. As três leveduras tiveram crescimento inicial em meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. O que mostra o aproveitamento do meio de cultura pelos micro-organismos. De acordo com Fugita (2010) as leveduras não diferem muito em crescimento com relação ao meio sintético e meio hidrolisado de cana, a grande maioria consome o açúcar do meio nas primeiras 6 horas de fermentação. A partir destes resultados de crescimento as leveduras foram selecionadas para os testes de produção etanólica.

### **Produção de álcool em D-glicose e D-xilose**

Inicialmente as leveduras foram testadas em meios de cultura de D-xilose e D-glicose para verificação da sua produção de álcool. As três leveduras produziram álcool a partir de D-glicose, quando foi utilizado D-xilose apenas a *P. stipitis* não foi capaz de produzir álcool, como pode ser visto na figura a seguir.

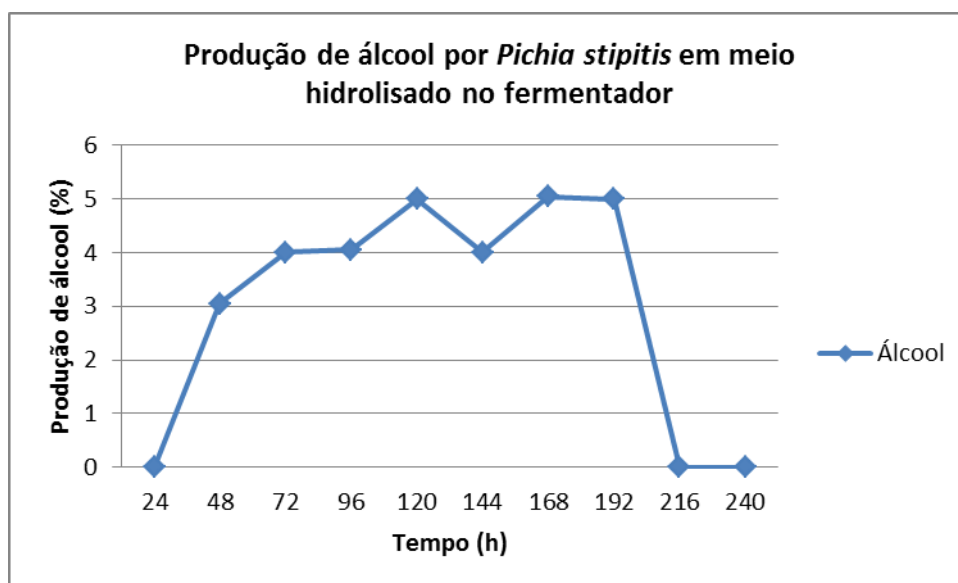


**Figura 10.** Média da produção de álcool por leveduras em meio de D-xilose e D-glicose

#### **Produção de álcool em meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**

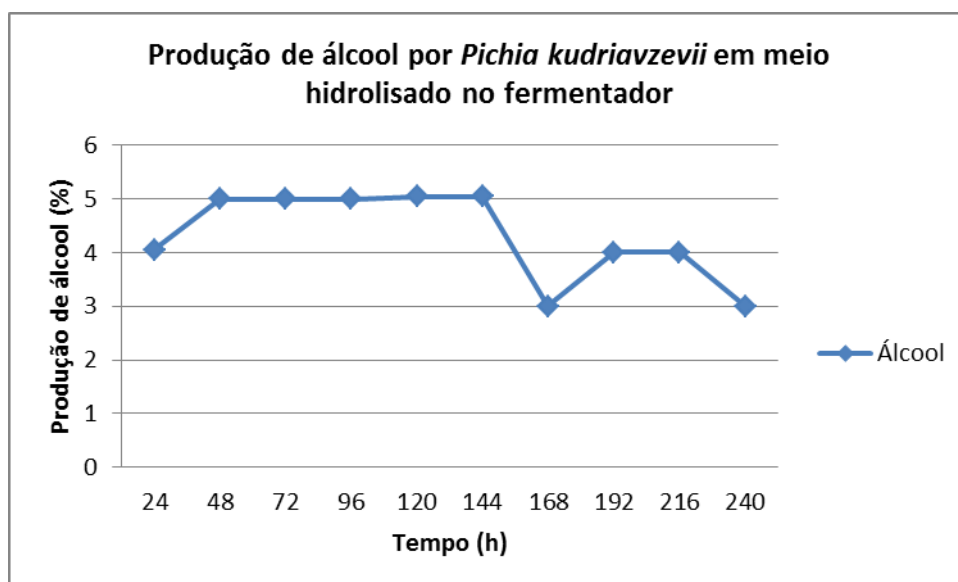
As leveduras foram testadas separadamente na fermentação, usando-se o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, e verificado a produção de álcool no destilador eletrônico.

A levedura *Pichia stipitis* CBS6054 usada como padrão neste experimento não teve produção alcóolica no primeiro dia de coleta, mas foi crescente das 48 às 192 horas de fermentação, chegando a zero no final dos dias experimentais.



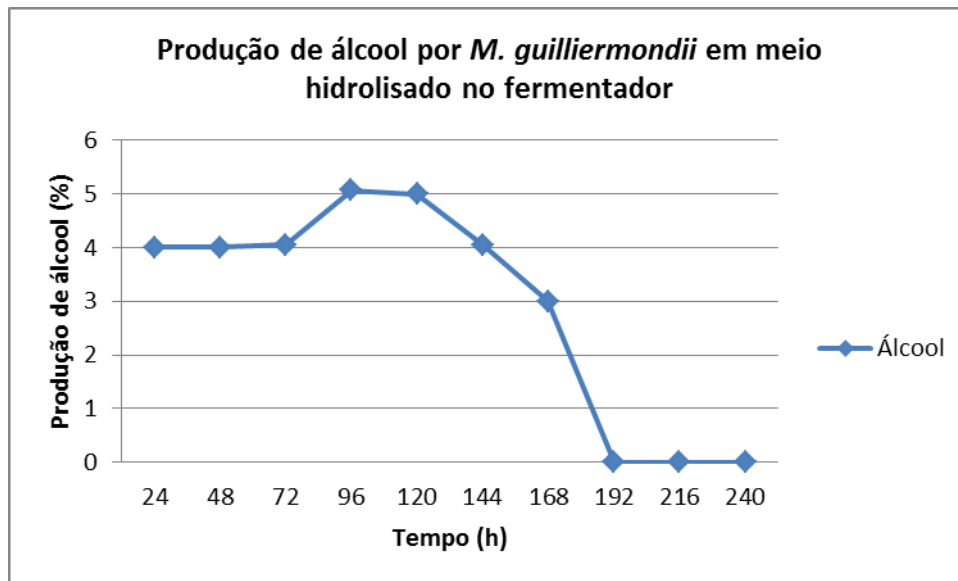
**Figura 11.** Produção de álcool por *Pichia stipitis* em meio hidrolisado no fermentador

A levedura *Pichia kudriavzevii* CBA-519 ficou em fermentação por 240 horas, sendo coletadas amostras a cada 24 horas. A levedura produziu álcool em todas os dias de coleta, começando com uma média de 4 % no primeiro dia, e aumentando e permanecendo em 5 % nas próximas cinco coletas.



**Figura 12.** Produção de álcool por *Pichia kudriavzevii* em meio hidrolisado no fermentador

A levedura *Meyerozyma guilliermondii* CBA-524 teve a média de crescimento de 4 % nas primeiras três coletas. Seu pico de produção alcoólica foi de 96 a 120 horas de fermentação com 5 %, decaindo nos próximos dias até finalmente chegar a zero às 192 horas de produção.



**Figura 13.** Produção de álcool por *Meyerozyma guilliermondii* em meio hidrolisado no fermentador

Dentre as inúmeras fontes de biomassa o bagaço de cana-de-açúcar tem se mostrado o mais promissor, obtido das indústrias de açúcar e álcool. A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (segunda geração) inclui o pré-tratamento de biomassa, enzimática hidrólise da celulose, fermentação de hexoses/açúcares pentose, e recuperação de etanol. Entre todos os tipos de pré-tratamentos químicos de biomassa, a hidrólise ácida é relatada como um dos métodos mais utilizados e mais antigos, a solubilização de hemicelulose ocorre a temperaturas elevadas, libertando açúcares pentose e facilitando a hidrólise enzimática do substrato remanescente (celulignina). Uma vantagem do processo de pré-tratamento é o ácido em temperaturas baixas e médias e, conseqüentemente, diminuição dos custos de energia (CANILHA, 2012).

A levedura *P. stipitis* foi utilizada por Silva (2011) utilizando xilose como fonte de carbono principal e foi capaz de consumir glicose e xilose em todas as corridas de fermentação. A produção de etanol por *Pichia stipitis* foi de  $90 \text{ g.L}^{-1}$ , avaliada num biorreator de tanque agitado utilizando o meio contendo xilose, também foi capaz de crescer e produzir etanol sob todas as condições de fermentação avaliadas. Bem como a *M. guilliermondii* e a *P. stipitis* inicialmente inoculadas em meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, que foram plaqueadas em ágar sabouraud e tiveram crescimento nas 96 horas de experimento.

A fermentação é um processo no qual o micro-organismo catalisa a conversão de uma substância em um determinado produto, se esta produção é economicamente vantajosa, ela poderá ser explorada industrialmente, assim essa atividade metabólica poderá ser explorada pela fermentação industrial.

As três leveduras testadas na fermentação, inicialmente com fontes de carbono os açúcares comuns utilizados em fermentações, D-xilose e D-glicose, mostraram um bom rendimento, sendo que a levedura utilizada como padrão *Pichia stipitis* só produziu álcool com D-glicose como fonte de carbono, nas condições testadas. A utilização de xilose é crítica para o sucesso de fermentação de biomassa em combustíveis e produtos químicos, mas poucos organismos na natureza são capazes de utilizá-lo *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada para a produção industrial de etanol, mas ela não consegue assimilar xilose, necessitando de uma adaptação genética para tal atividade, o que pode ser feito com o auxílio de *Pichia stipitis*. Logo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi descartada dos ensaios de fermentação.

Como as leveduras *Pichia stipitis*, *Pichia kudriavzevii* e *Meyerozyma guilliermondii* mostraram produção de álcool em D-xilose e D-glicose, o experimento foi conduzido utilizando resíduo de bagaço de cana-de-açúcar.

A leitura de álcool produzido pelas três leveduras, que utilizaram o meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, em alcoômetro foi essencial para os ensaios posteriores, que foram repetidos e analisados em cromatografia líquida de alta eficiência.



## **Cromatografia líquida de alta eficiência**

Uma variedade de fatores podem influenciar a fermentação da xilose por leveduras, incluindo pH, temperatura, agitação, aeração, xilose inicial, as concentrações de células e a suplementação do meio de fermentação com nutrientes, entre outros (FERREIRA et al., 2011). Foi reconhecido que a tecnologia de pré-tratamento é um fator importante para determinar a conversão eficiente da biomassa em etanol e um grande esforço tem sido feito para aumentar a digestibilidade de materiais lignocelulósicos para a sacarificação enzimática subsequente. O hidrolisado pode conter açúcares, dependendo do método utilizado na digestibilidade de materiais lignocelulósicos. Neste trabalho a concentração de açúcar no meio de cultura foi 11.53g/L, utilizando 50% de hidrolisado obtido (23.06g/L), Chandel et al. (2007) obteve 30,29 g/L de açúcar por hidrólise ácida do bagaço de cana de açúcar. Um grande problema com o processo de hidrólise de materiais lignocelulósicos, é a liberação de inibidores de fermentação que influenciam negativamente a bioconversão de açúcares nos produtos desejados (HUANG et al., 2011). Pode também haver um efeito sinérgico entre os compostos inibidores, que aumenta o desafio para o micro-organismo durante a fermentação no hidrolisado. A estratégia usual para minimizar o efeito inibidor causado por ácido durante a fermentação é ajustar o valor do pH dos hidrolisados, o que reduz significativamente a toxicidade (CANILHA et al., 2010; WU et al., 2014). O caldo foi neutralizado com CaOH, até o pH 5,0. A fermentação do hidrolisado pré-tratado foi a recomendada para a *P. stipitis* a CBS6054 pH 5,0, e a temperatura 30°C (KUMAR et al., 2009, WAN et al., 2012, SCORDIA et al., 2012, BISWAS et al., 2012, ZHA et al., 2013, DASGUPTA et al., 2013). Os compostos voláteis, tais como furfural e fenóis são removidos por ebulição, enquanto supercalagem com Ca(OH)<sub>2</sub> remover e/ou reduz a concentração de outros componentes ácidos, por exemplo, ácido acético e tânico (KUMAR et al., 2009). Embora o isolado *P kudriavzevii* CBA-519 exibiu tempo de fermentação prolongado para o hidrolisado, a concentração de etanol foi de 3.05 g/l foi obtido um rendimento de etanol de 0,26 g/g depois de 192h, mostrando um atraso na fermentação, sugerindo que a presença de compostos inibidores no hidrolisado poderia ter causado o stress para as células não adaptadas, atrasando o crescimento celular e a capacidade de fermentação. Isto sugere que a estirpe, adaptada durante o cultivo prolongado no hidrolisado, necessita aclimatar às tensões específicas presentes no hidrolisado, incluindo talvez melhor tolerância para quaisquer compostos inibitórios

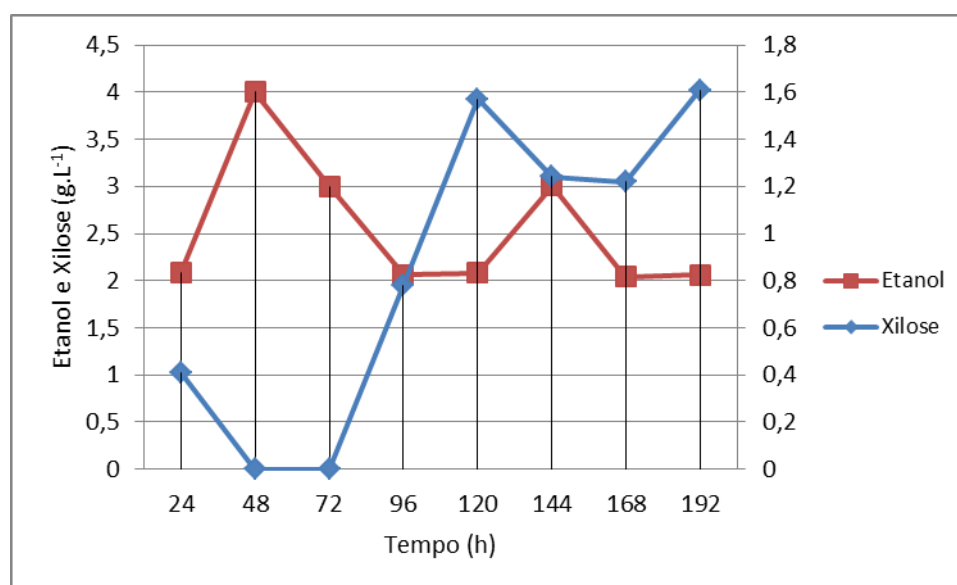
presentes. Alguns autores propuseram que a adaptação de um micro-organismo, em tais circunstâncias pode ser atribuído à síntese de novas enzimas ou cofatores que permitam o metabolismo do açúcar mais eficientes e reduzem os efeitos de quaisquer inibidores de Huang et al., (2009).

**Tabela 04.** Efeito de sacarificação e co-fermentação de açúcar residual durante a produção de etanol utilizando diferentes leveduras.

	<i>P stipitis</i> CBS6054			<i>P kudriavzevii</i> CBA-519			<i>M guilliermondii</i> CBA-524		
	D-Xilose mg/mL	D-glucose mg/mL	Etanol g/l	D-Xilose mg/mL	D-glucose mg/mL	Etanol g/l	D-Xilose mg/mL	D- glucose mg/mL	Etanol g/l
24	0,41	ND	2,08	0,75	5,37	ND	1,48	ND	<b>3,01</b>
48	ND	ND	<b>4,00</b>	0,71	5,25	ND	1,46	ND	2,07
72	ND	ND	3,00	1,39	3,55	ND	1,44	ND	2,07
96	0,78	ND	2,06	2,45	9,08	ND	3,27	ND	3,05
120	1,57	ND	2,08	2,29	7,74	ND	0,63	ND	1,09
144	1,24	ND	3,01	1,23	5,07	ND	5,09	ND	2,02
168	1,22	ND	2,04	1,14	3,39	ND	2,25	ND	2,06
192	1,61	ND	2,06	0	0,52	<b>3,05</b>	-	-	-
216	-	-	-	0	0	2,05	-	-	-
240	-	-	-	0	0	2,09	-	-	-

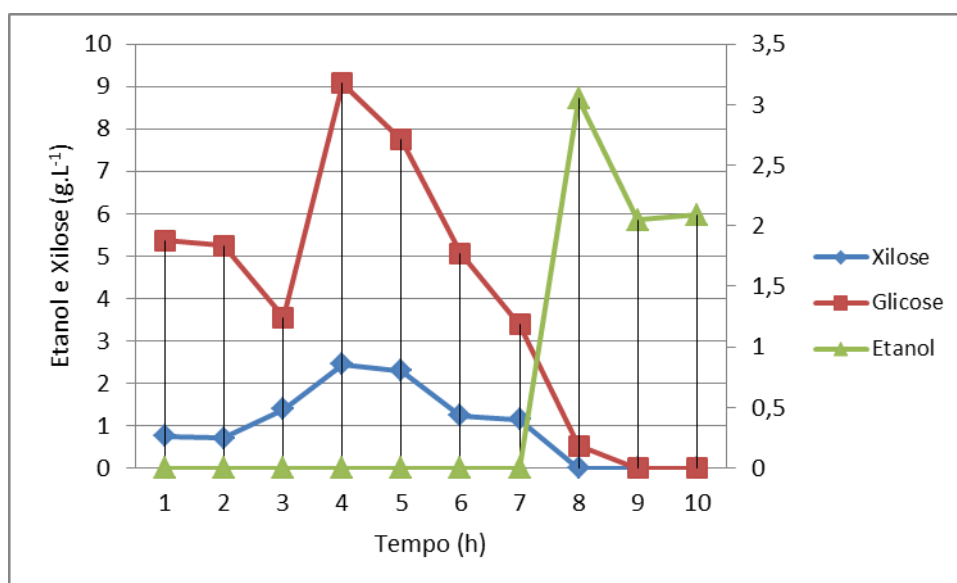
ND - não detectado

Durante o processo de fermentação pode ocorrer variações na concentração de etanol produzido devido principalmente quando há uma redução na fonte de carbono, no qual a levedura pode utilizar o etanol como fonte de carbono, como pode ser visto nos gráficos abaixo (Figuras: 14, 15 e 16), quando há uma disponibilização das pentoses consequentemente há um aumento na produção de etanol.



**Figura 14.** Etanol produzido por *Pichia stipitis* coletada a cada 24 horas de fermentação

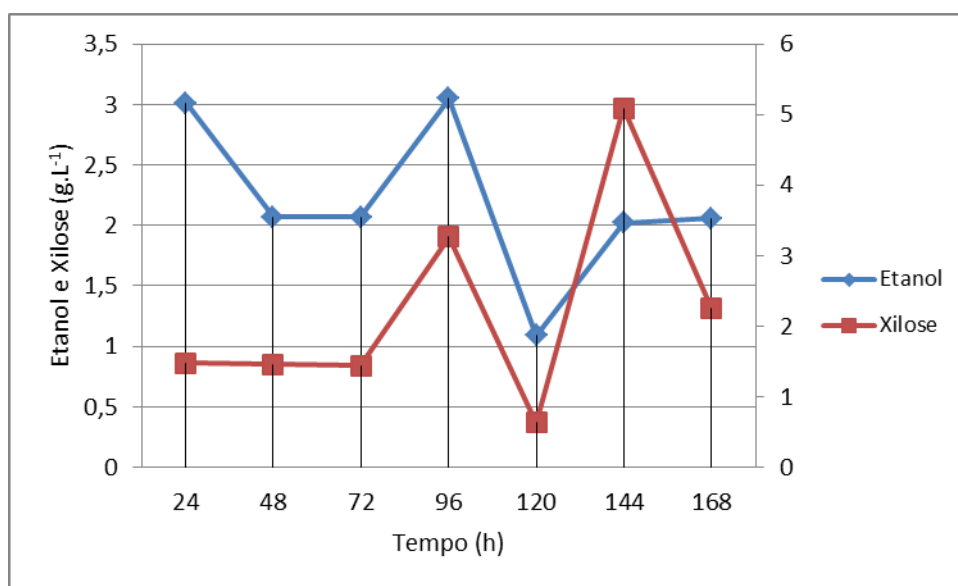
Com a utilização da levedura *Pichia kudriavzevii* observou-se a glicose em maior quantidade no meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar do que a xilose, onde ambas serviram de matéria-prima para a produção de etanol. A produção etanólica só ocorreu no 8º dia de crescimento da levedura, o pico dessa produção mostra claramente a utilização dos açúcares neste processo, isso acontece porque a levedura utiliza primeiro a glicose, que é um monossacarídeo, e depois a xilose, estes resultados estão de acordo com Nigam (2001), que usa resíduo de palha de trigo como fonte de carbono. A fermentação do meio hidrolisado de palha de trigo mostrou que a levedura *P. stipitis* consumiu a glicose antes da xilose, devido a diferenças metabólicas. Nigam (2001) demonstrou também que a linhagem de *Pichia stipitis* tem potencial para a conversão de biomassa em álcool combustível.



**Figura 15.** Etanol produzido por *Pichia kudriavzevii* coletada a cada 24 horas de fermentação

A utilização da levedura *Meyerozyma guilliermondii*, também conhecida como *Candida guilliermondi*, mostrou uma constante produção de etanol durante as 168 horas de fermentação. A xilose se manteve abaixo da produção de etanol, com exceção em 144 horas, onde teve o pico de 5 g.L no meio de cultura. Schirmer-Michel et al. (2008), usou o meio hidrolisado de casca de soja com a *C. guilliermondii* observando os compostos que se formam na fermentação e que podem atrapalhar o resultado. Os experimentos foram feitos com o meio de cultura com inibidores e sem inibidores de

cultivo. No crescimento das células e na produção de etanol, mostrou que os resultados dos cultivos não desintoxicados foi abaixo dos que não tiveram inibidores de fermentação no meio de cultivo. Nas primeiras 24 horas de cultivo *C. guilliermondii* teve o pico de produção em 5,78 g.L<sup>-1</sup> de etanol, o que mostra que o cultivo de *M. guilliermondii* em meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com 3,1 g.L<sup>-1</sup> de produção tem boas perspectivas.



**Figura 16.** Etanol produzido por *Meyerozyma guilliermondii* coletada a cada 24 horas de fermentação

As fermentações foram monitoradas através da medição D-glicose, D-xilose, e concentrações de etanol de amostras avaliadas com um intervalo fixo durante o processo, como mostra o padrão de produção de etanol na tabela 04 e 05 são apresentados os rendimentos obtidos. Um perfil típico de fermentação de biomassa de cana usando *P. stipitis* CBS6054 revelou a produção de etanol máxima (8,20g/l) com o rendimento (0,33g/g) e produtividade (0,17g / l / h) após 48h (SCORDIA et al., 2012), Os principais parâmetros para a comparação da fermentação para as diferentes linhagens no hidrolisados, foram; rendimento em etanol e produtividade, ressaltado que as condições foram as estabelecidos para *P. stipitis* CBS6054. Os valores de rendimento de etanol obtido no presente trabalho foi de 0,34 g/g para *P. stipitis* CBS6054, este foi também relatado anteriormente por outros autores, como Biswas et al. (2013); obtendo um rendimento 0,38g/g, Wan et al. (2012) também obteve 0,42 g/g de etanol para *P. stipitis* CBS 6054. Neste estudo a *P. stipitis* CBS6054, acumulou uma concentração final 4,0 g/L e um rendimento de produto de 0,34 g de etanol g de açúcar em 48 h. Para

*M. guilliermondii* CBA-524, a concentração máxima de etanol foi 3,01 g/L com um rendimento de 0,26 g de etanol g de açúcar após 24h de cultivo. Para a *M. guilliermondii* CBA-524 os resultados mostram que nas primeiras 24 h de cultivo, ocorreu acumulação máxima de etanol, em comparação com *P. stipitis* CBS6054 tabela 4. A produção máxima de etanol foi observada depois de 192h de fermentação para *P kudriavzevii* CBA-519, indicado que o mecanismo de conversão de etanol levou mais tempo para se adaptar. Um grande problema com o processo de hidrólise de materiais lignocelulósicos, é a libertação de inibidores de fermentação que influenciam negativamente a bioconversão de açúcares nos produtos desejados Huang et al. (2011). A estratégia usual para minimizar o efeito inibidor causado por ácido durante a fermentação, é o ajuste do pH para 6,0 com Ca(OH)<sub>2</sub>, que pode melhorar significativamente a fermentabilidade de hemiceluloses hidrolisado (SCORDIA et al., 2012).

**Tabela 05.** Comparação da produção de etanol utilizando leveduras recentemente isoladas e a *P. stipitis* CBS6054.

<b>Linhagem</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Etanol (g/L)</b>	<b>Y<sub>P/S</sub> (g/g)</b>	<b>Q<sub>P</sub> (gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>)</b>
<i>P stipitis</i> CBS6054	48	4.00	0.34	0.083
<i>P kudriavzevii</i> CBA-519	192	3.05	0.26	0.015
<i>M guilliermondii</i> CBA-524	24	3.01	0.26	0.125

Os rendimentos de conversão de açúcares em etanol (Y<sub>P/S</sub>) e produtividades volumétricas (Q<sub>P</sub>) apresentados na Tabela 5, foram de 0,34 g/g e 0,083 g/L/h para a *P stipitis* CBS6054, para a *P kudriavzevii* CBA-519 0,26 g/g e 0,015 g/L/h, e para a *M guilliermondii* CBA-524 0,26 g/g e 0,125 g/L/h, respectivamente. Os resultados obtidos no presente estudo, também tem sido relatada para *P. stipitis* DSM 3651 com um rendimento de 0,30 g/g e uma produtividade de 0,16 g/L/h em hidrolisado de bagaço de cana (CANILHA et al., 2010), a linhagem BY2 de *P. stipitis* para produção de etanol obteve 0,45 g/g e a produtividade volumétrica de 0,33 g/L/h a partir hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (HANDE et al., 2013), a linhagem NRRL Y-7124 de *P. stipitis* obteve rendimento volumétrico de 0,32 g/g e produtividade de 0,065 g/L/h em casca de sementes de girassol hidrolisado (TELLI-OKUR; EKEN-SARAÇOGLU, 2008). A linhagem NCIM-3497 de *P. stipitis* atingiu um rendimento de etanol de 0,425

g/g e a produtividade de 0,176 g/L/h no hidrolisado de *Eichhornia crassipes* (KUMAR et al., 2009), para *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2 os melhores resultados para a produção de etanol e a produtividade foi de 0,19 g/g e 0.13 g/l/h, respectivamente, a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (FERREIRA et al., 2011), e rendimento de etanol de 0,33 g/g e uma produtividade de 0,17 g/L/h para *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS6054 a partir *Arundo donax* L. (SCORDIA et al., 2012).

Após a concentração máxima de etanol, ocorreu uma redução na concentração (Tabela 04), provavelmente devido ao seu consumo pela levedura como uma consequência da exaustão rápida de açúcares a partir do meio de crescimento. Comportamento semelhante já foi observado por outras cepas de leveduras (CHANDEL et al., 2007); isto pode resultar da utilização de etanol para manter a viabilidade das células após o esgotamento dos açúcares (YUANGSAARD et al., 2013), indicando que esta estirpe também utiliza etanol como fonte de carbono (FERREIRA et al., 2011).

Nossos resultados são comparáveis aos observados com a linhagem *P. stipitis* CBS6054 adaptada, indicando que o processamento do bagaço hidrolisado sob esta condição não vai inibir o crescimento de *M guilliermondii* CBA-524. Os valores de rendimento em etanol e produtividade obtidos no presente trabalho (Tabela 4) não são muito elevados, mas estes resultados são de interesse quando se considera que este é o primeiro estudo sobre a produção de etanol por estas linhagens de levedura, e as condições estabelecidas para a fermentação foi as melhores para a *P. stipitis* CBS6054 padrão. Os parâmetros da fermentação podem ser alterados para uma melhor comparação entre os desempenhos de microrganismos, que permite identificar variações e prever as condições ótimas para cada linhagem cultivada, para o seu rendimento máximo e o tempo do processo, a fim de evitar o desperdício de tempo e de energia na fase final da fermentação (KUMAR et al., 2009), revelando, assim, a importância de estabelecer o melhor meio e a condições de fermentação para produção de etanol atingindo elevada produtividade utilizando a *M. guilliermondi* CBA-524 e *P. kudriavzevii* CBA-519.

A produção de etanol utilizando a *Sachromyces cerevisiae* aproveita apenas um terço da cana no processo de fermentação da sacarose, os outros dois terços poderiam ser utilizados por leveduras capazes de hidrolisar celulose e hemicelulose, justificando a

busca de novas leveduras e genes capazes de conferir a estas leveduras a capacidade de aproveitar melhor esta biomassa na produção de etanol.

O etanol de segunda geração não tem sido um sucesso, devido a necessidade de tecnologia que aumente a disponibilidade de celulose fermentável (BARCELOS et al., 2013). Novas leveduras termotolerantes capazes de utilizar uma gama de açúcares, alta capacidade de secreção e crescimento extremamente rápido como *Kluyveromyces marxianus* (GARCÍA, 2006) e a *M. guilliermondi* CBA-524 abre novas perspectivas para a utilização deste substrato para produção de etanol. A eficácia da fermentação de materiais lignocelulósicos apresenta dois desafios principais. Em primeiro lugar, a estrutura cristalina da celulose, o que é altamente resistente à hidrólise e a associação lignina-celulose, forma uma barreira física que impede o acesso enzimático às fibras de celulose. Além disso, hidrólise acida exige a utilização de altas temperaturas e pressões, levando à destruição de uma parte de hidratos de carbono, que são convertidos principalmente a compostos furânicos, e a geração de substâncias tóxicas pela degradação parcial da lignina (MAEDA, et al., 2001).

Os pré tratamentos do material lignocelulósico utilizados atualmente apresentam desvantagem devido o custo e geração de compostos tóxicos que afetam a fermentação, quando comparado com a hidrólise enzimática (SALVACHÚA et al., 2013), por isso a necessidade de novas leveduras e novos genes de basidiomicetos capazes de quebrar a lignina, que combinados podem obter melhores rendimentos no processo de fermentação. A degradação biológica da lignocelulose é um complexo processo onde muitos fatores, como a levedura, e condições de fermentação estão envolvidos. A clonagem destas enzimas nestas leveduras será um passo importante neste processo, a utilização da *M. guilliermondi* CBA-524 geneticamente modificada com os genes de lacase e lignina peroxidase, poderia melhorar sua eficiência neste processo de fermentação.

## CONCLUSÃO

Foi possível identificar dois genes de lignina peroxidase no *Pleurotus* sp UEA e no *Trametes* sp. UEA, com maior similaridade encontrada no GeneBank ao *T.versicolor* 495278 .

Nos quatro fungos (*Hexagonia glabra* UEA, *Pycnoporus sanguineus* UEA, *Trametes* sp UEA e *Pleurotus* sp UEA) foi possível amplificar o gene de lacase, mas com baixa similaridade, a sequência com maior similaridade do GeneBank foi a do *Coriolus versicolor* 2598856.

Ambas as leveduras *Meyerozyma guilliermondi* CBA-524 e *Pichia kudriavzevii* CBA-519 mostraram potencial de produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana, que tem demonstrado a sua potencialidade como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração.

Melhorias na formulação de meios de cultura, modificação nos métodos de fermentação e inserção de novos genes, poderá fornecer os rendimentos desejados de etanol a partir destes micro-organismos em hidrolisados de lignocelulose. Obtendo assim linhagens com capacidade de produzir etanol em escala industrial.



## REFERÊNCIAS

- ABREU, C.A.; FERREIRA, M.E.; BORKET, C.M. Disponibilidade e avaliação de elementos catiônicos: Zinco e cobre. In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P.; RAIJ, B.; ABREU, C.A., eds. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal, CNPq/FAPESP/POTAFOS, 2001. p.125-150.
- ADRIO, J.L.; DEMAIN, A.L. Methods in Biotechnology. **Microbial Enzymes and Biotransformations**. BARREDO, J. L. (ed.); Humana Press Inc., Totowa, NJ, vol. 17, cap. 1, 2005.
- ADRIO, J.L.; DEMAIN, A.L. Genetic improvement of process yielding microbial products. **FEMS Microbiol. Rev.** vol. 30, p. 187-214. 2014.
- AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G.; TORRY-SMITH, M.; WENGER, K.S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, vol. 41, p. 2333-2336. 2006.
- ALONSO, D.M.; MARISCAL, R.; MORENO-TOST, R.; ZAFRA POVES, M.D.; LÓPEZ-GRANADOS, M. Potassium leaching during triglyceride transesterification using K/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalysts. **Catalysis Communications**, vol. 8, no 12, p. 2074–2080. 2007.
- ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M.G.S. Bioethanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência**. Universidade de Campinas, 2006.
- ARSLAN, Y.; EKEN-SARAÇOĞLU, N. Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation. **Bioresource Technology**, vol. 101, p. 8664-8670. 2010.
- ASGHER, M.; IQBAL, H.M.N.; IRSHAD, M. Characterization of purified and xerogel immobilized novel lignin peroxidase produced from *Trametes versicolor* IBL-04 using solid state medium of corncobs. **BMC Biotechnology**, vol.12, no 1, p. 46. 2012.
- BAJPAI, P.; MISHRA, S.P.; MISHRA, O.P.; KUMAR, S.; BAJPAI, P.K.; SINGH, S. Biochemical pulping of bagasse. **Biotechnology Progress**, vol. 20, no. 4, p.1270-1272, 2004.
- BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, vol. 34, no 5, p. 551-573. 2008.
- BARCELOS, C.A.; MAEDA, R.N.; BETANCUR, G.J.V.; PEREIRA JÚNIOR, N. The essentialness of delignification on enzymatic hydrolysis of a sugar cane bagasse

cellulignin for second generation ethanol production. **Waste Biomass Valor**, vol. 4, no 2, p. 341-346. 2013.

BISWAS, A.K.; CHATLI, M.K.; SAHOO, J. Antioxidant potential of curry (*Murraya koenigii* L.) and mint (*Mentha spicata*) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. **Food Chemistry**, vol. 133, no 2, p. 467-472, 2012.

BISWAS, R.; UELLEND AHL, H.; AHRING, B.K. Conversion of C6 and C5 sugars in undetoxified wet exploded bagasse hydrolysates using *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS6054. **AMB Express**, vol. 3, p. 42. 2013.

BLACK, A.; REDDY, C.A. Cloning and characterization of a lignin peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 179, no. 1, p. 428-435. 1991.

BOTÃO, S.G.; LACAVA, P.M. Uso de bagaço da cana-de-açúcar para cooperação de energia elétrica, no estado de São Paulo e a comercialização do excedente da energia gerada. **Revista Biociências**, vol. 9, n. 3, p. 43-47. 2003.

BRASIL. O etanol brasileiro no mundo – Os impactos socioambientais causados por usinas exportadoras – ONG Repórter Brasil, 2011. Disponível em: [www.agrocombustiveis.org.br](http://www.agrocombustiveis.org.br)

BURKE, R.M.; CAIRNEY, J.W.G. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto and ericoid mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, vol. 12, p. 105-116. 2002.

CALLAGHAN, T.V.; WERKMAN, B.R.; CRAWFORD, R.M.M. The tundra-taiga interface and its dynamics: concepts and applications. **Ambio Special Report**, vol. 12, p. 6-14. 2002.

CAMARGO, P.D. Força verde: um novo campo para a indústria química. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, p. 18-21, 2007.

CANILHA, L.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; ANTUNES, F.A.F.; FREITAS, W.L.C.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, vol. 2012. 2012.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemical and Biotechnology**, vol. 161, p. 84-92. 2010.

CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M.; MAGALHÃES, A.F.; FREIRE, M.A.L.; SILVA, F.F. SILVA, R.R.; CARVALHO, B.M.A. Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 41, no 1, p. 125 -132. 2006.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, vol. 32, no 8, p. 2191-2195. 2009.

CASSA-BARBOSA, L.A. **Isolamento e Caracterização de Leveduras Fermentadoras de Pentoses da Biodiversidade Amazônica**. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

CASSA-BARBOSA, L.A.; PROCÓPIO, R.E.L.; MATOS, I.T.S.R.; FILHO, A.S. Isolation and characterization of yeasts capable of efficient utilization of hemicellulosic hydrolysate as the carbon source. **Genetics and Molecular Research**, vol. 14, no 3, p. 11605-11612. 2015.

CENBIO - Centro Nacional de Referência em Biomassa. Acesso em 07 de Janeiro de 2016. Disponível em: <http://143.107.4.241/publicacoes.htm>

CHANDEL AK, Kapoor RK, Singh A, Kuhad RC (2007) Detoxication of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, vol. 98:1947-1950

CHAURASIA, P.K.; BHARATI, S.L.; SINGH, S.K.; YADAVA, S. Animation of p-Hydroquinone by laccase of *Xylaria polymorpha* MTCC-1100. **Brazilian Journal of General Chemistry**, vol. 85, no. 3, p. 683-685. 2015

CHI, Z., AMEBORY, N. *Saccharomyces cereviasae* strains with different degrees of ethanol tolerance exhibit different adaptive responses to produced ethanol. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, vol. 24, p. 75-78. 2000.

CHIVUKULA, M.; SPADARO, J.T.; RENGANATHAN, V. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. **Biochemistry**, vol. 34, p. 7765- 7772, 1995.

CONAB. (2016) Companhia Nacional de Abastecimento. Acesso em 07 de Janeiro de 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>

COUTO, S.R.; TOCA-HERRERA, J.L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotecnology Advances**, vol. 25, no. 6, p. 558-569. 2007.

DANTAS FILHO, P.L. **Análise de custos na geração de energia com bagaço de cana-de-açúcar: um estudo de caso em quatro usinas de São Paulo**. 2009. 175 p. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós graduação em Energia). Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

DASGUPTA, D.; SUMAN, S.K.; PANDE, D.; GHOSH, D.; KHAN, R.; AGRAWAL, D.; JAIN, R.K.; VADDE, V.T.; ADHIKARI, D.K. Design and optimization of ethanol

production from bagasse pith hydrolysate by a thermotolerant yeast *Kluyveromyces sp.* IPE453 using response surface methodology. **SpringerPlus**, vol. 2, no. 159. 2013.

DEKKER, R.F.H.; VASCONCELOS, A.F.D.; BARBOSA, A.M.; GIESE, E.C.; PACCOLA-MEIRELLES, L.A. A new role of veratryl alcohol regulation of synthesis of lignocellulose-degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus *Botryosphaeria sp.*: influence of carbon source. **Biotechnology Letters**, vol. 23, p. 1987-1993. 2001.

DEMAIN, A.L.; ADRIO, J.L. Contributions of microorganisms to Industrial Biology. **Molecular Biotechnology**, vol. 38, p. 41-55, 2008.

DEMAIN, A.L. Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In: SUTTON, B. A **Century of Mycology**. Cambridge: Cambridge University Press. p. 233-254. 1996.

DURÁN, A.E.; MUNIESA, M.; MÉNDEZ, X.; VALERO, F.; LUCENA, F.; JOFRE, J. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 92, no. 2, p. 338-347. 2002.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; HEINZE, T. Hemicellulose. In: **Polysaccharides**. Edited by: Heinze T. Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag, vol. 186, p. 1-67. 2013.

EGGERT, C.; LAFAYETTE, P.R.; TEMP, U.; ERIKSSON, K.L. DEAN, J.F.D. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 1766-1772. 1998.

ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; ASATIANI, M.; KVESITADZE, G. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. **Enzyme Microb Technol.** vol. 38, p. 998-1004. 2006.

ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARDZIANI, T. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresour Technol.** vol. 99, p. 457-462. 2008.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARDZIANI, T.; AGATHOS, S.N. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. **World J Microbiol Biotechnol.** vol. 25, p. 331-339. 2009.

FAN, J.X.; YANG, X.X.; SONG, J.Z.; HUANG, X.M.; CHENG, Z.X.; YAO, L.; JUBA, O. S.; LIANG, Q.; YANG, Q.; ODEPH, M.; SUN, Y.; WANG, Y. Heterologous Expression of Transaldolase Gene Tal from *Saccharomyces cerevisiae* in *Fusarium*

*oxysporum* for Enhanced Bioethanol Production. **Appl Biochem Biotechnol.** vol. 164, p.1023-1036. 2011.

FERREIRA, A.D.; MUSSATTO, S.I.; CADETE, R.M.; ROSA, C.A.; SILVA, S.S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian Forest. **Yeast**, vol. 28, p. 547-554. 2008.

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A. NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BOM, E. P. S. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste Biomass Valor**, vol. 1, p. 65-76. 2010.

FILHO, A.J.M.M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar.** 2008, 79 f. Dissertação (Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz -USP.

FUGITA, T.P.L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.** 2010, 60 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

GALHAUP, C.; WAGNER, H.; HINTERSTOISSER, B.; HALTRICH, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 30, p. 529-536. 2002.

GARCIA, T.A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus*.** 2006, 110p. Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular). Universidade Nacional de Brasília, Brasília-DF.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, vol. 3, no. 1, p. 1-26. 1999.

GIARDINA, P.; CANNIO, R.; MARTIRANI, L.; MARZULLO, L.; PALMIERI, G.; SANNIA, G. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 2408-2413. 1995.

GOLD, M.H. e ALIC, M. Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiological Reviews**. vol. 57, no. 3, p. 605-622. 1993.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Quím. Nova**, vol. 32, no. 3, p. 582-587, 2009.

GOMES, C.M.F.; VASCONCELOS, A.M.; EGITO, A.S.; CARNEIRO, J.C.; FONTELES, N.L.O.; SALLES, H.O. Biodegradação do bagaço de cana-de-açúcar por microrganismos ruminais de caprinos e ovinos. **Bioscience Journal**, vol. 31, no 1, p. 204-214. 2015.

GOUVEIA, E.R.; NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR, A.M.; ROCHA, J.G.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**. vol. 32, p. 1500-1503. 2009.

GUO, C.; HE, P.; LU, D.; SHEN, A.; JIANG, N. Cloning and molecular characterization of a gene coding D-xylulokinase (CmXYL3) from *Candida maltose*. **J. Appl. Microbiol.** 101, 139-150, 2006.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi, production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiol Lett**, vol. 13, p. 125–135. 1994.

HERNANDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMIREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A.; TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**. vol. 100, no. 3, p. 1238-1245. 2009.

HOEGGER, P.J.; KILARU, S.; JAMES, T.Y.; THACKER, J.R.; KÜES, U. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. **FEBS J**, vol. 273, p. 2308–2326. 2006.

HONG, J.; WANG, Y.; KUMAGAI, H.; TAMAKI, H. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulose genes. **Journal of Biotechnology**, vol. 130, no. 2, p. 114-123. 2007.

HORII, J. A cana-de-açúcar como matéria prima. Piracicaba: ESALQ, Dept. de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, 2004. 27 p.

HUANG, C.F.; JIANG, Y.F.; GUO, G.L.; HWANG, W.S. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. **Bioresource Technology**, vol. 102, p. 3322-3329. 2011.

HUANG, C.F.; LIN, T.H.; GUO, G.L.; HWANG, W.S. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**. vol. 100, p. 3914-3920. 2009.

HUANG, J.; CHEN, D.; WEI, Y.; WANG, Q.; LI, Z.; CHEN, Y.; HUANG, R. Direct ethanol production from lignocellulosic sugars and sugarcane bagasse by a recombinant *Trichoderma reesei* strain HJ48. **The Scientific World Journal**, vol. 2014. 2014.

HUMBERT, R.P. **The growing of sugarcane**. Spaced planting. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, London, New York. 118. 1968.

JANUSZ, G.; KUCHARZYK, K.H.; PAWLIK, A.; STASZCZAK, M.; PASZCZYNSKI, A.J. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 52, p. 1–12. 2013.

- JEFFRIES, T.W. Biodegradation of lignin carbohydrate complexes. **Biodegradation**. vol. 1, p. 163-176, 1990.
- JOHANNES, T.W.; ZHAO, H. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 9, p. 261–267. 2006.
- JOHJIMA, T.; ITOH, N.; KABUTO, M.; TOKIMURA, F.; NAKAGAWA, T.; WARIISHI, H.; TANAKA, H. Direct interaction of lignin and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry**. vol. 96, p. 1989-1994, 1999.
- JOHNSON, E.A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts – the ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 97, no. 2, p. 503-517. 2013.
- JONSSON, L.; NYMAN, P.O. Characterization of a lignin peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Biochimie**, vol. 74, p. 177-182. 1992.
- KACHLISHVILI, E.; PENNINGCKX, M.J.; TSIKLAURI, N.; ELISASHVILI, V. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. **World J Microbiol Biotechnol**. 22:391–397, 2006.
- KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Appl Microbiol Biotechnol**. vol. 64, p. 137–145. 2004.
- KAPICH, A.N.; PRIOR, B.A.; BOTHA, A.; GALKIN, S.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A. Effect of lignocellulose-containing substrate on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. **Enzyme Microb Technol**. vol. 34, p. 187–195. 2004.
- KAPICH, A.N.; PRIOR, B.A.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A. A rapid method to quantify prooxidant activity in cultures of wood-decaying white-rot fungi. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 61, p. 261-271. 2005.
- KAWASAKI, J.; SILALERTRUKSA, T.; SCHEYVENS, H.; YAMANOSHITA, M. Environmental sustainability and climate benefits of green technology for bioethanol production in Thailand. **J. Issaas**, vol. 21, no. 1, p. 78-95. 2015.
- KIISKINEN, L.; SALOHEIMO, M. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 137-144. 2004.
- KIRK, T.K.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W.J.; LORENZ, L.F.; ZEIKUS, J.G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**. vol. 117, p. 277-285, 1978.
- KIRK, K.T. Degradation and conversion of lignocelluloses. Degradation and conversion of lignocelluloses. In: Smith, J. E.; Berry, D. R.; Kristiansen, B. **The filamentous fungi, fungal technology**. London: Edward Arnold. vol. 4, p. 266-295. 1983.

- KLOCK, U. 2000. **Qualidade da madeira juvenil de *Pinus maximinoi* H. E. MOORE**. Tese (Doutorado em Ciências Florestais). Universidade Federal do Paraná, Pós-graduação em Engenharia Florestal.
- KNEZEVIC, A.; MILOVANOVIC, I.; STAJIC, M.; LONEAR, N.; BRESKI, I.; VUKOJEVIC, J.; CILERDZIC, J. Lignin degradation by selected fungal species. **Bioresource Technol.** vol. 138, p. 117-123. 2013.
- KUMAR, D.; MURTHY, G. S. Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy use in cellulosic ethanol production. **Biotechnol. Biofuels**, vol. 4, p. 27. 2011.
- KUMAR, S.; DHEERAN, P.; SINGH, S.P.; MISHRA, I.M.; ADHIKARI, D.K. Cooling system economy in ethanol production using thermotolerant yeast *Kluyveromyces sp.* IIPE453. *Am. J. Microbiol. Res.* vol. 1, p. 39-44. 2013.
- KUMAR, A.; SINGH, L.K.; GHOSH, S. Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, vol. 100, p. 3293-3297. 2009.
- LEVIN, L.; FORCHIASSIN, F.; RAMOS, A.M. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. **Mycologia**, vol. 94, p. 377-383. 2002.
- LEVIN, L.; HERRMANN, C.; PAPINUTTI, V. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. **Biochem Eng J.** vol. 39, p. 207–214. 2008.
- LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. In: LIMA, U.A. (Coord.). *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blucher. **Biotechnologia Industrial**. p. 1-43, 2001.
- LI, Y.; ZHANG, W.; ZHENG, D.; ZHOU, Z.; YU, W.; ZHANG, L.; FENG, L.; LIANG, X.; GUAN, W.; ZHOU, J.; CHEN, J.; LIN, Z. Genomic Evolution of *Saccharomyces cerevisiae* under Chinese Rice Wine Fermentation. **Genome Biol Evol**, vol. 6, no. 9, p. 2516-2526. 2014.
- LYONS, N.A.; FONSLow, B.R.; DIEDRICH, J.K.; YATES III, J.R.; MORGAN, D.O. Sequential primed kinases create a damage-responsive phosphodegron on Eco1. **Nature Structural & Molecular Biology**, vol. 20, p. 194-201. 2013.
- MACHADO, G.O. **Preparação e caracterização de CMC e CMC grafitizado**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química de São Carlos, São Paulo, 2000, 101p.
- MACHUCA, A. e FERRAZ, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme Microb Technol.** 29:386–391, 2001.



MACIEL, M.J.M.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H.C.T. Industrial and Biotechnological Applications of Ligninolytic Enzymes of the Basidiomycetes. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 13, n. 6, p. 1-13, 2010.

MAEDA, Y.; KAJIWARA, S.; OHTAGUCHI, K. Manganese peroxidase gene of the perennial mushroom *Elfvigia applanata*: cloning and evaluation of its relationship with lignin degradation. **Biotechnology Letters**. vol. 23, p. 103-109. 2001.

MAHAJAN, S.; PRABHUNE, A. Evaluation of ethanol production by a new isolate of yeast during fermentation in synthetic medium and sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Ann Microbiol**, vol. 63, p. 63-70. 2013.

MARCOTTE, M.; TAHERIAN, A. R.; RAMASWAMY, H. S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International**, vol. 34, n. 8, p. 695-703, 2001.

MARDONES, L.; GOMIDE, J.L.; FREER, J.; FERRAZ, A.; RODRIGUEZ, J. Kraft pulping of Eucalyptus nitens wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal Chemistry. Technology. Biotechnology**. vol. 81, p. 608-613, 2006.

MATEUS, D.R. e OKINO, L.K. **Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos**. In: VLR BONONI (ed.) *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. São Paulo. Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, p. 106-139. 1998.

MAYER, A.M. e STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**. vol. 60, no. 6, p. 551-565, 2002.

MENDES, R. **Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. 2008, 119 f. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

MIKUNI, J.; MOROHOSHI, N. Cloning and sequencing of a second laccase gene from the white-rot fungus *Coriolus versicolor*. **FEMS Microbiology Letters**, p. 79-84. 1997.

MIYAFUJI, H.; DANNER, H.; NEUREITER, M.; THOMASSER, C.; BVOCHORA, J.; SZOLAR, O.; BRAUN, R. Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 32, no. 3-4, p. 396-400. 2003.

MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**. vol. 93, p. 1-10. 2004.

NAIDU, R.; SYERS, J.K.; TILLMAN, R.W.; KIRKMAN, J.H. Effect of liming and added phosphate on charge characteristics of acid soils. **Journal of Soil Science, Oxford**, vol. 41, no.1, p.157-164. 1990.

NIEMENMAA, O.; UUSI-RAUVA, A.; HATAKKA, A. Demethoxylation of [O14CH3]-labeled lignin model compounds by the brown-rot fungi *Gloeophyllum trabeum* and *Poria* (*Postia*) *placenta*. **Biodegradation**, vol.19, p. 555–565. 2008.

NIGAM, J.N. Ethanol production from wheat straw hemicelluloses hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, vol. 87, p. 17-27. 2001.

OKAMOTO, Y. Functional analysis of ISC1 by site-directed mutagenesis. **Biochemistry**, vol. 42, no. 25, p. 7855-7862. 2003.

OLIMPIO, J.A. O açúcar do Brasil. Sinterpi – Sindicato dos trabalhadores e trabalhadoras em assistência técnica e extensão rural do estado do Piauí. <http://www.sinterpi.org.br/> acesso em: 13 de março de 2014.

OSMA, J.F.; SARAVIA, V.; HERRERA, J.L.T.; COUTO, S.R. Mandarin peelings: the best carbon source to produce laccase by static cultures of *Trametes pubescens*. **Chemosphere**. vol. 67, p. 1677–1680. 2007.

PACHECO, T.F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características flutuantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2011, 106f. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

PAPINUTTI, V.L.; FORCHIASSIN, F. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes fomentarius* growing in solid-state fermentation. **J Food Eng.** vol. 81, p. 54–59. 2007.

PEZZELLA, C.; AUTORE, F.; GIARDINA, P.; PISCITELLI, A.; SANNIA, G.; FARACO, V. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. **Current Genetic**. vol. 55, p. 45-57. 2009.

POINTING, S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 57, no. 1-2, p. 20-33. 2001.

POMPEU, G.B. **Comportamento enzimático de quatro fungos lignocelulolíticos crescidos em bagaço e palha de cana-de-açúcar e expostos a duas concentrações de nitrogênio, visando à produção de etanol**. 2010, 96 f. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo – Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

PORTAL DO BIOGÁS - Acesso em 20 de dezembro de 2015. Disponível em: <http://www.portaldobiogas.com/>

PROÁLCOOL – MCT – Documento do Ministério da Ciência e Tecnologia - Acesso em 20 de dezembro de 2015. Disponível em: [http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0005/5512.pdf/](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0005/5512.pdf/)

PRUDENTE, D. S.; MASUNAGA, E.; MORAES, P. H. G.; OLIVEIRA, R. A utilização do bagaço de cana-de-açúcar na composição da dieta no confinamento bovino. **Cognitio**, vol. 1, p. 1. 2010.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R.E.; MARTÍNEZ-ANAYA, C.; CUERVO-SOTO, L.I.; SEGOVIA, L.; FOLCH-MALLOL, J.L. Loosenin, a novel protein with cellulose disrupting activity from *Bjerkandera adusta*. **Microbial Cell Factories**. vol. 10, p. 8. 2011.

RAMOS, J.; ROJAS, T.; NAVARRO, F.; DAVALOS, F.; SANJUAN, R.; RUTIAGA, J.; YOUNG, R.A. Enzymatic and fungal treatments on sugarcane bagasse for the production of mechanical pulps. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**. vol. 52, p. 5057-5062. 2004.

REBRIKOV, D.N.; STEPANOVA, E.V.; KOROLEVA, O.V.; BUDARINA, Z.H.I.; ZAKHAROVA M.V; YURKOVA, T.V.; SOLONIN, A.S.; BELOVA, O.V.; POZHIDAEVA, Z.A.; LEONT'EVSKY, A.A. Laccase of the lignolytic fungus *Trametes hirsuta*: Purification and characterization of the enzyme, and cloning and primary structure of the gene. **Applied Biochemistry and Microbiology**, vol. 42, no. 6, p. 564-572. 2006.

REDLAK, K.; DAHM, H.; CIESIELSKA, A.; STRZELCZYK, E. Enzymatic activity of ectendomycorrhizal fungi. **Biology and Fertility of Soils**, vol. 33, no. 1, p. 83-90. 2001.

RICHARD, H. **Enzimologia e Biocatálise**. In: SVRIBAN, R. (Coord.). Biotecnologia. São Paulo: Manole, Parte: 3: Engenharia Enzimática, cap. 1, p. 179-207. 1985

RIPOLI, T.C.C.; RIPOLI, M.L.C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba: Barros & Marques Ed. Eletrônica, 302 p. 2004.

RODRIGUEZ-PORRATA, B.; NOVO, M.; GUILLAMÓN, J.; ROZÉS, N.; MAS, A.; CORDERO OTERO, R. Vitality enhancement of the rehydrated active dry wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 126, no. 1-2, p. 116-122. 2008.

ROSALES, E.; RODRIGUEZ COUTO, S.; SANROMAÑ, A. New uses of food wastes: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. **Biotechnol Lett**. vol. 24, p. 701–704. 2002.

ROSALES, E.; RODRIGUEZ COUTO, S.; SANROMAÑ, M.A. Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. **J Food Eng**. vol. 66, p. 419–423. 2005.

RYU, B.; KIM, J.; KIM, K.; CHOI, Y.; HAN, J.; YANG, J. High-cell-density cultivation of oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* for biodiesel production using

organic waste from the brewery industry. **Bioresource Technology**, vol. 135, p. 357-364. 2013

SALVACHÚA, D.; MARTÍNEZ, A.T.; TIEN, M.; LÓPEZ-LUCENDO, M.F.; GARCÍA, F.; RÍOS, V.; MARTÍNEZ, M.J.; PRIETO, A. Differential proteomic analysis of the secretome of *Irpex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, vol. 6, p. 115. 2013.

SANTOS, J. R.A.; LUCENA, M.; GUSMÃO, N.; GOUVEIA, E.R. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, vol. 36, p. 584-588. 2012.

SAUCEDO-LUNA, J.; CASTRO-MONTOYA, A.J.; MARTINEZ-PACHECO, M.M.; SOSA-AGUIRRE, C.R.; CAMPOS-GARCIA, J. Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from *Agave tequilana* bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. **J Ind Microbiol Biotechnol**. vol. 38, no. 6, p. 725-32. 2011.

SCHIRMER-MICHEL, A.C.; FLÔRES, S.H.; HERTZ, P.F.; MATOS, G.S.; AYUB, M.A.Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**. vol. 99, p. 2898-2904. 2008.

SCHIRMER-MICHEL, A.C.; FLÔRES, S.H.; HERTZ, P.F.; AYUB, A.Z. Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 84, no. 2, p. 223-228. 2009.

SCHNEIDER, P.; CASPERSEN, M.B.; MONDORF, K.; HALKIER, T.; SKOV, L.K.; OSTERGAARD, P.R. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. **Enzyme Microbial Technology**. vol. 25, p. 502-528. 1999.

SCORDIA, D.; COSENTINA, S.L.; LEE, J.W.; JEFFRIES, T.W. Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicelluloses hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitidis* CBS6054. **Biomass and bioenergy**, vol. 39, p. 296-305. 2012.

SILVA, J.P.A.; MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitidis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. vol. 24, no. 1, p. 151-156. 2011.

SONGULASHVILI, G.; ELISASHVILI, V.; WASSER, S.; NEVO, E.; HADAR, Y. Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation. **Biotechnol. Lett**. vol. 28, p. 1425-1429. 2006.

SOUZA, A.P.; GRANDIS, A.; LEITE, D.C.C.; BUCKERIDGE, M.S. Sugarcane as a bioenergy source: history, performance, and perspectives for second-generation bioethanol. **Bioenerg. Res**. vol. 7, p. 24-35. 2014.

SUGIURA, M.; HIRAI, H.; NISHIDA, T. Purification and characterization of a novel lignin peroxidase from white-rot fungus *Phanerochate sordida* YK-624. **FEMS Microbiology Letters**. vol. 224, p. 285-290. 2003.

SZENGYEL, Z. **Ethanol from wood cellulose enzyme production**. 2000, 121 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Lund – Departamento de Engenharia Química.

TELLI-OKUR, M.; EKEN-SARAÇOĞLU, N. Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 2162-2169. 2008.

TEMP, U.; ZIEROLD, U.; EGGERT, C. Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. **Gene**, vol. 236, p. 169-177. 1999.

TOMÁS-PEJÓ, E.; NEGRO, M.J.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, M. Effect of nutrient addition on preinoculum growth of *S. cerevisiae* for application in SSF processes. **Biomass Bioenergy**, vol. 45, p. 168–174. 2012.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**. vol. 72, p. 169-183. 2000.

UDOP, 2012; União dos produtores de bioenergia <http://www.udop.com.br/>

ÚNICA, União da Indústria de Cana-de-açúcar. Acesso em 07/01/ 2016. Disponível em: <http://www.unica.com.br/linha-do-tempo/>

UZAN, E.; NOUSIAINEN, P.; BALLAND, V.; SIPILÁ, J.; PIUMI, F.; NAVARRO, D.; ASTHER, M.; RECORD, E.; LOMASCOLO, A. High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 108, no. 6, p. 2199-2213, 2010.

VITTI, A.C. **Utilização pela cana-de-açúcar (cana planta) do nitrogênio da uréia (15N) e do mineralizado no solo em sistemas de manejo com e sem a queima**. 1998. 93p. Dissertação (Mestrado) Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1447-1457. 2012.

WANG, H.; SHI, P.; LUO, H.; HUANG, H.; YANG, P.; YAO, B. A thermophilic  $\alpha$ -galactosidase from *Neosartorya fischeri* P1 with high specific activity, broad substrate specificity and significant hydrolysis ability of soymilk. **Bioresource Technology**, vol. 153, p. 361-364. 2014.

- WHITELEY, C.G. e LEE, D.J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme Microbiology and Technology**. vol. 38, p. 291-316. 2006.
- WU, C.H.; CHIEN, W.C.; CHOU, H.K.; YANG, J.; LIN, H.T.V. Sulfuric Acid Hydrolysis and Detoxification of Red Alga *Pterocladia capillacea* for Bioethanol Fermentation with Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus*. **J. Microbiol. Biotechnol**, vol. 24, no. 9, p. 1245-1253. 2014.
- YANASE, M.; TAKATA, H.; FUJII, K.; TAKAHA, T.; KURIKI, T. Cumulative effect of amino acid replacements results in enhanced thermostability of potato type L alpha-glucan phosphorylase. **Appl Environ Microbiol**, vol. 71, p. 5433–5439. 2005.
- YAVER, D.S.; GOLIGHTLY, E.J. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. **Gene**, vol. 28, p. 95–102. 1996.
- YELLE, D.J.; RALPH, J.; LU, F.; HAMMEL, K.E. Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. **Environmental Microbiology**, vol. 10, no. 7, p. 1844-1849. 2008.
- YELLE, D.J.; WEI, D.; RALPH, J.; HAMMEL, K.E. Multidimensional NMR analysis reveals truncated lignin structures in wood decayed by the brown rot basidiomycete *Postia placenta*. **Environmental Microbiology**, vol. 13, no. 4, p. 1091-1100. 2011.
- YUANGSAARD, N.; YONGMANITCHAI, W.; YAMADA, M.; LIMTONG, S. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. **Antonie van Leeuwenhoek**. vol. 103, p. 577-588. 2013.
- ZHA, Y.; HOSSAIN, A.H.; TOBOLA, F.; SEDEE, N.; HAVEKES, M.; PUNT, P.J. *Pichia anomala* 29X: a resistant strain for lignocellulosic biomass hydrolysate fermentation. **FEMS Yeast Res**, vol. 13, p. 609–617. 2013.
- ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. vol. 35, p. 367-375. 2008.
- ZHOU, X.; LIN, X.; MA, W.; FANG, W.; CHEN, Z.; YANG, B.; LIU, Y. A NEW AROMATIC amine from fungus *Pestalotiopsis vaccinia*. **Phytochemistry Letters**, vol. 7, p. 35-37. 2014.
- ZIFCAKOVA, L.; DOBIASOVA, P.; KOLAROVA, Z.; KOUKOL, O.; BALDRIAN, P. Enzyme activities of fungi associated with *Picea abies* needles. **Fungal Ecology**, vol. 4, no. 6, p. 427-436. 2011.