



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

SARAH RAQUEL SILVEIRA DA SILVA

**MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOCELULOLÍTICAS A
PARTIR DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS DA AMAZÔNIA**

**MANAUS
2015**

SARAH RAQUEL SILVEIRA DA SILVA

**MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOCELULOLÍTICAS A
PARTIR DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS DA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof^a Dr^a Antonia Queiroz Lima de Souza

**MANAUS
2015**

Ficha Catalográfica

S586m Silva, Sarah Raquel Silveira da
Melhoramento da produção de enzimas ligninocelulolíticas a
partir de resíduos agrícolas da Amazônia. / Sarah Raquel Silveira
da Silva -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2015.

X, 59 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado
Amazonas - Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza

Dedico este trabalho a Deus por que sem Ele nada seria possível, a meus pais Janete Silveira da Silva e Waldenilson Rebelo da Silva por todo apoio amor e apoio, ao meu esposo Paulo Alexandre Lima Santiago por toda dedicação, paciência, ajuda e apoio em todos os momentos, a minha orientadora Antonia Queiroz Lima de Souza com quem aprendi muito ao longo do processo e a todos que colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

“Combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé.”.

2 Timóteo 4:7

AGRADECIMENTOS

À Deus todo poderoso e misericordioso que me deu forças e me capacidade para finalizar mais essa etapa.

Aos meus pais Janete Silveira da Silva e Waldenilson Rebeo da Silva por todo apoio, cuidado e compreensão durante todo o processo.

Ao meu amado esposo, companheiro e amigo por todo apoio, esforço, paciência, ensinamentos e colaboração ao longo de todo o trabalho.

À minha orientadora Antonia Queros Lima de Souza pela oportunidade, carinho, trabalho e confiança para executar essa pesquisa.

Às queridas amigas Adriana da Silva e Silva, Flávia Paiva Carvalho e Simone Maciel Fernandes por toda colaboração e ensinamentos.

Àos companheiros de laboratório Elissandro dos Banhos, Kamila Rangel, Fátima Almeida, Geraldo Henrique, pelo convívio agradável e prazeroso.

Ao professor Paulo Couceiro pela colaboração em ter permitido a utilização dos seus equipamentos.

Às colegas Isadora, Rosane, Daiane e Vera pelo convívio harmonioso e pela disponibilidade em ajudar.

Às amigas Marta Oliveira, Júlia do Carmo, Jorge Manrique, André Higa e Emerson Bacelar pela companhia e companheirismo.

Ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia pela vaga

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM por ter disponibilizado os recursos financeiros para a execução deste trabalho.

RESUMO

O acelerado crescimento populacional e também das atividades econômicas têm gerado um significativo aumento de resíduos, sejam eles sólidos, líquidos e gasosos, com indesejáveis efeitos ao meio ambiente. As atividades agrícolas têm-se intensificado ao longo dos anos e com isso, resíduos orgânicos são gerados e acumulados no meio ambiente ocasionando a deterioração do mesmo. Diante disto, têm-se buscado alternativas sustentáveis que utilizem esses resíduos para inúmeras finalidades economicamente viáveis. Os resíduos agrícolas nativos da Amazônia são pouco utilizados com esta finalidade, diante disso, há a necessidade de novos estudos que visem a utilização dos mesmos. Os resíduos orgânicos vegetais (casca, farelos, sementes, bagaços) são constituídos por um composto lignocelulósico (celulose, hemicelulose e lignina) e a partir desses, é possível a produção de vários produtos de alto valor agregado como aminoácidos, proteínas, enzimas de interesse para diversas indústrias, sendo elas indústrias de alimentos (sucos, bolos), indústria têxtil, indústria de papel, etc. Há microrganismos que produzem um complexo enzimático lignocelulolítico capaz de degradar os componentes da parede celular da célula vegetal. Tais enzimas são de grande interesse para indústrias de diversos setores, pois através dessas, é possível a otimização da produção dos produtos de interesse. Diante disso, 1 % (1g) de três substratos agrícolas amazônicos (cascas de cupuaçu, maracujá e macaxeira) foram submetidos à cultivo submerso em duas soluções salinas (Manachini e GLBN 40) em erlenmeyers de 125 ml contendo 20 ml de duas soluções distintas de sais minerais pelos fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e um Basidiomiceto em 120h (5 dias) e 240h (10 dias). Foram avaliadas sete enzimas (CMCase, FPase, β -glicosidase, Xilanase, Lignina Peroxidase, Manganês Peroxidase e Lacase) onde o *A.niger* foi o melhor produtor de CMCase, Xilanase e β -glicosidase (7,295 UI/mL, 13,596 UI/mL e 33,653 UI/mL, respectivamente), *Penicillium* sp. foi o melhor produtor de FPase e Lignina Peroxidase (0,126 UI/mL e 36.391 UI/L, respectivamente) e o Basidiomiceto mostrou-se o melhor produtor de Manganês Peroxidase e Lacase (1.053 UI/L, 324,074 UI/L, respectivamente). Posteriormente, *A.niger* que foi o melhor produtor das celulasas, foi submetido a um novo experimento onde os melhores substratos (casca de maracujá e casca de macaxeira) foram mesclados e submetidos a cultivo submerso com as duas soluções salinas mescladas também, em uma matriz de 9 proporções. A melhor proporção foi R6:4 S1:1. Um novo experimento foi feito com essa proporção e o *A.niger* foi submetido a um consórcio fúngico com o Basidiomiceto verificando se havia diferença entre dois métodos diferentes de experimento. Os experimentos finais apontaram o melhoramento enzimático na produção de Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase (1.570 UI/L e 11.610 UI/L), quando comparados aos valores obtidos pelos dois fungos no experimento inicial.

PALAVRAS-CHAVE: Enzimas lignocelulolíticas, Fungos da Amazônia, Melhoramento enzimático

ABSTRACT

The rapid population growth and also of economic activities have generated a significant increase in waste, whether in solid, liquid and gaseous, with undesirable effects on the environment. Agricultural activities have intensified over the years and thus, organic waste are generated and accumulated in the environment causing the deterioration. Given this, have been sought sustainable alternatives using these residues to numerous economically viable purposes. The organic vegetable waste (bark, bran, seeds, bagasse) are made up of a lignocellulosic compound (cellulose, hemicellulose and lignin) and from the these, it is possible to produce various products with high added value such as amino acids, proteins, enzymes of interest for various industries, and they food industries (juices, cakes), textile industry, paper industry, etc. There are micro-organisms that produce lignocelulolítico an enzyme complex capable of degrading the components of the cell wall of the plant cell. These enzymes are of great interest for various industries, because through these, it is possible to optimize the production of products of interest. Therefore, 1% (1 g) of three Amazonian agricultural substrates (cupuaçu shells, passion fruit and cassava) underwent submerged cultivation in two salt solutions (Manachini and GLBN 40) in 125 ml Erlenmeyer flasks containing 20 ml of two different solutions minerals by the fungi *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. and in Basidiomycete 120h (5 days) and 240 hours (10 days). Enzymes were evaluated seven (CMCase, FPase, β -glucosidase, xylanase, lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase) where the *A. niger* was the best producer of CMCase, β -glucosidase and xylanase (7,295 IU/mL, 13,596 IU/mL and 33,653 IU/ml, respectively), *Penicillium* sp. was the best producer of FPase and Lignin peroxidase (0,126 IU/mL and 36.391 IU/L, respectively) and the Basidiomycete proved to be the best producer of manganese peroxidase and laccase (1.053 IU/L, 324,074 IU/L, respectively). Subsequently, *A. niger* which was the best producer of cellulases, was subjected to an experiment where the best substrates (passion fruit bark and cassava bark) were mixed and subjected to submerged culture with two salt solutions also merged in a matrix 9 proportions. The best ratio was R6: 4 S1:1. A new experiment was done with this ratio and the *A. niger* was subjected to a fungal consortium with basidiomycete checking for differences between two different methods of experiment. The final experiments showed improvement in the enzymatic production of manganese peroxidase and lignin peroxidase (1.570 IU/L and 11.610 IU/L) compared to the values obtained by the two fungi in the initial experiment.

KEY WORDS: Lignocellulolytic enzymes , Fungi amazonian, Enzymatic improvement

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1-Valores comerciais de enzimas lignocelulolíticas (dados retirados do site da Sigma Aldrich).....	9
---	---

CAPÍTULO I

Tabela 2-Matriz de proporções Substrato/Solução Salina.....	30
Tabela 3-Comparação entre o experimento inicial e o melhoramento da produção de lignocelulases.....	42
Tabela 4-Comparação entre <i>A.niger</i> e Basidiomiceto nos experimentos iniciais com o melhoramento utilizando consórcio fúngico com o <i>A.niger</i> e o basidiomiceto.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal com os principais constituintes Fonte: STICKLEN, (2008) (Modificado)	3
Figura 2. Estrutura da celulose formada por monômeros de β -glicose unidos por pontes de hidrogênio. Fonte: RAVEN, (2007) (Modificado)	4
Figura 3. Estrutura dos monossacarídeos que constituem a hemicelulose : D-glucose (1), D-Galactose (2), L-Arabinose (3), D-Xilose (4), D-Manose (5), 4-O-Metil-D-Glucurônico(6) e L-Ramnose (7). Fonte: MARTINS, (2005)	5
Figura 4. Estrutura dos álcoois precursores da lignina. Fonte: MARTINS, (2005)	5
Figura 5. Sistema de degradação da celulose. Fonte: MARTINS, (2005)	10
Figura 6. Enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose. Fonte: BON et al., (2008)	11
Figura 7. Ciclo catalítico das MnPs . Fonte: AGUIAR, (2011)	13
Figura 8. Ciclo catalítico das LiP. Fonte: AGUIAR, (2011)	13
Figura 9. Ciclo catalítico da Lacase. Fonte: AGUIAR, (2011)	14

CAPÍTULO I

Figura 10. Reativação das linhagens fúngicas.	22
Figura 11. Esquema da realização do cultivo submerso.	23
Figura 12. Sistema de filtração à vácuo utilizado para obter os extratos enzimáticos.	24
Figura 13. Esquema de quantificação de CMCase e Xilanase.	25
Figura 14. Esquema de quantificação de FPase.	26
Figura 15. Esquema de quantificação de B-glicosidase	27
Figura 16. Esquema de quantificação de Lacase	27
Figura 17. Esquema de quantificação de Lignina Peroxidase	28
Figura 18. Esquema de quantificação de Manganês Peroxidase	29
Figura 19-Atividade enzimática de CMCase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.	31
Figura 20- Atividade enzimática de FPase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.	32
Figura 21-Atividade enzimática de B-glicosidase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.	32
Figura 22-Atividade enzimática de Xilanase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.	33
Figura 23-Atividade enzimática de Lacase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.	34
Figura 24-Atividade enzimática de Lignina Peroxidase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.	35
Figura 25-Atividade enzimática de Manganês Peroxidase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.	35
Figura 26-Melhoramento da produção de Celulases e Xilanase através de uma matriz de proporções mesclando a casca de maracujá e a casca de macaxeira com as duas soluções basais (GLBN 40 e Manachini).	36
Figura 27- Melhoramento da produção de Ligninases através de uma matriz de proporções mesclando a casca de maracujá e a casca de macaxeira com as duas soluções basais (GLBN 40 e Manachini).	37
Figura 28-Melhoramento da produção de Celulases e Xilanase aplicando duas metodologias diferentes.	37
Figura 29- Melhoramento da produção de Ligninases aplicando duas metodologias diferentes.	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	2
2.1.1 Celulose	3
2.1.2 Hemicelulose.....	4
2.1.3 Lignina	5
2.2 FUNGOS PRODUTORES DE LIGNOCELULASES.....	6
2.3 ENZIMAS LIGNOCELULOTÍICAS	7
2.4 CELULASES.....	9
2.4.1 Endoglucanases	10
2.4.2 Exoglucanases	10
2.4.3 β - glicosidases	11
2.5 HEMICELULASES	11
2.5.1 Xilanases	11
2.6 LIGNINASES.....	11
2.6.1 Manganês peroxidases (MnP).....	12
2.6.2 Lignina peroxidases (LiP)	13
2.6.3 Lacases (Lac).....	13
REFERÊNCIAS	15
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
CAPÍTULO I	19
1 INTRODUÇÃO	20
2 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 MATÉRIA PRIMA	22
2.2 REATIVAÇÃO	22
2.3 CULTIVO SUBMERSO	23
2.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS	23
2.5 ANÁLISES QUANTITATIVAS	24
2.5.1 Endoglucanase (CMCase).....	24
2.5.2 Xilanase.....	25
2.5.3 Exoglucanase (FPase).....	25
2.5.4 β -glicosidase (BGL)	26
2.5.5 Lacase (Lac)	27
2.5.6 Lignina Peroxidase (LiP)	28
2.5.7 Manganês Peroxidase (MnP).....	28
2.6 MELHORAMENTO UTILIZANDO DOIS SUBSTRATOS E UMA LINHAGEM FÚNGICA (MELHORAMENTO 1).....	30
2.7 MELHORAMENTO UTILIZANDO CONSÓRCIO FÚNGICO E DOIS SUBSTRATOS (MELHORAMENTO 2).....	30
3 RESULTADOS	31
3.1 ANÁLISES QUANTITATIVAS	31
3.2 MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE LIGNOCELULASES.....	36
4 DISCUSSÃO	39
4.1 ANÁLISES QUANTITATIVAS	39
4.2 MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE LIGNOCELULASES	41
4.3 MELHORAMENTO UTILIZANDO CONSÓRCIO FÚNGICO	43
5 CONCLUSÃO	45

REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS.....	51

1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola tem aumentado ao longo dos anos e com isso o aumento de resíduos agrícolas tem se intensificado. A utilização de resíduos é, sem dúvida, a opção mais interessante sob o ponto de vista econômico, ambiental, e até mesmo, social. A reciclagem de resíduos representa o benefício da minimização do problema ambiental que é seu descarte inadequado (PIRES, 2008), além do benefício da produção de moléculas de alto valor agregado como proteínas, ácidos, metabólitos secundários, etanol e enzimas.

O Brasil produz por ano/hectare cerca de 838 mil de toneladas de maracujá, mais de 21 milhões de toneladas de macaxeira (IBGE, 2013) e mais de 2 mil toneladas de cupuaçu (IBGE, 2006). Tais resíduos podem ser utilizados como adubo e outros são agregados à ração de animais para aumentar o valor nutricional, no entanto, grande parte dos resíduos produzidos é abandonada sem destino pré-definido no meio ambiente gerando acúmulo dos mesmos. Neste contexto, os microrganismos são de suma importância, pois são naturalmente decompositores e muitos são capazes de degradar lignocelulósicos através de um complexo enzimático lignocelulolítico. Dentre os fungos produtores de lignocelulases estão as espécies mais estudadas: *Trichoderma reesei* (também denominado *Trichoderma viride*), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriense*, *Humicola insolens*, *Fusarium solani*, *Myrothecium verrucaria*, *Sporotrichum pulverulentum* (ou *Chrysosporum lignorum*), *Aspergillus* sp. (SCHEUFELE, 2012)

Enzimas lignocelulolíticas podem ser utilizadas por diferentes indústrias, em diversas atividades e finalidades como, por exemplo, a indústria alimentícia que utiliza essas enzimas para clarear sucos, a indústria têxtil que utiliza enzimas para clarear as fibras das roupas, indústria de papel que pode utilizá-las para clarear a polpa de celulose, indústria de combustível que pode utilizá-las na produção de combustível de segunda geração na fase de hidrólise enzimática do substrato, etc. Tais processos dependem atualmente de reagentes químicos para obter resultados adequados tornando o processo caro e prejudicial ao meio ambiente. Utilizando enzimas, o processo é vantajoso para o meio ambiente, pois reduz a emissão de poluentes químicos no ambiente, alcançando o mesmo resultado desejado ou o melhoramento do mesmo.

Assim, a devida pesquisa visou comparar a produção enzimática entre fungos da Amazônia utilizando como fonte de carbono resíduos agrícolas com ampla demanda na região

Amazônica com a finalidade de aumentar a produção de enzimas lignocelulolíticas de interesse industrial.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A busca pela transformação de resíduos em produtos economicamente viáveis têm se intensificado diante do aumento da produção agrícola gerando, por sua vez, cada vez mais resíduos. A agricultura representa 33% do potencial energético da biomassa no país, enquanto resíduos de atividades florestais correspondem a 65%. Palhas, cascas de frutos e árvores, cereais, bagaços, resíduos de podas e rejeitos madeireiros apresentam grande potencial para geração de energia (SEBRAE, 2013).

No Brasil, as regiões norte e nordeste destacam-se como as maiores consumidoras de macaxeira (*Manihot esculenta* Crantz.), e o país se destaca pela expressiva produção agrícola com mais de 21 milhões de toneladas no ano de 2013, tornando-se atualmente o segundo maior produtor mundial de raízes, ficando atrás apenas da Nigéria. A macaxeira é cultivada em toda a Região Meio-Norte do Brasil sendo a Região Norte a maior produtora segundo IBGE (2013), é a principal fonte alimentar para a população rural estando entre as principais culturas plantadas por produtores familiares (EMBRAPA, 2005).

A produção do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) no Brasil concentra-se na região Amazônica, sendo o Estado do Pará o principal produtor, seguido do Amazonas. Os principais produtos gerados a partir do cupuaçu é a elaboração de sucos, sorvetes, picolés, geléias, iogurtes, doces e compotas (FRAIFE FILHO, 2013) e também está entre as principais culturas familiares.

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá (*Passiflora edulis* Sims.) responsável por mais de 95% da produção sendo o Pará o maior produtor na Região Norte do País, seguido do Amazonas (IBGE, 2014).

Inúmeros processos podem ser realizados transformando resíduos em produtos com alto valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, biocombustível de segunda geração, etc. (PANDEY et al., 2000; BALLESTEROS et al, 2001). Diante da vasta variedade da flora e de microrganismos Amazônicos, os resíduos da região Amazônica surgem como uma fonte promissora para a produção de tais produtos bem como a utilização de microrganismos nativos.

A biomassa lignocelulósica é composta por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e pela lignina, polímero complexo de grupos metoxi e fenilpropânicos, que mantém as células unidas cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos (SÁNCHEZ, 2009). Entende-se, segundo Aguiar Filho, (2008) que a disposição das moléculas de hemicelulose estão quase paralelas às fibrilas de celulose, enquanto as fibrilas de lignina dispõem-se aleatoriamente conferindo maior estabilidade à parede celular como mostra a figura 1.

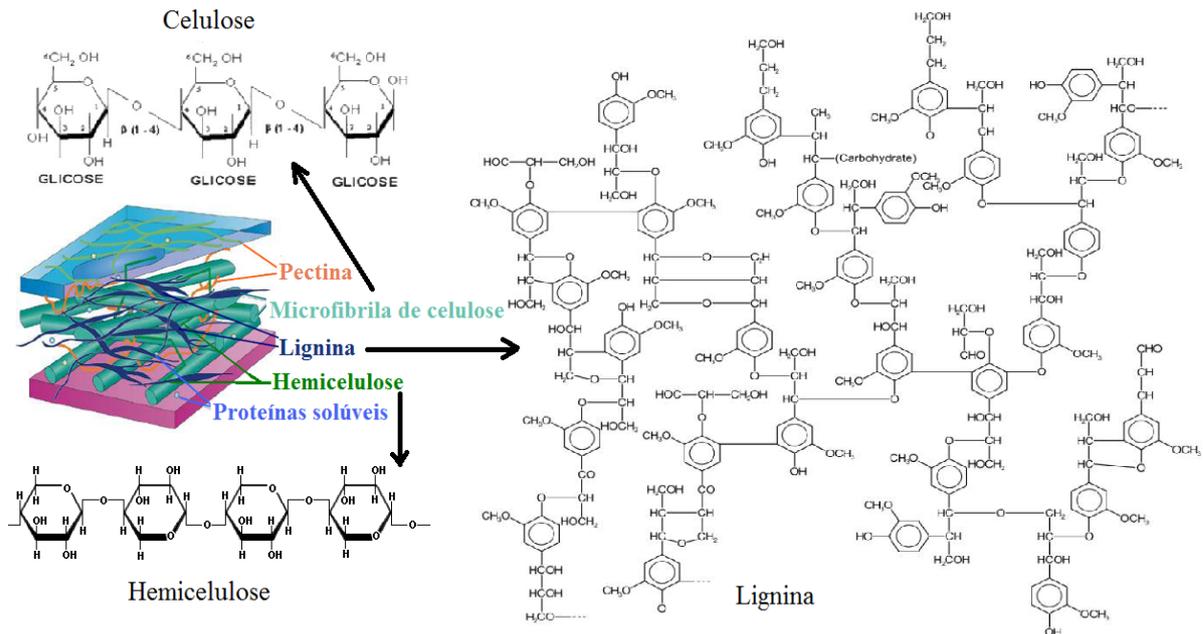


Figura 1. Estrutura da parede celular vegetal com os principais constituintes **Fonte:** STICKLEN, (2008) (Modificado)

2.1.1 Celulose

O principal componente da parede celular é a celulose, sendo que metade do carbono orgânico disponível na biosfera está contido nela. A fração celulósica correspondente a 40%-60% da matéria seca. A madeira possui cerca de 50% de celulose enquanto as fibras de algodão são quase que puramente celulose, isto mostra que as quantidades de celulose variam de vegetal para vegetal.

A celulose é um polímero linear composto por dímeros glicose-glicose (celobiose) que se repetem sempre apresentando o oxigênio que liga os anéis glicosídicos na posição equatorial, conforme mostrado na figura 2. Possui subunidades de β -glicose onde os grupos -OH são ligados às cadeias vizinhas por ligações de hidrogênio intracadeias resultando na formação de fibrilas, as quais apresentam alto grau de cristalinidade onde as cadeias de glicana estão firmemente ligadas em paralelo, até regiões com menor grau de ordenação

chamadas de regiões amorfas. Estas características conferem à molécula de celulose resistência elevada à hidrólise ácida e enzimática (RAVEN, 2007; ORGANIZAÇÃO BNDES e CGEE, 2008; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; BON et al., 2008).

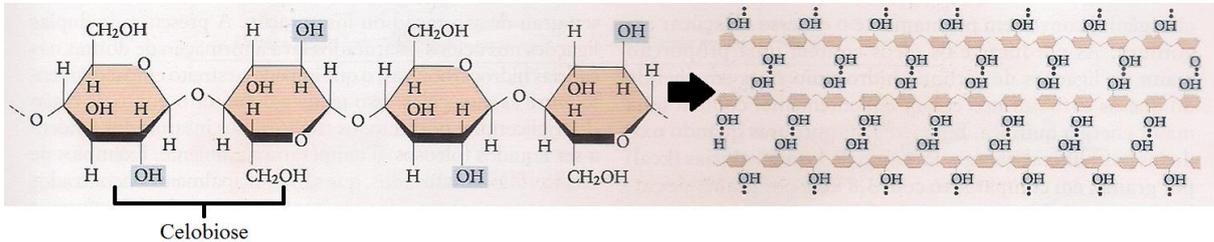


Figura 2. Estrutura da celulose formada por monômeros de β -glicose unidos por pontes de hidrogênio. **Fonte:** RAVEN, (2007) (Modificado)

Devido à essa estrutura e à sua insolubilidade e heterogeneidade, a celulose, torna-se um substrato resistente para a hidrólise. Microorganismos enfrentam este desafio de degradar a celulose com a auxílio de um sistema multi-enzimático (SCHWARS, 2001; RAVEN, 2007).

2.1.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos não celulósicos encontrados nos tecidos vegetais, geralmente constituídos por uma cadeia principal de xilose (ligações β -1,4) com várias ramificações de manose, arabinose, galactose, ácido glicurônico etc. Figura. 3 (BON et al., 2008; ORGANIZAÇÃO BNDES e CGEE, 2008). Esses açúcares apresentam-se na forma de polímeros ramificados, com menos massa molecular quando comparada à celulose e podem ser homopolímeros (ex: xilana) e heteropolímeros (ex: glicomanana formada por glicose e manose) (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

A xilana é o polissacarídeo mais comum nas hemiceluloses e corresponde a 20%-40% do peso seco do vegetal. Depois da celulose é o polissacarídeo natural mais abundante, de cuja degradação obtém-se como produto final a xilose (BON et al., 2008). A hemicelulose estabiliza a parede celular através de ligações de hidrogênio com as microfibrilas de celulose, limitando a extensibilidade da parede celular (RAVEN, 2007). Este polissacarídeo estabelece a ligação entre celulose e lignina.

Diferentemente da celulose, a hemicelulose não apresenta região cristalina estando mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas.

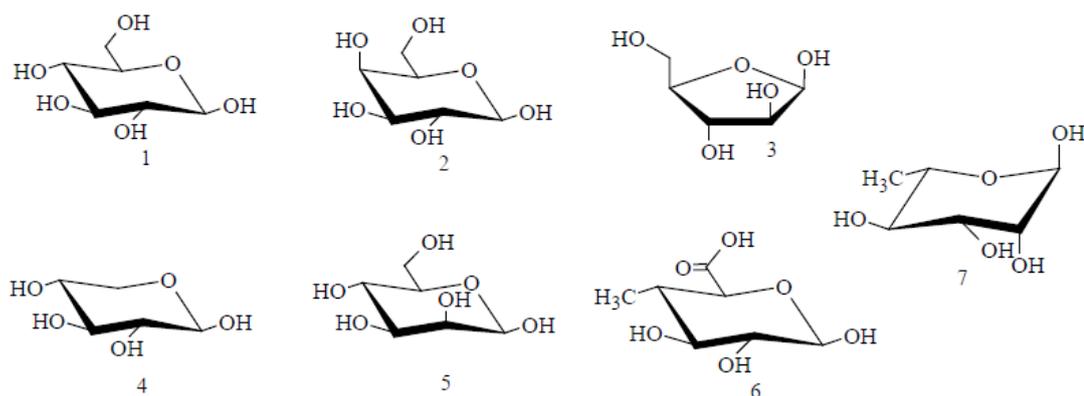


Figura 3. Estrutura dos monossacarídeos que constituem a hemicelulose : D-glucose (1), D-Galactose (2), L-Arabinose (3), D-Xilose (4), D-Manose (5), 4-O-Metil-D-Glucurônico(6) e L-Ramnose (7). **Fonte:** MARTINS, (2005)

2.1.3 Lignina

A lignina é um polímero constituinte da parede celular de todas as plantas vasculares, constituída de fenilpropano, apresentando uma conformação tridimensional e amorfa, representado por 20% a 30% do total dos lignocelulósicos conferindo à parede celular resistência a ataques microbiológicos e rigidez (AGUIAR FILHO, 2008; RAVEN, 2007; CUTTER, 2002; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Juntamente com a hemicelulose e a pectina, a lignina preenche os espaços entre as fibras de celulose além de atuar como ligante entre os componentes da parede celular.

Apresenta estrutura não-uniforme, muito complexa com massa molecular altamente elevada. É tridimensional constituída por unidades *p*-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático unidas por ligações éter que estabelecem ligações cruzadas entre si.

A lignina é formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico os quais se caracterizam por possuírem um anel aromático com diferentes substituintes. Figura 4 (BON et al., 2008).

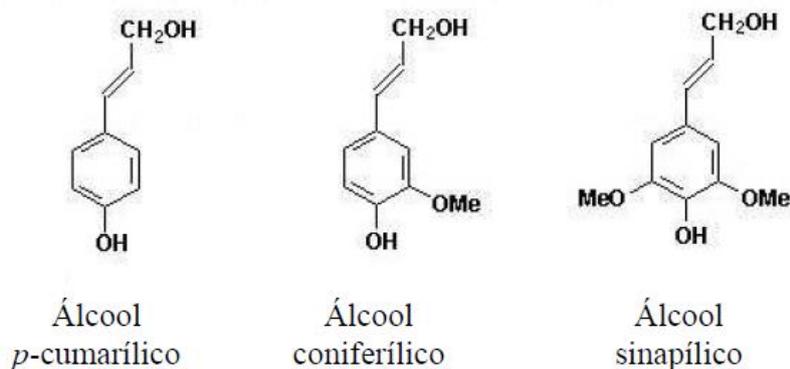


Figura 4. Estrutura dos álcoois precursores da lignina. **Fonte:** MARTINS, (2005)

2.2 FUNGOS PRODUTORES DE LIGNOCELULASES

A biomassa vegetal em decomposição e a superfície do solo são os principais habitats da microflora lignocelulolítica. Sistemas completos de degradação de celulose são produzidos por diferentes gêneros e espécies de bactérias e fungos (BON et al., 2008).

Os organismos mais efetivos na biodegradação de materiais lignocelulósicos são os fungos da decomposição branca (*white-rot fungi*) que degradam todos os componentes da madeira (celulose, hemicelulose e lignina) e os da decomposição parda ou marrom (*brown-rot fungi*) que degradam principalmente as frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose). A maioria desses microrganismos pertencem à classe Basidiomycota, sendo que ascomicetos e fungos mitospóricos geralmente são classificados como fungos da decomposição branda (*soft-rot fungi*) que podem degradar lignina e polissacarídeos, no entanto, em velocidades baixas (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; CARVALHO et al., 2009). De forma geral, os fungos de decomposição parda são associados com coníferas (gimnospermas), e os de decomposição branca com folhosas (angiospermas) (ARANTES e MILAGRES, 2009).

A produção de complexos enzimáticos capazes de degradar celulose através de fungos de ocorrência natural é amplamente disseminada na natureza incluindo espécies de fungos do gênero *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Humicola* (MARTINS, 2005; BON et al., 2008)

A importância dos fungos no processo enzimático está ligado a transformação dos resíduos lignocelulósicos, pois produzem uma diversidade de enzimas específicas aptas a modificar moléculas e são capazes de decompor uma variedade de materiais lignocelulósicos para a produção de polissacarídeos utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética bem como para a produção de alimentos, como por exemplo, o cultivo de cogumelos comestíveis (BHAT e BHA 2000; GIMENES, 2010).

Os membros do gênero *Penicillium* são filamentosos com exceção do *Penicillium marneffeii*; sua reprodução é do tipo sexuada pela formação de ascósporos (espóros sexuados internos). Tem como característica a produção de micélios vegetativos septados que penetram no substrato (em caso de cultivo estático), produzindo hifas aéreas, nas quais se desenvolvem conidióforos onde os quais se formam os conídios (esporos assexuais) (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1996)

São comumente considerados como contaminantes podendo causar infecções, particularmente em imunodeprimidos, além de produzirem micotoxinas (compostos químicos venenosos produzidos por certos fungos) (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1996) e algumas

espécies como *P. echinulatum* podem produzir enzimas celulolíticas para aplicação tecnológica (CAMASSOLA e DILLON, 2007).

Os gêneros de *Aspergillus* pertencem ao filo Ascomycota, à ordem Eurotiales e à família Trichocomaceae. São fungos filamentosos, cosmopolitas que habitam os solos e resíduos vegetais, observado como um bolor negro em frutas e outros alimentos (AGUIAR, 2010).

Tais fungos filamentosos possuem uma boa capacidade de fermentação e altos níveis de secreção enzimática, características que os tornam ideais para aplicações industriais (JA'AFARU, 2007). Diversas espécies de *Aspergillus* produzem altos níveis de β -glicosidase sendo importante em processos de sacarificação pois, o acúmulo de celobiose no meio pode causar inibição das exoglucanases e das endoglucanases (AGUIAR e MENEZES, 2000).

Os fungos Basidiomicetos mais conhecidos formam estruturas de reprodução macroscópicas e são conhecidos popularmente por cogumelos e orelhas de pau. A maioria são saprófitas e participam da decomposição de folhas, galhos e troncos, sendo encontrados em uma grande variedade de substratos e em diferentes biomas. Em termos ecológicos, sua grande importância é o papel que desempenham na ciclagem de nutrientes. (GIMENES, 2010)

2.3 ENZIMAS LIGNOCELULOTÍICAS

Nos últimos anos o interesse em enzimas lignocelulolíticas tem aumentado devido às muitas aplicações potenciais para estas enzimas em diversos setores industriais (CAMASSOLA e DILLON, 2007). Há uma grande busca da produção de enzimas de baixo custo e bom rendimento com capacidade eficaz de degradar resíduos lignocelulósicos e transformá-los em carboidratos menores como dissacarídeos (celobiose) ou monossacarídeos (glicose) e um dos desafios para a produção eficaz de tais enzimas é o desenvolvimento de processos eficientes que possibilitem a otimização da produção.

O uso de enzimas é considerado atualmente como um dos maiores setores da indústria biotecnológica, sendo os fungos os principais organismos produtores de substâncias de interesse econômico, visto que são considerados como fontes de baixo custo, podendo ser cultivados em grande quantidade e em curto tempo. Outra vantagem é o fato da produção não estar condicionada à sazonalidade e pela possibilidade de usar materiais de baixo custo para a produção das mesmas, como os resíduos, contribuindo assim para a redução da poluição ambiental, substituindo processos químicos rigorosos, além de serem naturais, não serem

tóxicas e possuem especificidade para determinadas funções (ZIMMER, et al., 2009; BAPTISTA, 2011; MUSSATO, 2007).

O mercado mundial de enzimas industriais chegou a US \$ 3,6 bilhões em 2010 e US \$ 3,9 bilhões em 2011. A expectativa é de crescer para US \$ 6 bilhões até 2016. (BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY, 2015). A América Latina representa 3,4% da demanda mundial de enzimas, sendo o Brasil o país mais expressivo desta região, respondendo por 60% do consumo de enzimas na região (MONTEIRO e SILVA, 2009).

As enzimas mais utilizadas pela indústria são as hidrolases e as óxido-redutases, sendo responsáveis por 44% e 30% das aplicações industriais, respectivamente (BON et al., 2008).

A utilização de celulasas é empregada no segmento têxtil na melhoria da qualidade dos fios durante o processo de tear, dão aspecto envelhecido aos jeans, substituindo a pedra-pomes que também é empregada para esse fim. As ligninases são utilizadas reduzindo a produção de efluentes formados pela indústria, participam do alvejamento das fibras e da degradação e descoloração de corantes.

Na indústria de papel, as celulasas e xilanases são utilizadas no branqueamento da pasta de celulose, substituindo o cloro que é utilizado para esse fim, no entanto, é muito tóxico para o meio ambiente. E as óxido-redutases são utilizadas para refinar a polpa de celulose, melhorando sua qualidade (MUSSATO et al, 2007). As fenoloxidasas são utilizadas no tratamento de efluentes e resíduos industriais de diversos setores industriais (têxtil, papelero, fotográfico, cosmético e farmacêutico), como por exemplo, corantes aromáticos que são um dos principais contaminantes detectados nos efluentes sendo prejudiciais ao meio ambiente, além de potencialmente carcinogênicos (AGUIAR, 2006).

Na indústria de biocombustíveis, as celulasas são utilizadas para quebrar as longas moléculas de celulose, gerando moléculas menores (açúcares) que em seguida são fermentadas e transformadas em etanol. O bioetanol é considerado mais potente que o álcool comum e até 20% menos poluente. (ORLANDELLI et al., 2012; MUSSATO et al., 2007, MONTEIRO et al., 2009; BON et al., 2008).

A biodegradação da biomassa lignocelulósica por fungos acontece através da ação de uma série de enzimas e compostos de baixa massa molar extracelulares. A biodegradação ocorre necessariamente de forma extracelular, pois os componentes dos lignocelulósicos precisam ser despolimerizados até compostos menores para que desta forma possam ser

transportados à parede celular e ao metabolismo intracelular dos fungos (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

A ação dos fungos degradadores de materiais lignocelulósicos ocorre através da penetração de suas hifas no lúmen das células vegetais e uma vez instaladas, as hifas produzem metabólitos extracelulares que agem em sítios onde a estrutura do substrato perdeu seu aspecto cristalino conferindo a este acessibilidade em proveito de um aspecto mais frouxo e sem forma, para que a enzima seja capaz de degradar a parede celular (BON et al., 2008; ARANTES e MILAGRES, 2009).

Os valores comerciais das lignocelulases estão descritas na Tabela 1, para fins de conhecimento de valores de mercado.

Tabela 1-Valores comerciais de enzimas lignocelulolíticas (dados retirados do site da Sigma Aldrich).

Enzima	Empresa	Microrganismo	Substrato	Valor de mercado	Embalagem
Endoglucanase	SIGMA-	<i>Acidothermus</i>	Milho	R\$ 404,00	100 U
	ALDRICH	<i>cellulolyticus</i>		(2 U/mg)	
Exoglucanase	SIGMA-	<i>Hypocrea jecorina</i>	Milho	R\$ 592,00	100 U
	ALDRICH			(0.13 U/mg)	
B-glicosidase	SIGMA-	-	Amêndoas	R\$ 957,00	100 U
	ALDRICH			(≥10-30 U/mg)	
Xilanase	SIGMA-	<i>Trichoderma viride</i>	-	R\$ 1788,00	250 U
	ALDRICH			(≥ 20 U/mg)	
Lacase	SIGMA-	<i>Pleurotus ostreatus</i>	-	R\$ 381,00	100 mg
	ALDRICH			(≥ 100-300 U/mg)	
Lignina	SIGMA-	-	-	R\$ 1100,00	10 mg
	ALDRICH			(> 0.1 U/mg)	
Manganês	SIGMA-	<i>Phanerochaete</i>	-	R\$ 1024,00	10 mg
	ALDRICH	<i>chryso sporium</i>		(≥ 20 U/mg)	

2.4 CELULASES

As etapas da degradação microbiana da celulose ainda não estão totalmente esclarecidas, mas sabe-se que ocorre pela ação de três grupos de enzimas que atuam sinergicamente na hidrólise da celulose que são as endo 1,4-β-glicanases, as celobiohidrolases (exo-1,4-β-glicanases) e as β-glicosidases (MARTINS, 2005; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; BON et al., 2008). Essas enzimas atuam de modo cooperativo causando a hidrólise completa da celulose até a glicose. As celulases são da família de enzimas do grupo glicosídeo hidrolases que catalisam a hidrólise de polissacarídeos e oligossacarídeos (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2013). Figura 5

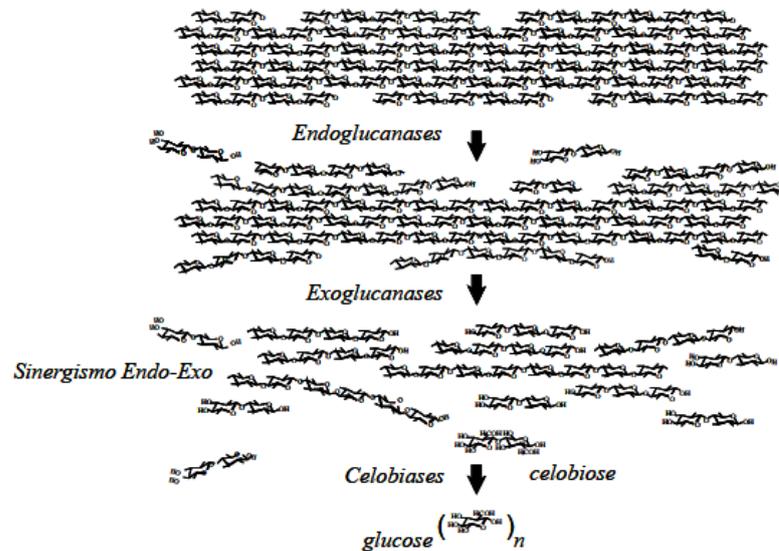


Figura 5. Sistema de degradação da celulose. **Fonte:** MARTINS, (2005)

2.4.1 Endoglucanases

As enzimas 1-4 β -glucanases hidrolisam aleatoriamente regiões internas da celulose amorfa e celulose modificada quimicamente como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC) (MARTINS, 2005), no entanto, têm maior afinidade pela regiões amorfas produzindo celo-oligossacarídeos com vários graus de polimerização que posteriormente serão atacados pelas celobio-hidrolases (CBH). Desta atuação envolvendo o consumo de uma molécula de água resulta um novo terminal redutor e um não redutor (BON *et al.*, 2008).

O sítio ativo das endoglucanases possui forma de chave possibilitando uma melhor ação da enzima sobre substrato (celulose). As regiões de organização estrutural mais simples são mais facilmente degradadas pois, não estão envolvidas com ligações de interação com hidrogênio entre moléculas, segundo Martins (2005).

2.4.2 Exoglucanases

As exoglucanases são formadas pela celodextrinase e pela celobio-hidrolase (CBH). As CBH atuam simultaneamente onde a CBH I hidrolisam terminais redutores enquanto as CBH II hidrolisam terminais não redutores liberados por ação das endoglucanases. As celobio-hidrolases apresentam em sua estrutura uma região responsável pela ligação da enzima ao substrato e sofrem inibição pelo produto formado a partir da hidrólise, a celbiose (BON *et al.*, 2008).

2.4.3 β - glicosidasas

A β - glicosidase ou celobiase degrada a celobiose, dissacarídeo solúvel em água, e potente inibidor de muitas celulases. A degradação da celobiose é feita através de hidrólise da celobiose resultando em duas moléculas de glicose. (BON et al., 2008).

2.5 HEMICELULASES

A hidrólise enzimática da hemicelulose requer um conjunto de enzimas mais complexo do que o necessário para degradar a celulose.

2.5.1 Xilanases

A biodegradação das hemicelulases ocorre de modo semelhante às celulases, no entanto, necessita de mais enzimas para a degradação completa da hemicelulose. A heterogeneidade e complexidade natural das xilanas são acompanhadas por uma variedade de enzimas xilanolíticas e dentre estas estão as 1-4 β -endoxilanases que despolimerizam a xilana pela hidrólise aleatória do esqueleto principal, α -L-arabinofuranosidas, α -glucuronidas, acetil-xilana-esterases, que têm a função de desramificar a cadeia principal de xilana e, as β -xilosidasas que clivam pequenos oligossacarídeos gerando a xilose (BON et al., 2008; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; GOTTSCHALK, et al., 2012, CARVALHO et al., 2009).

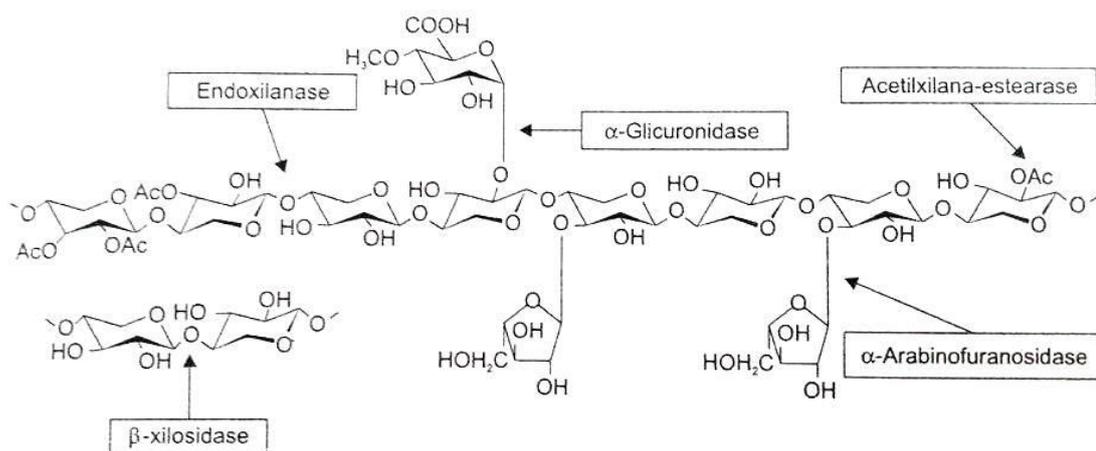


Figura 6. Enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose. **Fonte:** BON et al., (2008)

2.6 LIGNINASES

Um vasto grupo de enzimas está relacionado à degradação da lignina. Todavia, há dúvidas na real atuação de cada grupo de enzimas na degradação da lignina.

As enzimas envolvidas podem ser agrupadas em fenoloxidasas que compreendem um grupo de enzimas pertencentes às metaloproteínas e, enzimas que produzem peróxido de

hidrogênio. Entre as fenoloxidasas, ainda se pode citar dois subgrupos: as peroxidases que são dependentes de peróxido (lignina peroxidase e as manganês peroxidase) e as lacases que são cuproproteínas que não precisam de peróxido para atuar (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

As enzimas que produzem peróxido são acessórias às peroxidases, gerando H_2O_2 in situ e possibilitando que as peroxidases atuem (CARVALHO et al., 2009). A degradação da lignina ocorre através de um processo multienzimático de enzimas intra e extracelulares que desestabilizam as ligações que constituem a macromolécula ocasionando sua quebra (SANTOS et al., 2011).

Uma enzima que até pouco tempo atrás era associada apenas ao complexo celulolítico, celobiose desidrogenase, aparentemente coliga os sistemas hidrolítico e oxidativo. Ela pode oxidar oligossacarídeos e, em seguida, transferir os elétrons para aceptores como quinonas, Fe^{+3} e O_2 (CARVALHO et al., 2009, ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

2.6.1 Manganês peroxidases (MnP)

As manganês peroxidases dependem de Mn^{2+} apresentando potencial de oxidação suficiente para atrair somente elétrons de estruturas fenólicas. O ciclo catalítico das MnPs, inicia-se com a oxidação por H_2O_2 ou por peróxidos orgânicos, levando a enzima nativa à um estado de oxidação deficiente de dois elétrons chamado de composto I (CI). Na primeira etapa, o CI pode ser reduzido a CII à custa da oxidação de uma estrutura fenólica ou de Mn^{2+} . Na segunda etapa, o composto II é reduzido ao seu estado nativo (C0), exclusivamente à custa de um elétron proveniente de um íon Mn^{2+} . O íon Mn^{3+} formado durante o processo, é bastante reativo e normalmente é estabilizado por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico. O complexo Mn^{3+} -oxalato, por sua vez, pode ser reduzido à custa da oxidação de outra estrutura fenólica. Figura 7.(ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; SANTOS et al., 2011; CARVALHO et al., 2009).

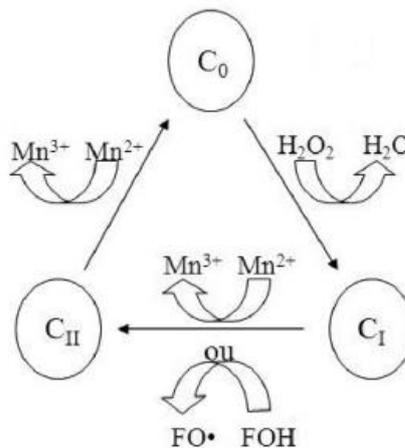


Figura 7. Ciclo catalítico das MnPs. Fonte: AGUIAR, (2011)

2.6.2 Lignina peroxidases (LiP)

As lignina peroxidases possuem um potencial de oxidação elevado que atrai elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas, dando origem a radicais cátion. Tanto a MnP quanto a LiP, são heme-proteínas, apresentando um ciclo catalítico semelhante às peroxidases de origem vegetal. A LiP também é ativada pela oxidação por H_2O_2 , levando à formação do (CI), no entanto, no caso das LiPs a redução do CII a CI e também CII a C_0 pode ocorrer por meio da oxidação de substratos não fenólicos levando à formação de radicais cátions (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; SANTOS et al., 2011).

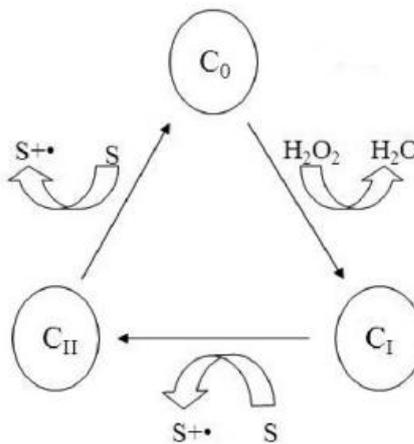


Figura 8. Ciclo catalítico das LiP. Fonte: AGUIAR, (2011)

2.6.3 Lacases (Lac)

As lacases atuam diretamente em estruturas fenólicas por meio da oxidação dos fenóis pela retirada de um elétron mediada pela redução de Cu^{2+} e Cu^{1+} que reduz o O_2 em H_2O , permitindo a atuação cíclica da enzima. As lacases podem degradar inclusive estruturas aromáticas não fenólicas por intermédio de mediadores como ABTS. Neste caso, a enzima é

capaz de oxidar alguns mediadores que, por sua vez, possuem potenciais de ionização mais elevado do que a própria enzima, sendo os mediadores mais estudados o ABTS, NHA e HBT (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; SANTOS et al., 2011; CARVALHO et al., 2009).

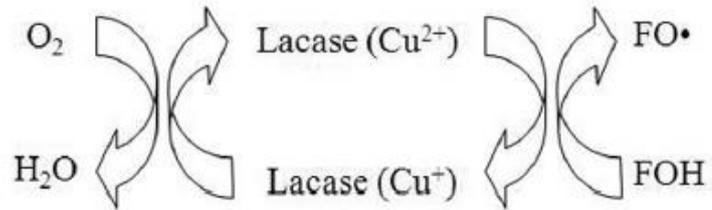


Figura 9. Ciclo catalítico da Lacase. **Fonte:** AGUIAR, (2011)

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. P. **Seleção de espécies de Basidiomicetos produtoras de ligninases para caracterização e aplicação das enzimas sobre corantes aromáticos**. Dissertação (Mestrado em engenharia de alimentos) Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, p.137, 2006.
- AGUIAR FILHO, J.M.M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Área de concentração: Microbiologia Agrícola. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 80, 2008.
- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulasas e xilanasas por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 18, n.1, p. 57-70, 2000.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n°. 10, p. 1729-1738, 2011.
- ARANTES. W. MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**. v. 32, n°. 6, p.1586-1595, 2009.
- BALESTEROS, I.; NEGRO, M.J.; OLIVA, J.M.; CABAÑAS, A.; MANZANARES, P.; BALLESTORES, M.. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p.496-508, 2006.
- BAPTISTA, N. M. Q. **Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos**. Monografia (Especialização em Micologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 38, 2011.
- BHAT, M. K.; BHA, T. S. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, p. 355-383, 2000.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**.- Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY. Disponível em <<http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/north-america-enzymes-industrial-applications-markets-bio091a.html>>. Acesso em: 04 de Abr. 2015.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**. v. 103, p. 2196-2204, 2007.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L. FERRAZ, A. MILAGRES A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**.v. 32, n°8, p. 2191-2195, 2009.

FRAIFE FILHO, G. A. **Cultivo do cupuaçuzeiro para o estado da Bahia**. CEPLAC/Centro de pesquisas do cacau – Cepec. Disponível em <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cupua%C3%A7uzeiro.htm>>. Acesso em: 15 de Fev. 2013.

CUTTER, E. G. **Anatomia Vegetal- Parte 1: Células e Tecidos**. 2. ed- São Paulo: Roca, 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA. **Recomendações Técnicas de Manejo para o Cultivo da Mandioca em Agricultura Familiar no Meio-Norte do Brasil**. Teresina, 2005.

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

GIMENES, L. J. **Fungos Basidiomicetos: Técnicas de coleta, isolamento e subsídios para processos biotecnológicos**. Instituto de Botânica, Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Curso de Capacitação de Monitores e Educadores, p. 19, 2010.

GOTTSCHALK, L. M. F.; SILVA, J. P. L.; SOUZA, E. F. Produção de xilanase por duas cepas de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. In: Brazilian Seminar on Enzyme Technology – ENZITEC – Xth, Outubro, Blumenau, SC, Brasil, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Censo agropecuário**, Rio de Janeiro, IBGE, p. 1-777, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Lavoura Permanente**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=df&tema=lavourapermanente2012>>. Acesso em: 16 de fev. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, v.26, n.1 p.1-83. 2013.

JA'AFARU, M. I.; FAGADE, O. E. Cellulase production and enzymatic hydrolysis of some selected local lignocellulosic substrates by a strain of *Aspergillus niger*. **Research Journal of Biological Sciences**, 2(1), p.13-16, 2007.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulósico de *Penicillium echinulatum***. Dissertação (Mestrado em Química). Sub área: Química Orgânica. Universidade de Caxias do Sul. Curitiba, p. 139, 2005.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, Jan / Jun. p.1-15, 2009.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: Poderosa Ferramenta na Indústria. Biotecnologia. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 41, n. 242, p. 28-33, 2007.

ORGANIZAÇÃO BNDES E CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. – Rio de Janeiro. ed 1, p. 316, 2008.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Revista Saúde e Biologia**. v.7, n.3, set./dez, p.97-109, 2012.

PANDEY, A., SCCOL, C.N., NIGAM, P., SCCOL, V.T. Biotechnological potential of agroindustrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v 74, p. 69-80, 2000.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. São Paulo: MAKRON Books, v.1, p. 521, 1996.

PIRES, A. M. M.; MATIAZZO, M. E. **Avaliação da Viabilidade do Uso de Resíduos na Agricultura**. EMBRAPA, Jaguariúna, 2008. Disponível em <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/15550/1/circular19.pdf>>. Acesso em: 09 de Abr.2015.

RAVEN, P.H; EVERT, R.F; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v.17, p. 185-194, 2009.

SANTOS, C.T, FILHO, G.A, ROCHA, T.J.O, FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao L.*): Obtenção de ligninases. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 87-96. 2011.

SCHEUFELE, F.B. **Bioconversão de resíduos agroindustriais por micro-organismos do bioma amazônico produtores de enzimas lignocelulolíticas**. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, p. 119, 2012.

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

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO A MICRO E PEQUENAS EMPRESAS- SEBRAE. Disponível em <<http://segmentos.sebrae2014.com.br/agronegocio/residuos-agricolas-com-potencial-energetico/?id=4761&t=4>>. Acesso em: 16 de Nov. 2013

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

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE. Disponível em <http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Bayer/enzymes>. Acesso em: 20 de Nov. de 2013.

ZIMMER, K, ET AL. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, jul./dez, p. 123-137, 2009.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Aumentar a produção de enzimas lignocelulolíticas a partir de resíduos agrícolas do Estado do Amazonas e cepas anteriormente avaliadas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a variação da produção de enzimas lignocelulolíticas em cultivo submerso frente às variações de duas soluções de sais minerais utilizando como substrato três resíduos agrícolas da Amazônia (casca de cupuaçu, casca de maracujá e casca de macaxeira), por três fungos Amazônicos: *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* e um Basidiomiceto.
2. Verificar a produção enzimática frente à mistura das duas melhores fontes de carbono por um dos melhores fungos, nas duas soluções salinas.
3. Avaliar a produção de enzimas lignocelulolíticas pelas duas melhores linhagens fúngicas submetidas a um consórcio, frente à melhor proporção de substratos e soluções salinas.

CAPÍTULO I

Melhoramento da produção de enzimas ligninocelulolíticas a partir de resíduos agrícolas da Amazônia

Melhoramento da produção de enzimas ligninocelulolíticas a partir de resíduos agrícolas da Amazônia

¹Silva, S.R.S.; ²Silva, & Souza, A.Q.L.^{1,2}

1 Univ. do Estado do Amazonas; 2 Univ. Federal do Amazonas, Brasil, Manaus.

Resumo

Novas alternativas para o aproveitamento de resíduos agroindustriais têm sido buscadas devido à crescente demanda agroindustrial. Diante disso, três substratos agrícolas amazônicos (cascas de cupuaçu, maracujá e macaxeira) foram submetidos à cultivo submerso em duas soluções salinas (Manachini e GLBN 40) pelos fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. e um Basidiomiceto em 120h (5 dias) e 240h (10 dias). Foram avaliadas a produção de sete enzimas (CMCase, FPase, β -glicosidase, Xilanase, Lignina Peroxidase, Manganês Peroxidase e Lacase) sendo o *A.niger* o melhor produtor de CMCase, Xilanase e β -glicosidase (7,295 UI/mL, 13,596 UI/mL e 33,653 UI/mL, respectivamente), *Penicillium* sp. o melhor produtor de FPase e Lignina Peroxidase (0,126 UI/mL e 36.391 UI/L, respectivamente) e o Basidiomiceto, o melhor produtor de Manganês Peroxidase e Lacase (1.053 UI/L, 324,074 UI/L, respectivamente). Outros experimentos foram realizados e obtêve-se o melhoramento de Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase (1.570 UI/L e 11.610 UI/L), quando comparados aos valores obtidos pelos dois fungos no experimento inicial.

1 INTRODUÇÃO

Diante da intensa produção agrícola, têm-se buscado alternativas para a utilização dos resíduos orgânicos gerados por tal setor. A geração de resíduos está associada ao desperdício no uso de matéria-prima, às perdas entre a produção e o consumo, e aos materiais que são gerados ao longo da cadeia agroindustrial, porém não possuem valor econômico evidente. Estima-se que 20% a 30% da safra de grãos, de frutas e de hortaliças colhidas no Brasil sejam desperdiçados no caminho entre a lavoura e o consumidor (ROSA et al.,2011). Todos esses alimentos desperdiçados e resíduos gerados pelas agroindústrias têm como destino, em sua maioria, o depósito no meio ambiente.

A região Amazônica tem grande potencial diante da variedade de resíduos nativos. No ano de 2013 a região norte do Brasil produziu mais de 53 mil toneladas de maracujá, mais de 7 milhões de toneladas de macaxeira (IBGE, 2013) e estima-se a produção de 300 toneladas de cupuaçu (FRAIFE FILHO, 2015).

A biomassa vegetal contém grandes quantidades de celulose, além de outros polissacarídeos hidrolisáveis em glicose para produção de etanol ou para a produção de

produtos químicos de interesse (SANTOS, 2010), além da possibilidade de convertê-los em outros produtos de alto valor agregado como enzimas, compostos de aroma, entre outros que por sua vez, geram interesse em indústrias têxteis, de polpa de celulose, cosmética, tratamento de resíduos, entre outras (SILVA, 2013; SANTOS, 2011).

Diante disso, a utilização de microorganismos é fundamental para conversão de lignocelulósicos, pois produzem complexos enzimáticos capazes de decompor essa biomassa e, visando a otimização da produção enzimática, é necessário a busca por alternativas de melhoramento da produção, desde condições de cultivo à melhoramento genético de cepas de interesse.

Os fungos são naturalmente decompositores e têm sido utilizados há anos como fonte de produção de metabólitos e enzimas. Muitos fungos Amazônicos têm sido estudados para estas finalidades diante do potencial promissor na produção de moléculas de interesse.

Os fungos filamentosos de maior interesse industrial incluem as espécies de *Aspergillus* sp., de *Trichoderma* (*T. reesei*) e *Penicillium* sp. (BON, et al., 2008; MARTINS, 2005), como produtores de celulasas e hemicelulasas. Os processos industriais (têxteis, fotografia, papelaria, etc.) geram efluentes com elevados níveis de toxicidade ao meio ambiente, pois fazem uso de corantes aromáticos altamente poluentes, até mesmo com potencial carcinogênico, no entanto, lignocelulasas possuem a capacidade de oxidar tais compostos gerando interesse ao setor de tratamento de efluentes (AGUIAR, 2006). Esse complexo enzimático é produzido principalmente por Basidiomicetos.

A biomassa lignocelulósica é composta de três tipos de polímeros, a celulose, hemicelulose e lignina que estão engrenados e fortemente ligados quimicamente através de forças não covalentes e por ligações cruzadas covalentes (SANCHÉZ, 2009).

Os fungos lignocelulolíticos produzem complexos enzimáticos capazes de degradar os componentes da parede celular vegetal onde o complexo celulolítico é composto por endoglucanase (atacam randomicamente as regiões internas amorfas da celulose liberando oligossacarídeos para a ação das exoglucanases) (AGUIAR FILHO, 2008; AGUIAR, 2010), exoglucanase (fragmentam as extremidades de oligossacarídeos gerados pelas endoglucanases, produzindo celobiose) (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004) e β -glicosidase (hidrolisam moléculas de celobiose produzindo a monômeros de glicose) (ALMEIDA, 2013).

O complexo hemicelulolítico é semelhante ao complexo celulolítico. As xilanas são as principais constituintes da hemicelulose e o complexo xilanolítico possui um conjunto de enzimas capazes de degradá-la. Essas enzimas atuam na quebra das ligações β -1,4 da

cadeia principal da xilana, originando oligômeros, que podem ser degradados a xilose pelas β -xilosidases. (GOTTSCHALK, SILVA e SOUZA, 2012).

A lignina é degradada através de um complexo enzimático composto por fenoloxidasas incluindo a Lignina Peroxidase (oxida compostos fenólicos e não fenólicos, na presença de H_2O_2), Manganês Peroxidase (oxida compostos fenólicos, na presença de H_2O_2) e lacase (pode oxidar compostos fenólicos e não fenólicos, mas não dependem de H_2O_2 para atuar) (IQBAL et al., 2011).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA PRIMA

Utilizou-se como matéria prima resíduos agrícolas regionais da Amazônia: casca de cupuaçu, maracujá e macaxeira que foram lavados com água corrente e sabão líquido para retirar resquícios de impurezas, secos a 60 °C em estufa, triturados e depois armazenados a -20 °C.

2.2 REATIVAÇÃO

Utilizou-se um Basidiomiceto (BAS 3M 1.1.1), um *Penicillium* sp. (Stsp C2-3/1-2C) e um *Aspergillus niger* (EJFLOR 3) os quais foram reativados das coleções de fungos dos laboratórios de Química de Microrganismo (UFAM) e Genética (ESA-UEA) de modo tripontual em placas de petri contendo o meio BDA e posteriormente, realizou-se repique central, e estes foram cultivados em incubadora BOD por 8 dias a 28 °C, como exemplificado na Figura 10.

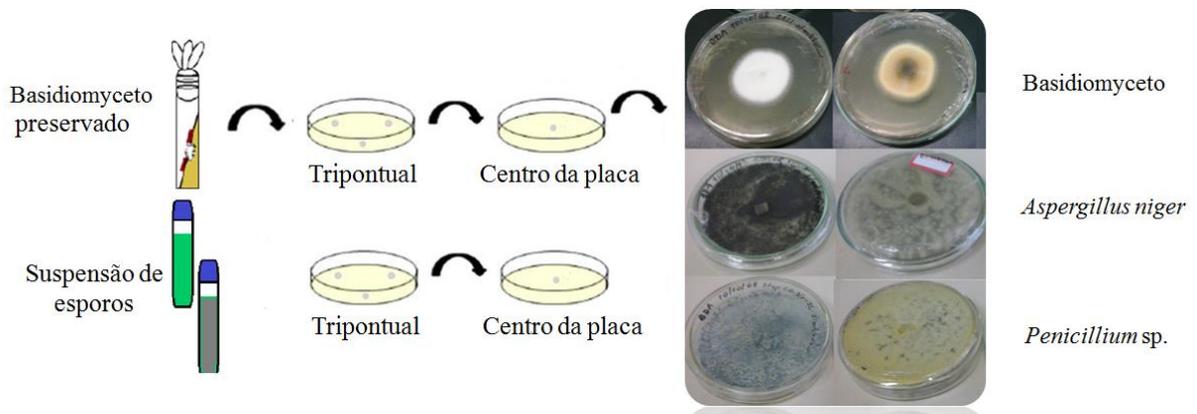


Figura 10. Reativação das linhagens fúngicas.

A manutenção dos Basidiomicetos foi feita em palitos de madeira cortados em pequenos pedaços devidamente estéreis. Dois pedaços de palito foram colocados dentro de tubos criogênicos contendo o meio BDA e inseriu-se um repique de Basidiomiceto entre os palitos. Estes foram incubados por 8 dias a 28 °C e, posteriormente conservados a 4 °C. Este tipo de conservação foi realizada com intuito do fungo não perder a atividade enzimática.

Para o *Aspergillus niger* e o *Penicillium* sp. foram feitas suspensões de esporos com os conídios raspados e inseridos em tubos criogênicos estéreis de 2 mL contendo 1,5 mL de água e glicerol (8:2), na concentração n°6 da escala de M. Farland mantidos a 4° C.

2.3 CULTIVO SUBMERSO

Inoculou-se 10 µL da suspensão de esporos do *Penicillium* sp. ou do *Aspergillus niger*, ou três fragmentos de aproximadamente 1 cm² do Basidiomiceto, em 20 mL da solução de Manachini (MANACHINI et al., 1987), pH 5,0 ou em 20 mL de solução GLBN 40, pH 4,5 descrito no anexo A, acrescentando-se 5% (1 g) de resíduos agrícolas da Amazônia in natura (cascas de cupuaçu ou casca de maracujá ou casca de macaxeira) triturados e secos, em erlenmeyers de 125 mL, em quintuplicata, sob agitação em incubadora shaker a 28 °C ao longo de 120 (5 dias) e 240 horas (10 dias). Figura 11.

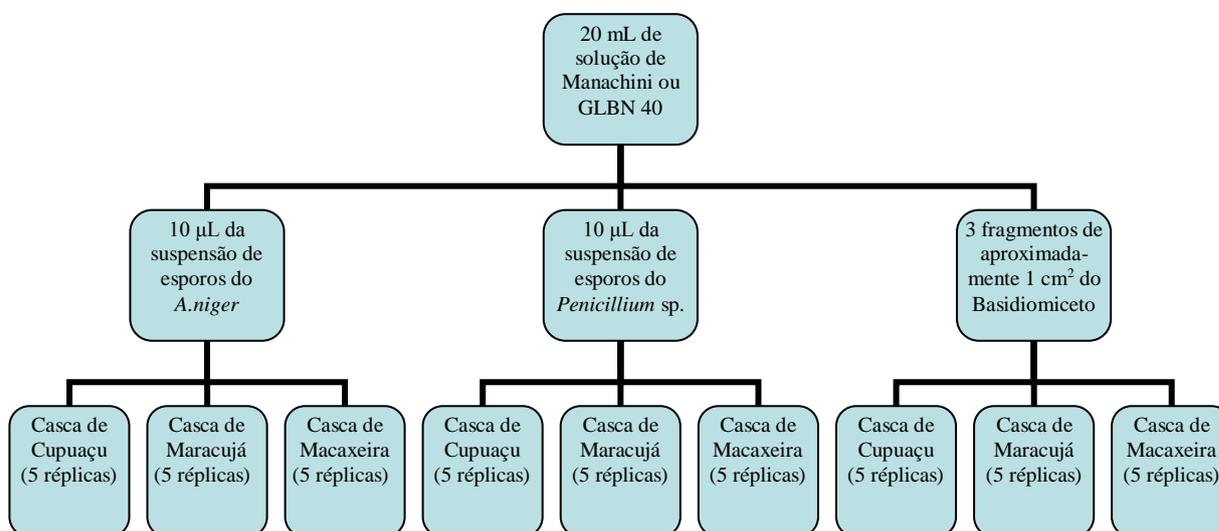


Figura 11. Esquema da realização do cultivo submerso.

2.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Após 5 e 10 dias, os experimentos foram filtrados em sistema de filtração à vácuo contendo membrana Millipore de 0,22 µm sendo capturados os extratos enzimáticos em tubos falcon de 50 mL onde posteriormente foram transferidos para tubos falcon de 15 mL para que

fossem armazenados a - 20 °C. Separou-se alíquotas de 2 mL para realização dos testes quantitativos. Figura 12.



Figura 12. Sistema de filtração à vácuo utilizado para obter os extratos enzimáticos.

2.5 ANÁLISES QUANTITATIVAS

2.5.1 Endoglucanase (CMCase)

A quantificação da atividade de endoglucanase carboximetilcelulase (CMCase) realizou-se em triplicata utilizando a metodologia Ghose, (1987) onde é utilizado o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) de Miller, (1959) o qual quantifica açúcares redutores gerados pela reação enzimática em contato com o substrato CMC (Carboximetilcelulose). Adicionou-se 450 μL do CMC a 1% em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e 50 μL de extrato enzimático em tubos de ensaio de 6 mL, aquecidos por 10 minutos a 50 °C em banho-maria. Após o tempo reacional, adicionou-se 500 μL de DNS aquecendo as amostras por 5 minutos em banho fervente e posteriormente, as amostras foram submetidas ao resfriamento em banho gelado por 3 minutos. Em seguida, adicionou-se 4 mL de água destilada ocorrendo posterior leitura em espectrofotômetro de UV no comprimento de onda 540 nm. Para o controle adicionou-se 450 μL de CMC e 500 μL de DNS aquecidos a 50° C por 10 minutos e após isto, adicionou-se 50 μL do extrato enzimático e essa mistura foi levada ao banho fervente por 5 minutos adicionando 4 mL de água destilada, após resfriamento em banho gelado por 3 minutos. Para o branco adicionou-se 500 μL de água destilada e 500 μL de DNS submetidos a banho fervente por 5 minutos e após resfriamento, adicionou-se mais 4 mL de água destilada. Figura 13.

Realizou-se uma curva padrão, que correlaciona valores de absorbância com a quantidade de produto formado, através de uma solução de glicose 1mg/ml.

Uma unidade de enzima é capaz de liberar 1 μmol de glicose por minuto.

2.5.2 Xilanase

A quantificação de xilanase deu-se através da mesmo método citado no item 2.5.1, porém, utilizou-se como substrato o Xilano. Realizou-se uma curva padrão, que correlaciona valores de absorbância com a quantidade de produto formado, através de uma solução de xilose 1mg/ml. A leitura das amostras ocorreu em espectrofotômetro a 540 nm. Figura 13.

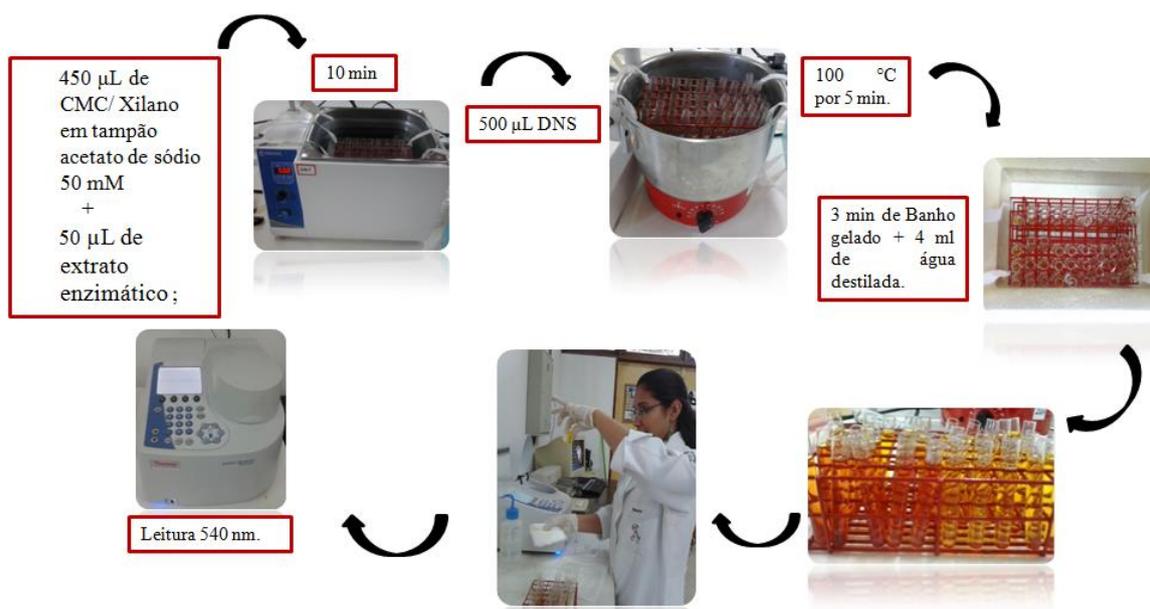


Figura 13. Esquema de quantificação de CMCase e Xilanase.

Uma unidade de enzima é capaz de liberar 1 μmol de xilose por minuto.

2.5.3 Exoglucanase (FPase)

A quantificação da atividade de FPase, deu-se pelo método de Ghose, (1987) realizado em triplicata incubando-se 20 μL de extrato enzimático, 1 círculo de papel de filtro Whatman nº1 de 0,6 cm de diâmetro e 40 μL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8 em uma placa de PCR a 50 $^{\circ}\text{C}$, por 60 min em banho-maria. Para o controle de substrato incubou-se 60 μL de tampão citrato de sódio e 1 círculo de papel de filtro. Para o controle da enzima incubou-se 20 μL de extrato enzimático e 40 μL de tampão citrato de sódio. Para o branco incubou-se apenas 60 μL de tampão citrato de sódio. Após o tempo reacional de 60 minutos, acrescentou-se 120 μL de DNS e foi levado ao banho fervente por 15 minutos. Em sequência, transferiu-se 80 μL do meio reacional para microtubos contendo 720 μL de água ultrapura. Figura 14. A leitura das amostras ocorreu em espectrofotômetro de UV a 540 nm. Realizou-se

uma curva padrão, que correlaciona valores de absorbância com a quantidade de produto formado, através de uma solução de glicose 1mg/ml.

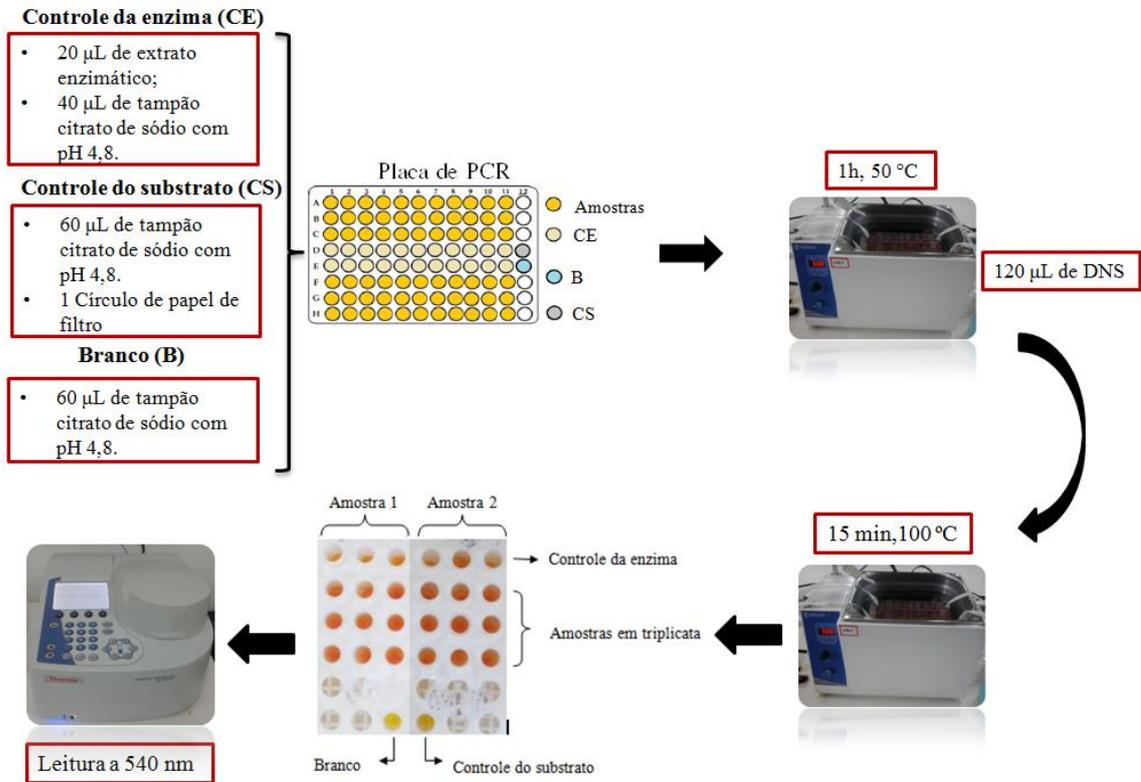


Figura 14. Esquema de quantificação de FPase.

Uma unidade de enzima é capaz de liberar 1 µmol de glicose por minuto.

2.5.4 β-glicosidase (BGL)

A quantificação da atividade de BGL deu-se através da metodologia descrita por Silva, (2013) onde em triplicata incubou-se 50 µL de Celobiose a 1% em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5, que reagiu com 50 µL de extrato enzimático em microtubos a 50 °C por 30 minutos. Posteriormente, transferiu-se 10 µL da amostra para microtubos contendo 1000 µL do reagente enzimático (RGT) do kit Glucose Liquicolor (In Vitro) que reagiu com a amostra durante 5 minutos a 37 °C em banho-maria. Para o controle do substrato adicionou-se 20 µL de celobiose a 20 µL de água ultra pura e dessa solução, retirou-se 10 µL que reagiu com 1000 µL de RGT. Para o controle da enzima adicionou-se 20 µL de extrato enzimático a 20 µL de água ultra pura e dessa solução, retirou-se 10 µL que reagiu com 1000 µL de RGT. Para o branco adicionou-se 10 µL de água ultra pura em 1000 µL de RGT. Para o padrão adicionou-se 10 µL de padrão glicose (STD) contida no kit, em 1000 µL de RGT. Figura 15. A leitura das amostras deu-se em espectrofotômetro de UV a 500 nm. O cálculo da atividade β-glicosidásica foi segundo o próprio kit Glucose Liquicolor.

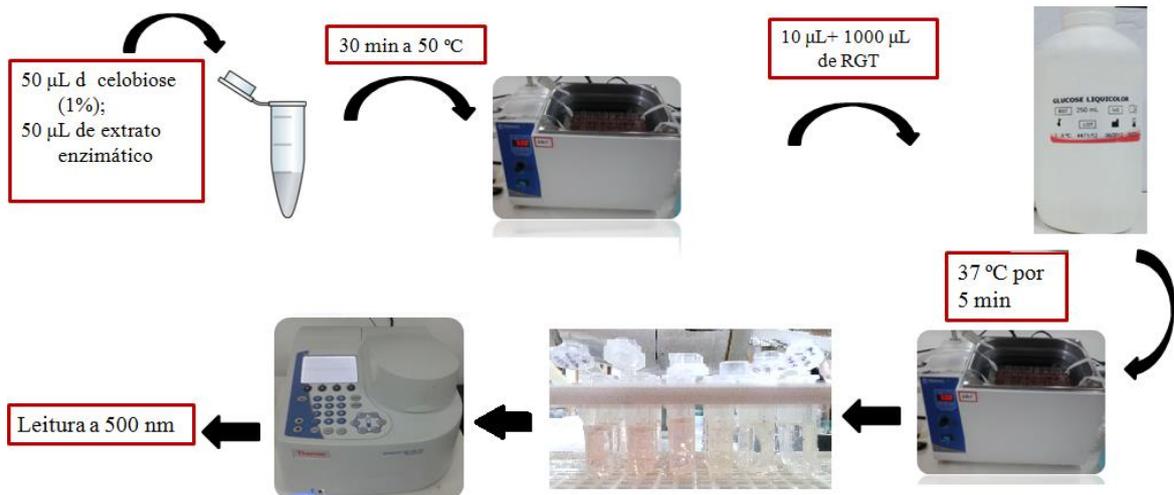


Figura 15. Esquema de quantificação de B-glicosidase

Uma unidade de enzima é capaz de liberar 1 µmol de glicose por minuto.

2.5.5 Lacase (Lac)

A quantificação da atividade de Lac deu-se em triplicata através da metodologia modificada de Bourbonnais *et al.*, (1998) tendo como substrato o ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)]. Acrescentou-se em microtubos 300 µL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,0, 100 µL de água ultrapura, 100 µL de ABTS 1 mM e 500 µL do extrato enzimático em banho-maria a 30 °C ao longo de 10 minutos. Para o controle (Abs_i), utilizou-se o mesmo protocolo, no entanto, usou-se o extrato enzimático fervido por 10 minutos. Para o branco adicionou-se água ultrapura no lugar da amostra. Realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro de UV a 420 nm após os 10 minutos reacionais (Abs_f).

Figura 16.

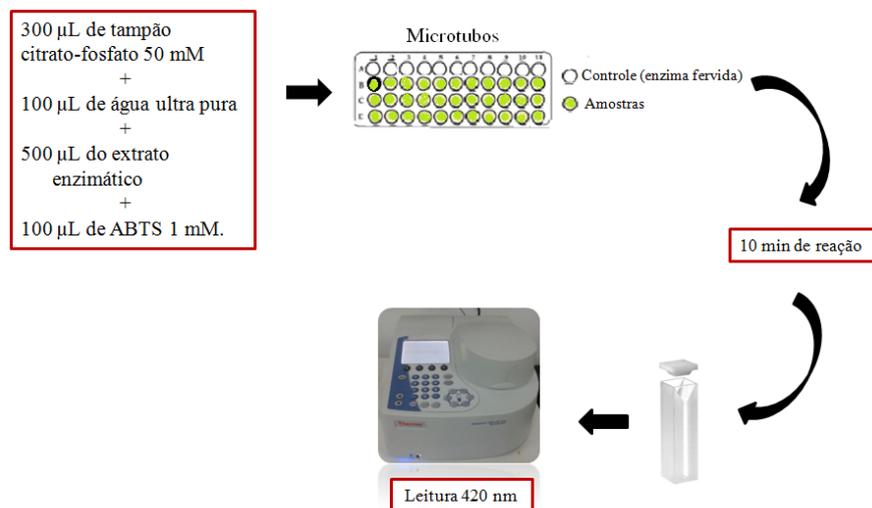


Figura 16. Esquema de quantificação de Lacase

Uma unidade enzima é capaz de oxidar 1 μmol de ABTS por minuto.

2.5.6 Lignina Peroxidase (LiP)

A quantificação da atividade de LiP, deu-se através da metodologia modificada de Kirk *et al.* (1986) tendo como substrato o álcool veratrílico. Adicionou-se em microtubos 400 μL do tampão tartarato de sódio 100 mM pH 3,0, 50 μL de álcool veratrílico 10 mM, 50 μL de solução de H_2O_2 (contendo 50 μL de H_2O_2 para 50 mL de água ultrapura, recém-preparada) e 500 μL do extrato enzimático em banho-maria a 40 °C ao longo de 10 minutos. Para o controle (Abs_i), utilizou-se o mesmo protocolo, no entanto, usou-se o extrato enzimático fervido por 10 minutos. Para o branco adicionou-se água ultrapura no lugar da amostra. Realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro de UV a 310 nm após 10 minutos reacionais (Abs_f). Figura 17.

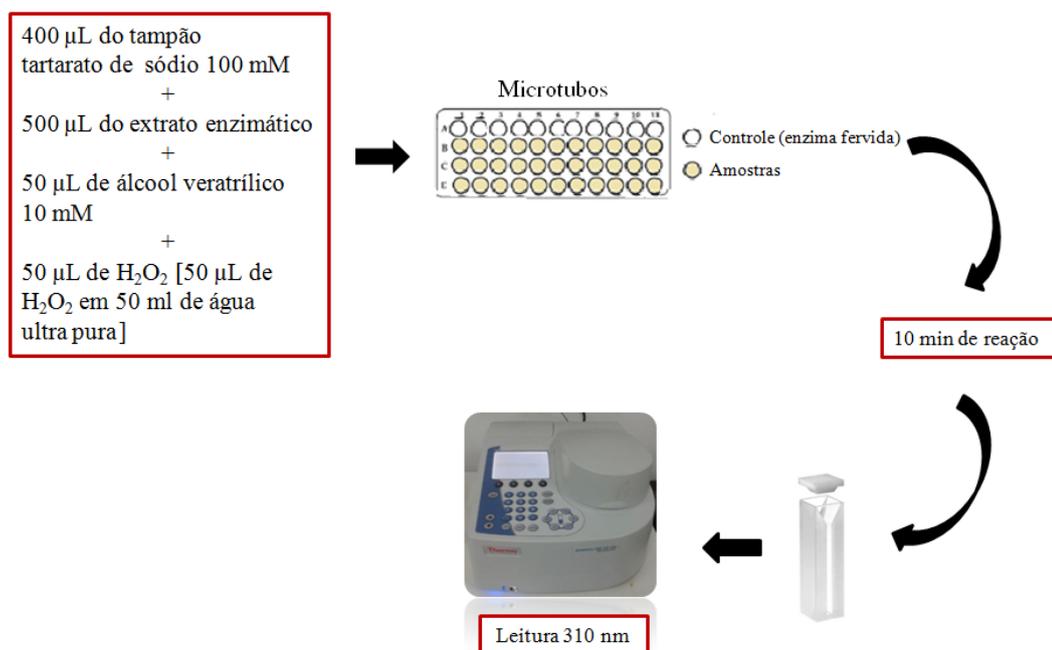


Figura 17. Esquema de quantificação de Lignina Peroxidase

Uma unidade de enzima é capaz de formar 1 μmol de veratraldeído por minuto.

2.5.7 Manganês Peroxidase (MnP)

A quantificação da atividade de MnP, deu-se em triplicata através da metodologia modificada de Khindaria, Grover e Aust, (1994) tendo como substrato o vermelho de fenol. Adicionou-se em microtubos 300 μL de tampão fosfato-citrato 50 mM e pH 4,5, 300 μL de lactato de sódio 50 mM, 100 μL de MnSO_4 1,0 mM, 100 μL de vermelho de fenol 0,1%, 50 μL de albumina bovina 1,8%, 50 μL de H_2O_2 2,0 mM e 100 μL de extrato enzimático em banho-maria a 35 °C ao longo de 5 minutos. Após o tempo reacional, acrescentou-se 65 μL de

NaOH 6,5 M para parar a reação. Para o controle (Abs_i), utilizou-se o mesmo protocolo, no entanto, usou-se o extrato enzimático fervido por 10 minutos. Para o branco adicionou-se água ultrapura no lugar da amostra. Realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro de UV a 610 nm após os 5 minutos reacionais (Abs_f). Figura 18.

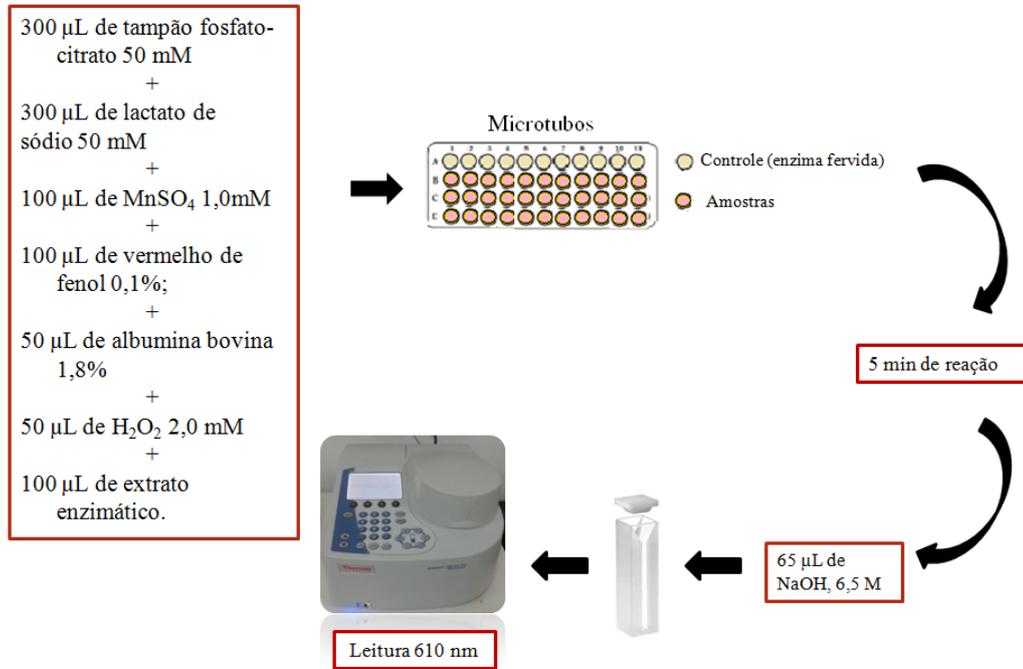


Figura 18. Esquema de quantificação de Manganês Peroxidase

Uma unidade de atividade de enzima é capaz de formar um µmol de Mn⁺³ por minuto.

O cálculo da atividade lignolítica foi segundo Aguiar Filho, (2008), Menezes *et al.* (2010) e Fernandes, (2013).

$$UI/L = \left[\left(\frac{\Delta Abs}{(\epsilon \times V_a \times t_r)} \right) \times Fd \times 10^6 \right]$$

Onde: $\Delta Abs = Abs_f - Abs_i$

ϵ = Coeficiente de extinção molar do produto formado ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

V_a = Volume da amostra em L

t_r = Tempo reacional em minutos

Fd = Fator de diluição da amostra

10^6 = Fator de conversão de M para µmol

UI = Unidade Internacional, onde internacional significa: $\mu mol \cdot min^{-1}$

Coeficiente de extinção molar:

Lacase (420 nm) = $36.000 M^{-1} cm^{-1}$

$$\text{LiP (310 nm)} = 9.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\text{MnP (610 nm)} = 22.000 \text{ M}^{-1}\text{.cm}^{-1}$$

Realizou-se o teste t de Student com nível de confiança de 95% para comparar as médias obtidas.

2.6 MELHORAMENTO UTILIZANDO DOIS SUBSTRATOS E UMA LINHAGEM FÚNGICA (MELHORAMENTO 1)

Após a dosagem enzimática de todas as enzimas do experimento inicial, realizou-se o melhoramento através de uma matriz de proporções mesclando os dois melhores substratos (casca de maracujá e casca de macaxeira) e ambas soluções salinas (Manachini e GLBN 40) totalizando 9 proporções diferentes inoculando 10 μL de suspensão de esporos de apenas uma das melhores linhagens indicada pelo experimento inicial (*A.niger*). Tabela 3. Este experimento foi realizado em triplicata ao longo de 5 e 10 dias.

Tabela 2-Matriz de proporções Substrato/Solução Salina

(S) Solução basal (MANA+GLBN 40)	(S) 6:4	(S) 1:1	(S) 4:6
(R)Resíduo (C.Maj+C.Max)			
(R) 6:4	R 6:4 S 6:4	R 6:4 S 1:1	R 6:4 S 4:6
(R) 1:1	R 1:1 S 6:4	R 1:1 S 1:1	R 1:1 S 4:6
(R) 4:6	R 4:6 S 6:4	R 4:6 S 1:1	R 4:6 S 4:6

Os resíduos (R) mesclados, casca de maracujá e casca de macaxeira (C.Maj+C.Max) foram submetidos à fermentação submersa por *A.niger* nas duas soluções basais (S) Manachini e GLBN 40(MANA+GLBN 40) também mescladas, as quais estão seguidas das proporções utilizadas no experimento.

2.7 MELHORAMENTO UTILIZANDO CONSÓRCIO FÚNGICO E DOIS SUBSTRATOS (MELHORAMENTO 2)

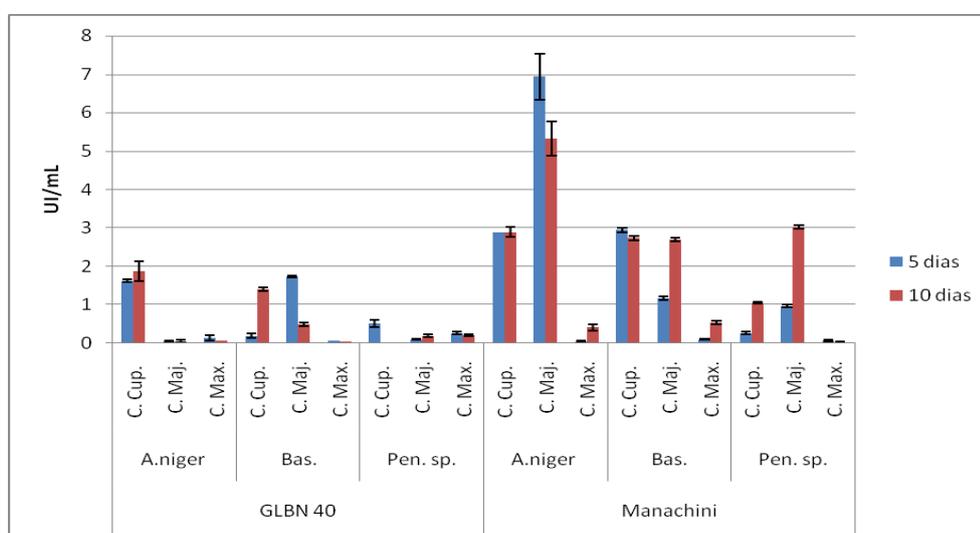
Após verificar a melhor proporção (R6:4 S1:1), realizou-se um novo experimento dividido em duas metodologias diferentes: na primeira (1.R6:4 S1:1) foi colocado 50% de GLBN 40 e inoculou-se 3 pedaços de Basidiomiceto. Após metade do tempo de cultivo (60 e 120 horas), foi inoculado 10 μL de suspensão de esporos de *A.niger* e acrescentou-se os outros 50% de solução de Manachini. Na segunda metodologia (2.R6:4 S1:1), foi inoculado 3 pedaços de Basidiomiceto com 100% da proporção de solução salina (S 1:1) e após metade do tempo de cultivo, foi inoculado 10 μL de suspensão de esporos de *A.niger*. Estes experimentos foram realizados em triplicata, em 5 e 10 dias considerando as duas melhores linhagens apontadas pelo experimento inicial (*A.niger* e Basidiomiceto).

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISES QUANTITATIVAS

A.niger mostrou-se o melhor produtor de CMCase com 6,938 UI/mL em C. Maj. ao longo de 5 dias de cultivo, *Penicillium* sp. foi o segundo melhor produtor com 3,021 UI/mL em C. Maj. e Basidiomiceto foi o que menos produziu com 2,950 UI/mL em C. Cup. ao longo de 5 dias. Todos os resultados foram melhores em solução de Manachini e houve produção em todos os substratos, conforme ilustrado na Figura 19.

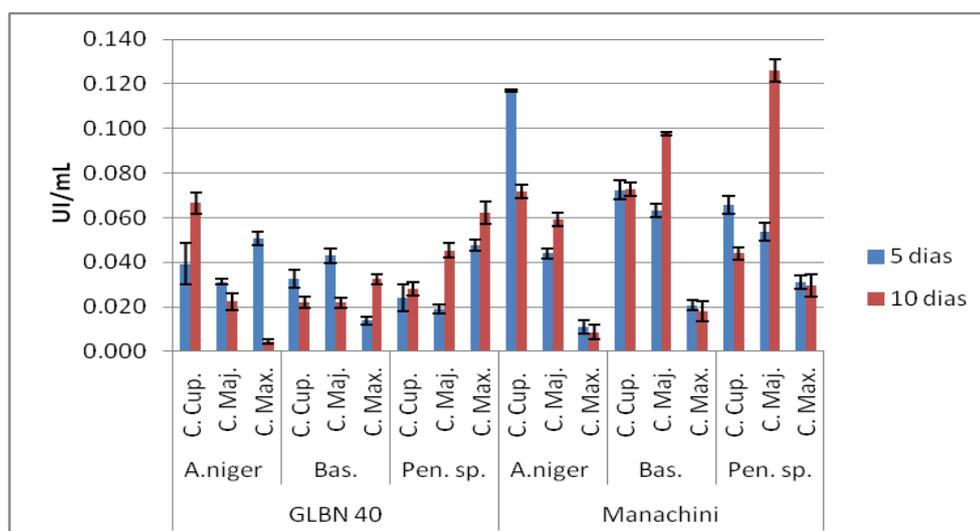
Figura 19-Atividade enzimática de CMCase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.



Aspergillus niger (*A.niger*), Basidiomiceto (Bas.) e *Penicillium* sp. (Pen. sp.) submetidos à fermentação submersa tendo como fonte de carbono casca de cupuaçú (C.Cup.), casca de maracujá (C.Maj) e casca de macaxeira (C. Max.), nas duas soluções basais (GLBN 40 e Manachini).

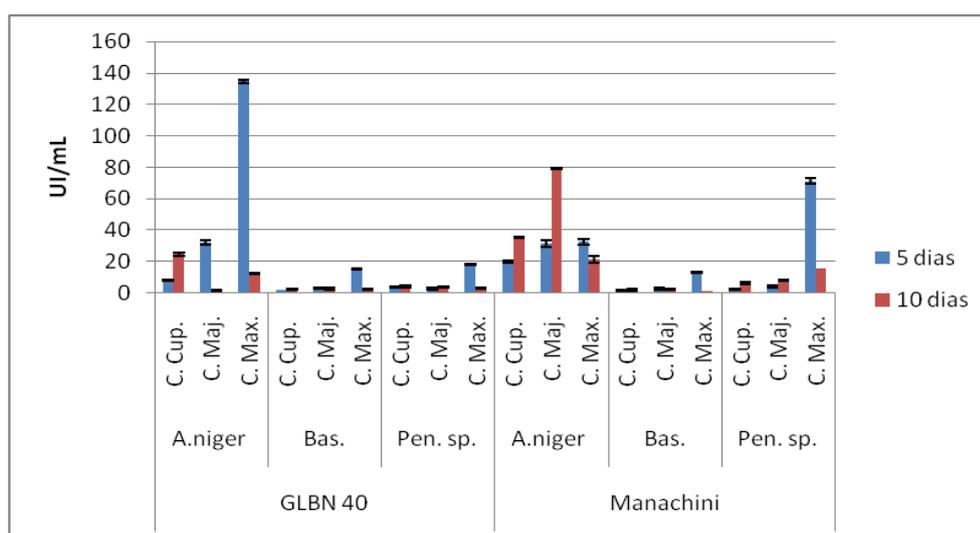
A solução de sais GLBN 40 não foi eficiente para a produção de CMCase quando comparada com a de Manachini. É possível observar também na Figura 19 que a produção de CMCase foi semelhante nas fontes de carbono da C. Cup. pelo *A. niger* e pelo Basidiomiceto em ambos os períodos avaliados e no 10º dia na C. Maj. pelo Basidiomiceto e pelo *Penicillium* sp., enquanto que foi insatisfatória a produção de CMCase utilizando a casca de macaxeira.

O *P. adametzii* apresentou-se como o melhor produtor de FPase em C. Maj. com 0,126 UI/mL ao longo de 10 dias de fermentação. O segundo melhor resultado encontrado foi do *A. niger* com 0,117 UI/mL em C. Cup. ao longo de 5 dias e o terceiro melhor resultado foi do Basidiomiceto em C. Maj. com 0,097 UI/mL ao longo de 10 dias. Todos estes resultados foram em solução de Manachini e em todos os substratos houve produção enzimática, conforme mostra a figura 20.

Figura 20- Atividade enzimática de FPase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.

Aspergillus niger (*A.niger*), Basidiomiceto (Bas.) e *Penicillium* sp. (Pen. sp.) submetidos à fermentação submersa tendo como fonte de carbono casca de cupuaçu (C.Cup.), casca de maracujá (C.Maj) e casca de macaxeira (C. Max.), nas duas soluções basais (GLBN 40 e Manachini).

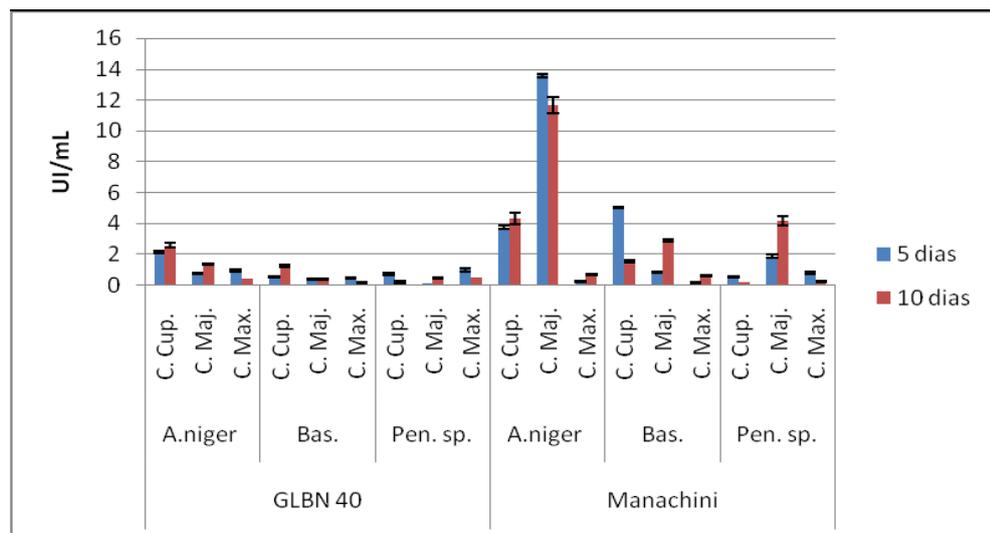
O *A.niger* mostrou-se o melhor produtor de β -glicosidase (BGL) em C. Max.com 134,615 UI/mL em solução GLBN 40 ao longo de 5 dias. O segundo melhor produtor foi o *Penicillium* sp. com 71,045 UI/mL em C. Max., ao longo de 5 dias, em solução de Manachini e o que menos produziu β -glicosidase foi o Basidiomiceto com 15,496 UI/mL em C. Max, GLBN 40, ao longo de 5 dias, havendo produção enzimática em todos os substratos, conforme ilustrado na figura 21, porém pouco significa quando comparada com a produção de *A.niger* nas condições acima descritas.

Figura 21- Atividade enzimática de B-glicosidase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.

Aspergillus niger (*A.niger*), Basidiomiceto (Bas.) e *Penicillium* sp. (Pen. sp.) submetidos à fermentação submersa tendo como fonte de carbono casca de cupuaçu (C.Cup.), casca de maracujá (C.Maj) e casca de macaxeira (C. Max.), nas duas soluções basais (GLBN 40 e Manachini).

A.niger apresentou-se como o melhor produtor de Xilanase com 13,596 UI/mL ao longo de 5 dias, em C. Maj. O segundo melhor produtor foi o Basidiomiceto com 5,063 UI/mL em C. Cup. ao longo de 5 dias. O menor produtor foi o *Penicillium* sp. com 4,181 UI/mL em C. Maj., ao longo de 10 dias. Todos estes resultados foram em solução de Manachini e em todos os substratos houve a produção de Xilanase, conforme mostra a figura 22.

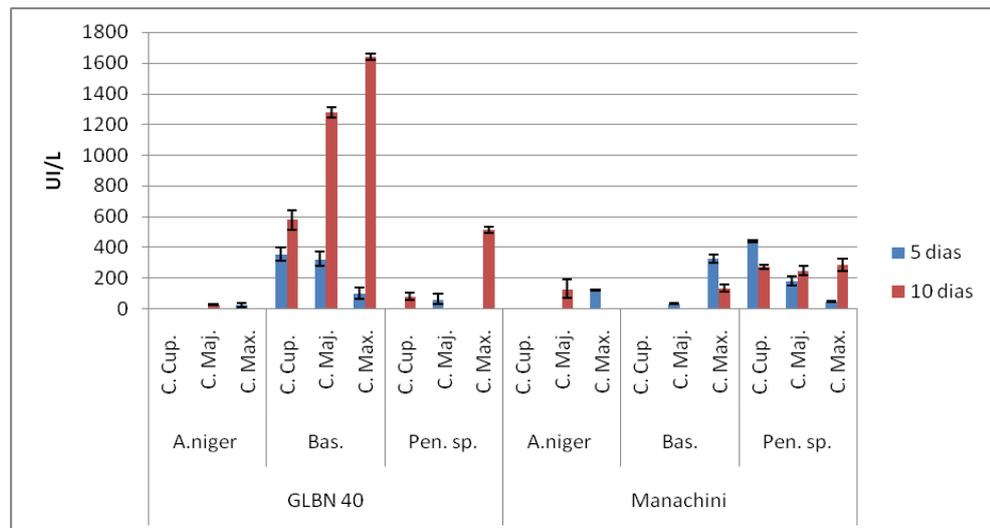
Figura 22-Atividade enzimática de Xilanase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.



Aspergillus niger (*A.niger*), Basidiomiceto (Bas.) e *Penicillium* sp. (Pen. sp.) submetidos à fermentação submersa tendo como fonte de carbono casca de cupuaçu (C.Cup.), casca de maracujá (C.Maj) e casca de macaxeira (C. Max.), nas duas soluções basais (GLBN 40 e Manachini).

O Basidiomiceto apresentou-se como o melhor produtor de Lacase com 1.61 UI/L em C. Max,. O segundo melhor produtor foi o *Penicillium* sp. em C. Max. com 513 UI/L, ambos em solução GLBN 40. O *A.niger* foi o menor produtor de Lacase com 129 UI/L em C. Maj., em solução de Manachini. Todos estes resultados foram melhores em 10 dias de cultivo. Não houve produção enzimática em *A.niger* (ambas soluções) e em Basidiomiceto (apenas em Manachini), com o substrato C. Cup. Nos demais substratos, não houve produção em 5 ou 10 dias, para alguns fungos, como mostra a figura 23.

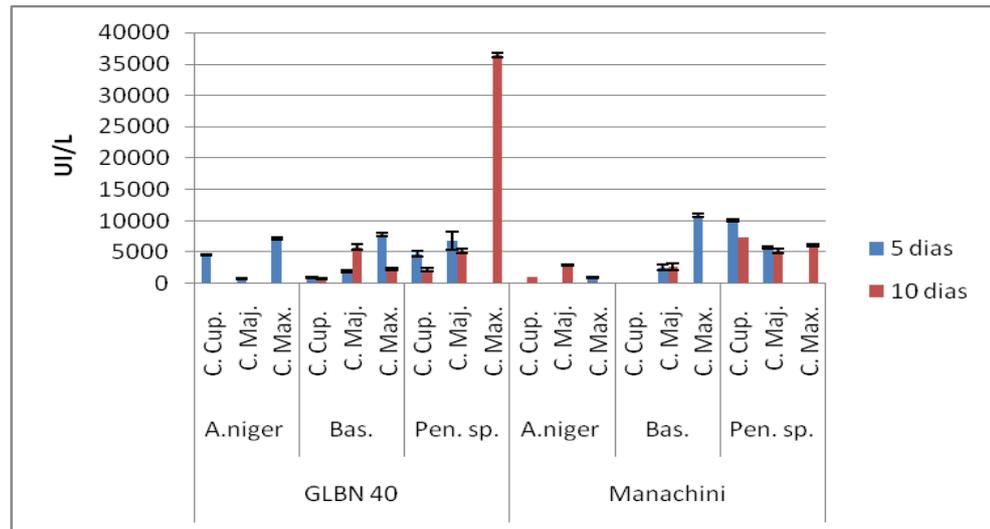
Figura 23-Atividade enzimática de Lacase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.



Aspergillus niger (*A.niger*), Basidiomiceto (Bas.) e *Penicillium* sp. (Pen. sp.) submetidos à fermentação submersa tendo como fonte de carbono casca de cupuaçu (C.Cup.), casca de maracujá (C.Maj) e casca de macaxeira (C. Max.), nas duas soluções basais (GLBN 40 e Manachini).

O *Penicillium* sp. mostrou-se como o melhor produtor de LiP com 36.391UI/L ao longo de 10 dias, em solução de GLBN 40. O segundo melhor produtor foi o Basidiomiceto com 10.881 UI/L ao longo de 5 dias em solução de Manachini. O *A.niger* foi o menor produtor ao longo de 5 dias, com 7.194 UI/L, em solução de Manachini. Todos os melhores valores obtidos foram em C. Max. Em alguns substratos não houve produção em uma das soluções, da mesma forma para o tempo de cultivo, como por exemplo, só houve produção de LiP em 5 dias nos substratos C. Cup. e C. Maj., na solução GLBN 40, no entanto, em Manachini o *A.niger* só produziu LiP nesses mesmos substratos, em 10 dias, de acordo com a figura 24. Em C. Cup., o Basidiomiceto não produziu LiP em solução de Manachini.

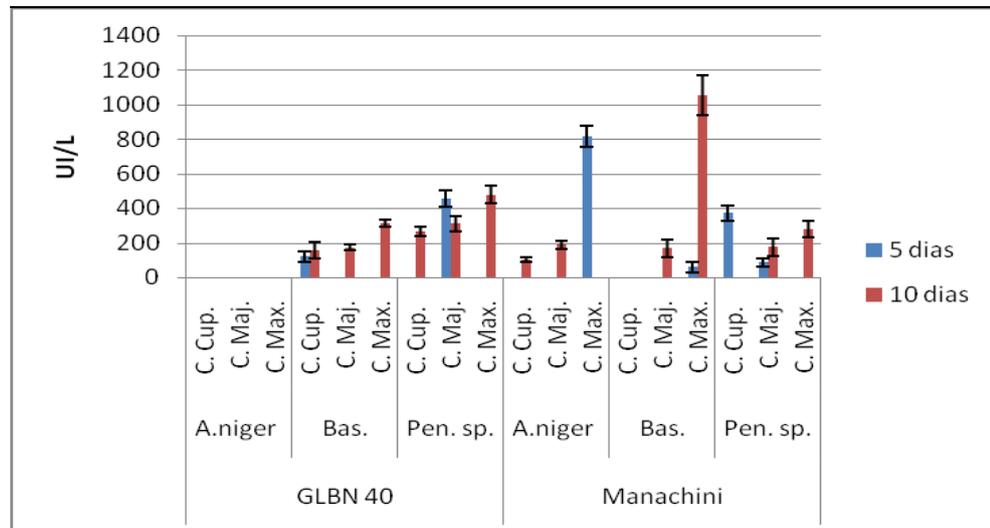
Figura 24-Atividade enzimática de Lignina Peroxidase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.



Aspergillus niger (*A.niger*), Basidiomiceto (Bas.) e *Penicillium* sp. (Pen. sp.) submetidos à fermentação submersa tendo como fonte de carbono casca de cupuaçu (C.Cup.), casca de maracujá (C.Maj) e casca de macaxeira (C. Max.), nas duas soluções basais (GLBN 40 e Manachini).

O Basidiomiceto mostrou-se o melhor produtor de MnP com 1.053 UI/L com 10 dias de cultivo. O segundo melhor produtor foi *A.niger* com 818 UI/L ao longo de 5 dias, ambos em solução de Manachini. O menor produtor foi o *Penicillium* sp. com 478 UI/L, no décimo dia, em solução GLBN 40. Todos estes resultados foram melhores em C. Max., no entanto, a figura 25 mostra que não houve produção de MnP por *A.niger* em todos os substratos em GLBN 40, porém houve produção enzimática em solução de Manachini em todos os substratos, no entanto, com limitações no tempo de cultivo. Não houve produção enzimática em outros substratos dependendo da linhagem utilizada e do tempo de cultivo.

Figura 25-Atividade enzimática de Manganês Peroxidase quantificada em cinco e 10 dias de cultivo.

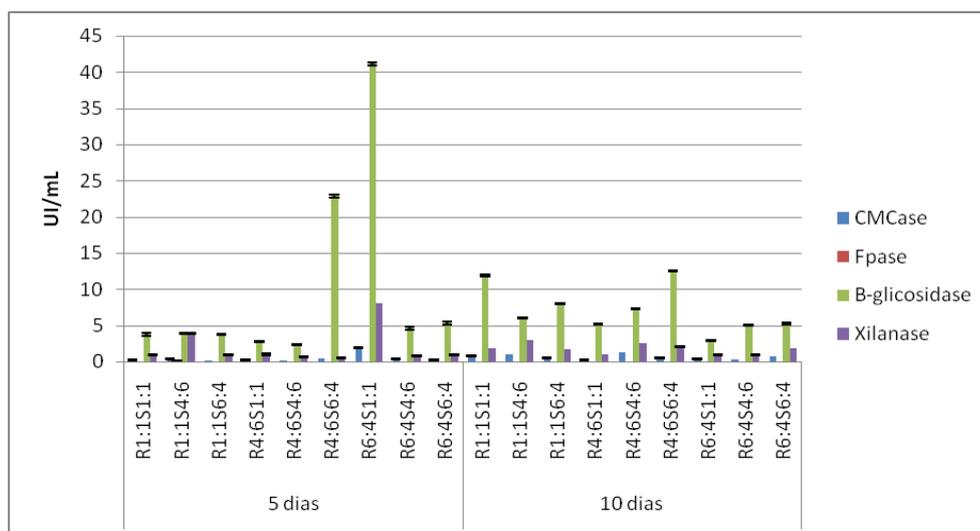


Aspergillus niger (*A.niger*), Basidiomiceto (Bas.) e *Penicillium* sp. (Pen. sp.) submetidos à fermentação submersa tendo como fonte de carbono casca de cupuaçu (C.Cup.), casca de maracujá (C.Maj) e casca de macaxeira (C. Max.), nas duas soluções basais (GLBN 40 e Manachini).

3.2 MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE LIGNOCELULASES

Segundo a figura 26, a melhor proporção para CMCase, Xilanase e β -glicosidase foi para a situação R6:4S1:1 com 1,863 UI/mL, 8,050 UI/mL e 41,158 UI/mL, respectivamente, em 5 dias de cultivo. Para FPase, a melhor proporção foi R1:1S4:6 com 0,071 UI/mL também ao longo de 5 dias de cultivo. Houve produção enzimática em todas as proporções.

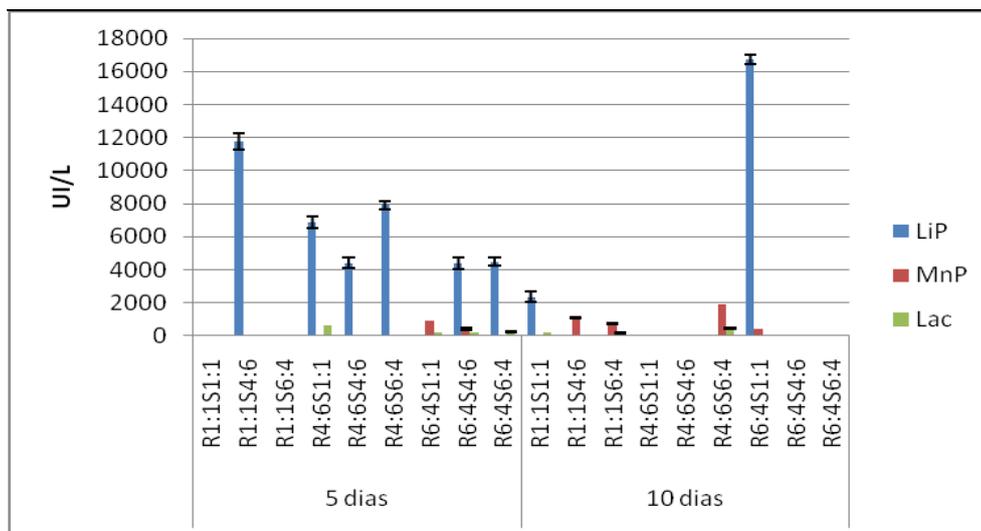
Figura 26-Melhoramento da produção de Celulases e Xilanase através de uma matriz de proporções mesclando a casca de maracujá e a casca de macaxeira com as duas soluções basais (GLBN 40 e Manachini).



Fermentação submersa com *A.niger* onde realizou-se a mescla de dois resíduos agrícolas (R) das duas soluções basais (S) submetidos a um cultivo com nove proporções diferentes por cinco e 10 dias de cultivo.

Segundo a figura 27, a melhor proporção para LiP foi R6:4S1:1 com 16.750 UI/L, para MnP a melhor proporção foi R4:6S6:4 com 1.899 UI/L, ambos em 10 dias de cultivo, e para Lac, a melhor proporção foi R4:6S1:1 com 630 UI/L com 5 dias de cultivo. As menores produções de LiP ocorreram em 10 dias de cultivo onde só houve produção nas proporções R1:1 S1:1 e R6:4 S1:1. Em MnP, os menores resultados foram encontrados em 5 dias de cultivo onde só houve produção nas proporções R6:4 S1:1 e R6:4 S4:6 e em Lac, os menores resultados foram com 10 dias onde só houve produção nas proporções R1:1 S1:1, R1:1 S4:6, R1:1 S6:4, R4:6 S4:6 e R4:6 S6:4.

Figura 27- Melhoramento da produção de Ligninases através de uma matriz de proporções mesclando a casca de maracujá e a casca de macaxeira com as duas soluções basais (GLBN 40 e Manachini).

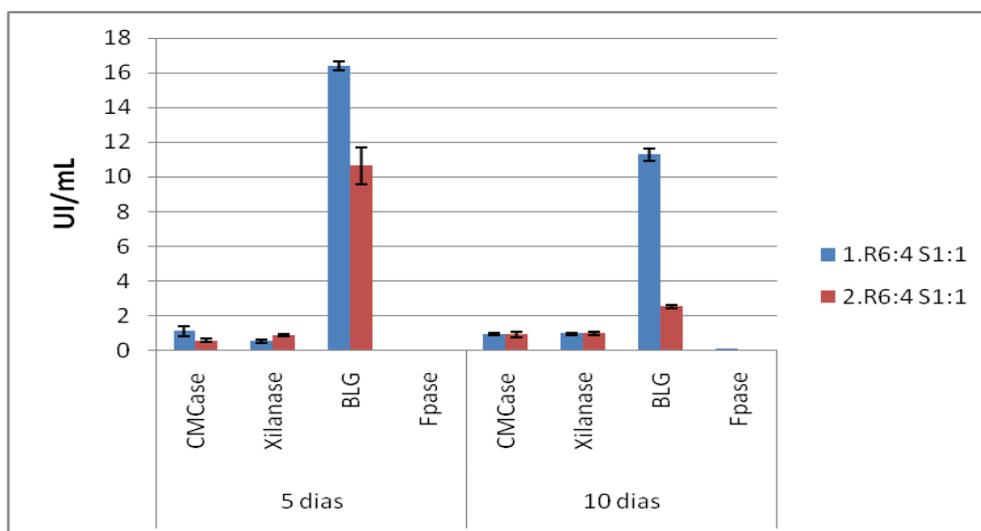


Fermentação submersa com *A.niger* onde realizou-se a mescla de dois resíduos agrícolas (R) das duas soluções basais (S) submetidos a um cultivo com nove proporções diferentes por cinco e 10 dias de cultivo.

3.3 MELHORAMENTO UTILIZANDO CONSÓRCIO FÚNGICO

Conforme mostrado na figura 28, os resultados do consórcio do basidiomiceto com o *A.niger* foram inferiores quando comparados ao experimento inicial e no melhoramento 1 no qual utilizou-se apenas *A.niger*, tanto para as Celulases quanto Xilanase, indicando assim, o experimento 1.R6:4 S1:1 como melhor para CMCase e BLG com 1,100 UI/mL e 16,391 UI/mL, respectivamente, para 5 dias e, indicando como o melhor experimento para Xilanase e FPase, o 2.R6:4 S1:1 com 0,9732 UI/mL e 0,553 UI/mL, em 10 e 5 dias, respectivamente, havendo produção enzimática nos dois experimentos.

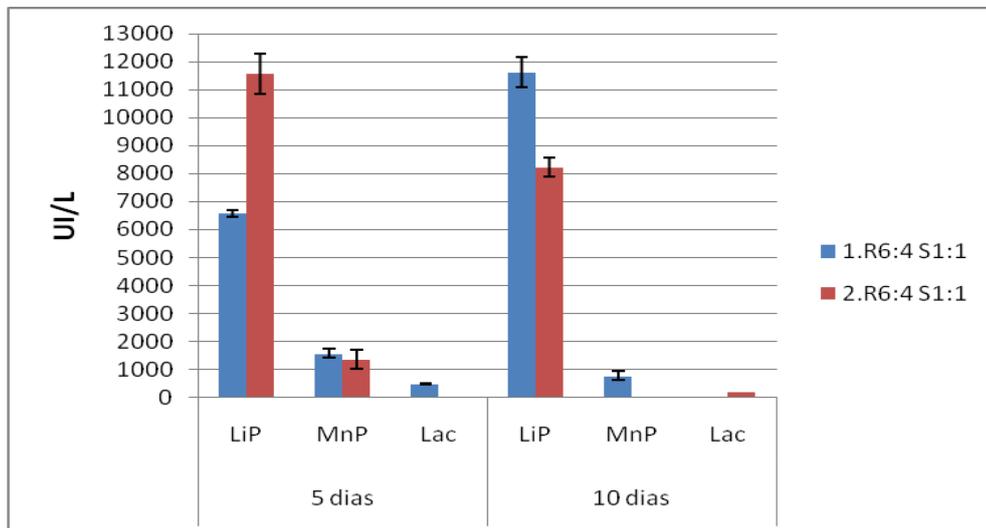
Figura 28- Melhoramento da produção de Celulases e Xilanase aplicando duas metodologias diferentes.



Dois metodologias diferentes(1.R6:4 S1:1 e 2.R6:4 S1:1) utilizadas para sugerir um melhoramento da produção enzimática ambos descritos no corpo texto.

Nas ligninases o experimento 2.R6:4 S1:1 foi melhor para LiP com 11.610 UI/L em 5 dias sendo superior ao experimento inicial (7.194 UI/L) e inferior ao melhoramento 1 (16.750 UI/L). Para MnP, o experimento 1.R6:4 S1:1 foi melhor com 1.571 UI/L sendo superior ao valor do melhoramento 1 (924 UI/L) e do experimento inicial (818UI/L). Em Lac, o experimento 1.R6:4 S1:1 obteve o melhor resultado com 473 UI/L sendo superior ao encontrado no melhoramento 1 (186 UI/L) e no experimento inicial (130 UI/L). Não houve produção enzimática de Lac no experimento 1.R6:4 S1:1 em 10 dias de cultivo e no 2.R6:4 S1:1 em 5 dias de cultivo. Em MnP não houve produção enzimática no experimento 2.R6:4 S1:1 em 10 dias de cultivo. A LiP foi produzida nos dois experimentos, como mostra a figura 29.

Figura 29- Melhoramento da produção de Ligninases aplicando duas metodologias diferentes.



Duas metodologias diferentes(1.R6:4 S1:1 e 2.R6:4 S1:1) utilizadas para sugerir um melhoramento da produção enzimática ambos descritos no corpo texto acima.

4 DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES QUANTITATIVAS

Verificou-se que o *A.niger* foi o melhor produtor de CMCase, β -glicosidase e Xilanase e o *Penicillium sp.* foi o melhor produtor de FPase sendo 3/4 em C. Maj. e também 3/4 em solução de Manachini, havendo variação em relação ao tempo de cultivo, conforme descrito no Anexo B.

Silva, (2013) utilizou os mesmos substratos em fermentação em estado sólido (FES) em seu experimento, ao longo de 8 dias de cultivo e encontrou aproximadamente 0,018 UI/mL de FPase produzida por *Penicillium sp.* em C.Maj. Marques *et al.*, (2012) utilizou o bagaço de cana-de-açúcar como substrato em cultivo submerso em meio Czapec-Dox por 14 dias e obteve 2,5 UI/mL e 1,0 UI/mL de CMCase e β -glicosidase, respectivamente, utilizando como inóculo *A.niger* assim como Santos *et al.*, (2013) que obteve 6,35 UI/mL de Xilanase, 5,33 UI/mL de CMCase em 5 dias utilizando farelo de cacau como substrato em FES. Todos esses valores citados foram inferiores aos encontrados neste trabalho com 6,938 UI/mL de CMCase, 0,126 UI/mL de FPase, 134,615 UI/mL de BLG e 13,596 UI/mL.

A eficiência da hidrólise da celulose depende de vários fatores como o substrato utilizado (correspondente à cristalinidade das fibras de celulose, porosidade e quantidade de hemicelulose presente no substrato) e até mesmo a natureza do próprio sistema enzimático (AGUIAR FILHO, 2008). Outros fatores que afetam a produção é a composição do meio de cultivo e o pH. Segundo Camassola, (2007) as celulasas responsáveis pela atividade sobre o papel de filtro (FPases) são enzimas ácidas, sendo assim, as atividades máximas em tampões citrato e acetato ocorrem em pH 4,8 e a solução de Manachini possui pH 5,0, onde a maior produção de FPase e CMCase. A maior produção de β -glicosidase (BGL) foi em GLBN 40 que possui pH 4,5, isto pode ser explicado pelo fato de que a maior atividade de BGL ocorre em pH entre 4 e 4,5. (CAMASSOLA, 2007). Acima desse pH, a atividade decresce, como ocorreu em solução de Manachini. A atividade de endo e exoglucanases pode ser inibida pela produção de celobiose, substrato da BGL (AGUIAR FILHO, 2008).

Verificou-se que para a produção de Lignases, o Basidiomiceto foi o melhor produtor em 2/3 das enzimas onde 2/3 teve a C. Max. como melhor substrato para a produção das mesmas e 2/3 das enzimas tiveram melhor desempenho em solução GLBN 40, variando nos dias de cultivo, conforme descrito no Anexo C

Assim como para celulases, diversos fatores influenciam a produção de enzimas lignolíticas e conseqüentemente a formação de produtos podendo-se destacar entre outros: a composição do meio de crescimento, tempo de cultivo, pH, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, temperatura, natureza química do substrato, luminosidade e aeração, além do microrganismo utilizado (IKEHATA et al., 2004).

As ligninases são enzimas que fazem parte de um complexo enzimático que degrada a lignina por um processo oxidativo e é constituído pelas enzimas Manganês Peroxidase (MnP), Lignina Peroxidase (LiP) e Lacase, sendo estas enzimas produzidas em diferentes combinações entre si, dependendo da linhagem fúngica e, são produzidas principalmente por Basidiomicetos denominados de fungos de “degradação branca”. A presença de atividade de MnP e lacase apontam ser a forma mais comum de expressão dessas enzimas dentre os Basidiomicetos (AGUIAR, 2006) sendo a Lacase secretada de modo tardio ao crescimento dos fungos e, quando as condições de cultivo estão limitadas para o crescimento dos mesmos, outras enzimas são produzidas, como as peroxidases ou outros mecanismos que auxiliam na degradação de compostos complexos (FERREIRA, 2009), isto pode justificar o fato de que os melhores resultados ocorrerem com o Basidiomiceto, ao longo de 10 dias de cultivo para Lacase e MnP.

Em estudos feitos em degradação de madeira de *Pinus halepensis* (Gymnosperma) e *Ficus sycomorus* L (Angiosperma) com *Penicillium chrysogenum*. e *A.niger* Hamed, (2013) verificou que o *P. chrysogenum* é mais eficiente na degradação de madeira, quando comparado ao *A.niger*. Neste trabalho verificou-se que o *Penicillium* sp. produz bem as três ligninases enquanto *A.niger* produz bem apenas uma destas tendo limitações dependendo do substrato.

Fernandes, (2013) submeteu cinco *Penicillium* spp. e cinco Basidiomicetos a cultivo submerso utilizando a solução GLBN 40 para a produção de ligninases através de 10 resíduos agrícolas ao longo de 10 dias de cultivo e observou que os melhores resultados na produção de Lac foi obtida por um Basidiomiceto em C. Maj. com 90 UI/L e de LiP foi em C. Max. com 320 UI/L produzida por um *Penicillium* sp. Estes resultados são similares ao encontrados neste trabalho, no entanto, os valores encontrados neste trabalho são superiores com 1.642 UI/L e 36.392 UI/L para Lac e LiP, respectivamente.

Baptista, et al., (2012) verificou a produção de LiP e Lac por *Penicillium commune* e seus melhores resultados foram 2.500 U/L para LiP em meio Bushnell Haas e 1.947 U/L para a Lac em meio Saboraud, ambos com 7 dias de cultivo, e acrescidos de 7% óleo diesel, sendo o valor de Lac semelhante ao obtido neste trabalho e o de LiP, inferior.

Utilizando *Lentinula boryana* para a produção de MnP e farinha de espiga de milho como substrato, Costa *et al.*, (2012) obteve 45 UI/L ao longo de 10 dias de cultivo em solução Socarean modificada, valor este, inferior ao encontrado neste trabalho com 1.053 UI/L em C. Max. utilizando um Basidiomiceto também.

4.2 MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE LIGNOCELULASES

Verificou-se que três entre quatro enzimas foram melhor produzidas na proporção R6:4 S1:1, com 1,863 UI/mL, 41,158 UI/mL e 8,051 UI/mL para CMCCase, β -glicosidase e Xilanase. Apenas para FPase a melhor proporção foi R1:1 S4:6 com 0,071 UI/mL, no entanto, tanto para as Celulases como para Xilanase o melhor tempo de cultivo foi em 5 dias, conforme descrito no Anexo D.

Para Ligninases, duas entre três enzimas foram melhor produzidas no 10° dia na proporção R4:6 S6:4 com 1.898 UI/L em MnP e na proporção R6:4 S 1:1 com 16.750 UI/L em LiP e apenas Lacase foi melhor produzida em R4:6 S1:1 com 630,864 UI/L, conforme descrito no Anexo E.

Desta forma, 4 (CMCase, BGL, Xilanase e LiP) entre as 7 enzimas avaliadas foram melhores produzidas na proporção R6:4 S1:1 e 5 entre 7 enzimas, foram melhor produzidas em 5 dias de cultivo, no entanto, os valores obtidos o melhoramento 1, não foram promissores para as Celulases, porém para Ligninases, houve de fato, um melhoramento na produção enzimática, quando comparados ao experimento inicial, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3- Comparação entre o experimento inicial e o melhoramento da produção de lignocelulases

<i>A.niger</i>			
Enzimas	Experimento inicial	Melhoramento da produção de Lignocelulases	Proporção
Xilanase (UI/mL)	13,596 ** ^m	8,050	R6:4 S1:1
CMCase (UI/mL)	6,938 ** ^m	1,862	R6:4 S1:1
FPase (UI/mL)	0,117 ** ^m	0,071	R1:1 S4:6
B-glicosidase (UI/mL)	134,615 ** ^g	41,158	R6:4 S1:1
Lacase (UI/L)	129,629** ^m	630,864	R4:6S1:1
LiP (UI/L)	7.194** ^g	16.750	R6:4 S1:1
MnP (UI/L)	818,181** ^m	1.898	R4:6 S6:4

Valores de unidade de enzima comparativos entre o experimento inicial com casca de cupuaçu (*), casca de maracujá (**) e casca de macaxeira (***) nas duas soluções salinas, Manachini (^m) e GLBN 40 (^g) e o melhoramento utilizando a mescla de casca de maracujá e casca de macaxeira.

Cada enzima tem sua especificidade, desta forma, micronutrientes da solução de Manachini somados aos micronutrientes e indutores presentes na solução GLBN 40 e aos substratos mesclados, podem ter enriquecido o meio e propiciado uma melhoria na produção de ligninas e piorado a produção das outras enzimas avaliadas.

Pereira, (2014) fez dois experimentos: no primeiro experimento, utilizou Milhocina 0,5 % como substrato e no segundo experimento, utilizou o Licor negro (semelhante estruturalmente ao álcool veratrílico, que por sua vez, é componente necessário para a produção de LiP) na concentração 3,4 g/L como indutor de LiP, inoculando *Phanerochaete chrysosporium* em cultivo submerso, encontrando aproximadamente 142 UI/L e 70 UI/L de LiP, respectivamente, em 10 dias de cultivo, no entanto, ao realizar um terceiro experimento mesclando a milhocina 0,5% com o Licor Negro 3,4 g/L, não obteve produção de LiP.

Conceição (2010) realizou um experimento onde as maiores atividades de MnP foram iguais a 4,664 UI/L e 23,587 UI/L , para Lac foram 1,236 UI/L e 8,713 UI/L em proporções de 1:1 de mandioca e de cevada e para LiP foram 2,867 UI/L e 0,932 UI/L em proporções de 3:7 de mandioca e de cevada para *Polyporus tricholoma* e *Lentinus tigrinus*, respectivamente, ao longo de sete dias, sendo estes valores inferiores aos encontrados neste trabalho.

Songulashvili *et al.*, (2007) utilizou resíduos mesclados de indústria alimentícia: farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo e cascas de banana e tangerina (MP) e, também

utilizou resíduos da produção de etanol a partir de grãos de trigo, kiwi e penas de galinha (REP) para a produção de Lacase e MnP a partir de Basidiomicetos e obteve os valores de 760 UI/L em (MP) e 490 UI/L em (REP) em Lacase, não havendo produção de MnP nesses substratos em cultura submersa com *Hypsizygus marmoreus*. Em *Trametes versicolor* o mesmo autor obteve 710 UI/L em (MP) e 1200UI/L em (REP) para MnP. Tais valores são próximos ao encontrado neste trabalho.

4.3 MELHORAMENTO UTILIZANDO CONSÓRCIO FÚNGICO

Segundo descrito no Anexo F, a melhor metodologia de cultivo para as lignocelulases foi 1.R6:4 S1:1 com oito melhores valores contra seis melhores valores em 2.R6:4 S1:1, sem considerar o tempo de cultivo. Em relação ao tempo de cultivo, o melhor tempo foi em 5 dias com 7 valores contra 5 melhores valores obtidos em 10 dias. Observou-se que a diferença entre as duas metodologias e o tempo de cultivo não foram significativas.

O consórcio fúngico foi favorável para as enzimas LiP e MnP com 11.610 UI/L e 1.570 UI/L, respectivamente, havendo ainda um melhoramento do resultado de Lacase com 473,456 UI/L, no entanto, o valor foi apenas superior ao valor encontrado no experimento inicial em *A. niger* sendo inferior ao valor encontrado para Basidiomiceto, conforme ilustrado na Tabela 4.

Tabela 4- Comparação entre *A. niger* e Basidiomiceto nos experimentos iniciais com o melhoramento utilizando consórcio fúngico com o *A. niger* e o basidiomiceto.

Enzima	Experimento inicial (<i>A. niger</i>)	Experimento inicial (Basidiomiceto)	Consórcio Fúngico (<i>A. niger</i> + Basidiomiceto)
Xilanase (UI/mL)	13,596 ^{**m}	5,062 ^{*m}	0,973
CMCase (UI/mL)	6,938 ^{**m}	2,949 ^{*m}	1,100
FPase (UI/mL)	0,117 ^{**m}	0,078 ^{**m}	0,055
B-glicosidase (UI/mL)	134,615 ^{***g}	15,496 ^{***g}	16,391
Lacase (UI/L)	129,629 ^{***m}	1.642 ^{***g}	473,456
LiP (UI/L)	7.194 ^{***g}	10.881 ^{***m}	11.611
MnP (UI/L)	818,181 ^{***m}	1.053 ^{***m}	1.571

Valores de unidade de enzima comparativos entre o experimento inicial com *A. niger* e com o basidiomiceto utilizando a casca de cupuaçu(*) , casca de maracujá (**) e casca de macaxeira (***) nas duas soluções salinas, Manachini (^m) e GLBN 40 (^g) e o melhoramento utilizando o consórcio fúngico entre estes mesmos fungos.

Consórcio significa associação, comunhão de interesses. A associação entre microrganismos pode ser importante para tratamentos biológicos, objetivando a redução do tempo de degradação de resíduos, visto que cada microrganismo tem suas particularidades. (COSTA et al., 2007) Bactérias e fungos são agentes eficazes na transformação de uma ampla gama de substância orgânicas, utilizando-as como fonte de carbono e energia durante seu crescimento. (SOARES, 2012).

Um consórcio de microrganismos pode favorecer a produção de algumas enzimas devido ao fato de que o crescimento de dois ou mais microrganismos em um mesmo ambiente, promove uma competição por nutrientes, dessa forma, os microrganismos ficam estressados e isso os leva a produzir metabólitos secundários que tem por finalidade garantir a sobrevivência de organismos particulares em ambientes hostis. Tais metabólitos secundários podem inibir o crescimento do outro fungo e favorecer a produção de determinadas enzimas, visto que a competitividade entre indivíduos aumenta.

Baptista, (2011) utilizou *A. terreus*, *P. commune* e *Cunninghamella echinulata* em consórcio no meio Bushnell Haas acrescido de 7% de óleo diesel e mantidos durante 7 dias à temperatura 28°C e obteve 2.683 UI/L de LiP e 13.070 UI/L para Lac. Observou-se que esse resultado de LiP foi inferior ao obtido neste trabalho (11.611 UI/L), no entanto, o resultado de Baptista, (2011) para Lac foi superior ao encontrado neste trabalho (473 UI/L).

5 CONCLUSÃO

O *A.niger* foi o melhor produtor de CMCase, β -glicosidase e Xilanase com 6,938 UI/mL, 134,615 UI/mL, e 13,596 UI/mL, respectivamente. O *Penicillium* sp. foi o melhor produtor de FPase e LiP com 0,126 UI/mL e 36.391 UI/L, respectivamente. O melhor produtor de Lacase e MnP foi o Basidiomiceto com 1.277 UI/L e 1.053 UI/L, respectivamente. Tais valores são bons frente à procura do mercado. Todos os substratos foram viáveis para a produção de todas as enzimas, dependendo do fungo utilizado para a produção das mesmas. *A.niger* não é um bom produtor de ligninases, no entanto, é um bom produtor de celulases, da mesma forma, o Basidiomiceto não é tão bom produtor de celulases, porém, responde positivamente à produção de ligninases, conforme esperado. O substrato em que houve melhor produção de FPase, Xilanase e CMCase, foi a casca de maracujá e em β -glicosidase, Lac, LiP e MnP o melhor substrato foi a casca de macaxeira indicando a casca de maracujá e a casca de macaxeira como bons substratos para a produção de enzimas lignocelulolíticas.

No melhoramento 1 onde submeteu-se a cultivo submerso o melhor produtor de celulases que foi o *A.niger* frente aos dois melhores substratos (C. Maj + C. Max) e as duas soluções salinas (GLBN 40 + Manachini), constatou-se que a melhor proporção para a produção de 4/7 das enzimas foi R6:4 S1:1 havendo, de fato, um melhoramento na produção de Lacase, LiP e MnP com 630,864 UI/L, 16.750 UI/L, 1.898 UI/L, respectivamente, quando comparados aos valores de *A.niger* no experimento inicial. No entanto, os resultados não foram promissores para as celulases decaindo consideravelmente os valores.

No melhoramento 2, onde foi feito o consórcio fúngico com o basidiomiceto e o *A.niger*, verificou-se que houve melhoramento apenas na produção de LiP e MnP com 11.610 UI/L e 1.570 UI/L, respectivamente, e entre as metodologias de melhoramento utilizadas em ambos experimentos (1 R6:4 S1:1 e 2 R6:4 S1:1), não houve diferença significativa na produção dessas enzimas, no entanto, o consórcio fúngico beneficiou o melhoramento da produção das mesmas, nas condições indicadas.

Diante do exposto, constatou-se que os valores iniciais de celulases são bons, no entanto, não se alcançou o melhoramento da produção das mesmas. Obteve-se o melhoramento de duas ligninases, LiP e MnP, com quase o dobro dos valores encontrados no experimento inicial. Os substratos agrícolas da Amazônia bem como os fungos Amazônicos utilizados são promissores para a produção de lignocelulases, tendo a possibilidade de serem submetidos ao melhoramento das condições de cultivo (temperatura, pH, concentração de

substrato, fonte de nitrogênio, etc.) além da possibilidade de melhoramento genético, com a finalidade de aumentar a produção enzimática.

REFERÊNCIAS

AGUIAR FILHO, J.M.M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Área de concentração: Microbiologia Agrícola. p. 80. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

AGUIAR, A. P. **Seleção de espécies de Basidiomicetos produtoras de ligninases para caracterização e aplicação das enzimas sobre corantes aromáticos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos. 137 p. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo *Aspergillus Níger***. Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Área de concentração: Desenvolvimento de Processos. 118 p. Centro de engenharias e ciências exatas - Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Toledo, 2010.

ALMEIDA, A. **Seleção de fungos filamentosos produtores de xilanases e celulases utilizando resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais). Área de Concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais. Centro de ciências biológicas e da saúde - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2013.

BAPTISTA, N. M. Q. **Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos**. 38 p. Monografia (Especialização em Micologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

BAPTISTA, N. M. Q.; SANTOS, A. C.; ARRUDA, F. V. F.; GUSMÃO, N. V. Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos. **Scientia plena**, v.8, n°1, 2012.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**.- Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BOURBONNAIS, M.; LEECH, D.; PAICE, M.G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochemistry and Biophysic**. ACTA-General Subjects, 1379, 381-390, 1998.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2196-2204, 2007

CONCEIÇÃO, T. A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por fungos Agaricomycetes cultivados em Resíduos agro-industriais do estado da Bahia**. 80 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

COSTA, A.; HERMANN, K. L.; HELM, C. V.; LIMA, E. A.; TAVARES, L. B. B. Expression of manganese peroxidase by *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* in submerged

and solid-state systems. In: BRAZILIAN SEMINAR OF ENZYME TECHNOLOGY – Xth ENZITEC. October, Blumenau, SC, Brasil, 2012.

COSTA, A.F.S.; SILVA, J.R.R.; SANTOS, R.C.M.M.; FARIAS, C.B.; SARRUBO, L.A.; JORDÃO, R.C.C.; SALGUEIRO, A.A. Obtenção de consórcio de microorganismos a partir de amostra de petróleo. **Revista Ciência e Tecnologia**. Ano 1, nº 1, julho-dezembro, 2007.

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

FERNANDES, S. M. **Prospecção de micro-organismos lignolíticos da microbiota amazônica para a produção de biocombustível de segunda geração e compostagem**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia). 89 p. Escola Superior de Ciências da Saúde - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2013.

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

FRAIFE FILHO, G. A. **Cupuacu**. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC. Disponível em <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cupuacu.htm>>. Acesso em: 16 Abr. 2015.

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

GOTTSLAHK, L. M. F.; SILVA, J. P. L.; SOUZA, E. F. Produção de xilanase por duas cepas de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA - X ENZITEC. Outubro, 2012. Blumenau, SC, Brazil.

HAMED, S. A. M. In-vitro studies on wood degradation in soil by soft-rot fungi: *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.78, p. 98-102, 2013.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I.; SMITH, D. W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal Environmental Engineering and Science**, v.3, p.1-19, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, v.26, n.1 p.1-83. 2013.

IQBAL, H. M. N.; ASGHER, N.; BHATTI, H. N. Optimization of physical and nutritional factors for synthesis of lignin degrading enzymes by a novel strain of *Trametes versicolor*. **BioResources**. v.9, 1273-1287 p., 2011.

KHINDARIA, A., GROVER, T.A., AUST, S.D. Oxalate-dependent reductive activity of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of biochemistry and biophysic**. v.314, nº 2. p. 301-306, 1994.

KIRK, T. K.; TIEN, M.; KERSTEN, P. J.; MOZUCH, M. D.; KALYANARAMAN, B. Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*: Mechanism of its degradation of the non-phenolic arylglycerol β -arylether substructure of lignin. **Biochemical Journal**. 236,279-287.1986

MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Purification and properties of endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 21-224. 1987.

MARQUES, M. P.; MONTI, R.; BERLINCK, R. G. S.; SPONCHIADO, S. R. P. Effect of carbon source and temperature in the production of CMCase and β -glucosidase by marine derived fungus *Aspergillus niger*. In: BRAZILIAN SEMINAR ON ENZYME TECHNOLOGY - Xth ENZITEC. October, Blumenau, SC, Brazil, 2012.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulósico de *Penicillium echinulatum***. Dissertação (Mestrado em Química). Sub área: Química Orgânica. Universidade de Caxias do Sul. Curitiba, p. 139, 2005.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

PEREIRA, B. **Produção de lignina peroxidase com a utilização de subprodutos industriais**. Monografia - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. Valorização de resíduos da agroindústria. In: II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA – Março, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2011.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**. v.27, 185-194 p., 2009.

SANTOS, T. C.; AMORIM, G. M.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Determinação da Atividade de CMCase e FPase da Estipe Fúngica *Rhizopus* sp. Através da bioconversão do Resíduo de Seriguela (*Spondias purpurea* L.). **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. v.13, p. 145-149, 2011.

SANTOS, T. C.; ROCHA, T. J. O.; OLIVEIRA, A. C.; ABREU FILHO, C.; FRANCO, M. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir farelo de cacau (*Theobroma cacao*). **Arquivos do Instituto Biológico**. v.80, n.1, p.65-71, 2013.

SANTOS, V. E. O. **Composição e digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído em reator estático**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial na área de microbiologia aplicada). Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, p. 103, 2010.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 16 de Abr. 2015.

SILVA, A.S. **Avaliação da produção de celulases e xilanase pela degradação de resíduos agrícolas regionais por fungos da Amazônia.** Dissertação (Mestrado em Química) Área de concentração: Química Orgânica. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

SOARES, E. P. **Fungos Amazônicos com potencial para degradação de polietileno tereftalato-PET.** 126 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) – Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2012.

SONGULASHVILI, G.; ELISASHVILI, V.; WASSER, S. P.; NEVO, E; HADAR, Y. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p. 57–61, 2007.

ANEXOS**ANEXO A**

Composição das soluções basais e suas respectivas quantidades.

SOLUÇÃO DE MANACHINI

COMPONENTES	QUANTIDADES
Fosfato de potássio (KH_2PO_4)	2,0 g
Sulfato de amônia (NH_4) ₂ SO ₄	1,0 g
Sulfato de manganês heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
Fosfato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,9 g
Extrato de Levedura	1,0 g
Água destilada	Completar 1000ml
pH 5	

SOLUÇÃO GLBN 40

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	2,0 g
Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
Tartarato de amônia ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$)	0,2 g
Cloridrato de tiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$)	0,001 g
Sulfato de manganês (MnSO_4)	0,04 mg
Tween 80	472 µl
Álcool Veratrílico	363 µl
Solução de elementos traço	70 ml
Água destilada	Completar 1000ml
pH 4,5	

SOLUÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO

Ácido nitriloacético ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_6$)	1,5 g
Ácido bórico (H_3BO_3)	0,01 g

Cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
Cloreto de sódio (NaCl)	1 g
Molibidato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
Sulfato de alumínio e potássio dodecahidratado ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
Sulfato de cobalto (CoSO_4)	0,1 g
Sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
Sulfato de manganês monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3,0 g
Sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
Água ultra pura	1000 mL

ANEXO B

Médias dos valores de unidades de enzimas de CMCase, FPase, β -glicosidade e Xilanase seguidas do desvio padrão. A letra A indica que há diferença significativa entre as médias. As letras maiúsculas iguais diferentes de "A" indicam que não há diferença significativa entre as médias na vertical e as letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias na horizontal ($p > 0.5$).

Atividade de CMCase UI/mL				
S.Salinas	Linhagens	Substrato	5 dias	10 dias
GLBN 40	<i>A.niger</i>	C. Cup.	1,621A \pm 0,379	1,873A \pm 0,254
		C. Maj.	0,043A \pm 0,026	0,049A \pm 0,039
		C. Max.	0,133A \pm 0,067	0,063A \pm 0,006
	Basidiomiceto	C. Cup.	0,189A \pm 0,053	1,398A \pm 0,042
		C. Maj.	1,732A \pm 0,013	0,492A \pm 0,052
		C. Max.	0,063A \pm 0,004	0,040A \pm 0,007
	<i>Penicillium. sp.</i>	C. Cup.	0,513A \pm 0,085	0,021A \pm 0,005
		C. Maj.	0,094A \pm 0,012	0,193A \pm 0,035
		C. Max.	0,265A \pm 0,045	0,215A \pm 0,021
Manachini	<i>A.niger</i>	C. Cup.	2,884A \pm 0,010	2,893A \pm 0,130
		C. Maj.	6,938A \pm 0,598	5,328A \pm 0,441
		C. Max.	0,049A \pm 0,015	0,415A \pm 0,084
	Basidiomiceto	C. Cup.	2,950A \pm 0,059	2,734A \pm 0,065
		C. Maj.	1,164A \pm 0,043	2,699A \pm 0,047
		C. Max.	0,100A \pm 0,005	0,538A \pm 0,045
	<i>Penicillium. sp.</i>	C. Cup.	0,266A \pm 0,036	1,054A \pm 0,029
		C. Maj.	0,966A \pm 0,032	3,021A \pm 0,044
		C. Max.	0,065A \pm 0,024	0,028A \pm 0,008

Atividade de Fpase UI/mL				
S.Salinas	Linhagens	Substrato	5 dias	10 dias
GLBN 40	<i>A.niger</i>	C. Cup.	0,039A \pm 0,009	0,067A \pm 0,005
		C. Maj.	0,031A \pm 0,001	0,022A \pm 0,004
		C. Max.	0,051A \pm 0,002	0,005A \pm 0,001
	Basidiomiceto	C. Cup.	0,032Ac \pm 0,003	0,022A \pm 0,002
		C. Maj.	0,043A \pm 0,003	0,022A \pm 0,002
		C. Max.	0,014A \pm 0,001	0,032Ac \pm 0,002
	<i>Penicillium. sp.</i>	C. Cup.	0,024A \pm 0,006	0,028A \pm 0,003
		C. Maj.	0,019A \pm 0,002	0,045A \pm 0,003
		C. Max.	0,048A \pm 0,003	0,062A \pm 0,005
Manachini	<i>A.niger</i>	C. Cup.	0,117A \pm 0,001	0,072A \pm 0,003
		C. Maj.	0,044A \pm 0,002	0,059A \pm 0,003
		C. Max.	0,011A \pm 0,003	0,009A \pm 0,003
	Basidiomiceto	C. Cup.	0,072A \pm 0,004	0,073A \pm 0,003
		C. Maj.	0,063A \pm 0,003	0,098A \pm 0,001
		C. Max.	0,021Ab \pm 0,002	0,018Ab \pm 0,005
	<i>Penicillium. sp.</i>	C. Cup.	0,066A \pm 0,004	0,044A \pm 0,003
		C. Maj.	0,054A \pm 0,004	0,126A \pm 0,005

		C. Max.	0,031A ±0,003	0,030A ±0,005	
Atividade de B-glicosidase UI/mL					
S.Salinas	Linhagens	Substrato	5 dias	10 dias	
GLBN 40	<i>A.niger</i>	C. Cup.	7,990A ±0,309	24,952A ±1,168	
		C. Maj.	32,001A ±1,431	1,679A ±0,178	
		C. Max.	134,615A ±0,788	12,297A ±0,368	
	Basidiomiceto	C. Cup.	2,046A ±0,196	2,580ab ±0,145	
		C. Maj.	3,330A ±0,185	2,741A ±0,437	
		C. Max.	15,496 A±0,479	2,471A ±0,111	
	<i>Penicillium. sp.</i>	C. Cup.	4,202A ±0,369	4,376A ±0,706	
		C. Maj.	2,590Ba ±0,579	3,819A ±0,644	
		C. Max.	18,210A ±0,473	3,110A ±0,133	
	Manachini	<i>A.niger</i>	C. Cup.	20,291A ±0,700	35,373A ±0,484
			C. Maj.	31,491A ±2,343	79,272A ±0,028
			C. Max.	32,893A ±1,852	21,355A ±2,178
Basidiomiceto		C. Cup.	1,721A ±0,246	2,009A ±0,610	
		C. Maj.	2,571Bb ±0,715	2,500A ±0,126	
		C. Max.	13,465A ±0,400	1,513A ±0,055	
<i>Penicillium. sp.</i>		C. Cup.	2,625A ±0,514	6,511A ±0,557	
		C. Maj.	4,486A ±0,791	8,381A ±0,446	
		C. Max.	71,045A ±1,794	15,480A ±0,106	
Atividade de Xilanase UI/mL					
S.Salinas		Linhagens	Substrato	5 dias	10 dias
GLBN 40		<i>A.niger</i>	C. Cup.	2,156A ±0,052	2,572A ±0,142
	C. Maj.		0,740A ±0,037	1,355A ±0,026	
	C. Max.		0,967A ±0,065	0,433A ±0,011	
	Basidiomiceto	C. Cup.	0,559A ±0,047	1,258A ±0,051	
		C. Maj.	0,394A ±0,053	0,382A ±0,039	
		C. Max.	0,469a ±0,038	0,177A ±0,020	
	<i>Penicillium. sp.</i>	C. Cup.	0,731A ±0,088	0,229A ±0,075	
		C. Maj.	0,123A ±0,026	0,470a ±0,040	
		C. Max.	1,011A ±0,098	0,495A ±0,022	
	Manachini	<i>A.niger</i>	C. Cup.	3,761A ±0,085	4,322A ±0,365
			C. Maj.	13,596A ±0,097	11,672A ±0,503
			C. Max.	0,212A ±0,045	0,703A ±0,050
Basidiomiceto		C. Cup.	5,063A ±0,042	1,534A ±0,059	
		C. Maj.	0,847A ±0,046	2,884A ±0,068	
		C. Max.	0,174A ±0,058	0,606A ±0,054	
<i>Penicillium. sp.</i>		C. Cup.	0,529A ±0,044	0,193A ±0,016	
		C. Maj.	1,868A ±0,129	4,181A ±0,306	
		C. Max.	0,781A ±0,067	0,241A ±0,034	

ANEXO C

Médias dos valores de unidades de enzimas de Lacase, LiP e MnP seguidas do desvio padrão. A letra A indica que há diferença significativa entre as médias. As letras maiúsculas iguais diferentes de "A" indicam que não há diferença significativa entre as médias na vertical e as letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias na horizontal ($p > 0.5 \%$).

Atividade de Lacase UI/L					
S.Salinas	Linhagens	Substrato	5 dias	10 dias	
GLBN 40	<i>A.niger</i>	C. Cup.	-	-	
		C. Maj.	-	28,395A ±2,828	
		C. Max.	24,700A ±14,970	-	
	Basidiomiceto	C. Cup.	355,556A ±42,893	580,000A ±63,847	
		C. Maj.	324,074A ±44,930	1277,160A ±35,006	
		C. Max.	101,852A ±38,267	1641,975A ±19,801	
	<i>Penicillium. sp.</i>	C. Cup.	-	79,012A ±23,006	
		C. Maj.	61,111A ±32,919	-	
		C. Max.	-	512,963A ±21,833	
Manachini	<i>A.niger</i>	C. Cup.	-	-	
		C. Maj.	-	129,630A ±61,195	
		C. Max.	118,519A ±3,704	-	
	Basidiomiceto	C. Cup.	-	-	
		C. Maj.	35,185A ±3,704	-	
		C. Max.	326,852A ±26,772	135,185A ±23,534	
	<i>Penicillium. sp.</i>	C. Cup.	441,358A ±5,658	272,840A ±13,397	
		C. Maj.	183,333A ±30,598	246,914A ±29,300	
		C. Max.	48,765A ±4,277	285,926A ±39,860	
Atividade de LiP UI/L					
S.Salinas	Linhagens	Substrato	5 dias	10 dias	
GLBN 40	<i>A.niger</i>	C. Cup.	4590,203A ±117,862	-	
		C. Maj.	783,751A ±89,630	-	
		C. Max.	7194,743A ±215,332	47,790A ±4,139	
	Basidiomiceto	C. Cup.	974,910B ±101,124	769,415A ±139,063	
		C. Maj.	2014,337A ±168,573	5777,778A ±452,096	
		C. Max.	7772,999A ±235,616	2276,703C ±207,056	
	<i>Penicillium. sp.</i>	C. Cup.	4709,677A ±418,818	2222,222A ±205,148	
		C. Maj.	6787,097A ±1391,968	5178,017a ±310,845	
		C. Max.	-	36391,876A ±343,513	
Manachini	<i>A.niger</i>	C. Cup.	-	1197,133A ±33,623	
		C. Maj.	-	2926,165A ±38,403	
		C. Max.	953,405B ±22,095	-	
	Basidiomiceto	C. Cup.	-	-	
		C. Maj.	2540,024A ±441,564	2659,498C ±526,382	
		C. Max.	10881,720A ±342,364	-	
			C. Cup.	10062,127A ±228,530	7354,839A ±51,692

	<i>Penicillium. sp.</i>	C. Maj.	5710,872a ±211,480	5216,249A ±426,348
		C. Max.	-	6060,932A ±211,884
Atividade de MnP UI/L				
S.Salinas	Linhagens	Substrato	5 dias	10 dias
GLBN 40	<i>A.niger</i>	C. Cup.	-	-
		C. Maj.	-	-
		C. Max.	-	-
	Basidiomiceto	C. Cup.	121,212A ±30,303	157,576A ±49,793
		C. Maj.	-	171,717A ±17,495
		C. Max.	-	313,131A ±17,495
	<i>Penicillium. sp.</i>	C. Cup.	-	266,667A ±25,353
		C. Maj.	454,545A ±47,913	310,606A ±45,455
		C. Max.	-	478,788A ±49,793
	<i>A.niger</i>	C. Cup.	-	103,030A ±16,598
		C. Maj.	-	187,879A ±25,353
		C. Max.	818,182A ±60,606	-
Manachini	Basidiomiceto	C. Cup.	-	-
		C. Maj.	-	166,667B ±52,486
		C. Max.	60,606A ±30,303	1053,030A ±117,036
	<i>Penicillium. sp.</i>	C. Cup.	371,212A ±45,455	-
		C. Maj.	85,859A ±23,144	175,758B ±49,793
		C. Max.	-	280,303A ±45,455

ANEXO D

Atividades enzimáticas das celulases obtidas no experimento em que se utilizou apenas o *A.niger* inoculado na mescla de casca de maracujá e casca de macaxeira. A letra R corresponde à mescla dos resíduos seguidos das proporções indicadas em sequência e o S corresponde à mescla das soluções basais seguidas das proporções indicadas. As médias das atividades enzimáticas estão seguidas do desvio padrão onde tais médias acompanhadas da letra A indica que há diferença significativa entre as médias. As letras maiúsculas iguais diferentes de "A" indicam que não há diferença significativa entre as médias na vertical e as letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias na horizontal ($p > 0.5 \%$).

Tempo	Proporções	CMCase UI/mL	
5 dias	R1:1S1:1	0,236A ±0,046	R1:1S1:1 0,756A ±0,026
	R1:1S4:6	0,315a ±0,047	R1:1S4:6 1,010A ±0,024
	R1:1S6:4	0,154B ±0,028	R1:1S6:4 0,539C ±0,063
	R4:6S1:1	0,158B ±0,068	R4:6S1:1 0,254A ±0,065
	R4:6S4:6	0,147A ±0,031	R4:6S4:6 1,277A ±0,065
	R4:6S6:4	0,397A ±0,022	R4:6S6:4 0,469C ±0,031
	R6:4S1:1	1,863A ±0,058	R6:4S1:1 0,326A ±0,053
	R6:4S4:6	0,356A ±0,039	R6:4S4:6 0,317a ±0,020
	R6:4S6:4	0,207A ±0,024	R6:4S6:4 0,700A ±0,019
Tempo	Proporções	FPase UI/mL	
5 dias	R1:1S1:1	0,058A ±0,004	R1:1S1:1 0,061A ±0,003
	R1:1S4:6	0,071A ±0,004	R1:1S4:6 0,052a ±0,003
	R1:1S6:4	0,049B ±0,005	R1:1S6:4 0,046A ±0,002
	R4:6S1:1	0,024b ±0,003	R4:6S1:1 0,033A ±0,002
	R4:6S4:6	0,015A ±0,002	R4:6S4:6 0,044A ±0,004
	R4:6S6:4	0,028A ±0,005	R4:6S6:4 0,027b ±0,002
	R6:4S1:1	0,055A ±0,005	R6:4S1:1 0,036A ±0,002
	R6:4S4:6	0,056a ±0,002	R6:4S4:6 0,025A ±0,004
	R6:4S6:4	0,043B ±0,004	R6:4S6:4 0,038A ±0,002
Tempo	Proporções	B-glicosidase UI/ mL	
5 dias	R1:1S1:1	3752B ±1,448	R1:1S1:1 11,889A ±0,141
	R1:1S4:6	3,895A ±0,090	R1:1S4:6 5,968A ±0,072
	R1:1S6:4	3740B ±0,054	R1:1S6:4 8,023A ±0,092
	R4:6S1:1	2,712A ±0,054	R4:6S1:1 5,185A ±0,070
	R4:6S4:6	2,282A ±0,082	R4:6S4:6 7,257A ±0,094
	R4:6S6:4	22,862A ±0,227	R4:6S6:4 12,535A ±0,054
	R6:4S1:1	41,158A ±0,179	R6:4S1:1 2,907A ±0,125
	R6:4S4:6	4,623A ±0,196	R6:4S4:6 5,022A ±0,040
	R6:4S6:4	5,326A ±0,214	R6:4S6:4 5,267A ±0,101
Tempo	Proporções	Xilanase UI/ mL	
5 dias	R1:1S1:1	0,906Bab ±0,063	R1:1S1:1 1,879A ±0,020
	R1:1S4:6	3,928A ±0,072	R1:1S4:6 2,923A ±0,017
	R1:1S6:4	0,904BCc ±0,052	R1:1S6:4 1,676A ±0,043
	R4:6S1:1	0,993C ±0,071	R4:6S1:1 1,028A ±0,014
	R4:6S4:6	0,650A ±0,036	R4:6S4:6 2,551A ±0,040
	R4:6S6:4	0,520A ±0,086	R4:6S6:4 2,032A ±0,036
	R6:4S1:1	8,051A ±0,046	R6:4S1:1 0,900ac ±0,030

	R6:4S4:6	0,807A ±0,057		R6:4S4:6	0,928b ±0,025
	R6:4S6:4	0,935A ±0,066		R6:4S6:4	1,886A ±0,022

ANEXO E

Atividades enzimáticas das ligninases obtidas no experimento em que se utilizou apenas o *A.niger* inoculado na mescla de casca de maracujá e casca de macaxeira. A letra R corresponde à mescla dos resíduos seguidos das proporções indicadas em sequência e o S corresponde à mescla das soluções basais seguidas das proporções indicadas em sequência. Médias das atividades enzimáticas seguidas do desvio padrão onde a letra A indica que há diferença significativa entre as médias. As letras maiúsculas iguais diferentes de "A" indicam que não há diferença significativa entre as médias na vertical e as letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias na horizontal ($p > 0.5$).

Tempo	Proporções		LiP UI/L	
5 dias	R1:1S1:1	-	R1:1S1:1	2.367,981A 334,724
	R1:1S4:6	11.780,167A ±482,280	R1:1S4:6	-
	R1:1S6:4	-	R1:1S6:4	-
	R4:6S1:1	6.879,331A ±345,601	R4:6S1:1	-
	R4:6S4:6	4.406,213B ±309,353	R4:6S4:6	-
	R4:6S6:4	7.921,147A ±265,233	R4:6S6:4	-
	R6:4S1:1	-	R6:4S1:1	16.750,299A ±284,700
	R6:4S4:6	4.389,486B ±350,620	R6:4S4:6	-
	R6:4S6:4	4.487,455A ±260,739	R6:4S6:4	-
			10 dias	
Tempo	Proporções		MnP UI/L	
5 dias	R1:1S1:1	-	R1:1S1:1	-
	R1:1S4:6	-	R1:1S4:6	1.116,162A ±31,540
	R1:1S6:4	-	R1:1S6:4	762,626A ±38,130
	R4:6S1:1	-	R4:6S1:1	-
	R4:6S4:6	-	R4:6S4:6	-
	R4:6S6:4	-	R4:6S6:4	1.898,990A ±17,495
	R6:4S1:1	924,242A ±26,243	R6:4S1:1	409,091A ±15,152
	R6:4S4:6	419,192A ±86,155	R6:4S4:6	-
	R6:4S6:4	-	R6:4S6:4	-
			10 dias	
Tempo	Proporções		Lac UI/L	
5 dias	R1:1S1:1	-	R1:1S1:1	217,901A ±11,162
	R1:1S4:6	-	R1:1S4:6	70,988A ±13,397
	R1:1S6:4	57,407A ±4,900	R1:1S6:4	181,481A ±15,158
	R4:6S1:1	630,864A ±7,484	R4:6S1:1	-
	R4:6S4:6	-	R4:6S4:6	91,358A ±4,660
	R4:6S6:4	80,247A ±4,660	R4:6S6:4	426,543A ±38,057
	R6:4S1:1	186,420A ±7,710	R6:4S1:1	-
	R6:4S4:6	209,877A ±13,899	R6:4S4:6	-
	R6:4S6:4	242,593A ±4,900	R6:4S6:4	-
			10 dias	

ANEXO F

Atividade enzimática das Lignocelulases no experimento onde utilizou-se o consórcio fúngico (*A.niger* + *Basidiomiceto*). 1.R6:4 S1:1 corresponde à metodologia um e 2.R6:4 S1:1 corresponde à metodologia dois, ambas descritas no corpo do texto. Médias seguidas da letra maiúscula “A” diferem estatisticamente entre si na horizontal, quanto às duas metodologias diferentes, e médias com letras minúsculas na vertical, não diferem estatisticamente quanto ao tempo de cultivo ($p > 0.5$ %). LiP corresponde à lignina peroxidase, MnP corresponde à manganês peroxidase e Lac corresponde à lacase. Em marrom estão os melhores resultados comparando as duas metodologias (1.R6:4 S1:1 e 2.R6:4 S1:1) e o (*) indica o melhor resultado entre os tempos de cultivo.

Tempo	Enzimas	1.R6:4 S1:1 (UI/mL)	2.R6:4 S1:1 (UI/mL)
5 dias	CMCase	1,100* A ±0,278	0,579A ±0,089
	Xilanase	0,533A ±0,087	0,866 A ±0,066
	BLG	4,098* A ±0,061	2,663A ±0,265
	Fpase	0,008A ±0,001	0,055* A ±0,005
10 dias	CMCase	0,923A ±0,064	0,930 A ±0,154
	Xilanase	0,953A ±0,054	0,973* A ±0,094
	BLG	1,918 A ±0,059	0,605A ±0,301
	Fpase	0,047 A ±0,005	0,039A ±0,007
Tempo	Enzimas	1.R6:4 S1:1 UI/L	2.R6:4 S1:1 UI/L
5 dias	LiP	6571,087A ±126,282	11577,061 Ab ±715,842
	MnP	1570,707* A ±151,767	1373,737A ±336,873
	Lac	473,457* A ±18,549	-
10 dias	LiP	11610,514* Ab ±542,976	8231,780A ±345,601
	MnP	767,677 A ±166,896	-
	Lac	-	188,889 A ±5,556