



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E

RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**“PROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS LIGNOLÍTICOS DA MICROBIOTA
AMAZÔNICA PARA A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL DE SEGUNDA
GERAÇÃO E COMPOSTAGEM”**

SIMONE MACIEL FERNANDES

MANAUS, JULHO DE 2013



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E

RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

**“PROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS LIGNOLITICOS DA MICROBIOTA
AMAZÔNICA PARA A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL DE SEGUNDA
GERAÇÃO E COMPOSTAGEM”**

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 a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dr^a. Antonia Queiroz Lima de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

Aluna: Simone Maciel Fernandes

MANAUS, JULHO DE 2013

SIMONE MACIEL FERNANDES

**“PROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS LIGNOLITICOS DA MICROBIOTA
AMAZÔNICA PARA A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL DE SEGUNDA
GERAÇÃO E COMPOSTAGEM”**

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 a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Data 30/07/2013

Banca Examinadora:

Antonia Queiroz Lima de Souza – Universidade do Estado do Amazonas

Yamile Benaion Alencar – Centro de Ensino Literatus

Aldo Rodrigues de Lima Procópio – Universidade do Estado do Amazonas

MANAUS, JULHO DE 2013

Dedico este trabalho ao meu esposo, amigo e companheiro Robervan Cordeiro Lasmar pelas infinitas horas de dedicação, caminhando ao meu lado, incentivando e dando apoio nos momentos em que mais precisei. A minha mãe Maria Ledy Maciel Parente pelas incontáveis noites que passou acordada orando por mim. Ao meu pai Raimundo Fernandes pelo amor declarado através de ações. Por mim e por vocês obtive essa vitória.

Dedicatória.

AGRADECIMENTOS

A Deus por seu imensurável amor, sabedoria concedida, por ter guiado meus passos e colocado em meu caminho as pessoas abaixo:

Ao meu esposo Robervan Lasmar pela compreensão, companheirismo, paciência, incentivo, enfim por todo amor concedido nos momentos em que mais precisei.

A Professora orientadora Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza, pela orientação acadêmica, incentivo à pesquisa e por ter sido mais que uma orientadora, sou grata pela sua amizade e paciência.

Aos meus pais Raimundo Fernandes e Ledy Maciel por terem me dado condições e orientações para me tornar a pessoa que hoje sou e acreditar que tudo é possível.

A minha família Mônica Cristina, Risonildo Fernandes, Roberto Fernandes, Sarah Fernandes, Davi Fernandes, Estevão Fernandes, Delziane Fernandes, Whollacy Pessoa e Roberta Fernandes por todo amor, preocupação e carinho.

Aos meus amigos do laboratório Laryssa Melo, Paulo Alexandre, Juliana Oliveira, Flavia Paiva, Adriana Silva e Dolores Fonseca pelos conhecimentos transmitidos no laboratório.

A Auricélia Gama e Fabiana Almeida pelos ensinamentos e principalmente pelo companheirismo, vocês foram dois presentes de Deus.

Aos meus amigos e colegas de turma: Diego Liciard, Dorothy Ívila e Soraya Félix por terem me proporcionado tantas alegrias.

A Vanda Maria da Silva pela amizade, carinho e todo o auxílio prestado na ESA.

Aos meus queridos irmãos em Cristo Delziane Fernandes, Karla Beatriz e Robervan Lasmar pelas inúmeras vezes que dobramos nossos joelhos em oração e entregamos nossos planos nas mãos de Deus.

Ao meu querido amigo hoje Pr. William Evangelista que me incentivou desde a graduação me fazendo acreditar que tudo se conquista com paciência, perseverança e determinação.

A minhas grandes e eternas amigas Gerlane Lima e Maria Cristiane por todas as vezes que planejamos e sonhamos com momentos como esse durante a graduação.

Ao meu querido Professor cubano e grande amigo Dr. Anésio Mesa Sardñas por ter acreditado e me incentivado durante a graduação.

A banca examinadora Dra. Yamile Benaion Alencar e Dr. Aldo Rodrigues de Lima Procópio.

A todos os meus colegas do MBT, pelos momentos difíceis, porém felizes que compartilhamos.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM por ter disponibilizado os recursos para a realização deste projeto.

RESUMO

“PROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS LIGNOLITICOS DA MICROBIOTA AMAZÔNICA PARA A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL DE SEGUNDA GERAÇÃO E COMPOSTAGEM”

Com o crescimento da população, aumenta a produção de alimentos e conseqüentemente são geradas toneladas de resíduos agrícolas, constituídos de: celulose, hemicelulose e lignina, formando a biomassa a qual pode ser utilizada como uma alternativa para a obtenção de produtos de alto valor agregado. Os micro-organismos são os principais decompositores da matéria orgânica, dentre as enzimas secretadas pelos fungos estão as ligninases e as lipases. As ligninases atuam na decomposição de compostos recalcitrantes e seus principais produtores são os basidiomycetos, que utilizam a lignina e a celulose como fonte de carbono e energia. As lipases possuem como seus principais substratos óleos e gorduras e apresentam um abrangente campo de aplicações biotecnológicas. Devido a importância da utilização da matéria orgânica de origem vegetal e a diversidade de micro-organismos com capacidade em produzir diversas enzimas com aplicações biotecnológicas, a presente pesquisa visou selecionar fungos capazes de converter a biomassa em biocombustível de 2ª geração e compostagem. Sendo assim, para a obtenção de ligninases foram utilizadas 10 linhagens fúngicas: cinco basidiomycetos e cinco *Penicillium* spp., utilizando como substratos: bagaço de cana (BCn), cascas e sementes de maracujá (CMj e SMj), cascas e semente de cupuaçu (CCp e SCp), cascas de macaxeira (CMx), urucum (CUr), guaraná (CGu), coco (CCc) e torta de pau rosa (TPR). Para a obtenção das lipases foram utilizadas as 10 linhagens e mais cinco *Aspergillus* spp., utilizando como substratos: SMj, SCp e óleo de oliva (OL). As linhagens foram cultivadas a 26 e 28 °C durante 240h a 120rpm em fermentação submersa (FSM) sendo observado o crescimento de todas as linhagens nos 11 substratos avaliados. O extrato enzimático foi obtido por filtração a vácuo, em seguida centrifugado em eppendorfs de 2mL durante 10 minutos a 10.000 rpm, novamente transferido para eppendorfs limpos e armazenado sob refrigeração. Através das análises observou-se que a manganês peroxidase (MnP) foi a enzima mais expressa na maioria dos substratos com as maiores atividades produzidas pelos *Penicillium* sp. 1 (Pen 1), com exceção apenas da CCp e CMj, sendo as maiores produções de lignina peroxidase (LiP) obtida pelo basidiomyceto 1 (Bas 1). Para lacase (Lac) os basidiomycetos foram os melhores produtores, sendo que apenas em CCc, CMx e CMj todos os *Penicillium* spp. produziram esta enzima. Para lipase a maior atividade foi detectada no substrato OL. pelo *Aspergillus* sp. 1 (Asp 1), seguido de SCp pelo *Aspergillus* sp. 4 (Asp 4). Dentre os três substratos avaliados observou-se que a SMj foi o melhor indutor, pois houve a produção por 14 das 15 linhagens utilizadas, com exceção apenas do *Aspergillus* sp. 3 (Asp 3), e os basidiomycetos foram os únicos em que produziram em pelos menos dois substratos. No processo de compostagem foram utilizadas duas cepas: Bas 1 e Pen 1, e cultivadas na CMj durante 90 dias. Após esse período os compostos originados foram pesados e observou-se a degradação de aproximadamente 80 % dos resíduos em que haviam a presença dos micro-organismos, com os menores pesos nos compostos contendo a CMj anteriormente autoclavada, e o grupo controle manteve-se inalterado, sendo que os pesos dos compostos variaram de acordo com as condições de cada experimento. Nos compostos produzidos foi realizado o plantio de *Curcubita* sp., e durante 30 dias observado o seu desenvolvimento, sendo o melhor crescimento observado nos compostos que continham o resíduo autoclavado mais os inóculos de Bas 1 e Pen 1. Esses resultados confirmam o potencial desses fungos em produzir ligninases e lipases utilizando resíduos agrícolas como substratos para a produção de biocombustíveis de segunda geração e compostagem.

Palavras-chave: ligninases, lipases, biocombustíveis, biomassa e compostagem.

ABSTRACT

"EXPLORATION OF MICROORGANISMS LIGNOLITICOS MICROBIOTA THE AMAZON TO BIOFUEL PRODUCTION OF SECOND GENERATION AND COMPOSTING"

With population growth, increasing food production and consequently tons of agricultural wastes are generated consisting of: cellulose, hemicellulose and lignin, forming the biomass which can be used as an alternative to obtain products with high added value. Microorganisms are the primary decomposers of organic matter, among the enzymes secreted by fungi are the ligninases and lipases. The ligninases act in the decomposition of recalcitrant compounds and their main producers are basidiomycetes, using the lignin and cellulose as a source of carbon and energy. Lipases have as its main substrates oils and fats and have a comprehensive field of biotechnological applications. Due to the importance of using organic matter of vegetable origin and diversity of micro-organisms capable of producing several enzymes with biotechnological applications, this research aimed to select fungi capable of converting biomass into biofuel 2nd generation and composting. Thus, to obtain ligninases 10 fungal strains were used: five Basidiomycetes and five *Penicillium* spp., as substrates: bagasse (BCn), and passion fruit peel (CMJ and SMJ), peel and seed cupuaçu (CCp and SCp), cassava peels (CMx), annatto (CUp), guarana (CGu), coconut (CCc) and pie rosewood (TPR). The 10 strains and five *Aspergillus* spp. were used to obtain the lipases, using as substrates SMJ, SCp and olive oil (OL). The strains were grown at 26 and 28 ° C for 240h at 120rpm in submerged fermentation (FSM) growth of all strains in substrates 11 reviews observable. The enzyme extract was obtained by vacuum filtration then centrifuged in 2 ml Eppendorf tubes for 10 minutes at 10,000 rpm again transferred to clean Eppendorf tubes and stored under refrigeration. Chemical analysis revealed that the manganese peroxidase (MnP) was more expressed in most substrates with the highest activities produced by *Penicillium* sp. 1 enzyme (Pen 1), except only the Cp and CMj, with the greatest amounts of lignin peroxidase (LiP) obtained by basidiomycete 1 (Bas 1). For laccase (Lac) the basidiomycetes were the best producers, and only in CCc, CMx and CMj all *Penicillium* spp. produced this enzyme. For the highest lipase activity was detected in the substrate OL. by *Aspergillus* sp. 1 (Asp 1), followed by the SCP *Aspergillus* sp. 4 (Asp 4). Of the three tested substrates was observed that the SMJ was the best inducer, since there was production by 14 of the 15 strains used, with the sole exception of *Aspergillus* sp. 3 (Asp 3), basidiomycetes and the ones that were produced using at least two substrates. In the composting process both strains were used: Bas 1 and Pen 1 and cultured in the CMJ for 90 days. After this period originated compounds were weighed and observed degradation of approximately 80 % of the waste that had the presence of micro-organisms, the lowest weight in compounds containing the CMJ previously autoclaved, and the control group remained unchanged, are the weights of the compounds varied with the conditions of each experiment. The produced compounds planting was carried *Curcubita* sp. And 30 days observed their development, with the best growth observed in compounds containing the residue over autoclaved inocula Bas 1 and Pen 1. These results confirm the potential of these fungi produce ligninases and lipases using agricultural wastes as substrates for the production of second generation biofuels and composting.

Keywords: ligninases, lipases, biofuels, biomass and composting.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	15
2 OBJETIVOS	3
2.1 GERAL	3
2.2 ESPECÍFICOS	3
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
3.1 Biotecnologia	4
3.2 Características gerais dos micro-organismos	4
3.2.1 A importância dos micro-organismos	5
3.2.2 Microbiologia aplicada a biotecnologia	5
3.3 Composição e Degradação da Biomassa Lignocelulósica	7
3.3.2 Hemicelulose	8
3.3.3 Lignina	9
3.3.4 Degradação da Lignina	10
3.3.5 Características gerais dos basidiomycetos	11
3.4.1 Ligninases	12
3.5 Alternativas para o aproveitamento da biomassa vegetal.....	13
3.5.1 Produção de biocombustíveis de segunda geração.....	14
3.5.2 Compostagem.....	15
3.5.3 Lipases.....	16
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	18
4.1 Locais de Coletas	18
4.2 Esterilização do material biológico e isolamento dos fungos endofíticos e basidiomycetos	19
4.3 Purificação, conservação e identificação.....	20
4.4 Fermentação Submersa (FSM) de resíduos agrícolas regionais para estimular a produção de ligninases.....	22
4.5 Obtenção do extrato enzimático	23
4.6 Ensaio quantitativo para detecção de ligninases	24
4.6.1 Determinação quantitativa de Lacase EC 1.10.3.2 (Lac)	24
4.6.2 Determinação quantitativa de Lignina Peroxidase EC 1.11.1.14 (LiP)	24
4.6.3 Determinação quantitativa de Manganês Peroxidase EC 1.11.1.13 (MnP)	25
4.6.4 Cálculo da atividade ligninolítica.....	25
4.7 Ensaio por Compostagem	26
4.8 Fermentação Submersa (FSM) utilizando como substrato óleo de oliva (OL), semente de cupuaçu (SCp) e semente de maracujá (SMj) para estimular a produção de lipases	28

4.8.1	Determinação da atividade lipolítica	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Avaliação do crescimento de cinco <i>Penicillium</i> spp. e cinco basidiomycetos nos dez resíduos agrícolas	32
5.2	Atividade de LiP, MnP e Lac nos 10 diferentes substratos in natura.....	35
5.2.1	Bagaço de cana de açúcar (BCn).....	35
5.2.2	Casca de coco (CCc)	36
5.2.3	Casca de cupuaçu (CCp)	38
5.2.4	Casca de guaraná (CGu).....	39
5.2.5	Casca de macaxeira (CMx)	41
5.2.6	Casca de maracujá (CMj).....	42
5.2.7	Casca de urucum (CUr).....	43
5.2.8	Semente de cupuaçu (SCp).....	45
5.2.9	Semente de maracujá (SMj)	46
5. 2.10	Torta de Pau Rosa (TPR)	47
5.3	Atividade ligninolítica de MnP.....	49
5.5	Atividade ligninolítica de Lac.....	55
5.6	Atividade de Lipase em três diferentes substratos	61
5.6. 1	Atividade de lipase por cinco <i>Penicillium</i> endofíticos da Amazônia em SCp, SMj e OL.....	61
5.6. 2	Atividade de lipase por cinco basidiomycetos em SCp, SMj e OL.....	62
5.6. 3	Atividade de lipase por cinco <i>Aspergillus ninger</i> endofíticos em SCp, SMj e OL.....	63
5.7	Fermentação para obtenção de enzimas lignolíticas a partir da biomassa local.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da parede celular vegetal. (Modificada).....	7
Figura 2: Representação esquemática da celulose. Fonte: Arantes 2009.	8
Figura 3: Açúcares que compõem a hemicelulose. Fonte: Arantes 2009.....	9
Figura 4: Precursores básicos na formação da molécula de lignina (Fonte: Guimarães, 2009).....	9
Figura 5: Locais das coletas dos materiais biológicos no Estado do Amazonas.	18
Figura 6: Esquema da assepsia do material biológico.....	19
Figura 7: Isolamento dos basidiomycetos: A – basidiomyceto em ambiente natural; B – isolamento dos micro-organismos em matriz 2x2; C – crescimento fúngico.....	20
Figura 8: Representação esquemática da Técnica de Tween ou diluição seriada. Fonte: Flavia Paiva, 2011 (modificada).	21
Figura 9: Esquema de Purificação pela técnica de repiques sucessivos, aplicada a fungos filamentosos com reprodução sexuada.	21
Figura 10: Esquema de Purificação pela técnica de repiques sucessivos, aplicada a fungos filamentosos com reprodução sexuada.	21
Figura 11: Obtenção do extrato enzimático: A – fungo cultivado em meio líquido, B – crescimento fúngico em substrato regional, C - montagem do sistema de filtração, D – processo de filtração E – obtenção do extrato enzimático.....	23
Figura 12: Esquema de Purificação pela técnica de repiques sucessivos, aplicada a fungos filamentosos com reprodução sexuada.	23
Figura 13: Esquema para a realização da compostagem.	26
Figura 14: Reação de hidrólise do p-nitrofenil palmitato e formação do p-nitrofenol e ácido palmítico.	29
Figura 15: Diversidade de basidiomycetos coletados no estado do Amazonas por SOUZA et.al.	31
Figura 16: Fermentação Submersa: A – Meio GLBN40 contendo resíduo agrícola, B – resíduo agrícola com inóculo do Pen 1.	32
Figura 17: Avaliação da atividade de Lac. em bagaço de cana de açúcar.....	36
Figura 18: Avaliação da atividade de LiP em bagaço de cana de açúcar.....	36
Figura 19: Avaliação da atividade de Lac em casca de coco.	37
Figura 20: Avaliação da atividade de LiP e MnP em casca de coco.....	37
Figura 21: Avaliação da atividade de Lac em casca de cupuaçu.	38
Figura 22: Avaliação da atividade de LiP e MnP em casca de cupuaçu.	39
Figura 23: Avaliação da atividade de Lac em casca de guaraná.	40
Figura 24: Avaliação da atividade de LiP e MnP em casca de guaraná.....	40
Figura 25: Avaliação da atividade de Lac em casca de macaxeira	41
Figura 26: Avaliação da atividade de LiP e MnP em casca de macaxeira.	42
Figura 27: Avaliação da atividade de Lac em casca de urucum.....	44
Figura 28: Produção de lípase em SCp, SMj e ÓL.	65
Figura 47: Bolsas hemérgicas contendo o composto obtido após 90 dias: 1A – CMj <i>in natura</i> com inóculo do Pen 1; 1B – CMj <i>in natura</i> com o inóculo do Bas 1; 1C – CMj <i>in natura</i> ; 2A – CMj autoclavada com o inóculo do Pen 1; 2B – CMj autoclavada com o inóculo do Bas 1.	70
Figura 48: Peso final das CMj após 90 dias de compostagem.	71
Figura 51: Crescimento fúngico em amostras contendo a CMj autoclavada: A – Amostra onde foi realizado o inóculo do Pen 1; B – Amostra onde foi realizado o inóculo do Bas 1.	73

Figura 51: Crescimento de <i>Curcubita</i> sp. com intervalos de 5 dias; A – Crescimento após cinco dias; B – Crescimento após 10 dias; C – Crescimento após 15 dias; D – Medida sendo tirada com 20 dias....	73
Figura 52: Crescimento de <i>Curcubita</i> sp. em compostagem utilizando CMj, após o inóculo do Pen 1.	74
Figura 53: Crescimento de <i>Curcubita</i> sp. em compostagem utilizando CMj, após o inóculo do Bas 1.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de enzimas produzidas comercialmente por micro-organismos.....	6
Tabela 2: Resíduos agrícolas regionais utilizados como substratos.....	22
Tabela 3: Identificação das linhagens selecionadas.....	32
Tabela 4: Avaliação de crescimento dos <i>Penicillium</i> spp. nos dez substratos regionais utilizados em cultivo submerso como fonte de carbono.....	34
Tabela 5: Avaliação de crescimento dos cinco basidiomicetos nos 10 substratos.....	34
Tabela 6: Avaliação do crescimento fúngico e da consistência da CMj durante 90 dias de compostagem.....	69

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Determinação da atividade enzimática.....	25
Equação 2: Determinação da atividade de lipase.....	29

LISTA DE ABREVIACOES

BDA – Batata+Dextrose+Agar
FSM – Fermentação submersa
BCn – Bagaço de cana
CCc – Casca de coco
CCp – Casca de cupuaçu
CGu – Casca de guaraná
CMx – Casca de macaxeira
CMj – Casca de maracujá
SMj – Semente de maracujá
SCp – Semente de cupuaçu
TPR – Torta de pau rosa
OL – Óleo de oliva
Bas 1 – Basidiomiceto 3M 1.1.1
Bas 2 – Basidiomiceto B05 1.1
Bas 3 – B01 controle
Bas 4 – B05 3.1
Bas 5 – B05 1.3
Pen 1 – Stsp C1 – 2/1 – 1a
Pen 2 – Stsp C2 – 3/1 – 2C
Pen 3 – PBR 2.2.2
Pen 4 – Stsp R2 1.1
Pen 5 – Ansp. Cg 1.2
Asp 1 – Ejflor 3 cont.
Asp 2 – 458 Asn
Asp 3 – F40 Asn
Asp 4 – F52 Asp. Ng
Asp 5 – F73Asp. Ng
MnP – Manganês Peroxidase
LiP – Lignina Peroxidase
Lac - Lacase

1 INTRODUÇÃO

A cada ano aumenta a procura por alternativas economicamente viáveis que causem menos impacto ao meio ambiente, devido as diversas vantagens que os processos biotecnológicos apresentam quando comparados aos processos convencionais, despertam não só o interesse das indústrias assim como dos pesquisadores, que intensificam suas atividades na tentativa de atender a demanda.

A floresta Amazônica é considerada uma das maiores reservas de recursos naturais e um dos locais mais ricos em biodiversidade do planeta, dessa maneira possui uma ampla diversidade de micro-organismos que se destacam devido a grande quantidade de processos que são capazes de realizar através da produção de substâncias de interesse, como, as enzimas: lignases, pectinases, xilanases, celulasas, proteases, lipases e outras (BARBOSA, 2001).

Os basidiomycetos denominados fungos de “degradação branca”, chamam a atenção por serem extremamente importantes na degradação da madeira, devido a sua capacidade em produzir enzimas que degradam materiais lignocelulósicos, como a exo-beta-1,4- gluconase, endo-beta-1,4-gluconase e beta-glucosidase (Celulasas) que atuam sobre a porção celulósica; as xilanases, mananases, glucanases e galactanases (Hemicelulasas) que atuam sobre a porção hemicelulósica e as enzimas oxidativas/ligninases como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase (COELHO, 2001).

Durante o processo de degradação ocorre a produção de açúcares fermentescíveis para a produção de biocombustíveis como o etanol de segunda geração, gerado através da bioconversão realizada por enzimas produzidas por fungos, como no caso da manganês peroxidase. Com base nesse potencial enzimático, os fungos possuem um papel importante no balanço de nutrientes e no equilíbrio dos ecossistemas terrestres. Logo, a necessidade de obter enzimas industriais de maneira economicamente viável determina a busca por matérias-primas de baixo custo.

A Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OCED) reconhece a tecnologia das enzimas como importante componente do desenvolvimento industrial

sustentável, o que estimula a utilização dessas tecnologias pelas indústrias químicas e farmacêuticas nas áreas da saúde, energia e meio ambiente (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009).

As lipases despertam o interesse biotecnológico devido as suas inúmeras aplicações, podendo ser utilizadas na formulação de detergentes, indústrias de laticínios, setores têxteis, na produção do biodiesel, áreas farmacêuticas e médicas (JAEGER et al., 1999; HASAN et al., 2009), estas enzimas catalisam reações de hidrólises, esterificação, interesterificação, acidólises, alcoólises e aminólises (HASAN et al., 2009). Os fungos filamentosos são os melhores produtores dessa enzima, pois as lipases por eles produzidas são extracelulares facilitando a extração do meio fermentativo (CONTESINI et al., 2010).

As toneladas de resíduos agrícolas descartadas são caracterizadas pela grande quantidade de biomassa rica em celulose, hemicelulose e lignina, chamando a atenção não só de especialistas, como também do poder público brasileiro, que buscam encontrar maneiras de realizar a transformação desse material, sendo a produção de biocombustíveis e a compostagem duas tecnologias que permitem o aproveitamento desses resíduos. Sendo assim, a preocupação com o meio ambiente aliada a necessidade da produção de energia torna incessante a busca por fontes renováveis, pois, atualmente os responsáveis pela produção de energia são os combustíveis de origem fóssil e seus derivados, que causam impactos ao meio ambiente devido a emissão de gases poluentes.

Considerando a disponibilidade de resíduos agrícolas e a diversidade de micro-organismos ainda pouco estudados, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de fungos do Amazonas quanto a capacidade de produzir ligninases por fermentação submersa utilizando como substratos resíduos agrícolas regionais visando a aplicação futura para a produção de biocombustíveis de segunda geração e compostagem.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Selecionar micro-organismos da microbiota Amazônica produtores de ligninases e lipases.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Selecionar micro-organismos produtores de ligninases e lipases a partir da microbiota amazônica.
2. Realizar ensaios para produção de ligninases e lipases em substratos locais;
3. Realizar ensaio quantitativo de ligninases e lipases em substratos locais;
4. Caracterizar as enzimas lignolíticas produzidas em fermentação submersa.
5. Realizar ensaios com a melhor cepa selecionada para produção de compostagem a partir de um substrato local

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Biotecnologia

As pesquisas voltadas para a biotecnologia exigem um ambiente especial para desenvolver, isso inclui capacitação sistemática de recursos humanos, disponibilidade de financiamento e custo reduzido. Com tantas vantagens os processos biotecnológicos tem maior aceitação em relação aos processos convencionais e como resultado surgem diversos produtos de interesse econômico e social (CUNHA et al., 2005).

3.2 Características gerais dos micro-organismos

No solo há grandes quantidades de micro-organismos, que realizam diversas transformações químicas indispensáveis para a fertilidade do solo, e diferente da maioria dos seres vivos, se adaptam a temperaturas extremas. Alguns fungos podem crescer em temperaturas abaixo do ponto de congelamento assim como em ambientes ácidos, como por exemplo frutas ácidas assim como em altas ou mínimas concentrações de sais, açúcares e outros nutrientes (INGRAHAM, 2010).

Estima-se que há aproximadamente 1,5 milhões de espécies de fungos (HAWKSWORTH, 2001), mas de acordo com MUELLER (2007) apenas 105.000 espécies foram descritas (). Os fungos possuem uma relação próxima com os animais e são considerados um grupo filogeneticamente distinto, são multicelulares e formam uma rede tubos filamentosos, denominadas hifas, compostas por celulose, quitina, ou uma combinação das duas, as quais envolvem a membrana citoplasmática, o conjunto de hifas forma um tipo de tecido especial denominado micélio, o qual é responsável pelas funções vegetativas (MADIGAN, 2010).

Os fungos podem ser caracterizados pela aparência global de seus talos, e dependendo de como suas células ou hifas estão dispostas apresentam-se na forma de leveduras, bolores ou cogumelos. As leveduras são unicelulares, na maioria das vezes ovais, e se reproduzem por

brotamento, os bolores são altamente ramificados e se entrelaçam livremente em hifas que formam um micélio aberto e os cogumelos possuem hifas firmemente entrelaçadas, onde se formam os esporos (INGRAHAM, 2010).

A alimentação dos fungos ocorre quando o micélio segrega enzimas especiais que atuam sobre as substâncias, ocorrendo liquefação, como é o caso dos fungos lignolíticos. Em algumas situações o micélio pode emitir órgãos haustórios que penetram no tecido dos organismos hospedeiros e absorvem o alimento. Dessa forma, a alimentação ocorre por meio da secreção de enzimas extracelulares que digerem componentes orgânicos complexos, como polissacarídeos ou proteínas, açúcares, peptídeos e aminoácidos (MADIGAN, 2010).

3.2.1 A importância dos micro-organismos

Os micro-organismos causam um impacto importante no ambiente transformando enormes quantidades de matéria orgânica, atuando na decomposição, mineralização e reciclagem dos nutrientes (ARON et al. 2005), resultando em um solo com condições físicas, químicas e biológicas adequadas ao desenvolvimento das plantas. A fixação dos nutrientes é prejudicada quando ocorre diminuição da microbiota, resultando no empobrecimento do solo. Porém, quando as condições são apropriadas o solo permite que os nutrientes sejam liberados para as plantas, sem perdas por lixiviação (BRAGA et al. 1999).

Durante a degradação da matéria orgânica sob a ação dos micror-organismos, açúcares são liberados e podem ser utilizados na produção de produtos químicos e combustíveis. A produção do bioetanol a partir de hexoses e pentoses derivadas das matérias residuais agrícolas é uma alternativa sustentável (ARON et al. 2005).

3.2.2 Microbiologia aplicada a biotecnologia

Os micro-organismos apresentam diversas vantagens que despertam o interesse da indústria biotecnológica, por serem produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como as enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteróides (BRAGA et al. 1999) mas apesar das inúmeras aplicações os fungos e as bactérias constituem dois grupos pouco estudados quando comparados ao número de espécies existentes (STROBEL, 2003). Das espécies descritas somente 16% têm sido cultivadas, esses dados revelam a falta de estudos que possam averiguar o potencial químico e biológico dos fungos acerca do seu sistema enzimático (PORTO, 2010).

As enzimas podem ser obtidas de fontes animais e vegetais, porém os micro-organismos são considerados fontes promissoras devido as diversas vantagens que apresentam

como: fácil manipulação; a alta razão superfície/volume, que facilita o rápido consumo de nutrientes para o seu metabolismo e biossíntese; a variedade de reações; a capacidade de adaptação, que facilita o seu transporte da natureza para o meio artificial, onde são capazes de crescer utilizando fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo e ainda assim produzir compostos de interesse; a ampla diversidade de espécies, produzindo diferentes enzimas, que podem catalisar as mesmas reações e o monitoramento durante o cultivo (PORTO, 2010).

As transformações biotecnológicas incluem uma variedade de processos ordenados de acordo com o número de etapas biologicamente realizadas e a complexidade dos substratos: 1) Fermentações – transformam materiais brutos tais como açúcares, metanol, misturas industriais como fontes de carbono com células em crescimento para produtos alvo mais complexos; 2) Fermentação precursora – utiliza-se substratos de partida definidos, os quais são transformados no produto alvo desejado com o uso de células em crescimento; 3) Biotransformações – transformações de precursores definidos em uma série de etapas definidas para o produto alvo desejado com o uso de enzimas ou de células totais; 4) Enzimas purificadas – utilizadas para a produção de produtos químicos (LYND, 2002).

A ação das enzimas é específica o suficiente para mudar um grupo químico em uma molécula e deixar outros inalterados. Por esse motivo, os micro-organismos são utilizados para a realização de etapas difíceis na síntese industrial de determinados compostos. A tabela abaixo apresenta algumas das utilidades das enzimas produzidas pelos micro-organismos quando aplicadas na indústria. (INGRAHAM, 2010).

Tabela 1: Exemplos de enzimas produzidas comercialmente por micro-organismos.

Enzimas	Atividade	Micro-organismo produtor	Utilização
Celulase	Hidrolisa celulose	<i>Trichoderma konigi</i>	Digestão/digerir
Colagenase	Hidrolisa colágeno	<i>Clostridium histolyticum</i>	Promove a cicatrização de feridas/Queimaduras
Diastase	Hidrolisa amido	<i>Aspergillus oryzae</i>	Digestão/digerir
Glicose isomerase	Converte glicose em frutose	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	Converte glicose a partir de amido de milho hidrolisado
Invertase	Hidrolisa sacarose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fabricação de doces
Lipase	Hidrolisa lipídeos	<i>Rhizopus spp.</i>	Digestão/digerir
Pectinase	Hidrolisa pectina	<i>Sclerotinia libertina</i>	Clarifica sucos
Proteases	Hidrolisa proteínas	<i>Bacillus subtilis</i>	Usado em detergentes

* Fonte: MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.M; DUNLAP, P.V; CLARCK, D.P. Microbiologia de Brock. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

3.3 Composição e Degradação da Biomassa Lignocelulósica

Com o aumento da população surge a necessidade do aumento da produção de alimentos, fazendo com que o setor agrícola intensifique suas atividades e como resultado toneladas de resíduos agrícolas passam a ser gerados, aumentando a biomassa existente, que consiste em todo o recurso renovável que pode ser utilizado para a produção de energia e produtos químicos, sendo também considerada a maior fonte de carboidratos, constituindo-se de três frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina (BADHAN et al., 2007).

A madeira é a parte fibrosa das árvores, sendo formada por tecidos lenificados, que se desenvolvem sob a casca. A variação da composição e organização dos componentes da sua estrutura estão relacionadas as suas características morfológicas e mecânicas. A madeira está vulnerável a ação de diversos agentes biológicos, tais como fungos, bactérias e insetos por ser um material orgânico e heterogêneo (SOARES, 1998). A Parede celular vegetal é constituída por polissacárideos como celulose (~ 40%) e hemicelulose (de 20 a 30%) que determinam a tensão nas fibras da madeira, e junto com a lignina (de 20 a 30%) formam uma estrutura rígida e complexa, pois ao penetrar entre as fibrilas, a lignina fortalece e enrijece as paredes celulares, sendo a lignina um dos constituintes da planta de mais difícil degradação (BRAGA et al. 1999).

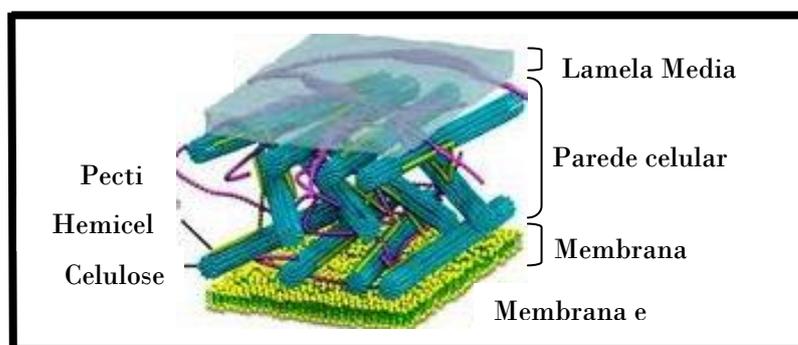


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da parede celular vegetal. (Modificada).

3.3.1 Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$) é um polímero de cadeia longa composto de um só monômero (glicose) (Fig. 2), classificado como polissacarídeo ou carboidrato, sendo o polissacarídeo mais abundante na natureza e um dos principais constituinte da parede celular vegetal responsável pela rigidez, predomina na metade da madeira tanto de coníferas, como de folhosas (ARON et al.2005). É um polissacarídeo não ramificado formado por dissacarídeos

celobiose, as quais estão dispostas em cadeias lineares de resíduos de D-glicose unidos por ligações glicosídicas β 1-4 (ZHANG, LYND, 2004).

Para que ocorra a formação de celulose, as cadeias lineares de polímeros adjacentes interagem entre si por pontes de hidrogênio, fazendo com que as estruturas se organizem e tenham formatos de microtubos compridos denominados de microfibrilas as quais se agrupam formando as fibras de celulose que também se agrupam em regiões cristalinas mais organizadas, onde fibrilas de celulose se encontram unidas por ligações de hidrogênio entre cadeias inter e intra moleculares e por forças de Van der Waals, resultando assim em uma fibra com alto grau de compactação (LYND et al., 2002). A hidrólise completa da celulose exige a combinação da ação de diversas enzimas com diferentes especificidades de substrato (ARON et al. 2005) .

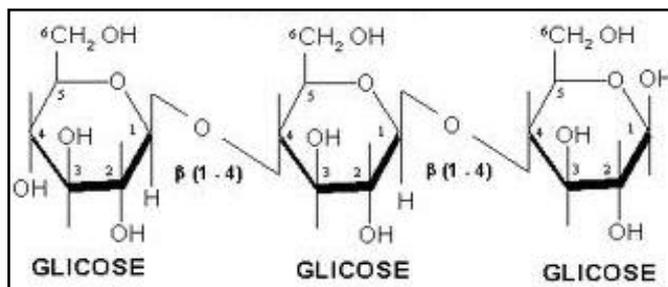


Figura 2: Representação esquemática da celulose.
Fonte: Arantes 2009.

3.3.2 Hemicelulose

A Hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante, sua estrutura é composta pela combinação de vários açúcares: D-xilose, D-manose, D-arabinose, D-galactose, D-glicose e outros (Fig. 3) podendo apresentar compostos como ácidos urônicos e desoxi-hexoses., classificadas de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero como: xilanas, glicanas, arabinanas, mananas e galactanas dentre outras, sendo as xilanas mais abundantes (FENGEL, WEGENER, 1989). A hemicelulose encontra-se intercalada às microfibrilas de celulose produzindo elasticidade e impedindo o contato entre elas e para que ocorra a sua degradação, assim como da celulose é necessário que primeiramente haja a degradação da lignina (ARON et al. 2005).

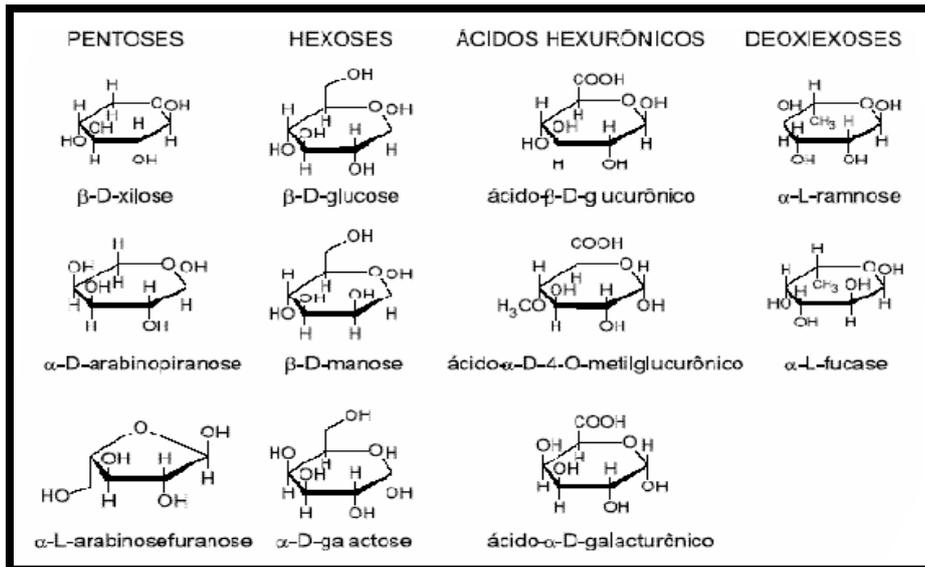


Figura 3: Açúcares que compõem a hemicelulose. Fonte: Arantes 2009.

3.3.3 Lignina

A lignina é um biopolímero aromático amorfo, tridimensional, formado via polimerização oxidativa, a sua decomposição faz parte do processo de ciclagem biogeoquímica da biomassa e é essencial para o equilíbrio dos ecossistemas florestais. Os blocos constituintes são compostos fenólicos, ela pode ser encontrada nas paredes primárias e secundárias das células, como também nos espaços intercelulares. A lignina é um polímero derivado de grupos fenilpropanoides e é formada a partir de três precursores básicos: os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Fig. 4).

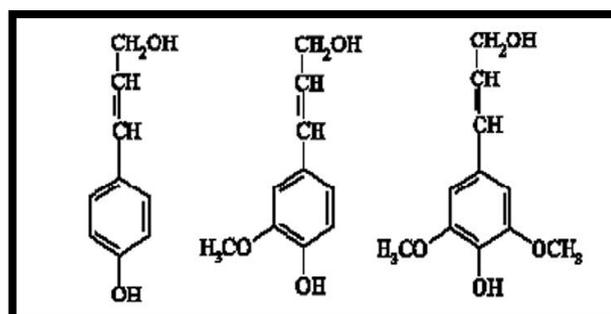


Figura 4: Precursores básicos na formação da molécula de lignina (Fonte: Guimarães, 2009).

A lignina está presente na parede celular em diferentes composições: madeiras duras de 25% a 35%; madeiras macias de 18% a 25% e gramíneas de 10% a 30% (GOLDSTEIN, 1976; BONONI, 1997).

De acordo com ONNERUD (2002) as principais funções biológicas da lignina são:

- Fornecer suporte estrutural à parede secundária de plantas vasculares;
- Tornar a parede celular vegetal hidrofóbica, permitindo o desenvolvimento eficiente dos tecidos para transporte de água em plantas vasculares;
- Conferir resistência contra ação de micro-organismos.

Uma das principais características da madeira é o seu alto teor de material ligninocelulósico e baixo teor de nitrogênio. Embora seja uma desvantagem para o crescimento e a atividade de degradação, há diversos micro-organismos capazes de decompor a madeira em condições externas favoráveis (BRAGA, 2009). Dentre os principais agentes de degradação da lignina estão os fungos da degradação branca que são dotados de um sistema lignolítico constituído de peroxidases, que atribuem aos fungos a capacidade de desestabilizar a estrutura da lignina (BLANCHETTE, 1998).

3.3.4 Degradação da Lignina

Durante a degradação da madeira esta vai perdendo a sua resistência devido a ação dos micro-organismos, as condições ambientais e um conjunto de mecanismos. Nesse processo ocorre uma troca onde o micro-organismo obtém nutrientes a partir dos biopolímeros existentes e libera enzimas extracelulares como as celulases, hemicelulases, pectinases e ligninases. A degradação da lignina ajuda a manter o equilíbrio das cadeias tróficas, assim como possui grande importância econômica, por tornar disponíveis substâncias de interesse para a indústria, pecuária e agricultura (ARON et al. 2005).

A lignina é degradada pelos fungos de degradação branca, marrom e macia que possuem um sistema lignolítico constituído de peroxidases que ao degradar a madeira expõe a celulose e a hemicelulose, disponibilizando-as para outros micro-organismos. Os fungos lignolíticos utilizam a celulose ou a lignina presente como fonte de carbono e energia, uma importante característica dos basidiomycetos (MADIGAN, 2010). Sendo que alguns fungos pertencentes a classe dos actinomycetos possuem a capacidade de realizar o início dessa degradação, porém, em velocidades mais baixas (FASANELLA, 2008).

Os basidiomycetos inicialmente colonizam a parte interna da madeira, as hifas formam uma rede, preenchem o lúmen das células e em alguns casos destroem a lamela média. De acordo com as espécies e as condições ambientais após dias ou anos, os basidiocarpos (corpos de frutificação) aparecem. A grande importância desses micro-organismos deve-se a sua capacidade em degradar os componentes da madeira, tais como, celulose, hemicelulose e lignina, através da secreção de enzimas que convertem polímeros externos em moléculas

menores, que são assimiladas e utilizadas como nutrientes fornecendo energia para o seu crescimento e reprodução (BONONI,1997).

Por fim, a atividade lignolítica resulta de um grupo de enzimas responsáveis pelo processo de oxidação de compostos fenólicos e compostos não fenólicos pertencentes à molécula de lignina ou ligninases, onde encontram-se as lacases e as diversas formas de peroxidases. Quando há combinação entre as enzimas manganês peroxidase e lacase ou lignina peroxidase, ocorre a composição do sistema enzimático mínimo necessário para a degradação da lignina (FASANELLA, 2008). Sendo que deslignificação da madeira pode ser seletiva quando apenas a lignina é removida sem qualquer perda distinta de celulose e não seletiva da madeira, na qual todos os componentes da parede celular são degradados (MOREIRA NETO, 2006).

O processo de degradação dos compostos lignocelulósicos na natureza pode ocorrer de maneira rápida ou lenta, isso irá depender das condições em que estão expostos e da diversidade de fungos existentes no local. Logo, a decomposição completa poderá levar de poucos meses a vários anos, principalmente se esses estiverem em condições secas e frias (LEVY, 1987).

3.3.5 Características gerais dos basidiomycetos

Os basidiomycetos constituem um grupo com mais de 30.000 espécies descritas e são conhecidos popularmente como cogumelos e orelha de pau por formarem corpos de frutificação. Sua fase vegetativa é chamada de micélio, formado por vários filamentos septados chamados hifas. A maioria dos cogumelos podem ser inseridos na alimentação e a sua principal característica que lhes conferem esse nome, são os basídios (MADIGAN, 2010).

Esses fungos são conhecidos como os fungos da podridão da madeira e podem ser classificados de acordo com o padrão de degradação que apresentam podendo ser divididos em grupos de fungos de degradação ou podridão parda, podridão mole e podridão branca. Sendo que na podridão parda a celulose é preferencialmente atacada e a lignina não é metabolizada, os polissacarídeos celulose e hemicelulose são degradados e nota-se uma coloração escura nos locais degradados. Enquanto, na podridão branca os três componentes celulose, hemicelulose e lignina são degradados e nota-se uma coloração clara. Logo, os fungos da podridão branca despertam um maior interesse nos aspectos ecológicos, pois atuam diretamente na decomposição de materiais lenhosos em florestas (MADIGAN, 2010).

3.4 Enzimas

Enzimas são proteínas com atividade catalítica, constituídas por uma parte protéica, podendo estar integradas a outras moléculas, como carboidratos e Lipídeos. Existe uma grande variedade de enzimas, sendo a maioria encontrada em pequenas quantidades, porém, algumas enzimas extracelulares são produzidas em grandes quantidades e são capazes de digerir materiais nutritivos insolúveis, como celulose, proteínas e amido, sendo portanto utilizadas em processos biotecnológicos industriais, contribuindo na redução da poluição do meio ambiente (FORGIARINI, 2006).

As enzimas são constituídas de cadeias peptídicas mais ou menos longas, compostas pela combinação de L-aminoácidos naturais, que apresentam uma estrutura tridimensional característica para cada uma, que lhes permite promover reações específicas dentro de um organismo vivo. A flexibilidade dessas estruturas protéicas permite que as mesmas se adaptem para receber no seu centro ativo moléculas diferentes daquelas existentes dentro do organismo que deu origem à enzima em questão, tornando possível a sua atuação fora do seu “*habitat natural aquoso*” (PORTO, 2010).

As enzimas possuem a capacidade de diminuir a energia de ativação requerida e formar um complexo de transição ativado originando um produto, realizando diversas transformações de maneira seletiva e rápida mediante as condições favoráveis. Diferente das sínteses químicas e devido a sua especificidade, catalisam transformações moleculares sem que ocorram reações paralelas indesejáveis (PIZARRO, 2003). Há dois grupos de enzimas que degradam os materiais lignocelulósicos: as hidrolases e as oxidativas, sendo que as hidrolases atuam como catalisadores no desdobramento de compostos por reação com moléculas de água (LYND et al., 2002).

3.4.1 Ligninases

Os fungos secretam diversas enzimas com importantes funções (BENNET, 1998), dentre estas as ligninases, que atuam principalmente na degradação de compostos recalcitrantes, responsáveis pela degradação da lignina (MOREIRA NETO, 2006). Manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase são as enzimas que formam esse complexo ligninolítico e dependendo da linhagem fúngica são produzidas em diferentes combinações, sendo a presença de atividade de manganês peroxidase e lacase as mais comuns dentre os basidiomycetos (PELAEZ *et al.*, 1995).

A descoberta da lignina peroxidase se deu em 1983, quando foi descrita como uma glicoproteína contendo ferro como grupo protético, necessitando de H₂O₂ para sua atividade

(REYS, 2003). O H_2O_2 primeiramente oxida a enzima e o intermediário oxidado, retira um elétron, de núcleos aromáticos formando radicais aril, que se decompõem espontaneamente via reação de caráter radicalar (CARVALHO, 2005).

A lignina peroxidase é uma glicoproteína que para realizar atividade catalítica requer peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essa enzima é capaz de oxidar a lignina e compostos derivados da mesma resultando na decomposição do substrato (DURÁN, 1997). Como resultado da ação dessa enzima álcoois benzílicos são oxidados, cadeias aromáticas são quebradas, ocorre também desmetilação, rearranjos intramoleculares e quebra de anéis em compostos não fenólicos relacionados à lignina (GOLD et al., 1989). A manganês peroxidase assemelha-se a lignina peroxidase, porém, a ação dessa enzima requer além do H_2O_2 íons Mn^{+2} que é oxidado pela enzima a Mn^{3+} , que por sua vez oxida substratos orgânicos, como fenóis e radicais fenóxi (KUWAHARA et al., 1984).

As lacases são produzidas por fungos e plantas e pertencem ao grupo das oxidases, catalisam a oxidação de uma série de compostos aromáticos e substâncias inorgânicas com redução concomitante do oxigênio da água (DURÁN et al., 1997). É uma enzima despolimerizante de lignina que, por processo oxidativo remove moléculas de fenil-propano mais externos à cadeia, gerando radicais fenoxilos. Esses radicais atuam em reações não catalíticas, como acoplamento radical-radical, desprotonação, desprotonação a ataques nucleofílicos pela água, levando a reações de polimerização, quebras alquílicas e oxidações nos carbonos e desmetilações. Alguns intermediários aromáticos de baixo peso molecular acabam sendo também liberados resultando na despolimerização da lignina (KIRK, 1986).

A Lignina peroxidase tem a capacidade de degradar diversos compostos fenólicos e não fenólicos, como também álcoois benzílicos e demetila, e provoca rearranjos intramoleculares. Avalia-se que o melhor pH para a remoção de fenóis desta enzima seja 4, sendo controlado preferencialmente pelo H_2O_2 (SOARES, 2000). A lacase e a manganês peroxidase não são capazes de oxidar estruturas não fenólicas e metoxiladas enquanto que a lignina peroxidase possui essa capacidade. Este tipo de enzima tem sido relatado em um grande número de fungos, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Phlebia tremellosa*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Junghuhnia seprabilina* e *Phlebia ochraceofulva* (SOARES, 1998).

3.5 Alternativas para o aproveitamento da biomassa vegetal

Procurando agregar economia a conservação do meio ambiente, nos últimos anos vários diversos países organizaram-se estrategicamente para obter novas fontes de energia,

sendo os resíduos lignocelulósicos uma alternativa, por estarem disponíveis em quantidades significativas (BALLESTEROS, 2001) com destaque para as fibras naturais vegetais devido a diversidade de espécies a serem pesquisadas.

No Brasil toneladas fibras são produzidas e podem ser encontradas na natureza, cultivadas como atividade agrícola ou resíduos gerados pela agroindústria, a qual dispõe de inúmeras fontes que nem sempre são aproveitadas de forma adequada. Assim, surgem inúmeros processos para transformá-los em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc. (PANDEY et al., 2000).

3.5.1 Produção de biocombustíveis de segunda geração

Nos últimos anos aumentou a produção mundial de óleos e gorduras, sendo no ano de 2007 produzidas 154 milhões de toneladas, enquanto em 2005 e 2006 a produção foi de 149,6 e 140,7 milhões de toneladas. Estes dados se referem apenas a produção dos 17 principais óleos e gorduras tais como óleo de soja, algodão, amendoim, girassol, colza, gergelim, milho, oliva, palma, palmiste, côco, linhaça e mamona, e óleos e gorduras de fonte animal como manteiga, sebo e peixe (PORTO, 2010).

As pesquisas com lipídeos buscam o desenvolvimento de novas técnicas e processos que possam adequar e melhorar a qualidade da matéria-prima em termos nutricionais, tendo em vista a utilização de óleos e gorduras na alimentação humana. Os triglicerídeos são os componentes mais expressivos de óleos e gorduras, e as propriedades químicas, físicas e nutricionais dependem da composição, estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes. A composição em ácidos graxos direciona o uso particular de um lipídeo para uma determinada aplicação industrial (PORTO, 2010).

A viabilidade de uso de uma matéria-prima depende de sua competitividade, tanto técnica quanto econômica e sócio ambiental, passando inclusive por importantes aspectos agronômicos como: (a) o teor de óleo vegetal e a complexidade exigida no processo de extração; (b) a produtividade por unidade de área; (c) o equilíbrio agronômico; (d) a atenção a diferentes sistemas produtivos; (e) o ciclo de vida da planta (sazonalidade); (f) sua adaptação territorial; e (g) o impacto sócio-ambiental de seu desenvolvimento (PORTO, 2010).

Seja para a produção de biodiesel ou outros produtos de interesse, além das considerações sobre as fontes de matéria-prima, é fundamental a contribuição de pesquisa visando otimização do desempenho do processo, considerando-se ainda a busca por rotas tecnologicamente limpas de produção, como via enzimática empregando lipases.

A modificação de óleos e gorduras abrange um conjunto de processos de interesse em diversos segmentos industriais, incluindo a geração de energia e a obtenção de alimentos e outros produtos de importância social e ambiental. Embora estes processos possam ser conduzidos por via química, há desvantagens associadas ao custo energético, como uso de condições operacionais elevadas de temperatura e pressão. Além disso, catalisadores químicos possuem baixa especificidade, fornecendo os produtos de composição química mista ou contaminada, o que requer etapas posteriores de purificação (PORTO, 2010).

Sendo assim, para substituir os processos químicos, surge a tecnologia enzimática como uma alternativa viável por oferecer as vantagens necessárias para um processo tecnologicamente limpo. Entre os diversos produtos que podem ser obtidos por biotransformação de óleos e gorduras, destaque pode ser dado à produção de biocombustíveis síntese de monoglicerídeos, empregados como emulsificantes, e à reestruturação de triglicerídeos visando a produção de alimentos com propriedades organolépticas e nutricionais desejáveis (PORTO, 2010).

O etanol obtido da celulose, hemicelulose e pectina é chamado de etanol celulósico, sendo que estes fazem parte dos principais constituintes vegetais que não servem para a alimentação humana e considerado insuficiente para a alimentação animal (BRAGA, 2009).

3.5.2 Compostagem

Os resíduos agrícolas na sua grande maioria necessitam sofrer transformações para serem chamados de matéria orgânica sendo capazes de induzir mudanças benéficas no solo sob o ponto de vista agrícola e uma das alternativas para a transformação dos resíduos orgânicos em fertilizantes orgânicos é a utilização do processo de compostagem.

A compostagem é um processo biológico, aeróbio que busca controlar a decomposição de materiais orgânicos, obtendo em menor tempo a humificação, por meio do fornecimento de condições favoráveis (como temperatura, umidade, pH e aeração) à atividade microbiana. A decomposição biológica depende da degradação dos compostos de carbono presentes na amostra (carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos, celulose, lignina etc), assim como seus nutrientes (FORGIARINI, 2006).

Nesse processo podem ser utilizados diferentes tipos de resíduos orgânicos para transformá-los em adubo, melhorando as qualidades físicas, físico-químicas e biológicas do solo. Esse processo ocorre em duas fases: a degradação ativa e a maturação (humificação) do material orgânico onde o composto é produzido e como resposta a compostagem, se obtém um solo rico de longa produção e maior qualidade (MATOS et al., 1998).

De acordo com MATOS et al. (1998) o produto final da compostagem garante ao solo diversas vantagens, ocasionando melhorias em suas propriedades:

- físicas: aumentando a capacidade de retenção de água e a macroporosidade;
- químicas: disponibilizando macro e micronutrientes em grandes quantidades;
- físico-químicas: aumentando a capacidade de troca catiônica;
- biológicas: agindo no controle de fitopatógenos através da proliferação de micro-organismos úteis.

A ação dos micro-organismos e enzimas é indispensável para a realização do processo de compostagem, pois são eles que atuam sobre a matéria orgânica, ocasionando sua fragmentação gradual e oxidação, logo o uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (ALEXANDRINO, 2007). Logo o processo de compostagem utilizando resíduos de diferentes atividades agrícolas, agroindustriais e industriais tem sido uma alternativa para o aproveitamento da biomassa (VITORINO; PEREIRA NETO, 1994)

Os estudos com micro-organismos têm mostrado a eficiência na remoção de substâncias recalcitrantes, destacando-se os basidiomicetos, degradadores da lignina (KAMIDA, 2005). O tratamento biológico tem por base a inoculação de micro-organismos (bactérias e/ou fungos basidiomicetos) que atuam sobre o substrato, degradando preferencialmente a lignina, esses processos apresentam segurança do ponto de vista ambiental, principalmente por não utilizarem substâncias químicas (SCHMIDT; WESCHSLER; NASCIMENTO, 2003).

3.5.3 Lipases

As lipases podem ser obtidas de diversas fontes da natureza como animais, vegetais e microbianas. Entretanto, as lipases produzidas pelos micro-organismos despertam um maior interesse, devido à sua maior estabilidade e diversidade. (BJÖRKLING et al., 1991). As lipases incluem um grupo de enzimas hidrolíticas que na maioria das vezes atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (SHARMA et al., 2001).

Cerca de 200 das 400 enzimas conhecidas são comercializadas, sendo grande parte de origem microbiana, dentre estas as proteases, carboidrases e lipases são as enzimas mais comercializadas. (SHARMA et al., 2001; CONTESINI et al., 2010). Estas enzimas se

destacam no setor industrial e são comumente produzidas por fermentação submersa, sendo uma alternativa adequada principalmente quando se utiliza um resíduo de baixo custo como meio de fermentação (GOMBERT et al, 1999; PALMA et al., 2000).

As lipases podem ser aplicadas nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos (panificação, queijos, chás), têxteis, polpa e papel, curtumes, cosméticos, biodiesel, biossensores e no tratamento de efluentes (JAEGER; REETZ, 1998; HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Uma vantagem que torna as lipases aplicáveis nos processos industriais deve-se ao fato de que estas não precisam de cofatores, pois, atuam em ampla faixa de pH, são estáveis à altas temperaturas; possuem elevada especificidade e propriedades de régio, quimio e enantiosseletividade (VILLENEUVE et al., 2000; HASAN, SHAH, HAMEED, 2006).

Os óleos e as gorduras são os substratos naturais para as lipases, estes contem triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes, enquanto esterases atuam sobre um único tipo de ligação éster, liberando ácidos graxos de baixo peso molecular (BROCKMAN, 1984). A maioria das lipases podem hidrolisar os substratos de esterases (JAEGER,1999

4 PARTE EXPERIMENTAL

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 15 linhagens fúngicas preservadas nas coleções de micro-organismos dos Laboratórios de Genética ESA/UEA e do grupo GEMMA (Grupo de Estudos em Espectrometria de Massas e de Micro-organismos da Amazônia) da UFAM.

4.1 Locais de Coletas

Neste trabalho foram utilizados basidiomycetos e plantas coletados em três cidades do Estado do Amazonas, sendo:

Local 1. Maués – situada as margens do Rio Maués-Açu a 268 km da Cidade de Manaus.

Local 2. Barcelos – situada as margens do Rio Negro a 405 km da cidade de Manaus.

Local 3. Manaus - Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) (Fig. 5).

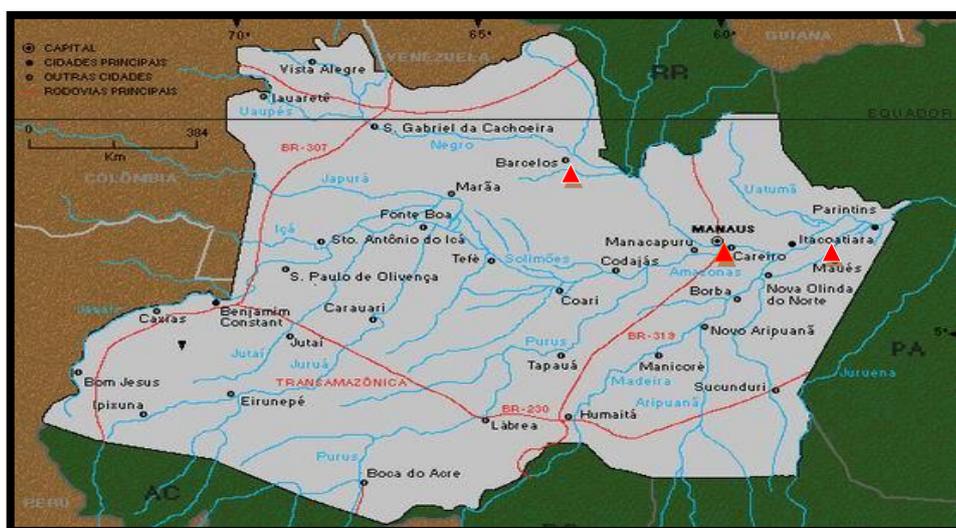


Figura 5: Locais das coletas dos materiais biológicos no Estado do Amazonas.

Os basidiomycetos e fragmentos das plantas coletados foram acondicionados em sacos plásticos esterilizados sob refrigeração e os basidiomas (basidiocarpo) foram mantidos em ambiente de câmara úmida, fechados hermeticamente e conservados sob refrigeração até o momento do isolamento para obtenção das cepas fúngicas puras. Após o isolamento os fungos foram purificados, identificados e conservados.

4.2 Esterilização do material biológico e isolamento dos fungos endofíticos e basidiomycetos

O material biológico coletado foi lavado com detergente líquido e água corrente e em seguida dividido em três amostras: (1) material de isolamento, (2) confecção de excidatas e (3) preservação do material genético.

Para a remoção dos micro-organismos epifíticos, em câmara asséptica, o material biológico foi esterilizado superficialmente com álcool 70 % por 1 minuto, posteriormente o tratamento com hipoclorito de sódio 3-5 %, por 2-5 minutos, novamente a imersão em álcool 70 % por 30 segundos e por fim a lavagem em água destilada estéril para o controle da assepsia (Fig. 6) (SOUZA et al, 2004).



Figura 6: Esquema da assepsia do material biológico.

Após a remoção dos micro-organismos epifíticos as amostras foram cortadas em pequenos fragmentos de 4mm x 4mm (Fig.7), em matrizes de 2x2 e inoculadas em placas de Petri contendo os meios de cultura sólidos: ISP2; Aveia e BDA com antibióticos (tetraciclina+ampicilina 100 µg/mL) para inibição do crescimento de bactérias e actinomycetos ou (cetaconazol+tetraciclina) para a inibição de fungos e bactérias gram negativas, sendo esse procedimento realizado em triplicata para cada meio. Foi feita uma placa controle para cada meio de cultura, nas quais foi inoculada uma alíquota de 50 µL da água destilada utilizada no final do processo de assepsia e espalhada superficialmente com alça de drigalski (SOUZA et al, 2004).

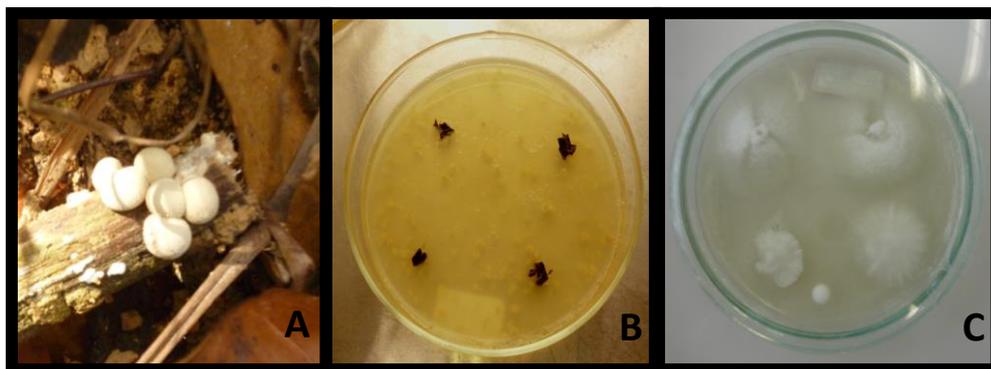


Figura 7: Isolamento dos basidiomycetos: A – basidiomyceto em ambiente natural; B – isolamento dos micro-organismos em matriz 2x2; C – crescimento fúngico.

Posteriormente, as placas contendo os inóculos foram fechadas e incubadas na B.O.D. a 18, 26 e 40° C por 24 dias com intervalos de 8 dias para a troca de temperatura. Após três dias de isolamento foi iniciada a repicagem dos fungos para tubos de ensaio, contendo o meio de cultura utilizado no isolamento e incubados até o momento da purificação. Todo o material foi datado e identificado para uso posterior.

4.3 Purificação, conservação e identificação

Para realizar a purificação dos fungos isolados foram adotadas duas técnicas:

Técnica 1: A Técnica de Tween ou diluição seriada (AZEVEDO, COSTA, 1973) (Fig.8), aplicada na purificação de fungos mitospóricos. Com a alça de platina foram raspados conídios do fungo isolado e inoculados em tubo de ensaio contendo 2 mL da solução de tween 80 a 0,02 %, essa solução foi agitada em vortex e após esse procedimento foi transferido 1 mL para outro tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada estéril, denominada solução estoque, desta foram preparadas cinco diluições seriadas sendo das três últimas diluições retirados 50 µL e inoculados em triplicatas. Após esse procedimento as placas foram incubadas durante 48h, e ao término desse período foi observado o crescimento da colônia originada de um único esporo a qual foi transferida para duas novas placas contendo o meio de cultura apropriado para seu crescimento.

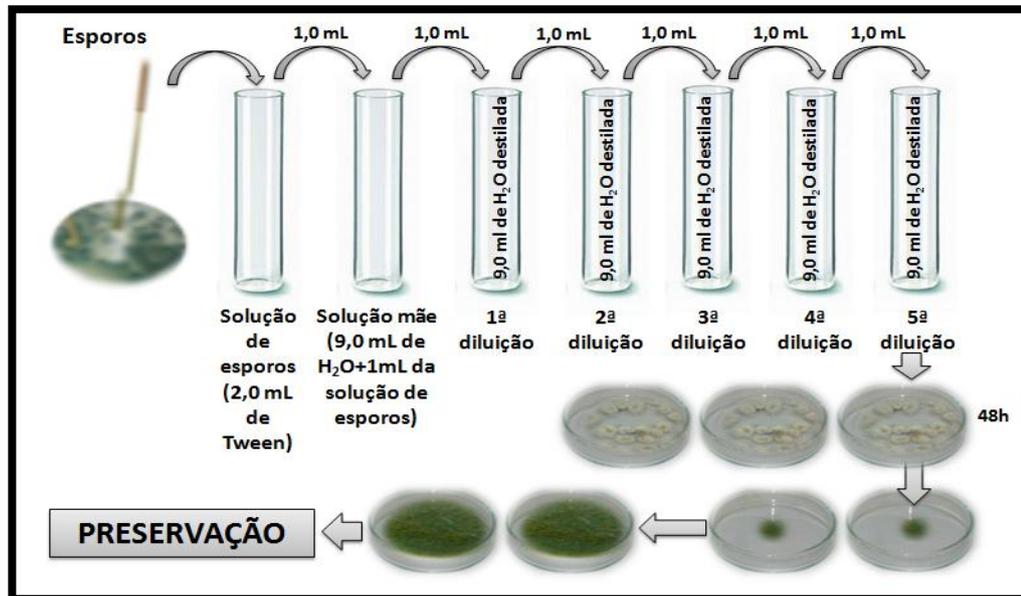


Figura 8: Representação esquemática da Técnica de Tween ou diluição seriada. Fonte: Flavia Paiva, 2011 (modificada).

Técnica 2 – A Técnica de repiques sucessivos é aplicada na purificação de fungos não mitospóricos e basidiomycetos. Foram retirados três fragmentos dos fungos isolados e inoculados em três pontos na placa de petri com o meio de cultura apropriado. Conforme ocorria o crescimento dos fungos, estes eram repicados para outras placas de petri (Fig. 9), sendo o processo realizado até ocorrer a purificação.



Figura 9:Esquema de Purificação pela técnica de repiques sucessivos, aplicada a fungos filamentosos com reprodução sexuada.

Após a purificação, os micro-organismos foram identificados pela análise das estruturas macroscópicas e microscópicas: hifas, micélio, estruturas de reprodução e

comparados com literatura específica à taxonomia de cada grupo (KIFFER & MORELET, 1997).

Por fim todos os isolados foram conservados utilizando quatro técnicas: Água destilada (CASTELLANI, 1939); óleo mineral; água com glicerol a 20% e palito de dente. Foi feito um inóculo no centro da placa e nas duas laterais do inóculo foram colocados dois palitos de dente dispostos paralelamente. Após cinco dias foi observado o crescimento fúngico no entorno do palito, com o bisturi foi feita a remoção do palito contendo o fungo armazenado em tubo de ensaio, o qual foi depositado em um tubo falcon de 15 mL e conservado sob refrigeração. Este tipo de conservação visa manter a atividade enzimática do fungo (comunicação pessoal Lopez, J.M. – curso Brasil-Espanha, realizado em Manaus/Am, 2009).

4.4 Fermentação Submersa (FSM) de resíduos agrícolas regionais para estimular a produção de ligninases

Para a produção das ligninases, foram selecionadas aleatoriamente 10 linhagens fúngicas, sendo cinco do gênero *Penicillium* e cinco basidiomycetos em FSM, estas foram cultivadas no meio GLBN 40, um meio de cultivo basal para inóculo contendo a solução de elementos traços com a adição dos indutores 40 mg de Mn (II), Tween 80 (0,5 g/L) e Álcool veratrílico (0,42 g/L), utilizando como substratos 10 resíduos agrícolas regionais (tabela 2).

Tabela 2: Resíduos agrícolas regionais utilizados como substratos.

Nº	Resíduos Agrícolas	Est.	Origem	Cód.
1	Bagaço de Cana	<i>In natura</i>	Comercial	BCn
4	Casca da Macaxeira	<i>In natura</i>	Comercial	CMx
5	Casca de Coco	<i>In natura</i>	Comercial	CCc
6	Casca de Cupuaçú	<i>In natura</i>	Comercial	CCp
7	Casca de Guaraná	<i>In natura</i>	Município de Maués	CGu
8	Casca de Maracujá	<i>In natura</i>	Comercial	CMj
9	Casca de Urucum	<i>In natura</i>	Campus da UFAM	CUr
2	Semente de Cupuaçú	<i>In natura</i>	Comercial	SCp
3	Semente de Maracujá	<i>In natura</i>	Comercial	SMr
10	Torta de Pau Rosa	<i>In natura</i>	Município de Maués	TPR

Para a fermentação foram utilizados erlens de 50 mL sendo adicionado em cada erlen 30 mL de meio GLBN 40 mais 1 % do resíduo agroindustrial sólido *in natura*. Os erlens foram autoclavados durante 15 minutos a 1 atm e 120 °C. O inóculo dos *Penicillium* spp., ocorreram com a adição de 30 µl de suspensão de conídios na concentração 10^7 esporos/mL. Enquanto os inóculos dos basidiomycetos foram realizados através do corte de três fragmentos de 5 mm de diâmetro. Após a inoculação os fungos foram mantidos em incubadora shaker (Fig. 10) durante 10 dias (240h) a 120 rpm com temperatura adequada para cada grupo, sendo 26 °C os basidiomycetos e 28 °C para *Penicillium* spp.



Figura 10: Incubação sob agitação, a 28 °C, por 10 dias.

4.5 Obtenção do extrato enzimático

Após 10 dias de cultivo em FSM o material foi retirado da incubadora shaker e por meio de filtração a vácuo foi obtido extrato enzimático (Fig. 11). O líquido filtrado foi depositado em tubos falcon de 15 mL autoclavados, em seguida transferidos para eppendorfs de 2 mL limpos e centrifugados a 9000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, com uma pipeta automática o líquido foi transferido para eppendorfs de 2 mL limpos e armazenados a 4 °C até o momento da leitura em espectrofotômetro.

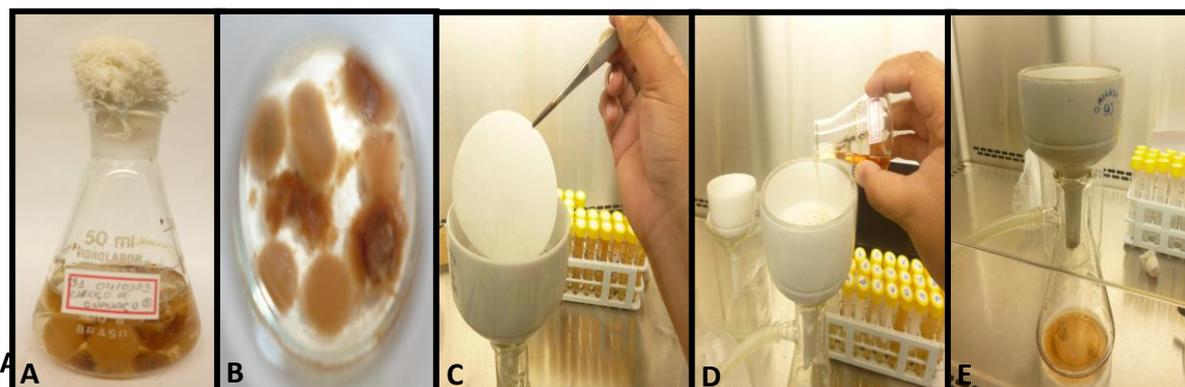


Figura 11: Obtenção do extrato enzimático: A – fungo cultivado em meio líquido, B – crescimento fúngico em substrato regional, C - montagem do sistema de filtração, D – processo de filtração E – obtenção do extrato enzimático.

4.6 Ensaios quantitativos para detecção de ligninases

As análises quantitativas de ligninases foram feitas por espectrofotometria de luz ultravioleta, sendo determinada a atividade enzimática das enzimas LiP, MnP e Lac.

4.6.1 Determinação quantitativa de Lacase EC 1.10.3.2 (Lac)

Para a determinação da atividade de Lac foi utilizado como substrato o ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)], de acordo com BOURBONNAIS et al. (1998). A reação foi feita diretamente na cubeta de vidro, onde foram adicionados: 300 µL de tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,0; 100 µL de água Milli-Q; 500 µL do extrato enzimático e 100 µL de ABTS 1 mM. A oxidação do substrato foi monitorada durante 10 minutos a 420 nm com leitura a cada um minuto (coeficiente de extinção molar do produto formado a 420 nm utilizado foi $36.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Para o controle foi feito um branco onde no lugar da amostra foi adicionado o tampão e as amostras que apresentavam coloração, foi adicionado o extrato enzimático fervido por 10 minutos. Foram mensuradas a absorvância inicial (Abs_i) e a absorvância final (Abs_f), onde a Abs_i foi determinada no momento em que se adicionou a solução de ABTS e a Abs_f ao término dos 10 minutos. Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar 1 µmol de ABTS oxidado por minuto.

4.6.2 Determinação quantitativa de Lignina Peroxidase EC 1.11.1.14 (LiP)

A atividade de LiP foi determinada de acordo com KIRK et al. (1986). Em uma cubeta de quartzo foram adicionados: 400 µL do tampão tartarato de sódio 100 mM pH 3,0; 500 µL do extrato enzimático; 50 µL de álcool veratrílico 10 mM e 50 µL de H_2O_2 (solução contendo 50 µL de H_2O_2 para 50 mL de água Milli-Q, recém-preparada). Sendo a reação enzimática iniciada quando adicionado H_2O_2 . A absorvância foi monitorada por 10 minutos a 310 nm, com leitura a cada um minuto. Para o controle foi feito um branco (referência) onde foi adicionado o extrato enzimático fervido por 10 minutos.

Foram mensuradas a absorvância inicial (Abs_i) e a absorvância final (Abs_f), onde a Abs_i foi determinada quando adicionada a solução de H_2O_2 e a Abs_f foi verificada após os 10 minutos. A atividade de LiP foi definida como a quantidade de LiP capaz de oxidar 1 µmol de álcool veratrílico por minuto (o coeficiente de absorvidade molar do produto formado a 310 nm utilizado foi $9.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.6.3 Determinação quantitativa de Manganês Peroxidase EC 1.11.1.13 (MnP).

A atividade de MnP foi determinada através da oxidação do vermelho de fenol. A reação foi realizada em tubos de ensaio contendo 1,5 mL de tampão fosfato-citrato 50 mM e pH 4,5, 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,5 mL de MnSO₄ 1,0 mM, 0,5 mL de vermelho de fenol 0,1%, 0,25 mL de albumina bovina 1,8%, 0,25 mL de H₂O₂ 2,0 mM e 0,5 mL de extrato enzimático. Após 5 minutos, 1,0 mL desta mistura reacional foi adicionada em outro tubo de ensaio contendo 65 µL de NaOH 6,5 M e a absorbância medida a 610 nm (o coeficiente de extinção molar do produto formado a 610 nm utilizado foi 22.000 M⁻¹.cm⁻¹).

Foram mensuradas a absorbância inicial (Abs_i) e a absorbância final (Abs_f), onde a Abs_i foi determinada quando adicionada a solução de vermelho de fenol e a Abs_f foi monitorada durante 10 minutos. Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 µmol de vermelho de fenol oxidado por minuto (KHINDARIA; GROVER; AUST, 1994).

4.6.4 Cálculo da atividade ligninolítica

Para determinar a atividade enzimática das ligninases foi utilizado o cálculo descrito pela fórmula a seguir (AGUIAR; FILHO, 2008; FERREIRA, 2009; MENEZES et al. 2010).

Equação 1: Determinação da atividade enzimática.

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

Onde: $\Delta Abs = Abs_f - Abs_i$;

ϵ = coeficiente de extinção molar do produto formado (M⁻¹.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 µL para L.

UI/L = Unidade internacional, onde internacional significa µmol.min⁻¹

4.7 Ensaio por Compostagem

Visando a produção de adubo orgânico economicamente viável a partir da biomassa local foram selecionadas duas cepas: Bas 1 e Pen 1 e cultivadas em um resíduo agrícola regional: cascas de maracujá que serviram como fontes de carbono.

A biomassa foi adquirida de forma comercial em um total de 90 kg de maracujás. Estes foram lavados com água corrente e detergente líquido, em seguida retirada toda a polpa e sementes. Após o despulpamento foram obtidos 30 kg de cascas, estas foram separadas, trituradas, pesadas e armazenadas em bolsas herméticas, sendo um 1kg por bolsa, totalizando 30 bolsas herméticas. Em seguida foram divididos em dois grupos e três subgrupos (Fig. 12) Sendo que cada grupo correspondia a um tratamento, onde: Grupo 1 = resíduo *in natura* e Grupo 2 = resíduo autoclavado.

Onde:

- 1A – Resíduo casca de maracujá *in natura* + 1 mL de suspensão de esporos de *Penicillium* sp.
- 1B – Resíduo de casca de maracujá *in natura* + inóculo do basidiomyceto.
- 1C – Resíduo de casca de maracujá *in natura*.
- 2A - Resíduo de casca de maracujá autoclavada + 1mL de suspensão de esporos de *Penicillium* sp.
- 2B – Resíduo de casca de maracujá autoclavada + inóculo do basidiomyceto.
- 2C – Resíduo de casca de maracujá autoclavada.

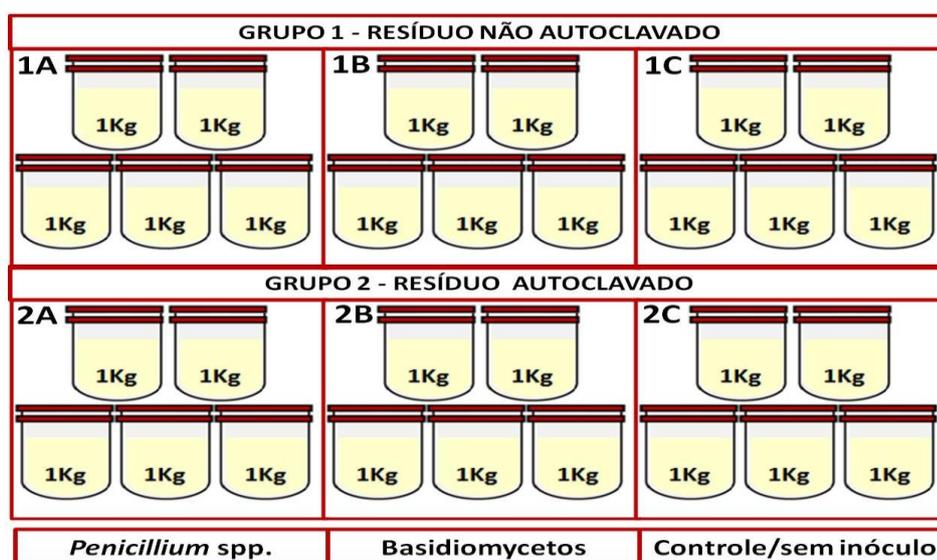


Figura 12: Esquema para a realização da compostagem.

O processo de inoculação do *Penicillium* sp., consistiu na adição de 1 mL de suspensão de conídios na concentração 10^7 esporos/mL em cada bolsa hermética. Para os basidiomycetos foi adota a técnica palitos de dente sendo estes inseridos nas bolsas herméticas que continham o resíduo sendo seis palitos para cada 1 kg (Fig. 13).

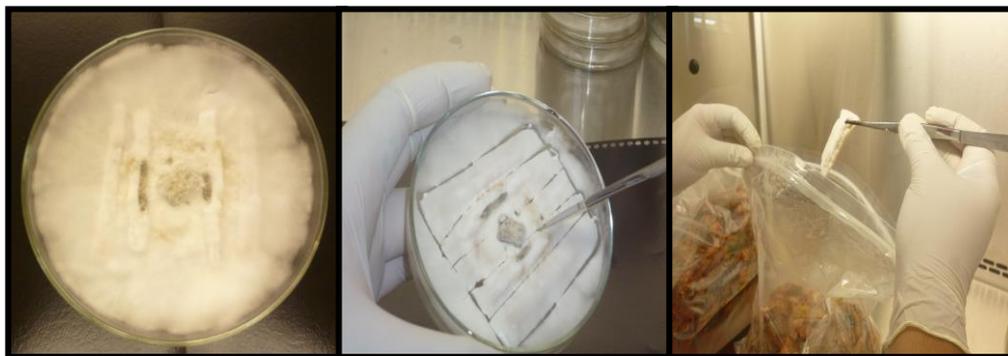


Figura 13: Realização do inóculo do Bas 1 através da técnica palito de dente.

Para o armazenamento desse material foi construído um estribo com uma altura de 1,20 m do solo. Todo o resíduo foi mantido em ambiente natural e exposto a mudanças de temperatura, porém em intervalos de cinco dias eram realizados dois procedimentos:

Procedimento 1 - o material era molhado por aproximadamente 10 a 15 min. para que a temperatura dentro das bolsas herméticas não ficasse tão elevada nos dias de calor intenso.

Procedimento 2 – eram realizadas observações quanto a consistência dos resíduos, com o propósito de analisar a ação dos fungos inoculados.

Após 90 dias foram selecionadas duas amostras de cada experimento e em câmara de fluxo laminar, com uma espátula metálica esterilizada foram retiradas 1 g do resíduo depositadas em tubos falcon de 15 mL, contendo 9 mL de água destilada estéril. Posteriormente agitados em vortex e por fim plaqueados em meio BDA com e sem antibiótico.

As placas foram incubadas durante 15 dias, com o objetivo de verificar os micro-organismos que estiveram presentes durante a degradação dos resíduos. Em seguida todo o material foi autoclavado, sendo as amostras mantidas de acordo com o grupo a que pertenciam, posteriormente pesados 105 g de cada composto e 105 g de solo, misturados e colocados em vasos nos quais foram plantadas três sementes de *Cucubita* spp. por vaso e observado o crescimento durante 30 dias.

4.8 Fermentação Submersa (FSM) utilizando como substrato óleo de oliva (OL), semente de cupuaçu (SCp) e semente de maracujá (SMj) para estimular a produção de lipases

Para a produção das lipases, foi adotada a metodologia descrita por COLEN (2006) com modificações. Primeiramente, foram selecionadas aleatoriamente 15 linhagens de fungos sendo cinco *Penicillium* spp, cinco basidiomycetos e cinco *Aspergillus* spp., estes foram inoculados em meio líquido contendo extrato de levedura (0,5 g.L⁻¹), ágar micológico (25 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (5 g.L⁻¹), (NH₂)₂CO (2,0 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (1,0 g.L⁻¹), NaCl (1,0 g.L⁻¹) e como substrato OL (10 mL.L⁻¹), SCp e SMj.

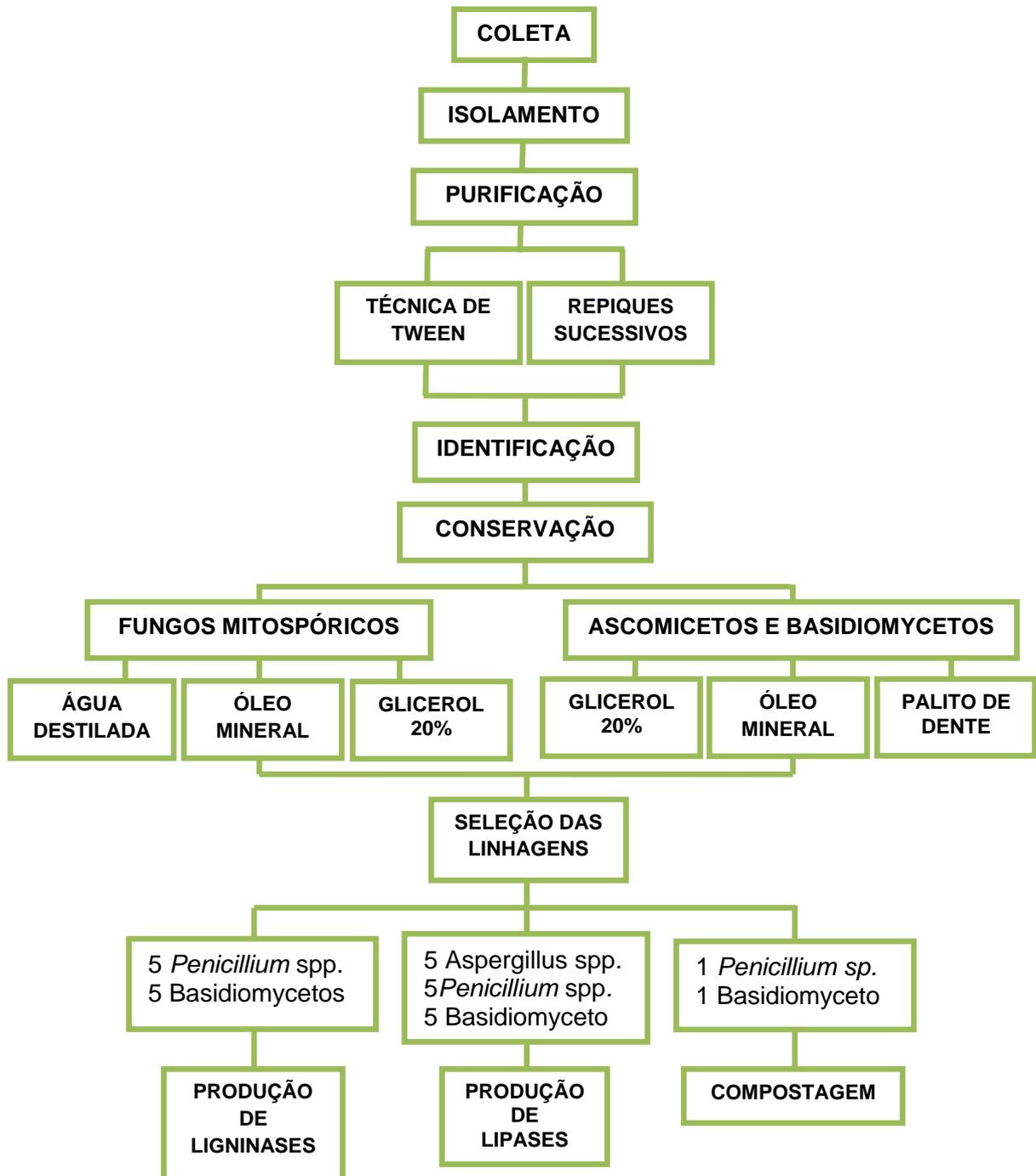
Para a fermentação foram utilizados erlens de 50 mL contendo 30 mL do meio de cultura líquido mais 1% de sementes ou óleo de oliva. Os erlens foram autoclavados durante 15 minutos a 1 atm e 121 °C. Os inóculos dos *Penicillium* spp., ocorreram com a adição de 30 µl de suspensão de conídios na concentração 10⁷ esporos/mL e dos basidiomycetos através do corte de três fragmentos de 5mm de diâmetro. Após a inoculação os fungos foram mantidos em incubadora shaker durante 10 dias (240h) a 120 rpm com temperatura adequada para cada grupo, sendo 26 °C para os basidiomycetos e 28 °C para *Penicillium* spp. e para a obtenção do extrato enzimático foi adotada a metodologia descrita no item 4.5.

4.8.1 Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi quantificada com algumas modificações de acordo com o método de WINKLER and STUCKMANN (1979), no qual a atividade lipolítica é medida através da estimativa do *p*-nitrofenol que é liberado através da ação da lipase na hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato (Fig. 15).

Para avaliar a atividade lipolítica foi preparada uma mistura (solução A) composta por uma alíquota de 2,2 mL de tampão fosfato 0,05 M (pH 8,0) contendo goma arábica (0,11 %) e deoxicolato de sódio (0,23%) e 0,2 mL de extrato protéico, sendo esta previamente incubada por 5 minutos a 37 °C. Em seguida foi preparada uma solução de *p*-nitrofenilpalmitato (*p*NPP) com concentração de 3 mg/mL dissolvida em isopropanol (Solução B). Para dar início a reação foi adicionado à Solução A 0,1 mL da solução B, sendo a temperatura para a reação enzimática de 37 °C durante 10 minutos. Como controle fez-se um branco, e no lugar da solução B, foi adicionado 0,1 mL de isopropanol.

Todas as etapas descritas anteriormente podem ser observadas no fluxograma abaixo.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a coleta foram realizados os procedimentos descritos nos itens: 4.2 e 4.3 sendo possível obter os fungos isolados utilizados neste trabalho.



Figura 14: Diversidade de basidiomycetos coletados no estado do Amazonas por SOUZA et.al.

Os basidiomycetos causadores da podridão branca são considerados os melhores micro-organismos com capacidade em degradar a lignina, celulose e hemicelulose em moléculas menores até CO₂ e água. (MATHEUS & OKINO, 1998), uma vez que utilizam materiais lignocelulósicos como substrato para a obtenção de carbono e nitrogênio. Outro grupo que também se destaca, pois estando em condições naturais ou *in vitro* são fontes de enzimas refere-se ao grupo dos *Penicillium* (OLIVEIRA et al., 2006).

Dessa forma, dos micro-organismos isolados foram selecionados cinco basidiomycetos, cinco *Penicillium* spp. e cinco *Aspergillus* do grupo ninger (tabela 3).

Tabela 3: Identificação das linhagens selecionadas.

Nº	Identificação	Código
1	Bas 1	Bas 3M 1.1.1
2	Bas 2	B05 1.1
3	Bas 3	B01 controle
4	Bas 4	B05.3.1
5	Bas 5	B03 1.3
6	Pen 1	Stsp C1-2/1-1 ^a
7	Pen 2	Stsp C2-3/1-2C
8	Pen 3	Pb R2 2.2
9	Pen 4	Stsp R2 1.1
10	Pen 5	Ansp cGg3
11	Asp 1	EJ flor 3 cont.
12	Asp 2	458 Asn
13	Asp 3	F40 Asn
14	Asp 4	F52 Asp. Ng
15	Asp 5	F73 Asp. Ng

5.1 Avaliação do crescimento de cinco *Penicillium* spp. e cinco basidiomycetos nos dez resíduos agrícolas

Nas condições de ensaio descritas no item 4.4, os basidiomycetos e *Penicillium* spp., foram inoculados em meio de cultura líquido (GLBN 40) contendo o resíduo agrícola regional (Fig.16), durante o período de incubação ao completarem 72, 168 e 240 h foram realizadas as observações referentes aos níveis de crescimento.



Figura 15: Fermentação Submersa: A – Meio GLBN40 contendo resíduo agrícola, B – resíduo agrícola com inóculo do Pen 1.

Decorridas 240 h o Pen 1 obteve um alto crescimento em oito substratos sendo o melhor em sete: CCp, CMx, CMj, CUr, SCp, SMj e TPR, seguido do Pen 2 que apresentou alto crescimento em seis substratos, sendo o melhor em BCn e CGu, havendo crescimento muito semelhante entre Pen 1 e Pen 2 nos substratos BCn, CCp, CMx, CMj. O Pen 3 e o Pen 4 apresentaram baixos crescimentos em cinco substratos, CCp, CGu e CMj, diferenciando apenas em CCc e SMj para o Pen 3 e SCp e TPR para o Pen 4, o qual para CCp o crescimento só pôde ser visualizado com 240 h. O Pen 5 apresentou crescimento bastante semelhante ao Pen 1 nos substratos SMj e TPR, e obteve o melhor crescimento no substrato CCc.

Dos 10 substratos avaliados como fontes de nutrientes para os cinco *Penicillium* spp. foi observado um alto crescimento de todos os indivíduos na CMx, o mesmo ocorreu no substrato SMj, com exceção apenas do Pen 3. Porém, todos os indivíduos apresentaram um crescimento baixo para CCc, não havendo crescimento nas primeiras 72 h para Pen 1 e Pen 5 (tabela 4).

No que se refere ao crescimento dos basidiomycetos (tabela 5), observou-se que assim como os *Penicillium* spp. todos os indivíduos cresceram em todos os substratos. O Bas 1 obteve um alto crescimento em sete substratos sendo o melhor para: CCp, CGu, CMj, CUr e SCp, obtendo baixo crescimento somente para CCc. O Bas 2 apresentou um alto crescimento para quatro substratos e foi o melhor para: CCc e BCn. O Bas 3 obteve um alto crescimento em três substratos, sendo o melhor para SMj, sendo visualizado com 72 h. O Bas 4 apresentou baixo crescimento em 50% dos substratos, e um alto crescimento em BCn e SCp. Enquanto, o Bas 5 obteve alto crescimento para CCp e CMx, sendo o melhor em TPR.

Ao analisar as tabelas 4 e 5 é possível observar que os *Penicillium* spp. obtiveram o melhor crescimento no substrato CMx, e os basidiomycetos no BCn. Enquanto o menor crescimento para os *Penicillium* spp. foi obtido no substrato CCc e para os basidiomycetos no substrato TPR. O período de 240 h de cultivo foi considerado apropriado para este processo, uma vez que ocorreu o crescimento das 10 linhagens fúngicas no meio de cultura (GLBN 40) contendo os 10 diferentes substratos e não houve contaminação por outros micro-organismos.

Tabela 4: Avaliação de crescimento dos *Penicillium* spp. nos dez substratos regionais utilizados em cultivo submerso como fonte de carbono.

Substratos <i>in natura</i>	Linhagens/Crescimento																	
	Pen 1			Pen 2			Pen 3			Pen 4			Pen 5			Controle		
	72h	168h	240h	72h	168h	240h	72h	168h	240h	72h	168h	240h	72h	168h	240h	72h	168h	240h
BCn	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+	+	++	++	++	++	-	-	-
CCc	-	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	++	-	++	++	-	-	-
CCp	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
CGu	++	++	++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	++	++	++	-	-	-
CMx	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
CMj	++	++	+++	++	++	+++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
CUr	+	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	+	++	++	-	-	-
SCp	+	+++	+++	+	++	++	+	++	++	+	+	+	++	++	++	-	-	-
SMj	+++	+++	+++	+	++	+++	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
TPR	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	+++	-	-	-

Níveis de crescimento: - (não apresentou crescimento); + (baixo crescimento); ++ (médio crescimento); +++ (alto crescimento).

Tabela 5: Avaliação de crescimento dos cinco basidiomicetos nos 10 substratos.

Substratos <i>in natura</i>	Linhagens/Crescimento																	
	Bas 1			Bas 2			Bas 3			Bas 4			Bas 5			Controle		
	72h	168h	240h	72h	168h	240h	72h	168h	240h	72h	168h	240h	72h	168h	240h	72h	168h	240h
BCn	++	+++	+++	++	+++	+++	+	++	+++	+	+++	+++	++	++	++	-	-	-
CCc	+	+	+	++	++	++	+	+	++	+	+	+	++	++	++	-	-	-
CCp	++	+++	+++	+	+	+	+	++	+++	+	++	++	++	+++	+++	-	-	-
CGu	+	+++	+++	+	++	++	-	+	++	-	-	+	-	+	++	-	-	-
CMx	+	+	+++	-	+	+++	+	++	++	-	-	+	-	++	+++	-	-	-
CMj	+	+++	+++	-	+	+++	-	+	++	-	-	++	+	++	++	-	-	-
CUr	+	++	+++	+	+	+++	+	++	++	+	++	++	++	++	++	-	-	-
SCp	++	+++	+++	+	++	++	+	+	+	+	++	+++	++	++	++	-	-	-
SMj	-	+	++	-	-	+	++	+++	+++	-	+	+	-	++	++	-	-	-
TPR	+	+	++	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	-	-	-

Níveis de crescimento: - (não apresentou crescimento); + (baixo crescimento); ++ (médio crescimento); +++ (alto crescimento).

5.2 Atividade de LiP, MnP e Lac nos 10 diferentes substratos in natura

O extrato enzimático foi utilizado para determinar a presença das ligninases através de análises por espectrofotometria de UV de acordo com os procedimentos descritos nos itens 4.6.1, 4.6.2, 4.6.3 e 4.6.4.

5.2.1 Bagaço de cana de açúcar (BCn)

O bagaço da cana de açúcar é um material ligninocelulósico cujo sua composição média é de 50 % de umidade, 2 % de Brix (sólidos solúveis em água) 46 % de fibra (32 – 50 % de celulose, 19 – 25 % de hemicelulose e 23-32 % de lignina) e 2 % de cinzas (HAMELINK et al., 2005; PANDEY et al., 2000). Ao utilizar o BCn como substrato observou-se a produção das ligninases por nove das dez linhagens utilizadas, com exceção apenas do Pen 1, que não registrou atividade para Lac. (Fig. 17), sendo a maior produção obtida pelo Bas 3 com atividade igual a 64,07 UI/L, seguido do Pen 3 com 62,47 UI/L, embora as demais linhagens de *Penicillium* spp. tenham apresentado dados superiores aos basidiomycetos, para estes houve registro de atividade em todas as linhagens.

Conforme pode ser observado na figura 18, a atividade de MnP foi a melhor expressa, destacando-se os *Penicillium* spp., com os maiores valores de atividade obtidos por Pen 1 com 1562,42 UI/L, seguido de Pen 2 com 1456,16 UI/L, sendo o Bas 3 o melhor produtor para o grupo dos basidiomycetos com atividade igual a 411,21 UI/L. A atividade de LiP, teve maiores resultados que Lac., e menores do que MnP, e assim como para as demais enzimas, os melhores produtores foram os *Penicillium* spp., as maiores atividades destacando-se o Pen 2 com 344,56 UI/L, seguido de Pen 1 com 337,63 UI/L, enquanto as maiores atividades para os basidiomycetos foram obtidas pelo Bas 2 com 270,01 UI/L e Bas 1 com 247,79 UI/L.

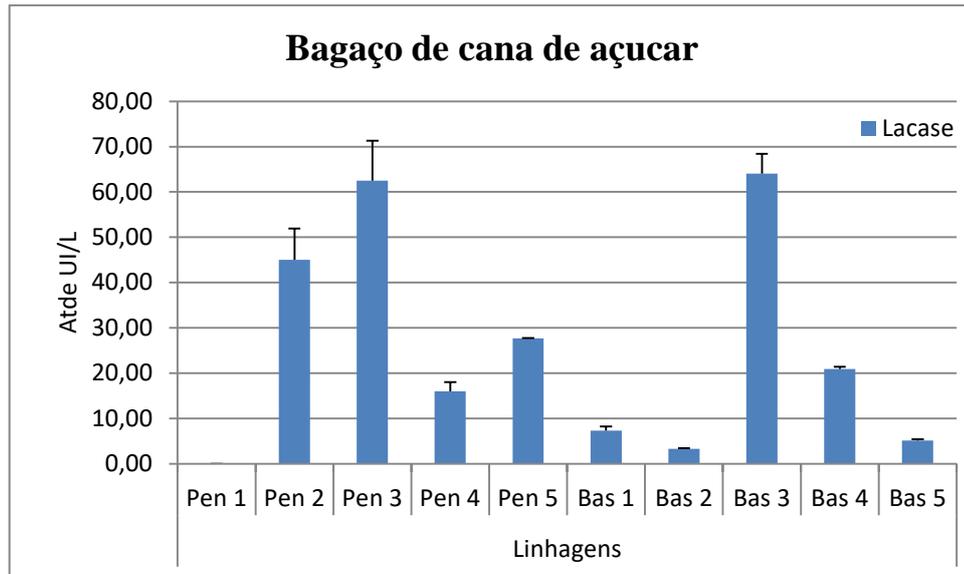


Figura 16: Avaliação da atividade de Lac. em bagaço de cana de açúcar.

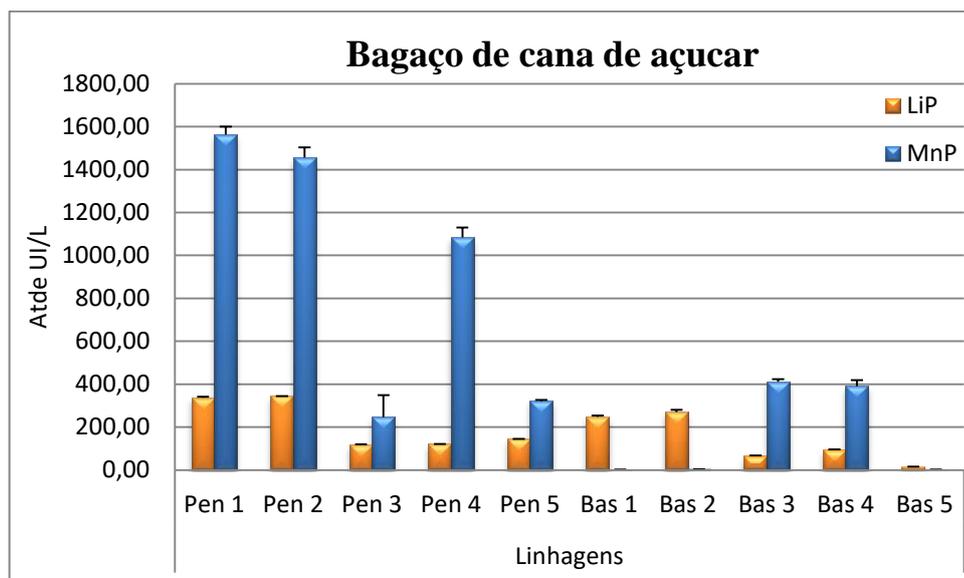


Figura 17: Avaliação da atividade de LiP em bagaço de cana de açúcar.

5.2.2 Casca de coco (CCc)

Ao utilizar a CCc como substrato, verificou-se que das dez linhagens utilizadas, nove produziram MnP, LiP e Lac, com exceção apenas do Bas 2 que não produziu MnP, porém, foi o melhor produtor de Lac com 42,04 UI/L (Fig. 19), que embora tenha sido a enzima menos expressa, todas as linhagens de basidiomycetos foram capazes de produzi-la, assim como no substrato BCn. A maior produção enzimática foi registrada para MnP, com o melhor resultado

obtido por Pen 1 com 1.828,69 UI/L, seguido de Pen 2, 3 e 4 que apresentaram resultados aproximados

A LiP foi a segunda enzima a obter a melhor produção, sendo o melhor produtor o Pen 4 com 206,93UI/L, seguido de Pen 2 e Pen 3 que apresentaram resultados próximos. Observou-se de acordo com a figura 20, que os *Penicillium* spp. foram os melhores produtores para MnP e LiP nesse substrato, mas assim como no substrato BCn os basidiomycetos foram os melhores produtores de Lac., sendo a menor atividade registrada para esta enzima igual a 1,85 UI/L obtida pelo Pen 4.

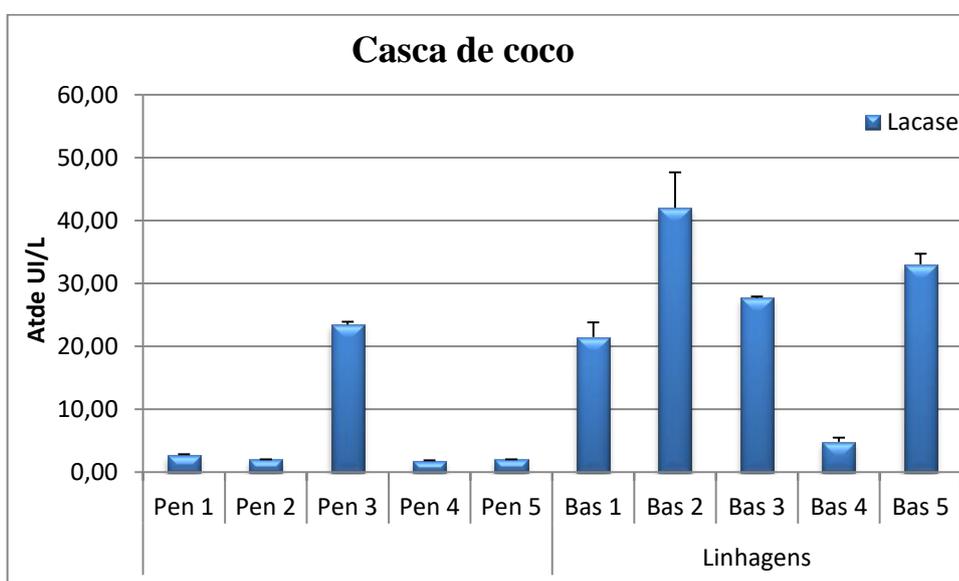


Figura 18: Avaliação da atividade de Lac em casca de coco.

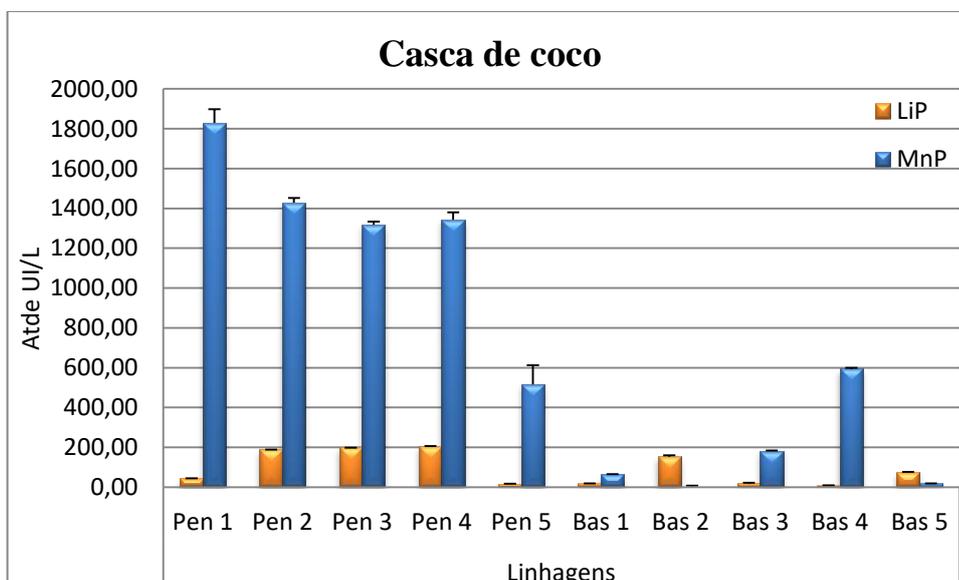


Figura 19: Avaliação da atividade de LiP e MnP em casca de coco.

5.2.3 Casca de cupuaçu (CCp)

A figura 21 apresenta a produção de Lac utilizando a CCp como substrato, observou-se que apenas seis linhagens foram capazes de produzir esta enzima, sendo cinco basidiomycetos e apenas o Pen 2 com 3,70 UI/L, valor inferior quando comparado aos obtidos pelas demais linhagens. Para a LiP as maiores atividades foram registradas pelo Bas 1 com 213,62 UI/L e pelo Pen 1 com 195,22 UI/L. Enquanto a MnP foi a segunda enzima a apresentar melhor produtividade com 116,06 UI/L pelo Bas 1 e 107,27 UI/L por Bas 2. De um modo geral, os basidiomycetos foram os melhores produtores neste substrato quando comparados aos *Penicillium* spp., pois produziram as três enzimas e obtiveram as maiores atividades.

Logo também é possível observar que o Bas 1 foi o melhor produtor nesse substrato uma vez que obteve os maiores resultados para as três enzimas. Ao comparar a produção de Lac com MnP e LiP observou-se que os valores de atividade foram inferiores, assim como nos substratos BCn e CCc.

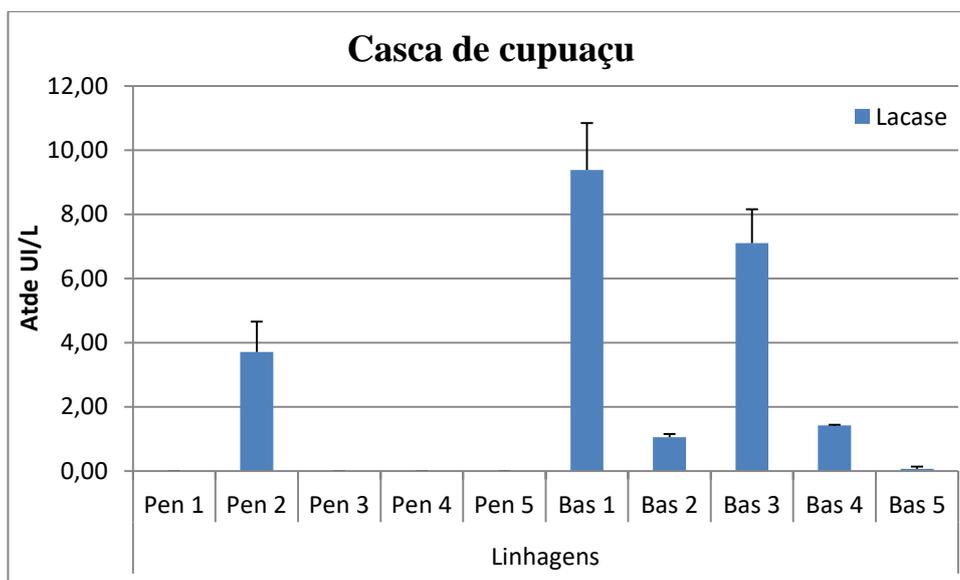


Figura 20: Avaliação da atividade de Lac em casca de cupuaçu.

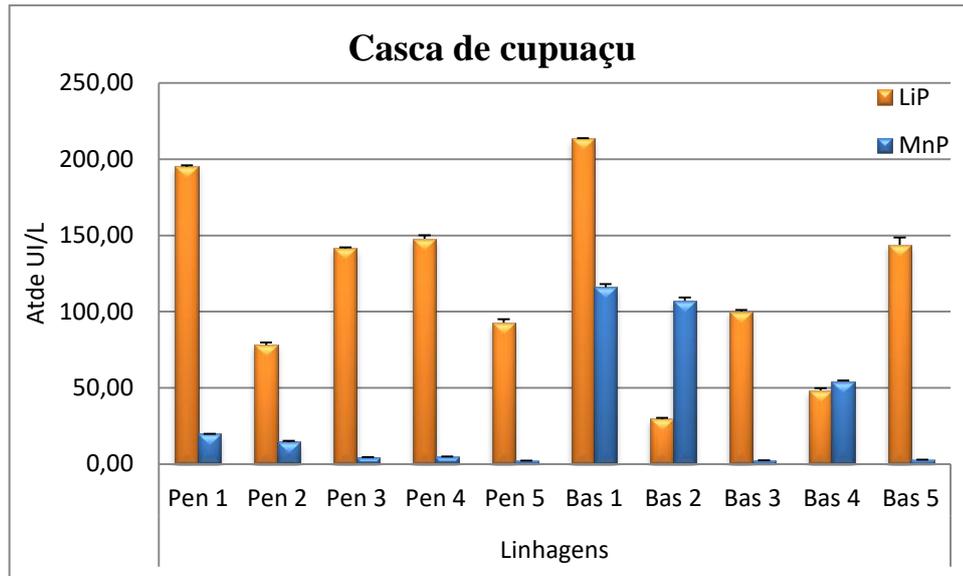


Figura 21: Avaliação da atividade de LiP e MnP em casca de cupuaçu.

5.2.4 Casca de guaraná (CGu)

Verificou-se que não houve registro de atividade de Lac para os *Penicillium* spp. (Fig. 23), entretanto as maiores atividades para LiP e MnP foram expressas por essas linhagens. Assim como nos substratos BCn e CCc, a MnP foi a enzima mais expressa com a maior produção obtida pelo Pen 4 com 526,0606 UI/L e para LiP pelo Pen 2 com 112,5448 UI/mL, seguido do Bas 1 com 97,4910 UI/L (Fig. 24). Semelhantes aos substratos citados anteriormente, a produção de Lac foi mais baixa e os melhores produtores foram os basidiomycetos, com atividade igual a 22,3457 UI/L para o Bas 1 seguido de Bas 2, 3 e 5 que apresentaram resultados aproximados. Uma linhagem a ser destacada nesse substrato é o Bas 1 que dentre as 10 linhagens obteve a melhor produção para Lac e o segundo melhor resultado para LiP, sendo considerado o melhor produtor entre os basidiomycetos, embora tenha obtido o menor resultado para MnP.

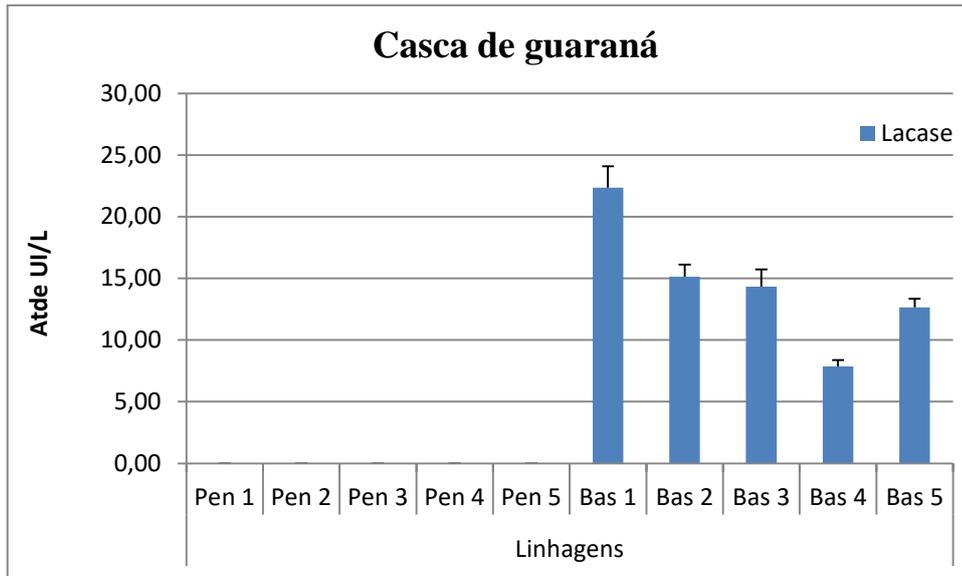


Figura 22: Avaliação da atividade de Lac em casca de guaraná.

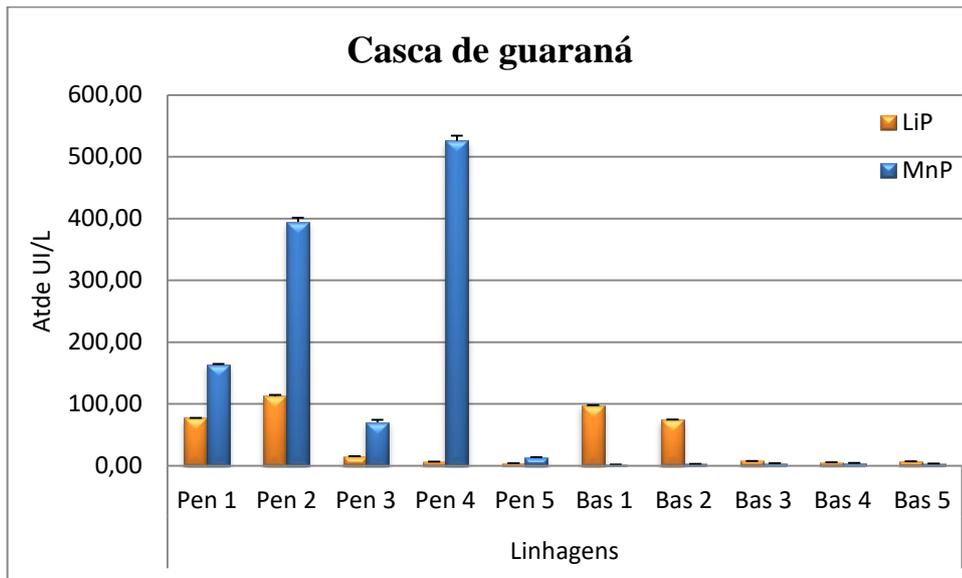


Figura 23: Avaliação da atividade de LiP e MnP em casca de guaraná.

5.2.5 Casca de macaxeira (CMx)

Conforme é possível observar na figura 25 e 26 a CMx pode ser considerada um bom substrato, pois, diferente dos substratos citados anteriormente todas as linhagens produziram as três enzimas e assim como nos substratos BCn, CCc e CGu a MnP foi a enzima mais expressa, com a maior produção obtida pelo Pen 3 com 892,02 UI/L, seguido do Pen 1, 2 e 4 com valores superiores aos apresentados pelos basidiomycetos e quanto a atividade de LiP, a maior produção foi obtida pelo Pen 2

Outro fator a ser destacado deve-se a produção de Lac. que embora neste substrato tenha apresentado uma baixa produção quando comparada a MnP e LiP, obteve resultados elevados comparados aos substratos anteriores e ressaltando também que assim como na CCc todos os *Penicillium* spp. produziram esta enzima, com as maiores produções obtidas pelo Pen 3 com 67,90 UI/L e Bas 2 com 44,26 UI/L.

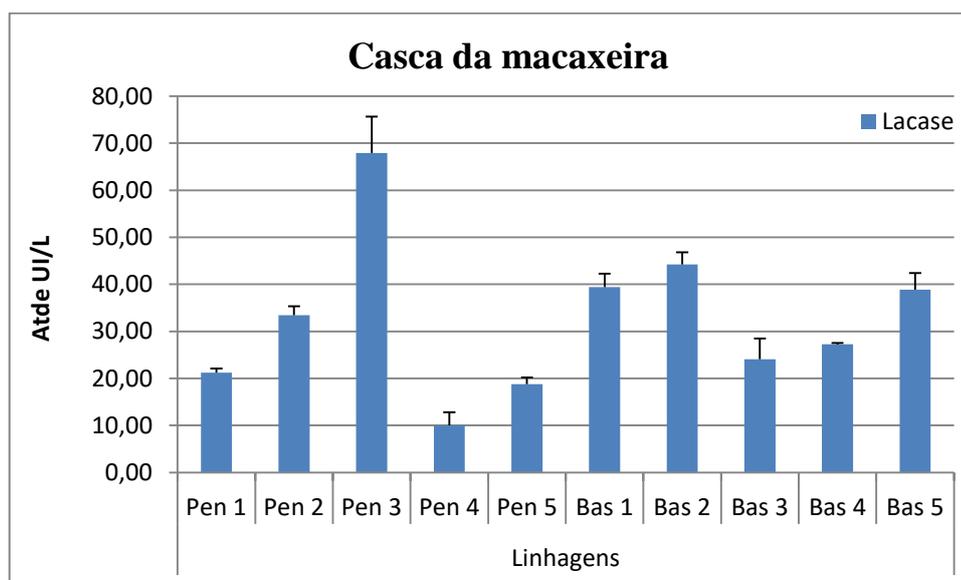


Figura 24: Avaliação da atividade de Lac em casca de macaxeira

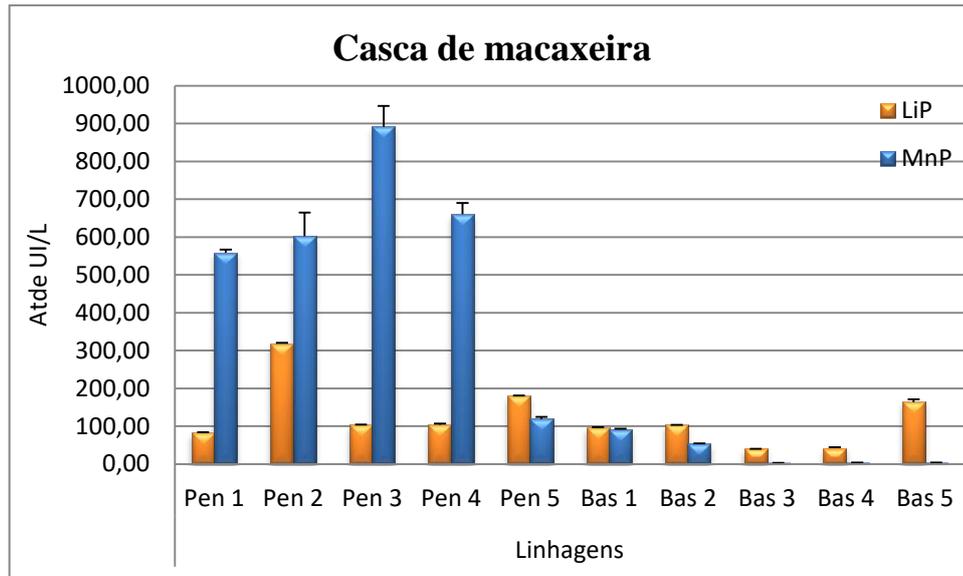


Figura 25: Avaliação da atividade de LiP e MnP em casca de macaxeira.

5.2.6 Casca de maracujá (CMj)

Ao utilizar a CMj como substrato foi possível verificar que a produção de Lac por todas as linhagens (Fig. 27) com o maior valor de atividade obtido pelo Bas 1 com 90,38 UI/L. Logo este pode ser considerado um bom substrato para a produção desta enzima quando comparado ao BCn, CCc e CGu.

Outro fator observado refere-se a maior produção enzimática, pois nos substratos BCn, CCc, CGu e CMx ocorreu para MnP (Fig. 28) enquanto para CMj assim como na CCp ocorreu para LiP com o melhor resultado obtido pelo Bas 1 com 174,19 UI/L, seguido de Bas 2 com 124,97 UI/L. Para MnP a maior produção obtida pelo Pen 1 e Pen 2 com 41,91 UI/L e 41,01 UI/L. Vale ressaltar, que os melhores produtores de Lac neste substrato foram os basidiomycetos, com destaque para o Bas na produção de LiP e Lac.

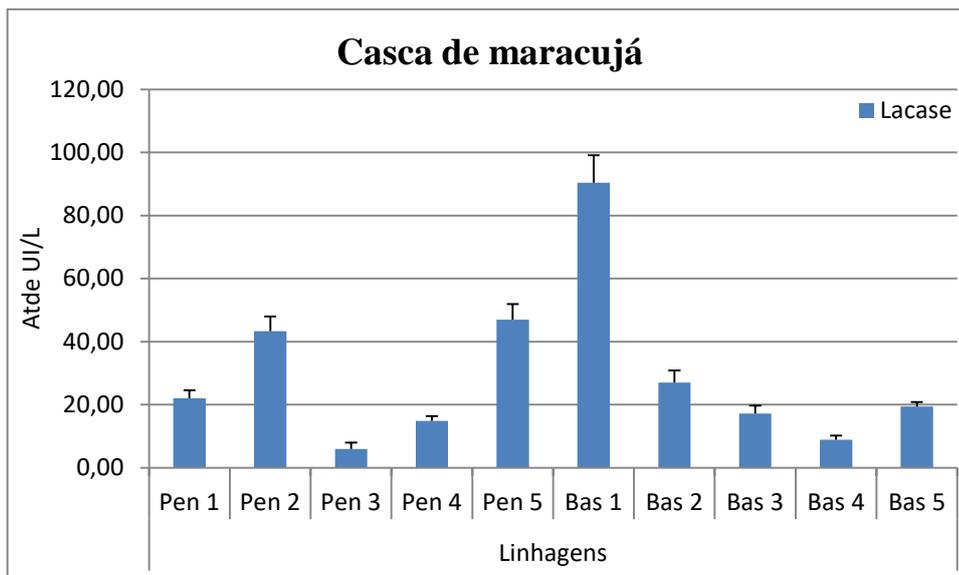


Figura 27: Avaliação da atividade de Lac em casca de maracujá

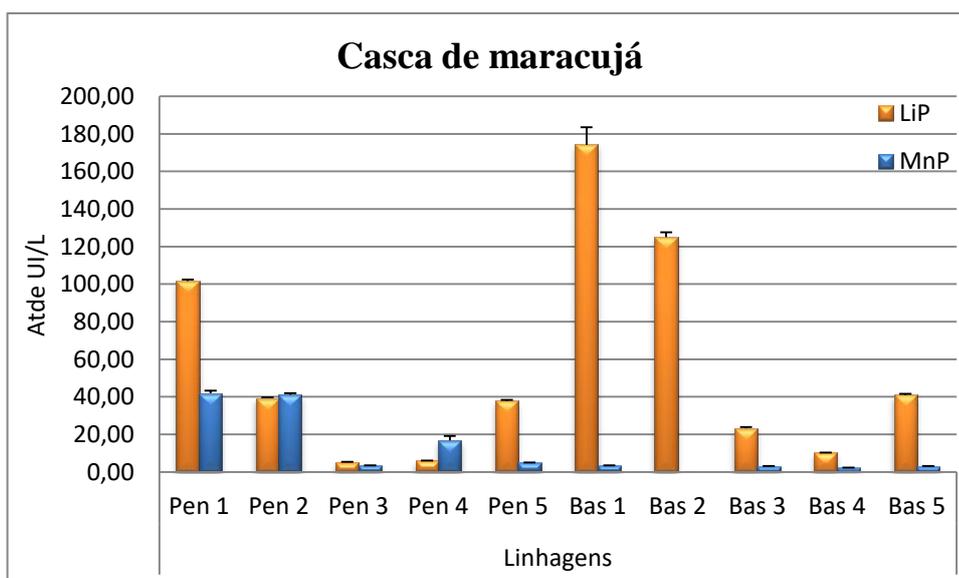


Figura 28: Avaliação da atividade de LiP e MgP em casca de maracujá

5.2.7 Casca de urucum (CUr)

As figuras 29 e 30 apresentam as atividades quando utilizada a CUr como substrato. Observou-se que a MnP obteve o maior valor de atividade destacando-se o Pen 4 com 501,11 UI/L. A atividade de LiP foi mais expressa uma vez que todas as linhagens produziram esta enzima, sendo o Pen 5 o melhor produtor, porém a produção realizada pelos basidiomycetos foi bastante significativa, pois embora a maior atividade tenha sido registrada pelo Pen 1, ao

comparar os demais valores de atividades registrados para as outras linhagens, verificou-se que os basidiomycetos expressaram os melhores resultados.

Os melhores produtores de Lac, assim como nos substratos BCn, CCc, CCp, CGu e CMj foram os basidiomycetos, com a maior produção obtida pelo Bas 5 com 33,76 UI/L, enquanto dentre os *Penicillium* spp. Pen 3 foi o único produtor com 5,99 UI/L, sendo que todas as linhagens de basidiomycetos obtiveram produtividade com resultados mais elevados.

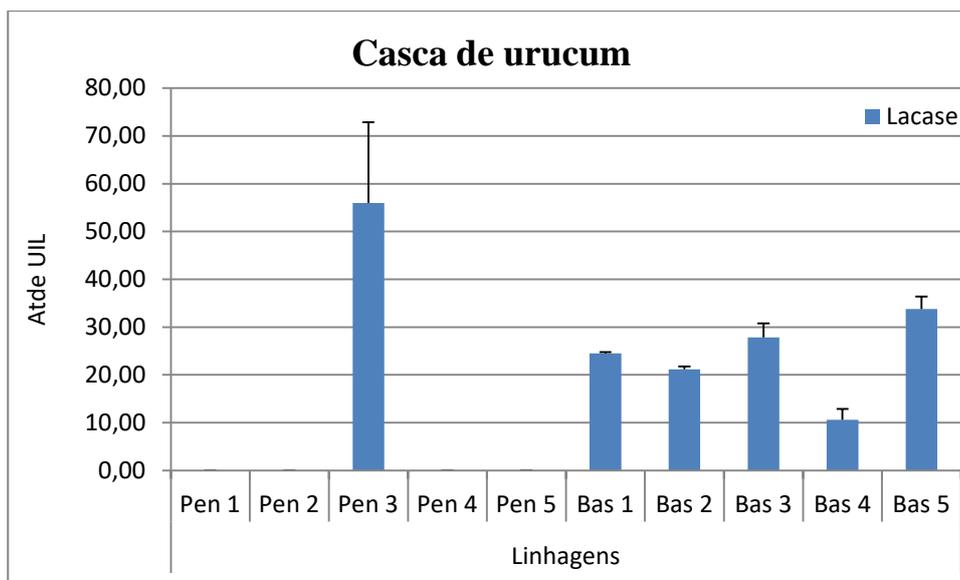


Figura 29: Avaliação da atividade de Lacase em casca de urucum.

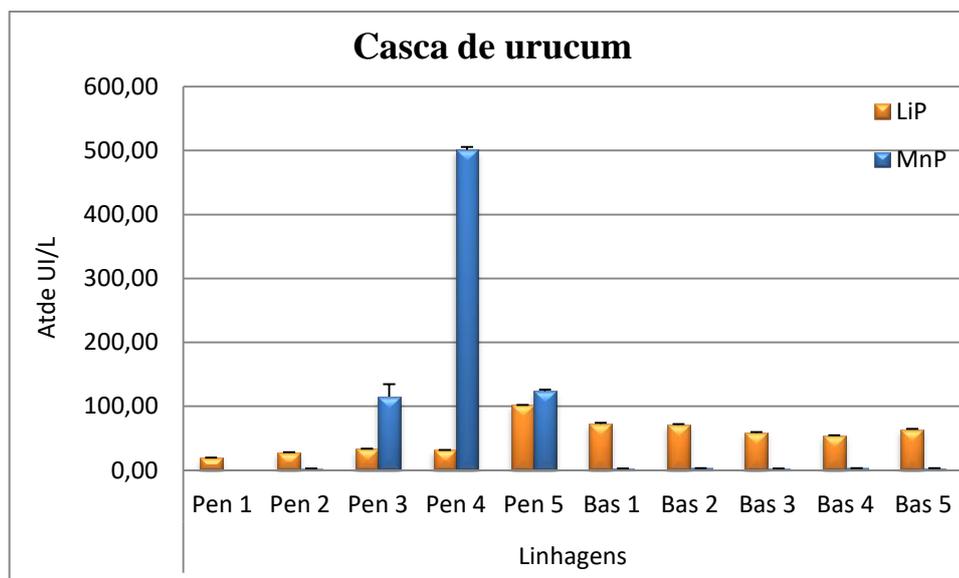


Figura 30: Avaliação da atividade de LiP e MgP em casca de urucum.

5.2.8 Semente de cupuaçu (SCp)

No substrato SCp, a maior atividade foi de MnP destacando-se o Pen 2 com atividade igual a 954,85 UI/L, seguido do Pen 5 com 947,67 UI/L. A atividade de LiP, foi expressa por todas as linhagens, e o maior resultado observado para Pen 1 com 198,56 UI/L. Semelhante ao que foi observado nos substratos anteriores, com exceção apenas de CMj e CCp, os maiores produtores para MnP e LiP, foram os *Penicillium* spp., embora estes tenham apresentado atividade inferior para Lac., sendo a maior atividade produzida pelo Bas 1 com 24,01 UI/L, seguido do Bas 3 e 4, onde, a atividade enzimática, se mostrou linear (Fig. 31 e 32).

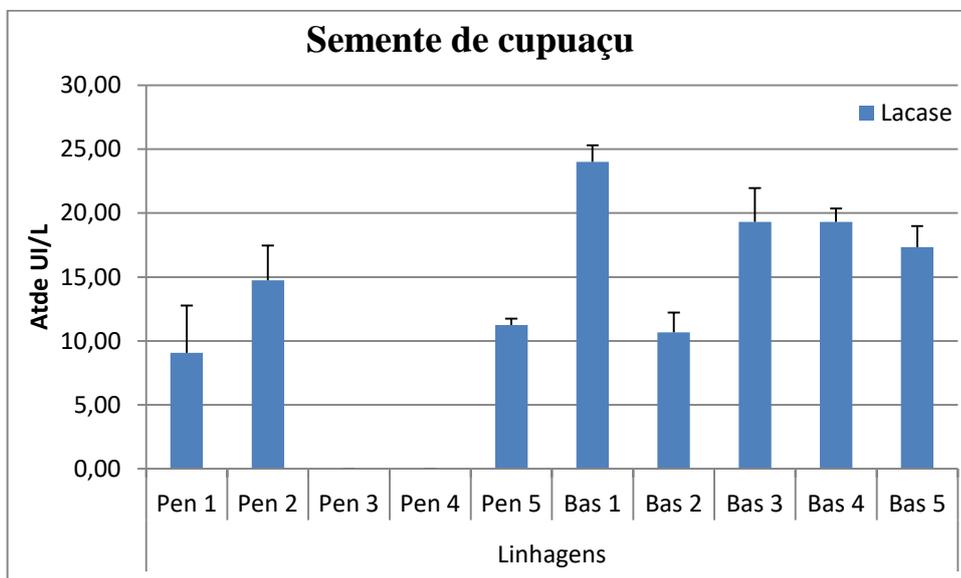


Figura 31: Avaliação da atividade de Lac em semente de cupuaçu.

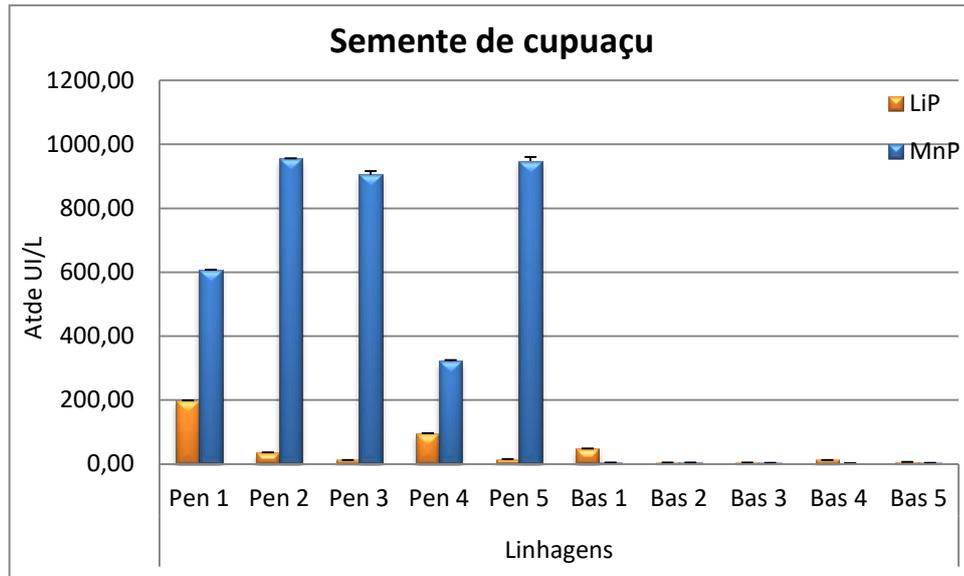


Figura 32: Avaliação da atividade de LiP em semente de cupuaçu.

5.2.9 Semente de maracujá (SMj)

Ao utilizar SMj como substrato, observou-se que houve registro de atividade por todas as linhagens utilizadas com exceção apenas do Pen 1 e Pen 4 que não registraram atividade de Lac (Fig. 33).

As maiores atividades para as ligninases nesse substrato foram obtidas pelos *Penicillium* spp. Porém, os basidiomycetos expressaram as três enzimas. A enzima que obteve a maior atividade registrada foi a MnP (Fig. 34), sendo o melhor produtor o Pen 3 com 892,02 UI/L seguido do Pen 2 com 512,32 UI/L. A LiP foi a segunda mais expressa, sendo o maior produtor o Pen 2.

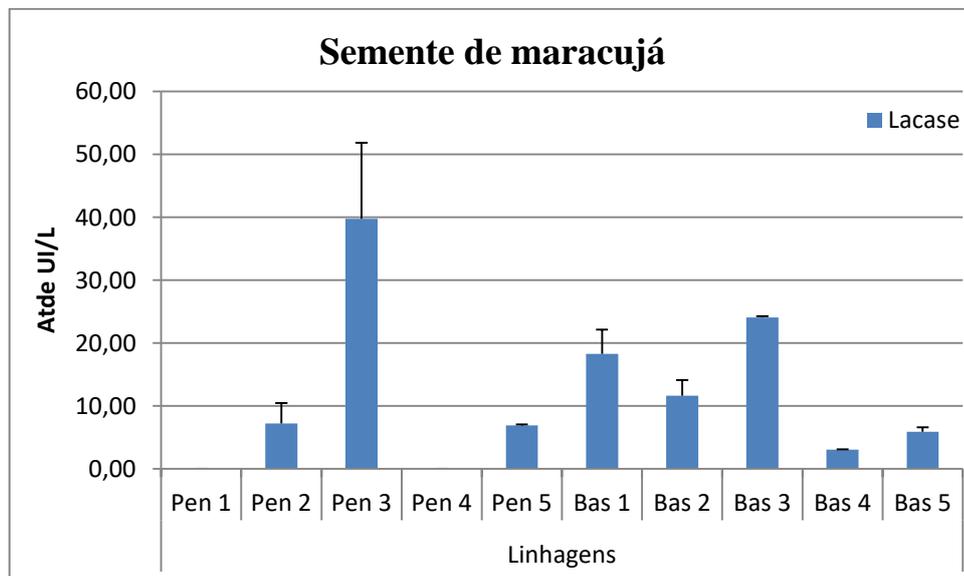


Figura 33: Avaliação da atividade de Lac em semente de maracujá.

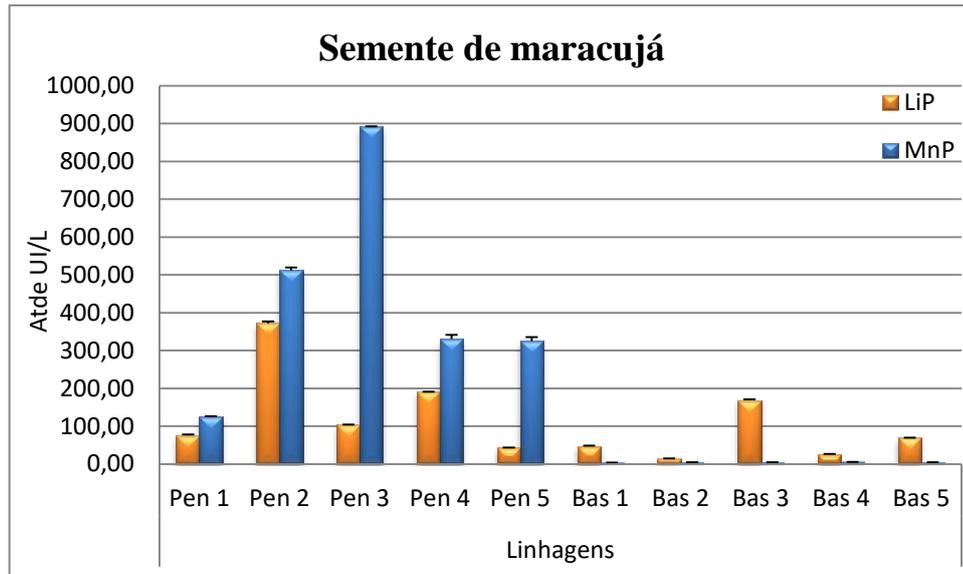


Figura 34: Avaliação da atividade de LiP e MnP em semente de maracujá.

5. 2.10 Torta de Pau Rosa (TPR)

No substrato TPR, a maior atividade enzimática foi observada para a MnP seguida da LiP, sendo os melhores produtores os *Penicillium* spp., cujo a maior atividade foi produzida pelo Pen 5 com 377,58 UI/L. Para LiP a maior atividade foi expressa pelo Pen 1 com 198,09 UI/L seguido por Pen 3 com 176,34 UI/L, sendo estes resultados bastante superiores aos expressos pelos basidiomycetos. No que se refere a atividade de Lac., assim como em BCn, CCc, CCp, CGu, CMj, CUR e SCp os basidiomycetos foram os melhores produtores (Fig. 35), pois as cinco linhagens apresentaram atividade com a maior atividade para Pen 2 com 16,24 UI/L, mas não houve atividade para 3 das 5 linhagens utilizadas. Embora os basidiomycetos tenham apresentado atividade baixa, houve produção de todas as enzimas por todas as linhagens (Fig. 36).

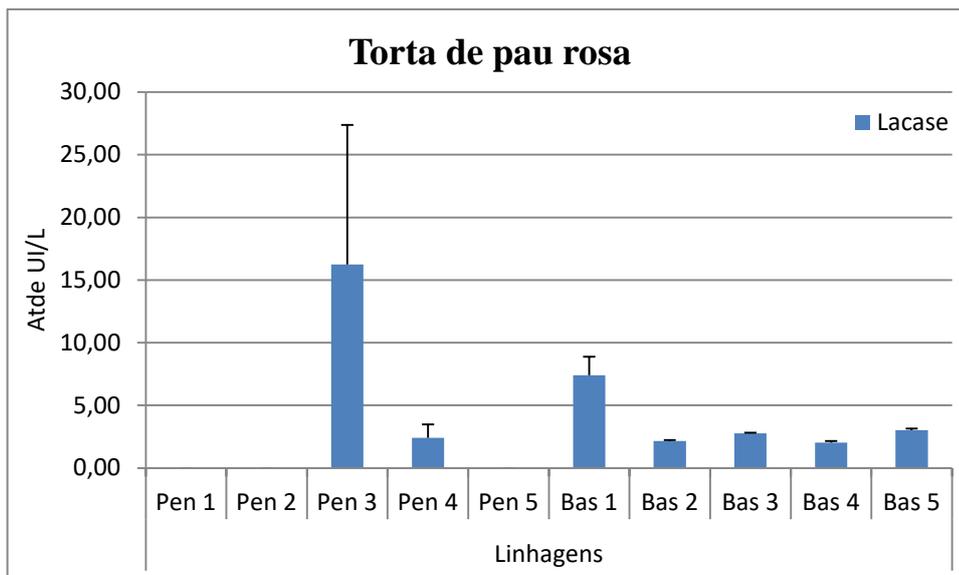


Figura 35: Avaliação da atividade de Lac em torta de pau rosa.

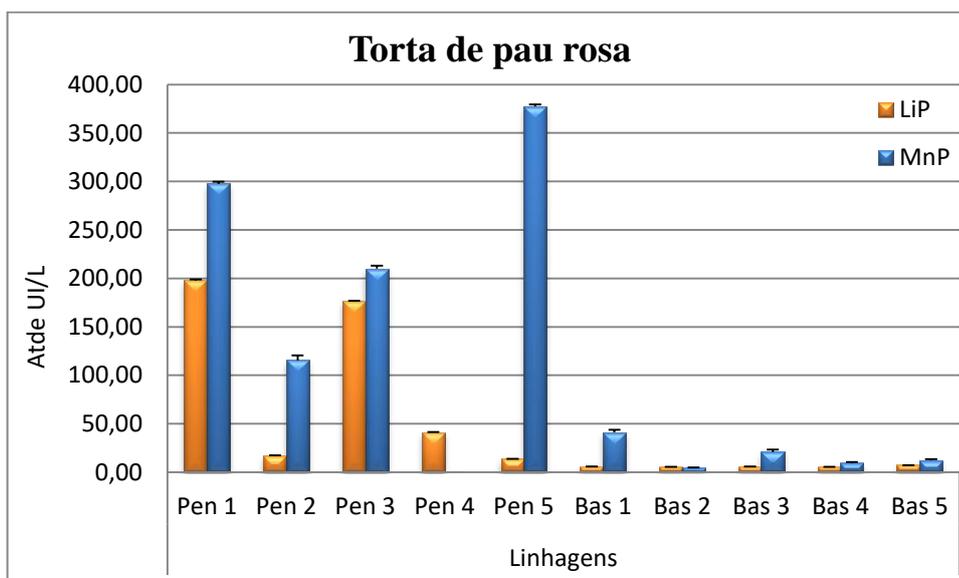


Figura 36: Avaliação da atividade de LiP e MnP em torta de pau rosa.

Através dos resultados das análises quantitativas foi possível constatar que nas condições de ensaio utilizadas, ocorreram padrões diferenciados quanto a produção de enzimas ligninolíticas. Essa variação na produção das enzimas ocorre devido ao potencial genético que cada grupo de fungos possui, aliado ao fato das fontes de lignina serem diversas e não homogêneas.

5.3 Atividade ligninolítica de MnP

A MnP atua oxidando diretamente Mn (II) a Mn (III), e age como espécie ativa nos processos de oxidação catalítica; este é quelado por ácidos orgânicos como o oxalato, formando um complexo estável de alto potencial de oxidorredução, porém a MnP oxida somente estruturas fenólicas (REYS, 2003). Neste experimento após 240 h de cultivo observou-se que os 10 substratos avaliados induziram a produção de MnP por sete das 10 linhagens utilizadas (Fig. 37), com exceção do Bas 2 nos substratos CCc e CMj e do Pen1 e 4 na CUr.

D'ANNIBALE (2004) detectou em uma linhagem de *L. tigrinus* atividade de MnP somente a partir do 7º dia sendo esta igual a 150 UI/L. Enquanto FENICE E COLABORADORES (2003) obtiveram pico de atividade no 7º dia com 400 UI/L, não sendo detectada nenhuma atividade antes do 5º dia de cultivo. Neste experimento o período de incubação foi de 10 dias e os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados pelos autores citados.

No experimento realizado por CONCEIÇÃO (2010) as maiores atividades de MnP foram iguais a 4,66 UI/L produzida por *P. tricholoma* e 23,58 UI/L por *L. tigrinus*, utilizando como substrato 50 % de mandioca e 50 % de cevada incubados a 28 °C. VYAS et al (1994), utilizou como produtor *P. chrysosporium* incubado em diferentes temperaturas e observou que a 39, 33 e 28°C houve produções de MnP e LiP, porém a 23 °C ocorreram maiores produções para MnP e a 18 °C somente atividade de MnP foi detectada. Neste experimento as temperaturas adotadas foram de acordo com o gênero a que as linhagens pertenciam, sendo 28 °C para os *Penicillium* spp. e 26° C para os basidiomycetos, podendo ter sido um fator influente para a obtenção de maiores produções.

Comparando todas as linhagens de *Penicillium* spp. entre si, observou-se que o Pen 1 foi o melhor produtor nos substratos BCn, CCc, CCp e CMj; o Pen 2 em SCp; o Pen 3 em CMx e SMj; o Pen 4 em CGu e CUr; e o Pen 5 em TPR. Observou-se que entre essas linhagens o maior valor de atividade foi apresentado pelo Pen 1 com 1828,69 UI/L quando cultivado na CCc, sendo considerado um bom produtor, pois, comparado as demais linhagens, destacou-se em 40 % dos substratos, e quando comparado aos basidiomycetos obteve as maiores produções nos substratos: BCn, CCc e CMj.

MATHEUS & OKINO (1998) também observaram a alta produção de MnP pelos *Penicillium* spp., logo, é possível aferir que embora os basidiomycetos sejam os melhores degradadores da lignina, celulose e hemicelulose os *Penicillium* spp. também são bons produtores desta enzima.

Dentre as cinco linhagens de basidiomycetos observou-se que o Bas 1 foi o melhor produtor em cinco substratos, sendo: CCp, CMx, CMj, SCp e TPR; o Bas 2 para a CUr; o Bas 3 no BCn sendo também o segundo melhor produtor na CCc, CGu, CMJ, SMj e TPR; o Bas 4 na CCc, CGu e SMj; e o Bas 5 o segundo melhor produtor em CGu e SMj. Dentre estes destacou-se o Bas 1 por ser o melhor em 50 % dos substratos, porém, o Bas 4 atingiu a melhor produção na CCc com 594,24.

Verificou-se que as maiores produções de MnP registrados em nove dos 10 substratos avaliados foram obtidos pelos *Penicillium* spp., com exceção da CCp, na qual a destacou-se o Bas 1. De acordo com as observações é possível verificar que MnP quando comparada as demais enzimas obteve as maiores produções pelos *Penicillium* spp. nos substratos BCn, CCc, CGu, CMx, CUr, SCp, SMj e TPR, assim como os basidiomycetos nos substratos BCn, CCc e TPR.

Os resultados apresentados neste trabalho são de grande importância, uma vez que a MnP atua na degradação da madeira através do seu sistema enzimático, gerando substâncias oxidantes pequenas e de fácil penetração. Segundo CONCEIÇÃO (2010), outra característica importante desta enzima refere-se a sua atuação em uma ampla faixa de pH, o que representa uma vantagem para a sua aplicação na indústria. Porém, a oxidação apenas de estruturas fenólicas limita sua capacidade de degradar integralmente a lignina (SOARES, 1998).

Os dados encontrados na literatura foram inferiores aos obtidos neste trabalho, pois segundo LECHNER; PAPINUTTI (2006), a composição do substrato influencia diretamente no padrão de produção das enzimas, sendo responsável por induzir ou aumentar a produção. De acordo com KAMIDA et al., (2005) outros fatores que influenciam a produção estão relacionados às características genéticas das espécies, assim como parâmetros físico-químicos (pH, nitrogênio, temperatura, oxigenação e presença de minerais), que interferem ou colaboram com a produção e ação dessas enzimas. Sendo assim, são necessários estudos a respeito da composição destes substratos, principalmente daqueles que induziram as maiores produções desta enzima.

Atividade ligninolítica de MnP

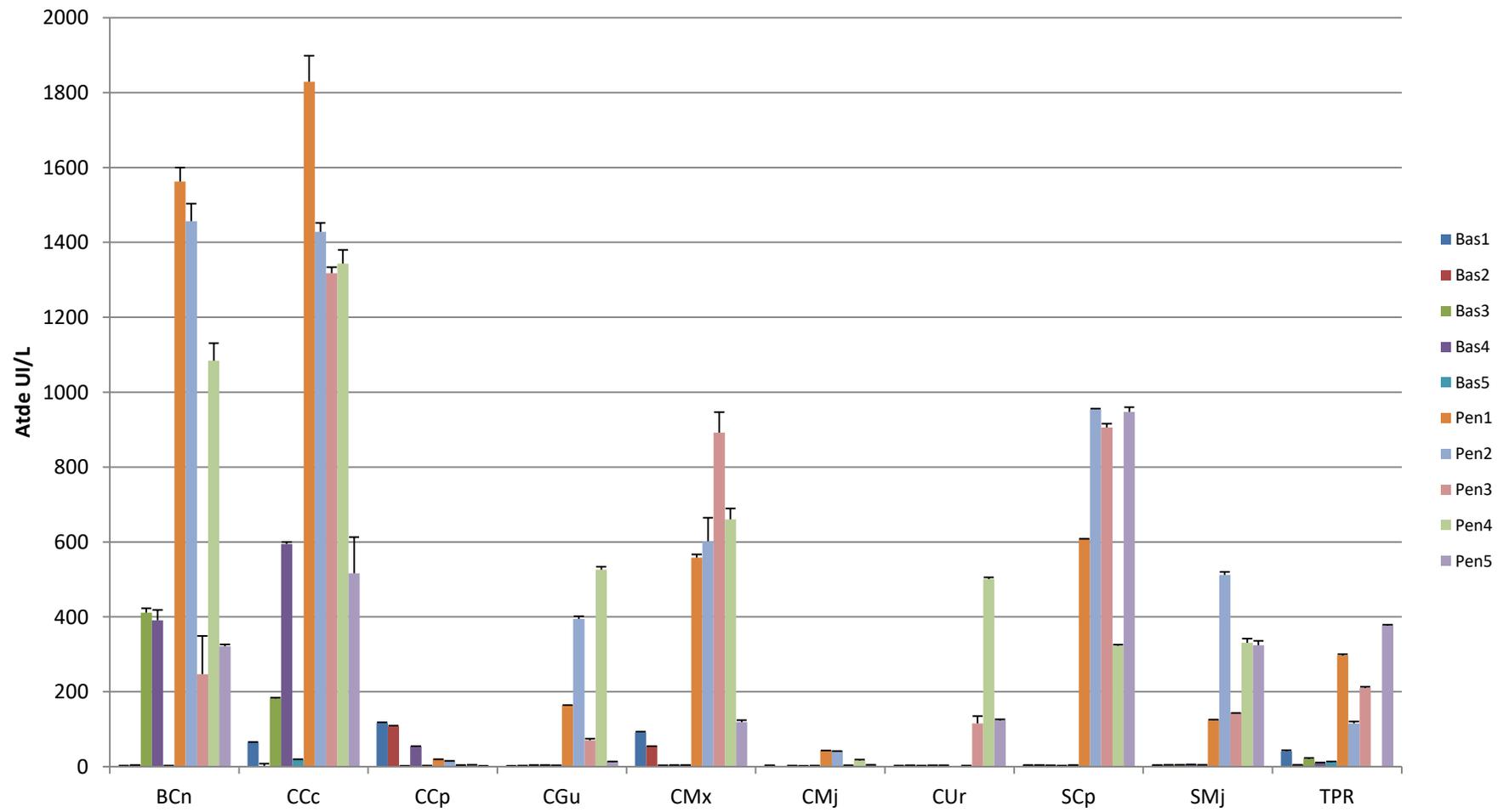


Figura 37: Avaliação da atividade de MnP nos 10 substratos avaliados.

5.4 Atividade ligninolítica de LiP

A LiP foi relatada nos fungos: como *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Phlebia tremellosa*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Junghuhnia seprabilina* e *Phlebia ochraceofulva* entre outros (SOARES,1998). Neste experimento as 10 linhagens fúngicas cultivados nos 10 substratos avaliados produziram esta enzima (Fig. 38).

Comparando a produção de LiP a MnP e Lac foi possível observar que a LiP apresentou os maiores valores de atividade na: CCp com 213,00 UI/L e na CMj com 174,19 UI/L ambos produzidos por Bas 1. Entre os basidiomycetos as atividades variaram de 5,02 UI/L na SCp a 270,01 UI/L no BCn ambas produzidas pelo Bas 2, enquanto para os *Penicillium* spp. a variação foi de 4,06 UI/L produzida pelo Pen 5 na CGu a 371,80 UI/L pelo Pen 2 na SMj

Nos ensaios realizados por CONCEIÇÃO (2010), utilizando como substrato bagaço de cana, resíduo de cevada, casca de coco e casca de mandioca as maiores produções das ligninases ocorreram após sete dias, sendo os melhores resultados para LiP iguais a 3,58 UI/L produzida por *P. tricholoma* utilizando 30% de mandioca e 70% de cevada e 6,95 UI/L produzido por *L. tigrinus* utilizando os mesmos substratos em concentrações diferentes sendo 50% de cada.

Observou-se que os *Penicillium* spp. apresentaram os maiores valores de atividade de LiP em oito dos 10 substratos avaliados, sendo: BCn, CCc, CGu, CMx, CUR, SCp, SMj e TPR, sendo exceção a CCp e CMj. Entre os *Penicillium* spp. o Pen 1 foi o melhor produtor para CCp, CMj, SCp e TPR; o Pen 2 para BCn, CMx, SMj e CGu; o Pen 3 o segundo melhor produtor para CCc, CUR e TPR; o Pen 4 para CCc e o Pen 5 para CUR.

Entre os basidiomycetos, o Bas 1 foi o melhor produtor para CCp, CGu, CMj, CUR, SCp; o Bas 2 para BCn e CCc; o Bas 3 para SMj; o Bas 4 o segundo melhor produtor para SCp; o Bas 5 o melhor para CMx e TPR. Ao comparar a produção das ligninases pelas 10 linhagens utilizadas observou-se que a LiP assim como MnP foi melhor expressa pelos *Penicillium* spp.. Isso se deve porque a MnP é semelhante à LiP devido a presença do grupo heme, e também dependente de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para sua atividade. Logo a produção de MnP se dá juntamente com a LiP durante o metabolismo secundário, sendo a regulação realizada pela concentração de carbono e nitrogênio do meio (REYS, 2003).

Embora os *Penicillium* spp. tenham obtido as maiores produções em 80% dos substratos atingindo o maior valor de atividade, verificou-se que o menor registro de atividade também foi produzido por uma das cinco linhagens desse gênero, o Pen 5. Porém,

SANTOS (2010) observou atividade inferior produzida por *Penicillium commune* com 2,50 UI/L em meio caldo Sabouraud. No que se refere a menor produção obtida pelos basidiomycetos, esta ocorreu na SCp pelo Bas 3 com 4,08 UI/L, considerada baixa quando comparada as linhagens utilizadas nesse experimento. Porém, a maior atividade encontrada por ZHAO E COLABORADORES (1996) foi de 0,17 UI/L e por ARORA e COLABORADORES (2002) de 0,1 UI/L, ambas produzidas por espécies de basidiomycetos.

Uma característica importante da LiP é a sua capacidade em oxidar substratos fenólicos e não fenólicos que a Lac e a MnP não são capazes de oxidar (SANTOS, 2010), como também álcoois benzílicos e demetila, e provocar rearranjos intramoleculares. SOARES (2000) avaliou que o melhor pH para a remoção de fenóis desta enzima seja 4, sendo controlado preferencialmente pelo H₂O₂. Experimentos futuros devem ser realizados com estas linhagens considerando a otimização do pH, o que pode contribuir com a produção de LiP.

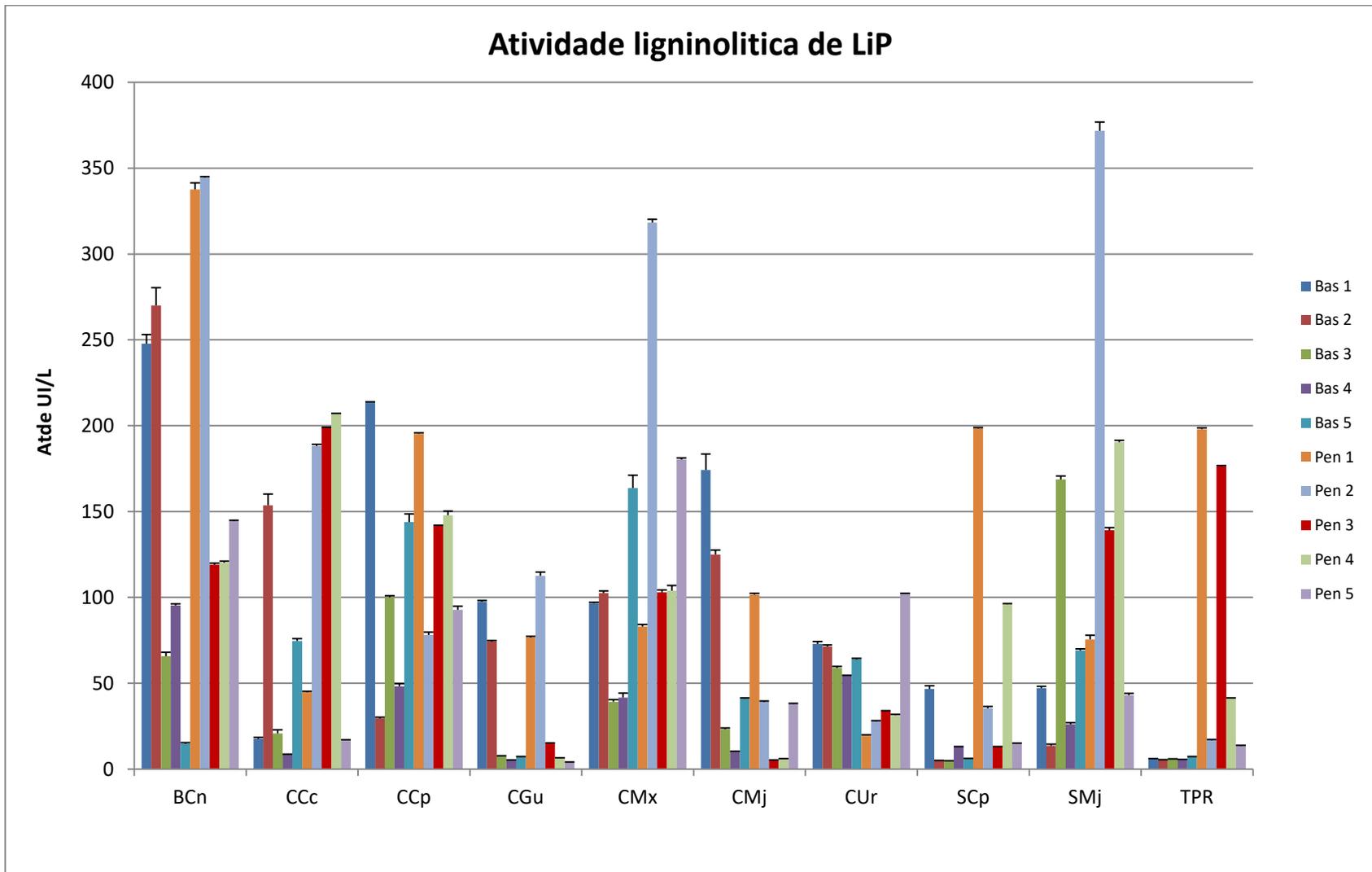


Figura 38: Avaliação da atividade de LiP nos 10 substratos avaliados.

5.5 Atividade ligninolítica de Lac

A Lac possui íon cobre no seu sitio ativo e tem ampla especificidade ao substrato emprega o oxigênio molecular como redutor e oxida anéis fenólicos para radicais fenóxi (GOLD; ALIC, 1993; SANTOS et al., 2010). Além do seu importante papel na degradação da lignina, pode ser aplicada na destoxificação de poluentes fenólicos (KUMARAN et al., 1997). Diferente do que foi observado na produção de MnP e LiP os basidiomycetos foram os melhores produtores desta enzima, sendo obtidas atividades pelas cinco linhagens nos 10 substratos avaliados (Fig. 39). GUZMAN et al. (1993) também verificou a produção de Lac por alguns fungos da podridão branca tais como *Lycoperdon* sp., *Coriolus versicolor*, *Phellinus ignarius*. Dentre os *Penicillium* spp, não houve a produção desta enzima por pelo menos uma das cinco linhagens em sete substratos, com exceção da CCc, CMx e CMj, com as maiores produções nos substratos CMx e SMj pelo Pen 3 com 67,90 UI/L.

As fontes de nitrogênio desempenham um importante papel na produção de lacases e seus efeitos dependem da natureza e concentração da fonte no meio de cultivo. De modo geral, nitrogênio inorgânico está associado à menor produção de lacases, enquanto fontes orgânicas desse nutriente favorecem a produção de níveis elevados (PISCITELLI et al., 2011). SILVA (2012) selecionou três linhagens de fungos da podridão branca e as cultivou em meio líquido contendo casca de café como única fonte de carbono, acrescentou diferentes fontes de nitrogênio dentre estas o extrato de levedura e obteve 22,50 UI/L produzido por *P. ostreatus*.

SANTOS (2010) verificou a atividade de Lac pelos fungos *Aspergillus terreus* e *Cunninghamella echinulata* e obteve como melhores resultados 18,97 UI/L e 18,70 UI/L. KEREM E COLABORADORES (1992) observaram altas atividades no início da degradação da lignina e verificaram que a Lac age como uma enzima inicial na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina, atuando na destoxificação de compostos do substrato e oxidando grupos fenólicos. No experimento realizado por CONCEIÇÃO (2010), os frascos foram incubados por 7 dias e após esse período foi realizado a extração das enzimas, as maiores produções foram obtidas a 28°C, por *P. tricholoma* com 6,93 UI/L utilizando casca de mandioca como substrato e *L. tigrinus* com 8,71 U/L utilizando 50% de mandioca e 50% de cevada.

Dentre as linhagens de *Penicillium* spp., verificou-se que o Pen 1 obteve o segundo melhor resultado na CCc, enquanto o Pen 2 foi o melhor para CCp e SCp, sendo também o único *Penicillium* sp. a apresentar atividade no substrato CCp, porém o Pen 3 destacou-se : em BCn, CCc, CMx, SMj, TPR e CUr, sendo para este último o único produtor, enquanto o

Pen 4 foi o segundo melhor produtor em TPR e o Pen 5 o melhor para CMj. Comparando as cinco linhagens, verificou-se que o Pen 3 além de ser o melhor produtor em 60% dos substratos apresentou o maior valor de atividade com 62,47 UI/L no BCn. O maior valor de atividade de Lac observado por BAPTISTA (2012) foi igual a 1,94 UI/L produzida por *Penicillium commune*, sendo este inferior aos maiores resultados aqui observados.

No que se refere a produção desta enzima pelos basidiomycetos, observou-se que os 10 substratos induziram a produção desta enzima por essas linhagens, onde Bas 1 foi o melhor produtor para CCp, CGu, CMj, SCp e TPR; o Bas 2 para CCc e CMx; o Bas 3 em BCn e SMj; o Bas 4 foi o segundo melhor produtor em BCn e o Bas 5 em CUr. Embora os basidiomycetos tenham apresentado as maiores produções para esta enzima, a atividade mais baixa foi produzida pelo Bas 5 em CCp com 0,86 UI/L, enquanto para os *Penicillium* spp. a menor atividade foi obtida pelo Pen 4 com 1,85 UI/L na CCc. Entretanto, SANTOS (2010) obteve como maior atividade de Lac 1,95 UI/L produzida por *Penicillium commune* em meio caldo Sabouraud.

TINOCO et al. (2011), verificou a maior atividade de lacase de *Pleurotus* sp com 1,4 U mL⁻¹ utilizando meio a base de extrato de malte contendo fontes de N proteicas como peptona e extrato de levedura. KARP et al. (2012) relataram atividade máxima de lacase de 11,6 U g⁻¹ trabalhando com *Pleurotus ostreatus*, em fermentação no estado sólido em meio a base de bagaço de cana acrescido. D'AGOSTINE et al. (2011) observaram maior atividade de lacase (80 U g⁻¹) de *Pleurotus ostreatus*, utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio em fermentação no estado sólido com cascas de soja.

Verificou-se que os 10 substratos avaliados foram bons indutores para a produção desta enzima pelos basidiomycetos, porém os substratos CCp e CGu não foram satisfatórios para os *Penicillium* spp. Das cinco linhagens de *Penicillium* spp. verificou-se que o Pen 1 não apresentou atividade em seis substratos sendo BCn, CCp, CGu, CUr, SMj e TPR, assim como o Pen 4 em cinco destes, sendo exceção a TPR.

Segundo IKEHATA (2004), dentre os fatores que estimulam a produção de Lac e a formação de produtos está a composição do meio, o tempo de cultivo, pH, razão carbono: nitrogênio, temperatura, natureza química do substrato, luminosidade e aeração. Vale ressaltar que a origem da Lac influencia diretamente na especificidade da enzima ao substrato. Sua função fisiológica ainda não é clara e seu papel na biodegradação da lignina é incerto (GOLD; ALIC, 1993; SANTOS et al., 2010), contudo a Lac e a MnP devem agir complementarmente ou sinergisticamente.

Atividade ligninolítica de Lac

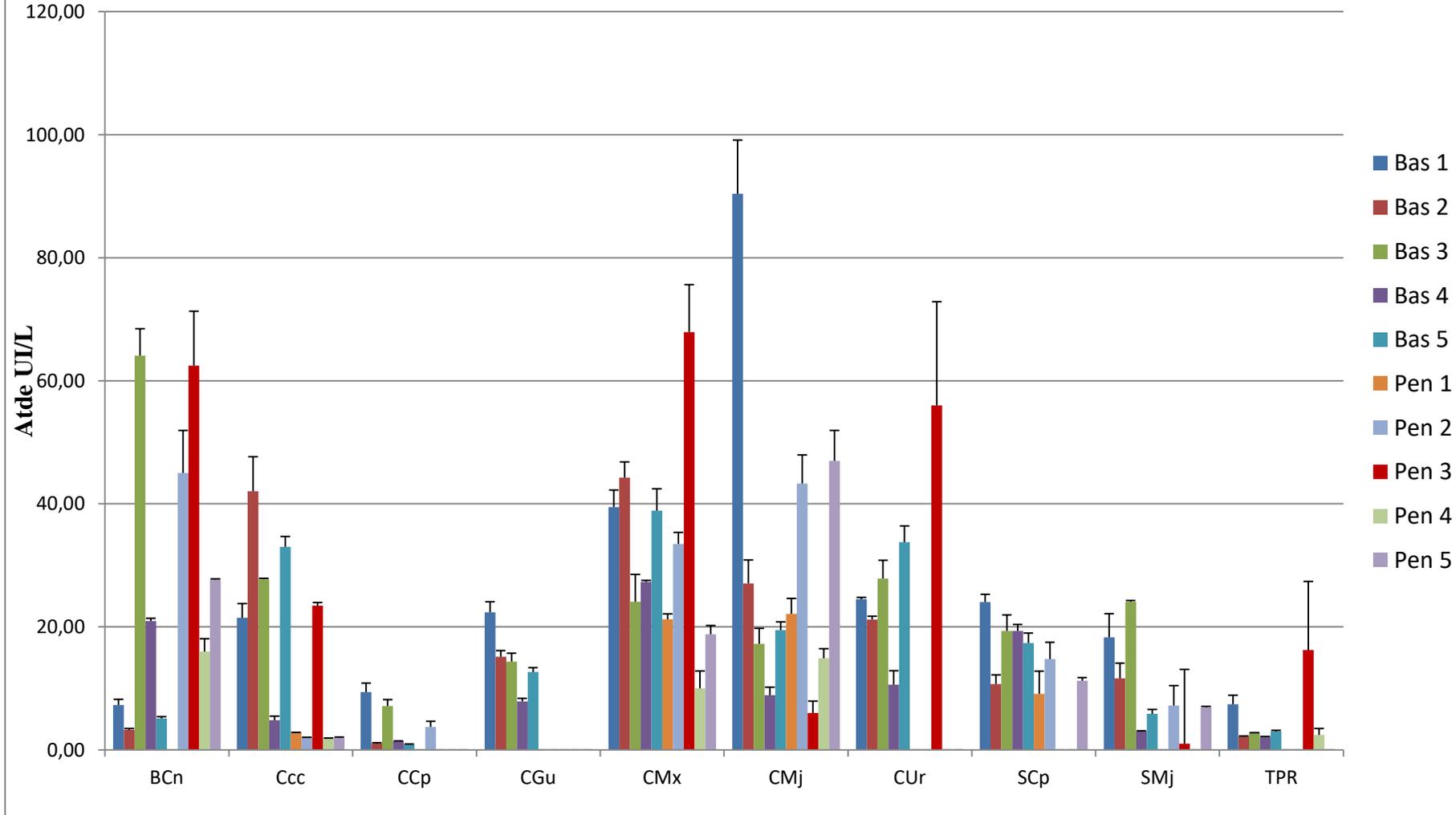


Figura 39: Avaliação da atividade de Lac nos 10 substratos avaliados.

Vários aspectos quanto a degradação da lignina precisam ser analisados, esta realizada pelos basidiomycetos é vista como um processo multienzimático que resulta da ação de várias enzimas intra e extracelulares, do grupo das oxidoreduções (peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio) e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular (LEONOWICZ et al. 1999, MOREIRA-NETO 2006).

ALEXANDRINO (2007) verificou a produção de várias enzimas oxidativas e hidrolíticas por *P. ostreatus* após 10 dias utilizando resíduo de laranja como substrato, e observou que não houve a produção de amilase e pectinase, porém Lac. e MnP foram encontradas, sendo a produção de Lac. induzida pelo aumento da umidade inicial, sendo nesta as maiores atividades registradas. O mesmo não foi observado para a produção de MnP, pois esta não foi afetada pela variação da umidade, sendo sua atividade constante assim como das enzimas hidrolíticas xilanase, endoglucanase, β -xilosidase e β -glicosidase que também apresentaram baixa produtividade.

Com base em todos os resultados, foi possível observar que os basidiomicetos apresentaram a capacidade de produzir Lac., LiP e MnP em todos os substratos utilizados, com exceção apenas do Bas 2 que não registrou atividade de MnP em CCc e CMj. Entretanto, todos os *Penicillium* spp. apresentaram atividades nos 10 substratos para LiP, mas obtiveram bons resultados de MnP, com exceção apenas do Pen 1 e o Pen 4 que não apresentaram atividade em CUR e TPR, estas cinco linhagens não foram consideradas boas para a produção de Lac., pois foram registradas produções desta enzima em apenas três substratos.

As espécies de *Pleurotus* estão entre os fungos da degradação branca produtores de lacases e outras ligninases. Segundo estudos realizados por RAJARATHANAM E BANO (1989) com *P. ostreatus* os principais fatores que afetam a degradação da lignina são os substratos de crescimento, a fonte de nitrogênio, bem como sua concentração e condições de cultivo. Sendo que geralmente a carência de uma fonte externa de nitrogênio, temperaturas de 25-30°C, disponibilidade de oxigênio e cultivo estático estimulam essa degradação.

No trabalho realizado por ALEXANDRINO (2007), utilizando resíduo de laranja como substrato as condições de cultivo utilizadas para a produção de Lac. e MnP parece ser dependente do crescimento do fungo. Sendo a atividade máxima de Lac. obtida após 15 dias de cultivo, e MnP após 30 dias. Enquanto neste trabalho foram observadas atividades com 10 dias de cultivo.

Geralmente são utilizados farelo e palha de trigo, palha de aveia, palha de arroz, bagaço de cana e alguns outros resíduos lignocelulósicos como substratos para o cultivo dos fungos causadores da podridão branca. Atualmente novos substratos têm sido propostos,

dentre eles as partes não comestíveis de certos alimentos, como: cascas, sementes e bagaços. Dessa forma, verificou-se que os dez resíduos agrícolas utilizados nesse trabalho para a produção de ligninases são considerados bons substratos para a produção de MnP, LiP e Lac, uma vez que nestes ocorreram a produção pelas dez linhagens utilizadas.

5.6 Atividade de Lipase em três diferentes substratos

As principais fontes de obtenção de lipases para aplicação industrial têm sido os micro-organismos (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; SAXENA et al., 2003). Desta forma, foram selecionados cinco basidiomycetos, cinco *Penicillium* spp e cinco *Aspergillus* spp., para a produção desta enzima utilizando como substratos SCp, SMj e OL. como controle. Há diversos estudos utilizando o óleo vegetal como fonte de carbono, e evidenciando que este é indutor suficiente para a síntese de lipases microbianas (HASAN et al., 2006). Pois os óleos e gorduras são os substratos naturais para a produção dessas enzimas sendo constituídas de triacilgliceróis formados por de ácidos graxos de cadeia longa (BROCKMAN, 1984).

Devido o crescimento microbiano estar relacionado às variações da composição do meio e condições do cultivo, a produção de lipases tem sido desenvolvida principalmente por fermentação submersa (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

5.6. 1 Atividade de lípase por cinco *Penicillium* endofíticos da Amazônia em SCp, SMj e OL.

A produção de lípase pelos *Penicillium* spp. nos três substratos, verificou-se que o Pen 1 foi o único produtor na CCp, e ao comparar o valor de atividade encontrado neste, com os resultados obtidos em SMj e OL, observou-se uma maior produção na SCp com 0,4196 UI/. No substrato SMj, diferente do observado na SCp houve produção por todas as linhagens avaliadas, porém com resultados inferiores aos apresentados pelo Pen 5 que obteve 0,3241 UI/L, sendo este o segundo maior resultado quando comparado as atividade produzidas nos demais substratos.

O substrato OL (controle) induziu a produção de lipase por apenas três linhagens, sendo a melhor produção obtida pelo Pen 2 com 0,2721 UI/L seguido do Pen 1 com 0,2018 UI/L, que embora sejam superiores as demais linhagens, foram inferiores aos encontrados por Pen 1 em SCp e Pen 5 em SMj. Logo, dos três substratos avaliados é possível aferir que a SMj foi o melhor indutor para a produção desta enzima, pois embora tenha sido registrado o segundo maior valor de atividade para este, todos os *Penicillium* spp. obtiveram produção. E dentre as linhagens, destacou-se o Pen 1 o qual foi o único a expressar atividade enzimática em todos os substratos, podendo ser considerado um bom produtor desta enzima.

Quando avaliada a torta de babaçu como substrato utilizando *Penicillium restrictu*, os melhores resultados foram 0,029 UI/L e 0,030 UI/L em meio enriquecido com peptona 1% (m/m) ou óleo de oliva 2% (v/m) (GOMBERT et al., 1999). WOLSKI et al., (2009) utilizaram como substratos farelo de soja e azeite de oliva com o fungo *Penicillium* sp. cultivado em

FES e FSM, e observaram resultados de 0,015 U/L para a primeira e 0,011 U/L, para a segunda. Verificou-se que esses resultados foram inferiores aos resultados aqui observados, onde a menor atividade foi produzida pelo Pen 1 com 0,036 em SMj (Fig.40).

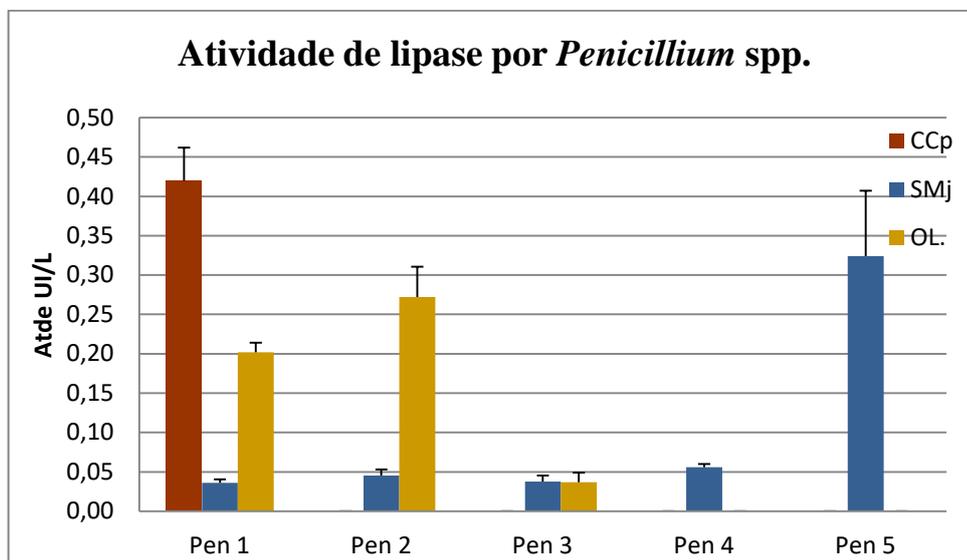


Figura 40: Atividade de lipase por *Penicillium* spp. em SCp, SMj e OL.

5.6. 2 Atividade de lipase por cinco basidiomycetos em SCp, SMj e Ol.

Foi observada a produção pelos basidiomycetos nos três substratos avaliados sendo exceção apenas o Bas 3 e o Bas 5 que não apresentaram atividade em SCp. O substrato SMj, induziu a produção de lipase por todas as linhagens avaliadas, mas com resultados inferiores aos observados em OL. Neste o maior valor de atividade foi encontrado pelo Bas 3 com 0,0591 UI/L e Bas 4 com 0,0422 UI/L. Quando comparado as produções obtidas na SCp, notou-se que para estas linhagens a SMj foi o melhor indutor. No substrato SCp, ocorreu a produção por três linhagens de basidiomycetos, sendo o maior resultado obtido pelo Bas 4 com 0,0678 UI/L e conforme apresenta a figura abaixo os resultados foram próximos para Bas 1 e Bas 2.

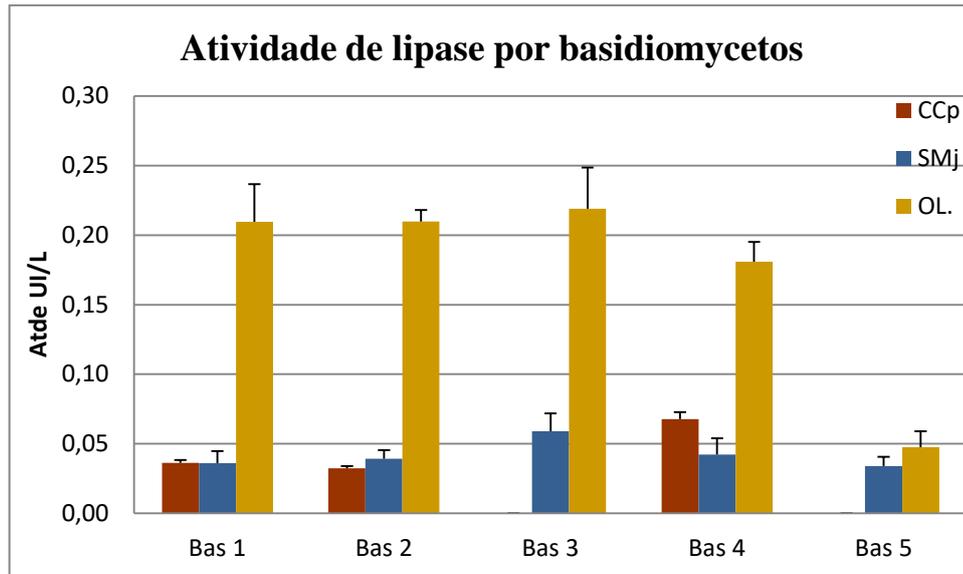


Figura 41: Atividade de lipase por basidiomicetos em SCp, SMj e OL.

5.6.3 Atividade de lipase por cinco *Aspergillus niger* endofíticos em SCp, SMj e OL.

Entre os *Aspergillus* spp., três linhagens produziram lipase em todos os substratos (Fig.42), com a maior atividade encontrada no controle produzida pelo Asp 1 com 0,5361 UI/L. Enquanto no substrato SCp foi registrada atividade igual a 0,3357 UI/L produzida pelo Asp 4. A SMj também foi um bom indutor, pois assim como na SCp foram apresentadas atividades por quatro linhagens, sendo o maior resultado obtido pelo Asp 2 com 0,1326 UI/L.

Verificou-se que a SCp e a SMj foram bons indutores para a produção de lipase para os *Aspergillus* spp., pois ambos induziram a produção por quatro linhagens, com destaque para a SCp. O melhor produtor foi o Asp 4 entretanto vale ressaltar que o Asp 3 não apresentou atividade em nenhum dos substratos avaliados e a boa atividade frente a OL era esperada, uma vez que este era o controle.

KAMINI; MALA; PUVUNAKRISHNAN (1998) utilizaram como substrato torta de gergelim para *Aspergillus niger* e encontraram 0,363 UI/L em 72h de cultivo. MAHADIK et al., 2002 utilizaram este mesmo fungo em farelo de trigo contendo 1% de óleo de oliva e a maior atividade enzimática foi de 0,630 UI/L, sendo maior que as atividades obtidas neste trabalho. MALA et al., (2007), em uma mistura de substratos composta por torta de gergelim e farelo de trigo obteve para esse mesmo fungo, atividade igual a 0,384 UI/L.

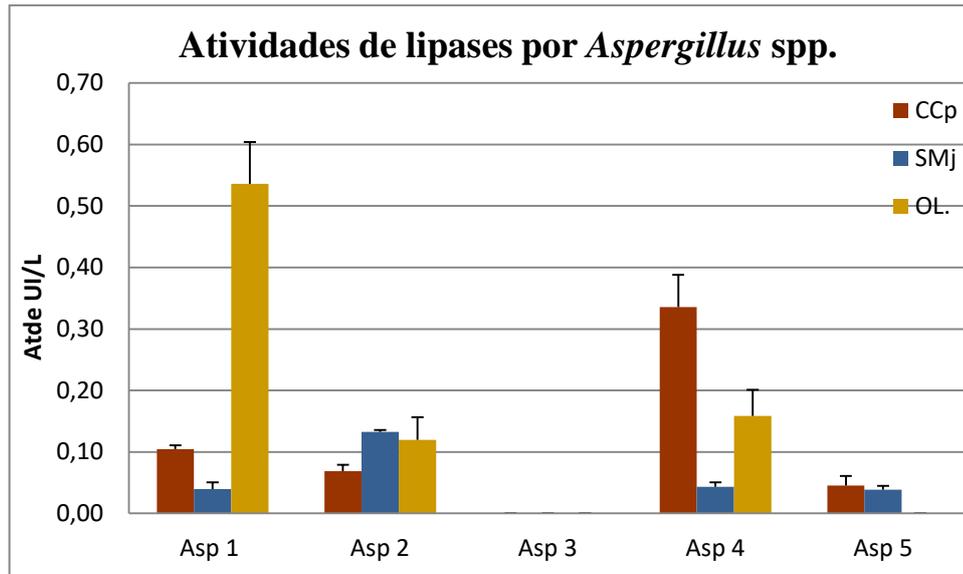


Figura 42: Atividade de lipase pelos *Aspergillus* spp. em SCp, SMj e OL.

As lipases possuem diversas utilidades podendo ser empregadas para diversos fins, tais como na saúde, indústria de medicamento, detergentes, produção de biodiesel, dentre outras, daí a importância de realizar pesquisas com a finalidade de descobrir novas fontes de obtenção desta enzima. (MHETRAS et al., 2009). A atividade de LiP e da Lac tem sido registrada em alguns fungos da podridão branca (ROTHSCHILD *et. al* 2002). Há também muitos estudos com lipases isoladas de *Aspergillus* spp. que apresentam aplicabilidade na indústria farmacêutica, como por exemplo a lipase isolada de *Aspergillus niger*, que realiza de modo excelente a separação de misturas racêmicas, como no caso da síntese enantiomérica do ibuprofeno (CONTESINI et al., 2010)

MLADENOSKA (2001) testou diversos lipídeos como: óleo de girassol, óleo de oliva e sedimentos de óleos de girassol, para verificar o efeito na produção de lipase por *Geotrichum candidum*, dentre estes, os sedimentos de óleo apresentaram os maiores resultados com 0,280 U/L, seguido pelo óleo de girassol 0,200 U/L e óleo de oliva 0,100 U/L. Dos três substratos testados neste trabalho (Fig. 44), observou-se que embora no OL. tenha sido encontrado o maior valor de atividade, produzido pelo Asp 1 com 0,5361 UI/L a SMj induziu a produção de lipases por todas as linhagens, com exceção apenas do Asp 3.

Produção de lipase nos três substratos avaliados

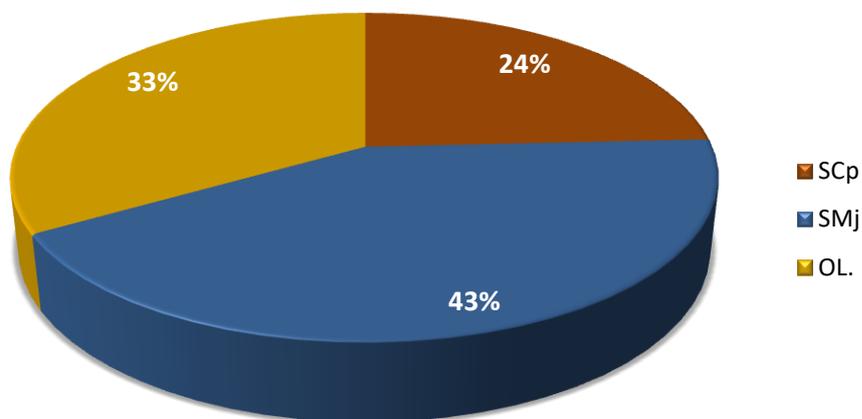


Figura 26: Produção de lipase em SCp, SMj e ÓL.

A composição dos óleos é de extrema importância na especificidade das lipases expressas por cada fungo, sendo a diferença nas propriedades entre os óleos definida pela composição de ácidos graxos em cada um. O óleo de oliva é composto por cerca de 70% de ácido oléico (C18:1), o qual é resultado da hidrólise do óleo e principal indutor da síntese de lipase (DE OLIVEIRA, 2009).

Várias lipases têm sido produzidas através da indução pelo óleo de oliva. Uma lipase alcalina (pH 8.5) produzida por *P. fluorescens* foi estudada por LEE et al. (2003) em meio contendo óleo de oliva emulsificado como fonte de carbono. Similarmente, uma lipase alcalina expressa por *Penicillium expansum* obteve atividade máxima quando crescida em meio contendo óleo de oliva 0.1% em pH 8.3 (SZTAJER et al., 1992).

No substrato SCp os melhores produtores foram os *Aspergillus* spp, enquanto para SMj os *Penicillium* spp., e para OL. os basidiomycetos. Entretanto, a maior atividade enzimática produzida no OL. foi obtida pelo Asp 1 com 0,5361 UI/L, seguido da SCp pelo Pen 1 com 0,4196 UI/L e na SMj pelo Pen 5 com 0,3241 UI/L.

Observou-se que dentre os *Penicillium* spp. houve expressão enzimática apenas pelo Pen1 e nos demais substratos embora tenha ocorrido produção pela maioria das linhagens, os valores obtidos foram menores do que os valores expressos para outras enzimas por uma mesma linhagem. Segundo GONÇALVES (2007) a atividade lipolítica diminui rapidamente assim que atinge seu máximo na produção devido a reações proteolíticas que decompõe a lipase por ação de proteases produzidas durante a fase de crescimento celular.

Na pesquisa realizada por COLEN (2006), utilizando *Colletotrichum gloesporioides* a maior atividade lipásica em FEL foi de 0,025 UI/L. Este resultado foi semelhante a alguns resultados aqui observados, porém bastante inferior ao maior valor obtido pelo Asp 1 no substrato OL. Entretanto TAN et al. (2004), observou em cultivo submerso para o *Penicillium camemberti* cultivado em meio de cultura contendo peptona como fonte orgânica de N atividade igual a 26,00 UI/L. O fungo produtor de lipase é eficiente para hidrolisar lipídios em vários substratos, conforme o observado por alguns pesquisadores, diferenciando frequentemente os valores de atividade obtidos na literatura.

Este trabalho apresentou a produção de lipase por 14 das 15 linhagens utilizadas com exceção apenas do Asp. 3, o que demonstra a capacidade lipolítica desses fungos, para serem utilizados em processos biotecnológicos, levando em consideração que os processos realizados pela natureza são tão eficientes quanto os processos tecnológicos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Através dos resultados das análises foi possível constatar que nas condições de ensaio utilizadas, ocorreram padrões diferenciados quanto a produção de enzimas ligninolíticas. Essa variação na produção das enzimas ocorre devido ao potencial genético que cada grupo de fungos possui, aliado ao fato das fontes serem diversas e não homogêneas.

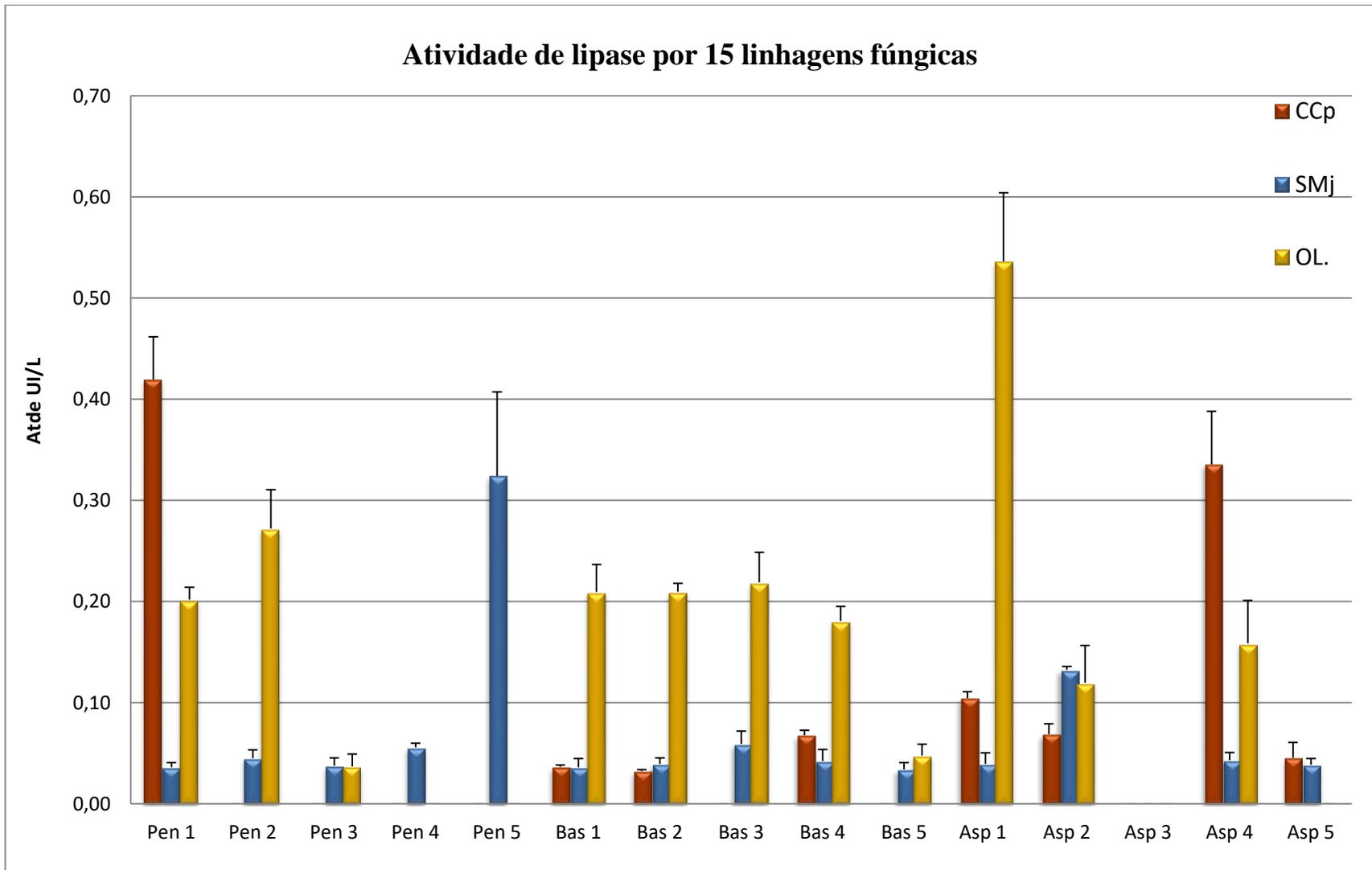


Figura 44: Atividade de lípase pelos basidiomycetos, *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. em três diferentes substratos

Tabela 7: Atividades enzimáticas de Lipase

Linhagens	Lipase					
	SCp		SMj		OL	
Pen 1	0,42	± 0,04	0,04	± 0,00	0,20	± 0,01
Pen 2	0,00	± 0,00	0,05	± 0,01	0,27	± 0,04
Pen 3	0,00	± 0,00	0,04	± 0,01	0,04	± 0,01
Pen 4	0,00	± 0,00	0,06	± 0,00	0,00	± 0,00
Pen 5	0,00	± 0,00	0,32	± 0,08	0,00	± 0,00
Bas 1	0,04	± 0,00	0,04	± 0,01	0,21	± 0,03
Bas 2	0,03	± 0,00	0,04	± 0,01	0,21	± 0,01
Bas 3	0,00	± 0,00	0,06	± 0,01	0,22	± 0,03
Bas 4	0,07	± 0,01	0,04	± 0,01	0,18	± 0,01
Bas 5	0,00	± 0,00	0,03	± 0,01	0,05	± 0,01
Asp 1	0,10	± 0,01	0,04	± 0,01	0,54	± 0,07
Asp 2	0,07	± 0,01	0,13	± 0,00	0,12	± 0,04
Asp 3	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
Asp 4	0,34	± 0,05	0,04	± 0,01	0,16	± 0,04
Asp 5	0,05	± 0,02	0,04	± 0,01	0,00	± 0,00

5.7 Fermentação para obtenção de enzimas lignolíticas a partir da biomassa local

O processo de compostagem busca formar um fertilizante orgânico produzido através de um processo biológico aeróbio de tratamento e estabilização de resíduos orgânicos, sendo que suas características físicas, químicas e biológicas, influenciam diretamente na sua decomposição. Durante esse processo os primeiros a serem decompostos são os açúcares, amidos e proteínas simples, e por fim ocorre a decomposição da proteína bruta e da hemicelulose. A celulose, a lignina e as gorduras são mais resistentes e no decorrer do tempo podem originar substâncias orgânicas com estrutura química mais complexa, genericamente denominadas húmus (MIYASAKA et al., 1983).

Segundo KIEHL (2004) a compostagem é um processo de decomposição microbiana controlado. Neste trabalho para a realização desse processo foram selecionadas duas cepas: Bas 1 e Pen 1 e como fonte de carbono foi utilizado um resíduo agrícola regional: casca de maracujá (CMj).

Após a inoculação das cepas o material foi transportado para um ambiente natural, colocado sobre um estribo e organizado de acordo com o grupo a que pertenciam (Fig. 46), ficando exposto a mudanças de temperatura durante 90 dias. Durante esse período, foram realizados os procedimentos conforme descrito no item 4.7.



Figura 45: Casca de maracujá em ambiente natural após 90 dias de compostagem.

Conforme apresenta a tabela abaixo, durante o processo de compostagem observou-se que o Bas 1 apresentou crescimento a partir do 10º dia de cultivo, e as cascas ficaram densas somente a partir do 15º dia permanecendo assim até o 25º, diferente do que foi observado para o Pen 1 que apresentou um médio crescimento a partir do 5º dia, e as cascas ficaram moles ao atingir o 25º dia e permaneceram assim por aproximadamente três semanas, tornando-se liquefeito após esse período até o final da compostagem. Enquanto o resíduo contendo o Bas 1 tornou-se denso ao completar 15 dias, permanecendo assim por duas semanas e semelhante ao resultado apresentado com inóculo do Pen 1 tornou-se liquefeito com 45 dias.

Tabela 8: Avaliação do crescimento fúngico e da consistência da CMj durante 90 dias de compostagem.

Casca de Maracujá				
Período /dias	Nível de crescimento		Consistência do Resíduo	
	Bas 1	Pen 1	Bas 1	Pen 1
05	-	++	+++	+++
10	+	++	+++	+++
15	++	+++	++	+++
20	++	+++	++	+++
25	++	+++	++	+
30	++	++	+	+
35	+	+	+	+
40	-	+	+	+
45	-	-	-	-
50	-	-	-	-
55	-	-	-	-
60	-	-	-	-
65	-	-	-	-
70	-	-	-	-
75	-	-	-	-

80	-	-	-	-
85	-	-	-	-
90	-	-	-	-

Níveis de crescimento: - (não apresentou crescimento); + (baixo crescimento); ++ (médio crescimento); +++ (alto crescimento).

Níveis de consistência: - (Liquefeito) + (Mole); ++ (Densa); +++ (Rígida)

Grande parte dos pesquisadores tem enfatizado que durante a decomposição do material orgânico ocorre uma fase rápida, e posteriormente uma mais lenta (IGUE, 1984). De acordo com PEREIRA NETO (2007) a concentração de N da matéria orgânica é que determina o tempo necessário para que ocorra a sua decomposição e mineralização. Decorridos 90 dias (Fig. 47), as bolsas herméticas contendo o resíduo e os inóculos foram levadas para o Laboratório de Genética e pesadas individualmente, proporcionando a obtenção do peso final (P_f) para compará-lo ao peso inicial (P_i).

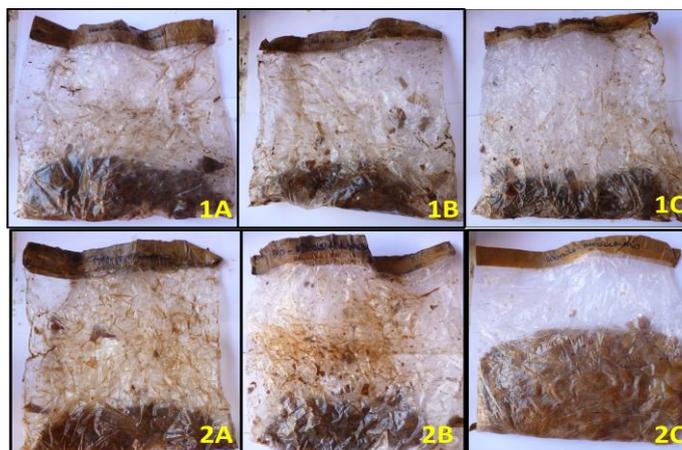


Figura 27: Bolsas hemérgicas contendo o composto obtido após 90 dias: 1A – CMj *in natura* com inóculo do Pen 1; 1B – CMj *in natura* com o inóculo do Bas 1; 1C – CMj *in natura*; 2A – CMj autoclavada com o inóculo do Pen 1; 2B – CMj autoclavada com o inóculo do Bas 1.

Conforme os dados apresentados na figura abaixo é possível observar que ocorreu a degradação de aproximadamente 80 % do resíduo nos grupos onde haviam a presença de micro-organismos, sendo o maior $P_f = 217,13$ g referente ao composto que continha o inóculo do Pen 1 na CMj não autoclavada.

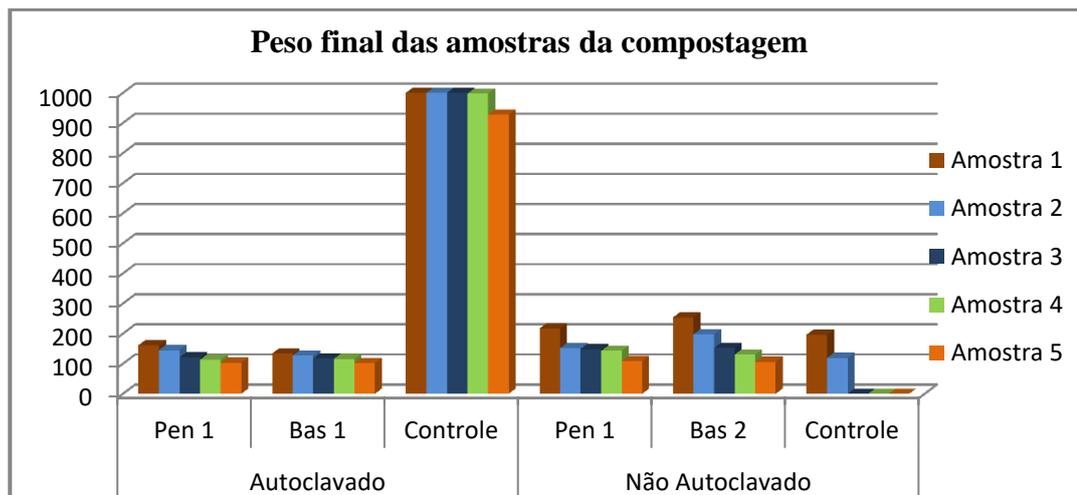


Figura 28: Peso final das cascas de maracujá após 90 dias de compostagem.

Observou-se que no controle (Fig. 48) que continha apenas a CMj autoclavada o peso final foi igual ao inicial, neste não foram realizados inóculos e nem houve a ação de outros micro-organismos, logo o resíduo não foi degradado, e permaneceu inalterado durante 90 dias de compostagem, sendo que duas dessas amostras foram rompidas devido a ação de fenômenos naturais, que causaram uma pequena abertura nas bolsas herméticas possibilitando a entrada de micro-organismos e conseqüentemente a degradação de uma pequena porção do resíduo, o que causou alterações nos pesos finais destas amostras, sendo estes de 997,42 g e 997,75g, diferente das demais que continham 1 kg.

Um fator que está ligado a compostagem é a produção de calor que ocorre durante todo o processo e libera CO_2 e vapor de água (KIEHL, 2004), tais características estão relacionadas ao metabolismo exotérmico dos micro-organismos, à sua respiração e à evaporação de água, que é favorecida pelo aumento da temperatura gerada no interior da massa (ZUCCONI, BERTOLDI, 1991).

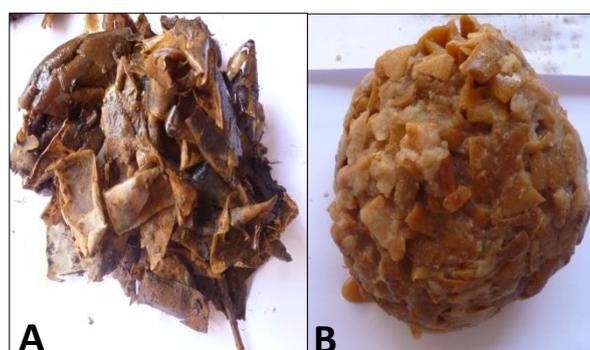


Figura 48: Comparação entre os compostos obtidos após 90 dias: A – Composto com a presença de micro-organismos; B – Casca de maracujá autoclavada.

Os menores pesos foram observados para os compostos que continham o inóculo do Bas 1 com $P_f = 102,11$ g e do Pen 1 com $P_f = 103,42$ g, evidenciando a capacidade que estes micro-organismos possuem em produzir enzimas capazes de degradar os componentes presentes na parede das células vegetais. Observou-se que no composto com a CMj não autoclavada contendo as cepas, os pesos finais também foram baixos, com o menor encontrado no composto com o inóculo do Pen 1 de $P_f = 108,60$ g. Conforme é observado na Fig. 49 os pesos dos compostos variaram de acordo com as condições de cada experimento, é possível observar que nos experimentos contendo os inóculos do Bas 1 e do Pen 1 houve a ação de enzimas produzidas por esses micro-organismos, contribuindo assim para agilizar o processo de compostagem.

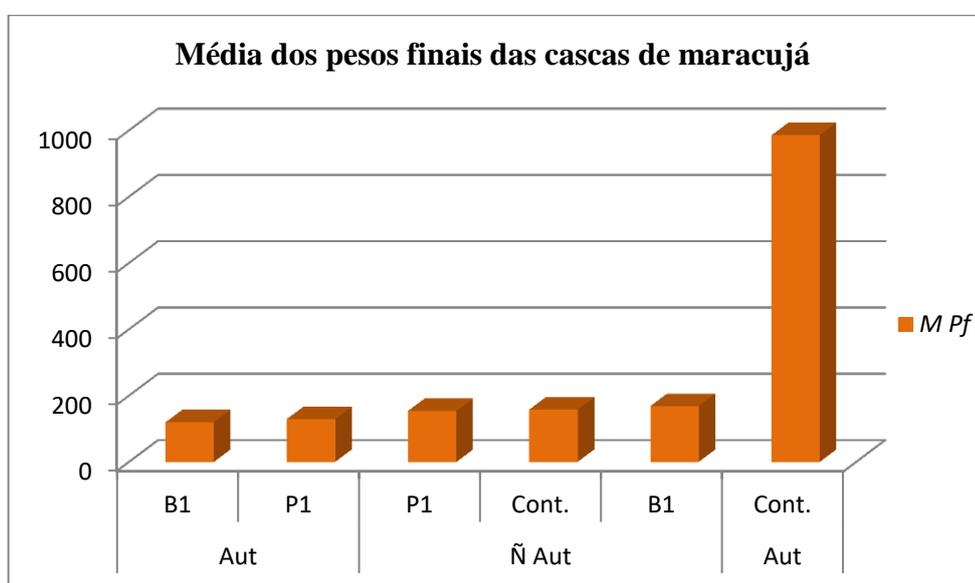


Figura 49: Peso final das amostras utilizadas durante a compostagem.

Após as amostras serem pesadas, destas foram retirados 1 g e realizado o procedimento descrito no item 4.7, sendo possível visualizar o aparecimento de alguns micro-organismos presentes durante a degradação, sendo dois deles semelhantes as cepas inoculadas. De acordo com MILLER (1992), durante o processo de compostagem, devido às modificações nas condições do meio, ocorre uma mudança entre as espécies de micro-organismos, sendo praticamente impossível identificar todos os presentes.

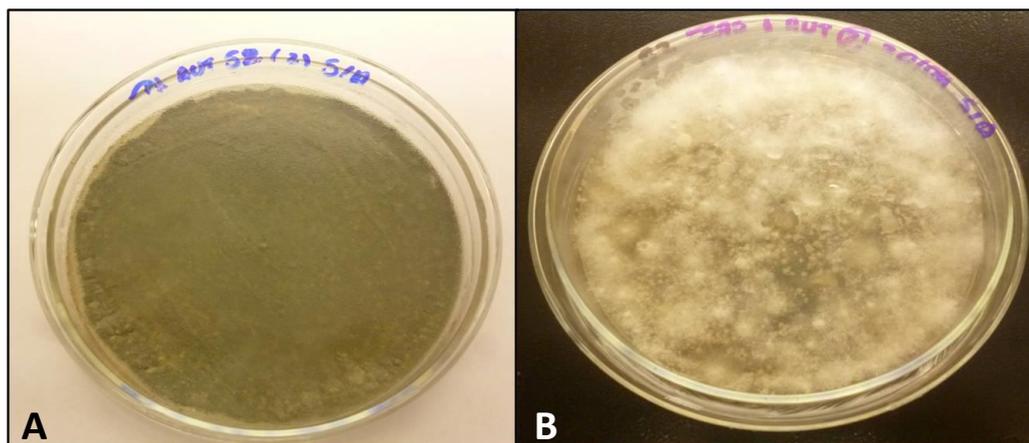


Figura 29: Crescimento fúngico em amostras contendo as cascas de maracujá autoclavada: A – Amostra onde foi realizado o inóculo do Pen 1; B – Amostra onde foi realizado o inóculo do Bas 1.

O restante das cascas foram novamente autoclavadas e posteriormente utilizadas para o plantio de uma espécie de *Curcubita* sp., mantendo a ordem do grupo a que pertenciam. Esse experimento foi realizado em triplicata, sendo separados 105 g do composto formado por cada grupo e misturados a 105 g de solo, e depositados em vasos de 16 cm de diâmetro.

As sementes foram plantadas a 1,5 cm da superfície e durante 30 dias foi observado o crescimento das plantas através das medidas realizadas em intervalos de cinco dias (Fig. 51). Nas amostras que continham o inóculos do *Penicillium* sp. e do basidiomyceto observou-se que as sementes germinaram com apenas 36 h, enquanto no controle não autoclavado só foi observado crescimento após 96 h e no controle autoclavado não ocorreu crescimento durante os 30 dias de compostagem.

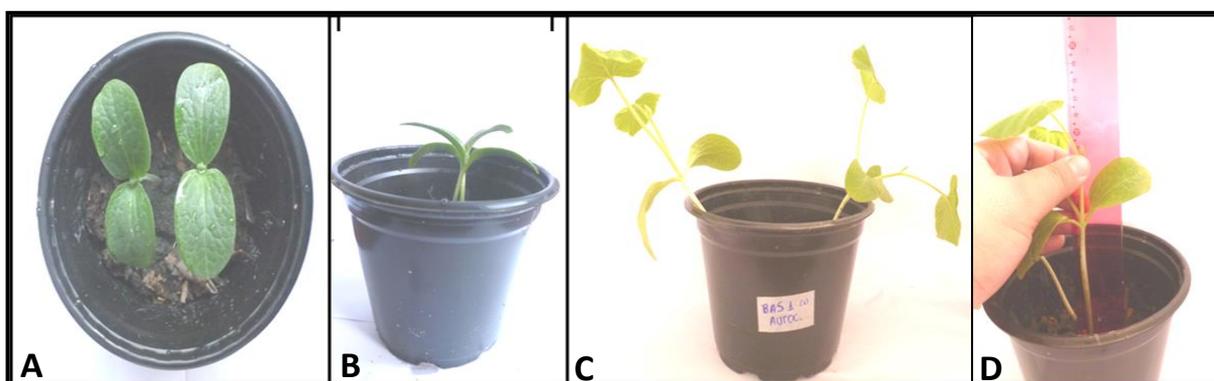


Figura 30: Crescimento de *Curcubita* sp. com intervalos de 5 dias; A – Crescimento após cinco dias; B – Crescimento após 10 dias; C – Crescimento após 15 dias; D – Medida sendo tirada com 20 dias.

O crescimento das plantas foi acompanhado diariamente e observou-se que as mudas cresceram bastante até o 15º dia, e a partir daí o crescimento permaneceu quase constante. No que se refere as amostras contendo o inóculo do Pen 1 (Fig. 52), sendo estas os grupos 1A

e 2A verificou-se que o crescimento das mudas foi muito superior quando comparado ao crescimento das mudas do grupos 1C, 2C e SL. Embora, o grupo 1A tenha tido crescimento inferior ao grupo 2A até o 20º dia, observou-se que a partir do 25º dia as medidas foram as mesmas.

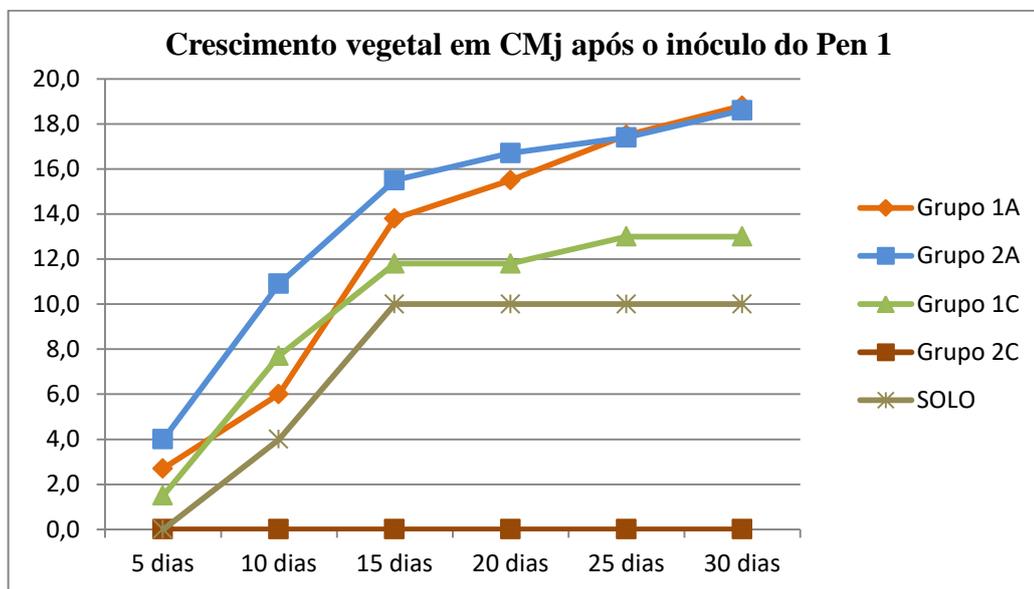


Figura 312: Crescimento de *Curcubita* sp. em compostagem utilizando CMj, após o inóculo do Pen 1.

As mudas plantadas nos vasos que continham o inóculo do Bas 1 (Fig. 53) também obtiveram resultado muito bons, semelhantes aos alcançados nos composto que continham o inóculo do Pen 1. Verificou-se que o grupo 1B apresentou um crescimento muito próximo ao grupo 2B até o 20º dia, sendo que a partir do 25º dia o crescimento foi maior para o grupo 1B, e quando comparados as mudas crescidas no grupo 1C, 2C e Solo, também foram destaque. Vale ressaltar que no grupo 2C no qual havia apenas as cascas de maracujá autoclavadas a semente cultivada não apresentou crescimento durante os 30 dias de observação.

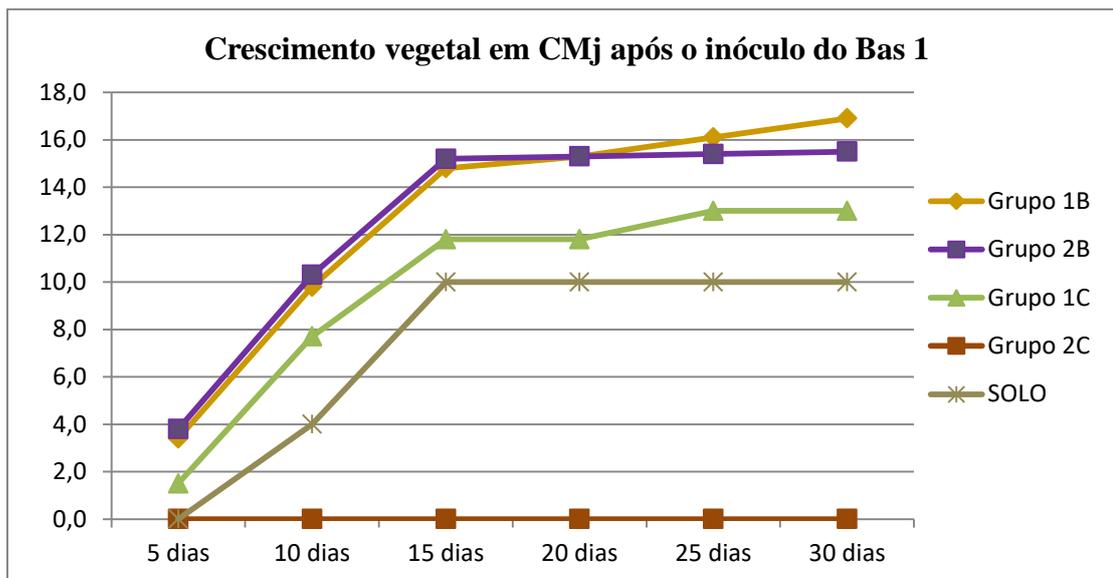


Figura 323: Crescimento de *Curcubita* sp. em compostagem utilizando CMj, após o inóculo do Bas 1.

A figura abaixo apresenta o desenvolvimento *Curcubita* sp. nos seis compostos formados após 90 dias de compostagem. Verificou-se que dentre todos os grupos os melhores crescimentos ocorreram no grupo: 1A e 2A, sendo que ambos continham o inóculo do Pen 1 com a CMj autoclavada *in natura*. Enquanto os inóculos realizados nos grupos 1B e 2B foi o Bas 1, ambos os grupos também apresentaram resultados significativos e muito semelhantes entre si, porém menor do que os encontrados em 1A e 2A mas muito superiores aos encontrados nos demais grupos.

Os grupos 1C e 2C referem-se aos grupos controles, sendo o primeiro apenas o resíduo *in natura* e o segundo a CMj autoclavada. Observou-se que neste segundo, não houve o crescimento de nenhuma muda de *Curcubita* sp. durante os 30 dias de experimento.

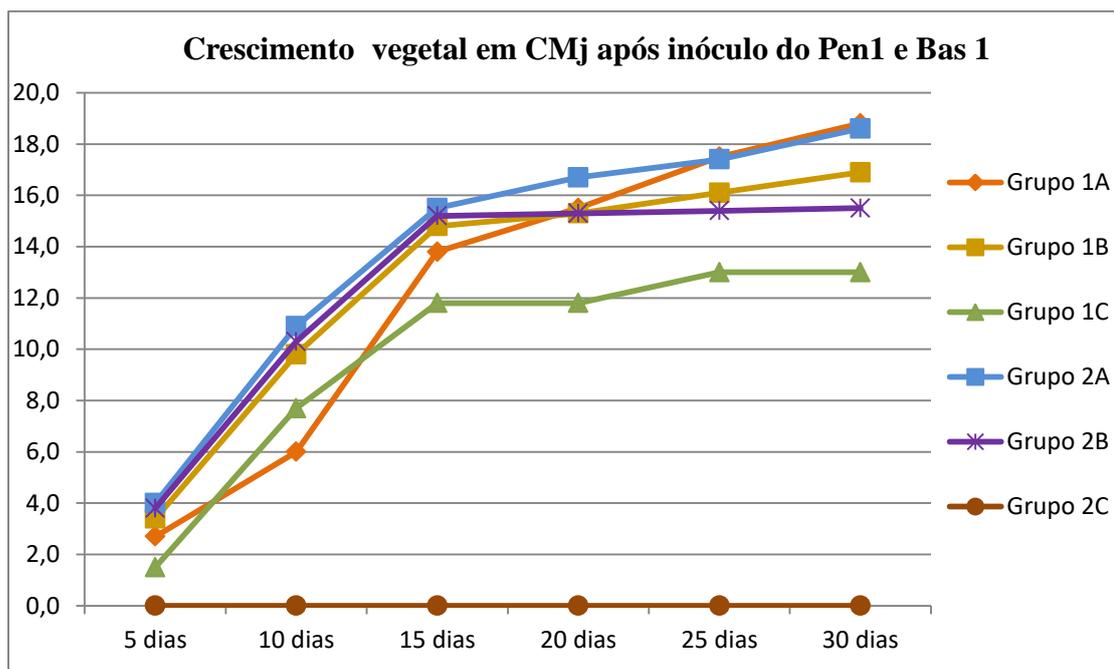


Figura 54: Crescimento de *Curcubita* sp. em compostagem utilizando CMj, após o inóculo do Pen 1 e Bas 1.

Ao comparar os dados referentes crescimento das plantas com o peso das amostras, nota-se que nos grupos 1A e 2A as plantas apresentaram um maior crescimento, e nestes também foram observados os menores pesos, consequência da degradação realizada através da produção de enzimas liberadas pelo fungo inoculado, assim como dos micro-organismos presentes no ambiente.

Neste trabalho foram obtidos resultados bastante significativos, evidenciando a importância da microbiota para o equilíbrio dos ecossistemas, contribuindo para a diminuição dos problemas de escassez de alimentos e saneamento ambiental. Embora a compostagem não seja uma solução final, contribui significativamente para reduzir os danos causados ao meio ambiente devido a disposição desordenada de resíduos e com a recuperação de solos agrícolas (LIMA, 2002).

6 CONCLUSÃO

1. As 10 linhagens cultivadas em FSM mostraram-se boas produtoras de ligninases e lipases.
2. A MnP foi a enzima mais frequente na maioria dos substratos, com os maiores valores de atividade obtidos pelos *Penicillium* spp, sendo o Pen 1 o melhor produtor, e dentre os basidiomycetos, o Bas 1 .
3. A LiP foi a única enzima produzida por todas as linhagens avaliadas, tendo como melhores produtores os *Penicillium* spp., destacando-se o Pen 1, porém na CCp o maior valor de atividade foi obtido pelo Bas 1, sendo este considerado o melhor produtor dentre os basidiomycetos.
4. A Lac foi melhor expressa pelos basidiomycetos com resultados bastante superiores aos obtidos pelos *Penicillium* spp. que embora tenham obtido os maiores valores de atividades para MnP e LiP em nove dos 10 substratos, apresentaram baixas produções para esta enzima, sendo produzida por todas as linhagens em apenas três substratos (CCc, CMx e CMj).
5. Ocorreu a produção de LiP por todas as linhagens utilizadas. A MnP foi produzida em oito substratos, com exceção apenas da CCp e CMj pelo Bas 2. Enquanto para Lac, os substratos foram considerados bons indutores somente para os basidiomycetos, pois dentre os *Penicillium* spp. houve registro de atividades por no máximo duas linhagens em quatro dos 10 substratos.
6. Os basidiomycetos embora não tenham obtidos as maiores atividades foram considerados bons produtores de lípase, sendo os únicos a produzir esta enzima pela maioria das linhagens nos três substratos, com exceção apenas do Bas 3 e 5 em SCp.
7. A SMj foi o único substrato a induzir a produção de lipase por 14 das 15 linhagens utilizadas, sendo o melhor indutor para os *Penicillium* spp., a SCp para os *Aspergillus* spp. e o OL para os basidiomycetos.

8. Na compostagem verificou-se que 90 dias foram suficientes para a degradação do resíduo agrícola, com destaque para o grupo contendo a CMj autoclavada com os inóculos do Bas 1 ou Pen 1.
9. No cultivo de *Curbita* sp. o melhor crescimento foi apresentado nos compostos contendo a CMj autoclavada com o inóculo do Bas 1 ou Pen 1.

O trabalho realizado demonstra o potencial das linhagens utilizadas para a produção de ligninases e lipases através da degradação de resíduos agrícolas regionais, sendo uma alternativa para o aproveitamento da biomassa local, contribuindo com o meio ambiente e colaborando com a produção agrícola.

7 REFERÊNCIAS

- AGUIAR FILHO, J. M. M. Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Agricultura Microbiológica) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.
- ALEXANDRINO, A. M. et al. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolítica por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, 27(2): 364-368, abr.-jun. 2007.
- ARO N, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, Oxford, v. 29, p. 719-739, 2005.
- ARORA, D. D.; CHANDER, . GILL,P.K. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and lacase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration and Biodegradation*, V. 50. P. 115 – 120, 2002.
- AZEVEDO, J. L.; COSTA, S. O. P. Exercícios práticos de genética, São Paulo: EDUSP, p. 288, 1973.
- BADHAN, A.K.; CHADHA, B.S.; KAUR, J.; SAINI, H.S.; BHAT, M.K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 504-510, 2007.
- BALLESTEROS, M. Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomasa: Biocombustibles para el sector del transporte. *Energía*, p. 161(1): 29-34, 2001.
- BAPTISTA, N. M. Q.; SANTOS, A. C., ARRUDA, F. V. F.; GUSMÃO, N. B. Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos. *Scientia Plena*, Aracaju, v. 8, n. 1, p. 1-7, jan. 2012.
- BARBOSA, F.B.C. A biotecnologia e a conservação da biodiversidade amazônica, sua inserção na política ambiental. *Cadernos de Ciência & Tecnologia* 18, p. 69-94. 2001.

- BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, v. 66, n. 2-3, p. 101-7, 1998.
- BJORKLING, F., GODTFEDSEN, S.E., KIRK, O. The future impact of industrial lipases. *TIBTECH*, p. 360-363, 1991.
- BLANCHETTE, R. A. Em The structural conservation of panel paintings: proceedings of a symposium at the J. Paul Getty Museum; Dardes, K.; Rothe, A., eds.; Getty Conservation Institute: Los Angeles, 1998.
- BONONI, V. L. R. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulósicos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. ed. *Microbiologia Ambiental*, Embrapa-CNPMA, Jaguariúna. p. 243-268, 1997.
- BOURBONNAIS R, Leech D, Paice MG. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochemica et Biophysica Acta* 1379:381-39. 1998.
- BRAGA, C. M. S. Microrganismos de solos Amazônicos com potencial na bioconversão de material lignocelulósico em sólidos solúveis. (Dissertação de Mestrado). Universidade do Estado do Amazonas AM, 2009.
- BRAGA, G. U. L.; DESTÉFANO, R. H. R.; MESSIAS, C. L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. *Revista de Microbiologia*, v. 30, n. 2, p. 107-113, 1999.
- BROCKMAN, H. L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: BORGSTROM, B.; BROCKMAN, H. L. (Ed.). *Lipases*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 1-46, 1984.
- CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, 2009.
- CARVALHO, C. C. Produção de Ligninases por Basidiomicetos através de Fermentação em estado sólido, caracterização e aplicação das enzimas. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2005.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v. 42, p. 225-226, 1939.
- COELHO, M. A. Z. Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais: Produção de Enzimas a Partir da Casca de Coco Verde, *B. CEPPA*, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.

- COLEN, G.; JUNQUEIRA, G. R.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, p.881-885, 2006.
- CONTESINI, F.J., LOPES, D.B., MACEDO, G.A., NASCIMENTO, M.d.G., and CARVALHO, P.d.O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 67, 163-171, 2010.
- CUNHA, M.A.; SOLVA, S.S.; CARVALHO, W.; SANTOS, J.C. Uso de células imobilizadas em gel PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. *Ciências Agrárias*, Teresina, v. 26, p. 61-70, 2005.
- D'AGOSTINI, E. C.; MANTOVANI, T. R. D.; DO VALLE, J. S.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Low carbon/nitrogenratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 68, n. 3, p. 295-300, 2011.
- D'ANNIBALE, A. et al. *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive mill wastewater. *Research in Microbiology*. 155:596-603, 2004.
- DURÁN, N., ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. ed. *Microbiologia Ambiental*, Embrapa Jaguariúna. P. 269. 292, 1997.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, p. 510, 2004.
- FASANELLA, C.C.; MONTEIRO, R.T.R. Ação das enzimas lignonilíticas produzidas por *Aspergillus Níger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente, Piracicaba, 2008.
- FENGEL, D.; WEGENER, G.; *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*, Walter de Gruyter: Berlin, p. 613, 1989.
- FENICE, M. et al. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal of Biotechnology*. 100:77-85, 2003.
- FERREIRA, L. F. R. ; Aguiar., M. M ; Messias, T. G ; POMPEU, G. B. ; LOPEZ, A. M. Q. ; SILVA, D. P. ; MONTEIRO, R. T. . Ecotoxicological evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010.

- FORGIARINI, E. Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP). (Dissertação de Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- GOLD LS, SLONE TH, BERNTEIN L. Summary of carcinogenic potency and positivity for 492 rodent carcinogens in the carcinogenic potency database. *Environ Health Perspect* p. 79:259–72, 1989.
- GOLD, M.H.; ALIC, M. Molecular biology of lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* *Microbiology Reviews*.57(3):606-622, 1993.
- GOLDSTEIN, I. S. Chemicals from Lignocellulose. *Biotechnol. and Bioengin.* Symposium. v. 6, p. 293-301, 1976.
- GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*, London, v. 35, p. 85-90, 1999.
- GONÇALVES, F.A.G. Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso. In Faculdade de Farmácia (Belo Horizonte, MG: Universidade Federal de Minas Gerais). 2007.
- GUZMÁN, G. et al. El cultivo de los hongos comestibles. México: Instituto Politécnico Nacional, 1993.
- HAMELINCK, C. N. et al. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, p. 384-410, 2005.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. Wallingford: CABI, v.1, 8 ed., 616 p., 1995.
- HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105, 1422-1432, 2001.
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, v. 118, p. 155-170, 2004.
- IKEHATA, K.; BUCHANA, SCHITC, D.W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal Environmental Engineering Science*, v. 3. p. 1-19, 2004.
- IGUE, K.; PAVAN, M.A. Uso eficiente de adubos orgânicos. p.383-18, 1984,
- INGRAHAM J.L.; INGRAHAM. C.A. Introdução à microbiologia: uma abordagem baseada em estudos de caso. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalyst: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications in lipases. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v. 53, p. 315-351, 1999.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, v. 16, p. 396-403, 1998.
- KAMIDA, H. et al. Biodegradação de Efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.
- KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*, London, v. 33, p. 505-511, 1998.
- KARP, S. G. et al. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 114, p. 735-739, 2012.
- KEREM, Z.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. Lignocellulose degradation during solid state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(4):1121-1127, 1992.
- KHINDARIA, A.; GROVER, T.A.; AUST, S.D. Oxalate-dependent reductive activity of Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 314, p. 301-306, 1994.
- KIEHL, E. J. Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto. 4.ed. Piracicaba: E. J. Kiehl, 173p, 2004.
- KIFFER, E. & MORELET, M. *Les Deutéromycètes – classification et clés d'identification générique*. INRA Editions, Paris, p. 306, 1997.
- KIRK, T. K., S; CROAN, M; TIEN, K. E; MURTAGH, and R. L. FARRELL. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. **Enzyme and Microbial Technology**. p. 27–32, 1986.
- KUMARAN, S.; SASTRY, C.A.; VIKINESWARY, S. Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago-hampas. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 13:43-49, 1997.
- KUWAHARA, M., GLENN, J.K., MORGAN, M.A. and GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxydases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Microbiol. Lett.*, p. 169, 247-250, 1984.

- LECHNER, B.E.; PAPINUTTI, V.L. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. *Process Biochemistry*. 41:594-598, 2006.
- LEE, H.K., Ahn, M.J., Kwak, S.H., Song, W.H., and Jeong, B.C. Purification and characterization of cold active lipase from psychrotrophic *Aeromonas* sp LPB 4. *Journal of Microbiology* 41, 22-27, 2003.
- LEONOWICZ, A., MATUSZEWSKA, A., LUTEREK, J., ZIEGENHAGEN, D., WOJTÁS - WASILEWSKA, M., CHO, N. & HOFRICHTER, M. Review: Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27:175-185, 1999.
- LEVY, B. F. The natural history of the degradation of Wood Phill. *Transactions of royal society of London, London*. V. 321. p. 423-433, 1987.
- LIMA, M.A. Agropecuária brasileira e as mudanças climáticas globais: caracterização do problema, oportunidades e desafios. *Cad. Ciência Tecnol.*, 19: 451-472, 2002.
- LOPEZ, J.M., Comunicação pessoal – Curso Brasil-Espanha, realizado em Manaus/Am, 2009.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S.; *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and molecular biology reviews*. V. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.
- MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.M; DUNLAP, P.V; CLARCK, D.P. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry, London*, v. 38, p. 715-721, 2002.
- MALA, J. G. S.; EDWINOLIVER, N. G.; KAMINI, N. R.; PUVANAKRISHNAN, R. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. *Journal of General and Applied Microbiology, Tokyo*, v. 53, p. 247-253, 2007.
- MATHEUS, D. R. & OKINO, L. K Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: *Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. Bononi, V. L. R. e Grandi, R. A. P. (eds.). São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado de Meio Ambiente. P. 184, 1998.
- MATOS, A. T.; VIDIGAL, S. M.; SEDIYAMA, M. A.; GARCIA, N.C.P.C.; RIBEIRO, M. F. Compostagem de alguns resíduos orgânicos, utilizando-se águas residuárias da

- suinocultura como fonte de nutrientes. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v.2, n.2, p.199-203, 1998.
- MENEZES, CR.; SILVA, I.S.; DURRANT, L.R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas lignocelulósicas. *Estudos Tecnológico*, São Leopoldo, v. 5, n.1, p. 68-78, 2009.
- MHETRAS, N.C., BASTAWDE, K.B., and GOKHALE, D.V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology* 100, 1486-1490, 2009.
- MILLER, F.C. 1992. Composting as a process based on the control of ecologically selective factors. In: Meeting, F.B. Soil Microb. Ecol., 18: 515-543
- MIYASAKA, S.; CAMARGO, O.A.; CAVALERI, P.A.; GODOY, I.J.; WERNER, J.C.; CURI, S.M.; LOMBARDI NETO, F.; MEDINA, J.C.; CERVELINI, G.S.; BULISANI, E.A. Adubação orgânica, adubação verde e rotação de culturas no Estado de São Paulo. Campinas: Fundação Cargill, 1983. p.138, 1983.
- MLADENOSKA, I.D., A. Lipase production by *Geotrichum candidum* - M2. *Bulletim of the Chemists and Technologists of Macedonia* p. 20, 39-43, 2001.
- MOREIRA NETO, Sérgio L. Enzimas Lignofílicas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.
- ONNERUD, H., ZHANG, L., GELLERSTEDT, G., AND HENRIKSSON, G. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis I. *Plant Cell* 14:1953–1962, 2002.
- OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. *Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp*, v.7, p. 1-19, 2006.
- PALMA, M.B., PINTO, A.L., GOMBERT, A.K., Seitz, K.H., KIVATINITZ, S.C., CASTILHO, L.R., FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Appl Biochem Biotech*, p. 84, 1137-1145, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agroindustrial residues: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 69-80, 2000.
- PETERSON, S. W. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based upon rDNA sequence analysis. In *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus*

- Classification, ed. by Samson, R. A. and Pitt, J. I., Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 323–355, 2000.
- PELÁEZ, F. et al. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological Research*. 99(1):37-42, 1995.
- PEREIRA NETO, J.T. Manual de compostagem: processo de baixo custo. UFV. Viçosa. p. 81, 2007.
- PIZARRO, A. V. L.; PARK, E. Y. Lypase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry*, London, v. 38, p. 1077-1082, 2003.
- REYS, L. F. Estudo da degradação de Polietileno Tereftalato (PET) por Fungos Basidiomicetes Lignofílicos. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R.; MARTÍN, C. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**. Vol 33. São Paulo, 2010.
- SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, London, v. 39, p. 239-247, 2003.
- SCHMIDT, P.; WESCHSLER, F. S.; NASCIMENTO, J. S. Tratamento do Feno de Braquiaria pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 32, n. 6, p. 1866-1871, 2003.
- SHARMA, R., CHISTI, Y., and BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances* 19, 627-662, 2001.
- SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol adv*, 19, 627-662, 2001.
- SOARES, C. H. L. Estudos Mecanísticos de degradação de efluentes de indústria de papel e celulose por fungos basidiomicetes degradadores de madeira. 1998. Tese (Doutorado em Química Orgânica) Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1998.
- SOARES, G. M. B. Aplicação de Sistemas enzimáticos à degradação de corantes Têxteis. 2000. 173f. Tese (Doutorado em Engenharia Têxtil) Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2000.
- SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos

- isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.
- STROBEL, G. & DAISY, B.; Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; v. 67; p. 491-502, 2003.
- SZTAJER, H., LUNSDORF, H., ERDMANN, H., MENGE, U., and Schmid, R. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochimica Et Biophysica Acta 1124*, 253-261, 1992.
- TAN, T. et al. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Process Biochemistry*, v. 39, p.1495-1502, 2004.
- TINOCO, R. et al. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 38, p. 531-540, 2011.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Amsterdam, v. 9, p. 113-148, 2000.
- VITORINO, K.M.N.; PEREIRA NETO, J.T. Estudo da compostabilidade dos resíduos da agricultura sucroalcooleira. In: CONFERÊNCIA SOBRE AGRICULTURA E MEIO AMBIENTE, 1., 1992, Viçosa- MF: UFV-NEPEMA. p.121-32, 1994.
- VYAS, B. R. M.; VOLC, J.; SASEK, V.. Effects of temperature on the production of manganese peroxidase and lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* Folia *Microbiologica* , Praga, v. 39, n. 1, p.19-22, 1994.
- WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 3, p. 663-670, 1979.
- WOLSKI, E.; MENUŠI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. *LWT -Food Science and Technology*, London, v. 42, p. 1557-1560, 2009.
- ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnology Bioenergy*, v. 88, p. 797-824, 2004.

ZHAO, J. et al. Comparatives studies of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases produced by selected White rot fungi in solid media. FEMS Microbiology Letters. 145:393-399, 1996.

ZUCCONI, F. AND M. BERTOLDI. Specification for sold waste compost. In: The biocycle guide to the art & science of composting. J.G. Press.Emmaus. p. 200-205, 1991.