

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS  
(CEFET-MG)**

**Marcella Thais Maia**

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EM  
ESCALA INDUSTRIAL PELO FUNGO *TRAMETES VILLOSA***

**Belo Horizonte (MG)**

**2022**

**Marcella Thais Maia**

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTIICAS EM  
ESCALA INDUSTRIAL PELO FUNGO *TRAMETES VILLOSA***

**Trabalho de conclusão de curso apresentado  
como requisito parcial para a obtenção do  
título de Bacharel em Química Tecnológica.  
Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Badotti.**

**CEFET-MG  
Belo Horizonte (MG)  
2022**

**Marcella Thais Maia**

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTIICAS EM  
ESCALA INDUSTRIAL PELO FUNGO *TRAMETES VILLOSA***

**Trabalho de conclusão de curso do Bacharelado em Química Tecnológica**

**CEFET-MG**

**Belo Horizonte, 30 de novembro de 2022**

**Profª Dra. Fernanda Badotti**

**(Orientadora – CEFET-MG)**

**Profª Dra. Andrea Rodrigues Marques**

**(Avaliadora – CEFET-MG)**

**Profª Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes**

**(Avaliadora – CEFET-MG)**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Gerson e Rosilene, e ao meu irmão Bruno, por todo apoio e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me permitiu saúde, dedicação e persistência para realização deste trabalho e dos meus objetivos durante toda a trajetória do curso.

Aos meus pais e irmão, que me incentivaram e apoiaram, dando todo suporte necessário em todos os anos de formação.

Agradeço aos meus amigos que foram presentes durante toda essa jornada do curso, mas em especial à Marcelle por ter sido meu braço direito em todos os momentos de dificuldades e que nunca me deixou desistir.

Agradeço os professores por todo conhecimento transmitido, o coordenador Márcio Basílio por toda ajuda, atenção e suporte necessários para a formação.

Por fim, agradeço a minha orientadora Fernanda Badotti, que além dos conhecimentos compartilhados, foi essencial para a minha formação, dando oportunidades para obtenção de novos conhecimentos em projetos de pesquisas, como esse trabalho, além de todo suporte, apoio e compreensão durante a realização deles.

Muito obrigada!

## RESUMO

Resíduos vegetais lignocelulósicos são matérias-primas renováveis e sustentáveis, desta forma, a bioconversão destas matérias apresenta-se como uma alternativa eficiente para a produção de diversos produtos bioquímicos e químicos de valor agregado. Os resíduos lignocelulósicos são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina, esta última uma matriz fibrosa altamente recalcitrante. Para o aproveitamento de todos os compostos presentes na biomassa vegetal, é necessário que ocorra o processo de despolimerização da lignina e posterior sacarificação dos açúcares que compõe a biomassa. Os fungos basidiomicetos de podridão branca, como a espécie *Trametes villosa*, através da produção de enzimas ligninolíticas como manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e lacases, tem a habilidade de degradar todos os constituintes da parede celular vegetal. Além disso, os sistemas enzimáticos ligninolíticos dos fungos basidiomicetos são os principais responsáveis pela biodegradação de poluentes orgânicos. A principal limitação para as aplicações biotecnológicas em escala industrial utilizando essas enzimas, é o baixo rendimento em processos fermentativos. Sendo assim, pesquisas baseadas na literatura científica especializada foram feitas a fim de compreender as melhores condições de cultivo do fungo *T. villosa*, sua habilidade na produção das enzimas MnP, LiP e lacases em resíduo vegetal, e processos de otimização viáveis que podem incrementar os níveis de produção das enzimas ligninolíticas em processos fermentativos.

**Palavras-chaves:** *Trametes villosa*; Resíduo Ligninolítico; Deslignificação; Enzimas industriais; Biorremediação.

## ABSTRACT

Lignocellulosic plant residues are renewable and sustainable raw materials, in this way, the bioconversion of these materials presents itself as an efficient alternative for the production of various value-added biochemical and chemical products. Lignocellulosic residues are made up of cellulose, hemicellulose and lignin, the latter being a highly recalcitrant fibrous matrix. For the use of all the compounds present in the plant biomass, it is necessary that the process of depolymerization of lignin and subsequent saccharification of the sugars that compose the biomass occur. White rot basidiomycete fungi, such as *Trametes villosa*, through the production of ligninolytic enzymes such as manganese peroxidase (MnP), lignin peroxidase (LiP) and laccases, have the ability to degrade all plant cell wall constituents. In addition, the ligninolytic enzyme systems of basidiomycete fungi are primarily responsible for the biodegradation of organic pollutants. The main limitation for biotechnological applications on an industrial scale using these enzymes is the low yield in fermentation processes. Therefore, researches based on specialized scientific literature were carried out in order to understand the best conditions for the cultivation of the fungus *T. villosa*, its ability to produce MnP, LiP and laccase enzymes in plant residues, and viable optimization processes that can increase the production levels of ligninolytic enzymes in fermentation processes.

.

**Key words:** *Trametes villosa*; Ligninolytic Residue; Delignification; Industrial enzymes; Bioremediation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 – Árvore das relações filogenéticas entre os sub-reinos, filos, classes e ordens do Reino Fungi.....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 2 – <i>Trametes villosa</i> (Sw.) Kreisel.....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 3 – Representação esquemática da molécula de celulose.....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 4 – Representação esquemática da hemicelulose.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 5 – Representação esquemática da lignina.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 6 – Biodegradação da lignina por fungos basidiomicetos de podridão branca....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 7 – Exemplos de compostos xenobióticos degradados por basidiomicetos.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 8 – Estrutura esquemática da lignina e estrutura tridimensional da lignina peroxidase.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 9 – Ciclo catalítico da LiP.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 10 – Mecanismo estado inicial MnP e sua estrutura tridimensional.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 11 – Ciclo catalítico de MnP.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 12 – Formação de CO<sub>2</sub> por manganês peroxidase a partir de estruturas de lignina.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 13 – Estrutura tridimensional da lacase: extremidade N-terminal (azul) à C-terminal (vermelho). Átomos de cobre em formato de esferas, sítios T1 em azul e par T3 em amarelo.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 14 – Ciclos catalíticos de lacases e estrutura tridimensional.....</b>	<b>24</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 – Composição química de algumas biomassas lignocelulósicas.....</b>	<b>5</b>
<b>Tabela 2 – Organismos degradadores de lignina.....</b>	<b>9</b>
<b>Tabela 3 – Enzimas que atuam da degradação de substratos lignocelulósicos.....</b>	<b>16</b>
<b>Tabela 4 – Valores de pH ótimo para produção de enzimas lacases de basidiomicetos.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabela 5 – Características das enzimas ligninolíticas.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabela 6 – Temperatura ótima de lacases de alguns basidiomicetos.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 7 – Atividade de <i>T.villosa</i> na produção de MnP (bruto e específico) na fermentação em estado sólido de bagaço de cana de açúcar.....</b>	<b>33</b>

## SIGLAS E ABREVIATURAS

**ABTS** – 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

**AL** – Água Lignina

**BGC** – Bagaço de cana

**CCMB** – Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia

**CSS** – Cultivo sobre substrato sólido

**CuZnSOD** – Cobre-Zinco Superóxido Dismutase

**DMF** – Dimetoxifenol

**EC** – *Enzyme commission* (classificação bioquímica das enzimas)

**FeSOD** – Ferro Superóxido Dismutase

**GLOX** – Glioxal oxidase

**GMC** – Glicose-Metanol-Colina

**HBT** – Hidroxibencotriazol

**HCB** – Hexaclorobenzeno

**HCBU** – Hexaclorobutadieno

**HPAs** – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

**KDa** – Quilodalton

**LiP** – Lignina Peroxidase

**MEA** – Ágar Extrato de Malte

**MM** – Massa Molecular

**MnP** – Manganês Peroxidase

**MnSOD** – Manganês Superóxido Dismutase

**PCA** – Pentacloroanisol

**PCF** – Pentaclorofenol

**qPCR** – *Real time quantitative PCR*

**pI** – Ponto Isoelétrico

**RBBR** – *Remazol Brilliant Blue R*

**SOD** – Superóxido dismutase

***T.versicolor*** – *Trametes versicolor*

***T.villosa*** – *Trametes villosa*

**TCDTB** – Tetraclorodietoxibenzeno

**TriCEB** – Triclorodietoxibenzeno

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>Fungos.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Fungos basidiomicetos lignocelulolíticos decompositores de madeira.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Fungos do gênero <i>Trametes</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>3.2</b>	<b>Estrutura biomassa lignocelulósica.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Celulose.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Hemicelulose.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Lignina.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Casca de coco.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Bagaço de cana de açúcar.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Fibra de Sisal.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3</b>	<b>Biorremediação e a aplicação de fungos basidiomicetos lignocelulolíticos.....</b>	<b>12</b>
<b>3.4</b>	<b>Biodegradação da lignina e de poluentes orgânicos por fungos basidiomicetos.....</b>	<b>14</b>
<b>3.5</b>	<b>Enzimas ligninolíticas.....</b>	<b>18</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Lignina Peroxidase.....</b>	<b>19</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Manganês Peroxidase.....</b>	<b>21</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Lacases.....</b>	<b>23</b>
<b>3.6</b>	<b>Seleção de fungos ligninolíticos produtores de enzimas de interesse industrial.....</b>	<b>25</b>
<b>3.7</b>	<b>Condições ótimas de cultivo de fungos basidiomicetos.....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De modo geral, os fungos são considerados degradadores de matéria orgânica no meio ambiente e, ecologicamente, tem um papel importante na ciclagem de nutrientes. Os fungos apresentam maior interesse nos processos de biorremediação quando comparados as bactérias heterotróficas, tendo em vista que estas possuem metabolismo limitado, onde o sistema enzimático só é produzido na presença de um contaminante, o que gera baixa eficiência na sua degradação. Por outro lado, os fungos nas mesmas condições, tem a capacidade de crescerem e se desenvolverem, gerando resultados satisfatórios nos processos de biorremediação (TUOMELA *et al.*, 2000).

Os fungos basidiomicetos toleram concentrações elevadas de poluentes orgânicos em um determinado meio, o que tornam esses microrganismos eficazes nos processos de biorremediação. Portanto, é necessário e indispensável o conhecimento das características físico-químicas das enzimas ligninolíticas produzidas por esses fungos, uma vez que, altas concentrações dos poluentes em culturas fúngicas podem interferir diretamente nos processos metabólitos vitais para o fungo, alterando a produção e a atividade de suas enzimas (MOREIRA-NETO, 2006).

Os fungos desempenham diversos papéis fundamentais e benéficos para o meio ambiente. O isolamento de potenciais espécies fúngicas é de suma importância para a utilização em uma vasta gama de setores industriais, dentre eles a indústria de enzimas (NAHER *et al.*, 2021).

O fungo *Trametes villosa* é considerado um basidiomiceto lignícola, pertence ao reino Fungi, Filo Basidiomycota e da Família Polyporaceae (MATHEUS *et al.*, 2000). É facilmente encontrado no Brasil e sua cepa possui alto potencial biotecnológico comprovado na utilização de indústrias devido a sua habilidade de produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas com eficiência na degradação de lignocelulose, capaz de, por exemplo, mineralizar pentaclorofenol e hexaclorobenzeno no solo, além de atuar na degradação de corantes sintéticos reativos (ANDRIANI *et al.*, 2020; MACHADO *et al.*, 2005; MATHEUS *et al.*, 2000).

Comparada com outras espécies do gênero, a espécie *Trametes villosa* é pouco estudada, mas, em contrapartida, há estudos demonstrando o seu alto potencial de produção de lacases, peroxidases e celulases em substratos lignocelulósicos. Silva *et al.* (2014), relatou que o isolado fúngico demonstrou capacidade de produção de Manganês Peroxidase (MnP) e Lignina Peroxidase (LiP) em compósitos biodegradáveis, como o bagaço de cana (CARNEIRO *et al.*, 2017; CONIGLIO *et al.*, 2019, 2020; SILVA *et al.*, 2014).

Os resíduos lignocelulósicos são matérias-primas renováveis e sustentáveis, portanto, a bioconversão desses resíduos é considerada uma alternativa viável e eficaz para a produção de biocombustíveis e produtos químicos com valor econômico (TOMÉ, 2021). A bioconversão desses resíduos exige o processo de deslignificação, que irá promover a liberação de celulose e hemicelulose que serão hidrolisados a açúcares simples, como a glicose e xilose. Para a realização deste processo estão envolvidas uma diversidade de enzimas fúngicas (MnP, LiP, lacase, celulase, hemicelulase) que apresentam resultados satisfatórios para a degradação de lignina, que ocorre a partir da ação concomitante das enzimas ligninolíticas em diferentes reações oxidativas, quebrando a estrutura aromática e possíveis ligações existentes entre as unidades básicas do polímero (CARDOSO, 2009).

Como já mencionado, a biomassa lignocelulósica é constituída por uma diversidade de componentes, o que conseqüentemente, é fonte para obtenção de uma vasta gama de compostos químicos e bioquímicos comercializáveis através da conversão da lignina, celulose e hemicelulose (BILAL *et al.*, 2018). Além disso, a utilização dessa biomassa lignocelulósica contribui diretamente para a bioeconomia, a sustentabilidade e para a economia circular, tendo em vista que, sua composição inclui resíduos sólidos, agrícolas e agroindustriais que são fontes para obtenção, por exemplo, de energias renováveis (CARUS; DAMMER, 2018).

Diversos estudos destacam a grande produção de enzimas ligninolíticas por basidiomicetos, mas um dos principais desafios de aplicação dessas enzimas em processos industriais é a obtenção em grande escala e com custos competitivos, uma vez que, as enzimas Lignina Peroxidase (LiP), Manganês Peroxidase (MnP) e Glioxal Oxidase (GLOX), por exemplo, apresentam grande potencial de aplicabilidade em processos industriais biotecnológicos de vários setores socioeconômicos, seja na biorremediação de efluentes de indústrias têxteis, degradação de polímeros, explosivos nitrados, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos ou até mesmo nas indústrias farmacêuticas, cosméticas, de papel e celulose, alimentos, entre outras (BREXÓ, 2013; YOSHIDA, 2015).

O objetivo desse trabalho é promover um estudo sobre a viabilidade da produção de enzimas ligninolíticas em escala industrial pelo fungo *Trametes villosa*, avaliando as melhores condições de cultivo do fungo *T. villosa*, sua habilidade na produção das enzimas MnP, LiP e lacases em resíduo vegetal, e processos de otimização viáveis que podem incrementar os níveis de produção das enzimas ligninolíticas em processos fermentativos.

## 2 METODOLOGIA

Para a realização do presente trabalho foram feitos estudos de diversos periódicos, publicações e artigos. Foram utilizados bancos de dados SCIELO, Web of Science, Periódicos Capes, biblioteca virtual Pearson e Google acadêmico. O período de seleção dos estudos foi realizado entre agosto de 2021 e outubro de 2022, utilizando como palavras chaves na busca eletrônica: fungo *Trametes villosa*, produção de enzimas ligninolíticas por basidiomicetos, aplicação de enzimas ligninolíticas em escala industrial, resíduos ligninocelulósicos utilizados por basidiomicetos para produção de enzimas, fungos com potencial de biorremediação.

Inicialmente foi realizada uma pesquisa de revisão bibliográfica dos principais fungos basidiomicetos de podridão branca, uma vez que, estes são os principais fungos com potencial de biorremediação devido ao fato de produzirem enzimas extracelulares específicas, como lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase que atuam na degradação de inúmeros substratos (MADIGAN, 2016).

Em seguida, a pesquisa foi direcionada especificamente para literaturas relacionadas ao fungo da espécie *Trametes villosa*, já que, de acordo com resultados prévios de pesquisas realizadas, este isolado demonstra alto potencial de produção de enzimas em substratos lignocelulósicos, tal como Manganês Peroxidase (MnP) e Lignina Peroxidase (LiP) (GIMENES, 2011; YAMANAKA *et al.*, 2008; CARNEIRO *et al.*, 2017; ANDRIANI *et al.*, 2020; ATILANO-CAMINO *et al.*, 2020).

Posteriormente, a fim de compreender os mecanismos genéticos que regulam a capacidade de produção de enzimas ligninolíticas pelo fungo *Trametes villosa*, foram feitas pesquisas bibliográficas de estudos focados na análise do sequenciamento de genoma e análise dos genes relacionados a codificação das enzimas relacionadas a degradação da lignina e análises bioquímicas da avaliação da produção de enzimas ligninolíticas pelo fungo *Trametes villosa* em diferentes meios de cultura (TOMÉ, 2021; GIMENES, 2011; ANTUNES, 2015; MACHADO 2018).

Por fim, foram feitas pesquisas específicas sobre a viabilidade de produção em escala industrial de enzimas ligninolíticas, fatores que afetam a produção dessas enzimas e seu meio de cultura ideal, bem como as técnicas que podem ser utilizadas para um incremento nos níveis de suas produções, sabendo-se que a enzimas ligninolíticas são produzidas, mas em baixos níveis (SILVA, 2014).

### 3 DESENVOLVIMENTO

#### 3.1 Fungos

Fungos são seres eucarióticos microscópicos ou macroscópicos, degradadores de matéria orgânica na natureza e estão presentes em uma diversidade de nichos ecológicos sob a forma micelial ou leveduriforme. Estes microrganismos, em sua maioria, são sapróbios, constituem o Reino Fungi, com uma grande variedade no ponto de vista fisiológico e morfológico (ÉSPÓSITO; AZEVEDO, 2010; RAJA *et al.*, 2017). Em termos ecológicos, tem importante papel na ciclagem de nutrientes, participando ativamente nos ciclos de carbono, nitrogênio, fósforo e potássio (TUOMELA *et al.*, 2000).

Os fungos, fisiologicamente, são heterotróficos aeróbicos, mas em algumas condições são considerados anaeróbios facultativos, com exigências nutricionais simples por meio da absorção de nutrientes, podendo utilizar diferentes fontes de carbono para o seu crescimento, como glicose, xilose, celulose, hemicelulose, lignina, entre outros compostos. Entretanto, também há fungos que sobrevivem em ambientes extremos, com quantidades mínimas de nutrientes, como nas regiões polares, denominados fungos oligotróficos (ESPÓSITO; AZEVEDO, 2010; WALKER; WHITE, 2005).

De acordo com seus papéis ecológicos, os fungos como já mencionado, podem ser considerados sapróbios, mas existem também os fungos simbióticos ou parasitas. Os fungos sapróbios irão atuar, principalmente, na decomposição de matéria orgânica, o que enfatiza a sua importância nos ecossistemas florestais, além de terem um papel importante na ciclagem do carbono. Os fungos simbióticos, por sua vez, irão estabelecer relações mutualísticas, muitas vezes benéficas com outros organismos, como por exemplo nas micorrizas, onde o fungo absorve açúcares e as plantas aumentam a captação de nutrientes. Já os fungos parasitas são considerados causadores de doenças, ou seja, são responsáveis pela infecção de animais, plantas e outros fungos (ESPÓSITO; AZEVEDO, 2010; SCHMIDT-DANNERT, 2016).

Atualmente há aproximadamente 125 mil espécies de fungos descritas e são estimados entre 2 a 5 milhões espécies não descritas. O Reino Fungi é composto por espécies classificadas em 12 filos diferentes, divididos entre 6 sub-reinos: Dikarya, composto pelos filos Ascomycota, Basidiomycota e Entorrhizomycota; Chytridiomycota, que inclui os filos Chytridiomycota, Monoblepharidomycota e Neocallimastigomycotae; Opisthosporidia, composto pelos filos Aphelidiomycota, Cryptomycota e Microsporidia; além dos filos Mucoromycota, Zoopagomycota e Blastocladiomycota, como ilustrado na Figura 1 (JAMES *et al.*, 2020).

A maior parte da diversidade fúngica se tratando das espécies descritas está concentrada no sub-reino Dikarya, sendo composto por Ascomycota, Basidiomycota e Entorrhizomycota,





### 3.1.1 Fungos basidiomicetos lignocelulolíticos decompositores de madeira

Os fungos basidiomicetos, especialmente, tem como principal atividade ecológica, a decomposição de madeiras, tecidos, papéis e outros resíduos de fontes naturais. Os fungos basidiomicetos lignocelulolíticos são conhecidos pelo potencial em degradação de compostos orgânicos recalcitrantes, como por exemplo, a lignina (MADIGAN, 2016).

A degradação da lignina por basidiomicetos, bem como outros compostos recalcitrantes, ocorre por um processo co-metabólico intermediado pela ação de um sistema enzimático e metabólitos de baixa massa molecular. E para que a degradação ocorra de forma positiva, fatores como as condições de cultura e a composição do meio, seja natureza ou concentração de fontes de carbono, nitrogênio, metais presentes, pH, agitação e adição de substâncias, devem ser favoráveis para que a expressão do sistema enzimático (YAMANAKA *et al.*, 2008).

São conhecidos três tipos de podridão da madeira: a podridão parda ou marrom, podridão branca e podridão mole (Tabela 1). Os basidiomicetos ligninolíticos provenientes da decomposição marrom degradam em alta velocidade, a celulose e a hemicelulose, enquanto a lignina não é metabolizada, mas são capazes de modificar algumas de suas extensões por desmetilação das unidades fenólicas e não fenólicas, além de uma limitada hidroxilação do seu anel aromático (ESPÓSITO-AZEVEDO, 2010; MADIGAN, 2016; MOREIRA-NETO, 2006). Já os basidiomicetos provenientes da decomposição branca, considerados dentre os microorganismos os mais eficientes na degradação da lignina na natureza, são capazes de atuar na degradação de todos os constituintes da madeira (celulose, hemicelulose e lignina) seja de forma seletiva ou simultânea (MADIGAN, 2016).

A delignificação por fungos de maneira seletiva, a lignina é removida sem perda marcante de celulose, já a não seletiva ou simultânea, ocorre a degradação de todos os componentes da parede celular. *Phanerochaete chrysosporium* apresenta algumas linhagens capazes de degradar simultaneamente hemicelulose, celulose e lignina. Enquanto *Ceriporiopsis subvermispora* tende a remover a lignina e depois avançar para a hidrólise de celulose (SÁNCHEZ, 2009; TUOMELA *et al.*, 2000). Por fim, basidiomicetos de podridão mole, mesmo que com capacidade de atuarem na degradação de todos os componentes da madeira, são em taxas mínimas, quando comparados as fungos de podridão branca e parda (ANDRIANI *et al.*, 2020; ESPÓSITO-AZEVEDO, 2010; MOREIRA-NETO, 2006).

**Tabela 1 – Organismos degradadores de lignina (TUOMELA *et al.* 2000).**

Organismo	Filo	Degradação da lignina	Ambiente	Alguns gêneros

Fungos da podridão branca	Basidiomycota (Ascomycota)	Mineralização da lignina, deslignificação seletiva ou não seletiva	Principalmente madeira dura	<i>Phanerochaete</i> , <i>Phlebia</i> , <i>Trametes</i>
Fungos da podridão parda	Basidiomycota	Modificação da lignina	Principalmente madeira mole	<i>Poria</i> , <i>Polyporus</i>
Fungos da podridão mole	Ascomycota ou fungos anamorfos	Limitada degradação da lignina	Ambientes aquáticos, madeira com umidade elevada, serrapilheira	<i>Chaetomium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Fusarium</i>
Bactérias	Actinomycetes ou Mixobactéria	Limitada desgradação da lignina	Sapwood, madeira saturada de água, madeira em estágio avançado de decomposição, serapilheira	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i>

Estudos sugerem diversos tipos de linhagens fúngicas envolvidas na degradação de compostos recalcitrantes, dentre elas estão: *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes villosa*, *Higrocybe* sp., *Lentinus crinitus*, *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Peniophora cinérea* e *Psilocybe castanella* (GUGLIOTTA, 2001; MACHADO *et al.*, 2005; MATHEUS *et al.*, 2000). Entre os fungos basidiomicetos, pesquisas recentes demonstraram que fungos do gênero *Trametes* possuem alto potencial de degradação lignocelulósica, devido a suas habilidades de produção de enzimas que atuam nesse processo (CARNEIRO *et al.*, 2017; CONIGLIO *et al.*, 2019, 2020; SILVA *et al.*, 2014; YAMANAKA *et al.*, 2008).

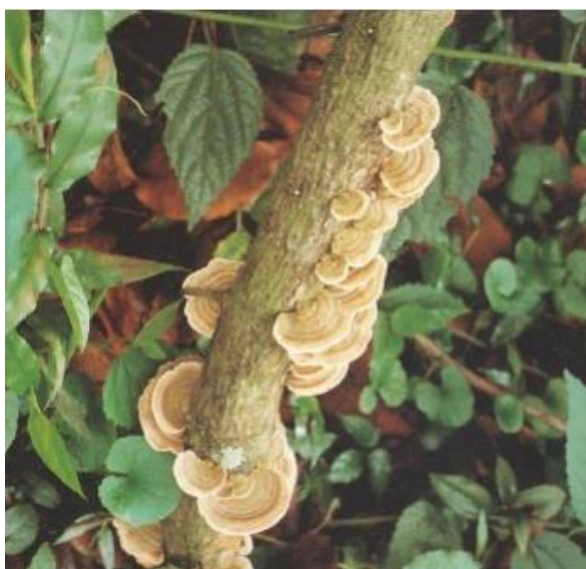
### 3.1.2 Fungos do gênero *Trametes*

*Trametes* é um gênero cosmopolita que está presente em praticamente qualquer tipo de ecossistema florestal com áreas temperadas, boreais e tropicais. Fisiológica e morfológicamente, fungos pertencentes ao gênero *Trametes* (Polyporales, Basidiomycota) podem ser classificados como fungos de podridão branca e caracterizados através da formação de basidiocarpos pileados, himenóforos poróides, sistema de hifas trimíticas com a produção de basidiósporos lisos de paredes finas não reagentes na presença do reagente Melzer (reagente químico para identificação de fungos) (JUSTO; HIBBETT, 2011).

O fungo do gênero *Trametes villosa* (Figura 2) pertence ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota e Família Polyporacea e é considerado um fungo basidiomiceto lignícola. Mesmo que pouco estudada quando comparada a outras espécies do mesmo gênero (*Trametes hirsuta*, *Trametes trogii* e *Trametes versicolor*), através de estudos já demonstrados, a espécie *Trametes villosa* é

uma cepa com alto potencial biotecnológico comprovado, com habilidade de produzir enzimas hidrolíticas e oxidativas que atuam diretamente e de forma eficiente na degradação de lignocelulose, além da sua capacidade de produzir lacases, peroxidases e celulases em resíduos lignocelísicos e de mineralizar pentaclorofenol e hexaclorobenzeno no solo, atuando na degradação de corantes sintéticos reativos (ANDRIANI *et al.*, 2020; ATILANO-CAMINO *et al.*, 2020; CARNEIRO *et al.*, 2017; GIMENES, 2011; YAMANAKA *et al.*, 2008).

**Figura 2 – *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel**



### **3.2 Estrutura biomassa lignocelulósica**

Considerada uma das maiores fontes de carbono e energia da superfície terrestre, a biomassa lignocelulósica é uma matéria-prima renovável e sustentável. Majoritariamente, fazem parte da sua composição a lignina, celulose e hemicelulose. Se tratando de números, a composição química da biomassa lignocelulósica, geralmente contém entre 30 a 50% de celulose, 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e pequenas quantidades de outros compostos como pectinas, proteínas, extrativos e cinzas, mas sofre variações dependendo da espécie de plantas, tecidos de acordo com seu genótipo e condições ambientais, conforme demonstrado na Tabela 2 (SANTOS *et al.*, 2012).

São gerados pela agroindústria grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos por ano. Esses resíduos podem ser reutilizados por microrganismos como substratos para conversão em produtos com alto valor agregado como: enzimas, biocombustíveis e outros produtos bioquímicos. Os bioprodutos provenientes da fermentação de glicose, utilizada como substrato para o crescimento microbiano, podem ser obtidos de resíduos lignocelulósico a partir da sua

conversão em açúcares fermentáveis (LOPEZ *et al.*, 2007; SÁNCHEZ, 2009; SONGULASHVILI *et al.*, 2007; VIKINESWARY *et al.*, 2006).

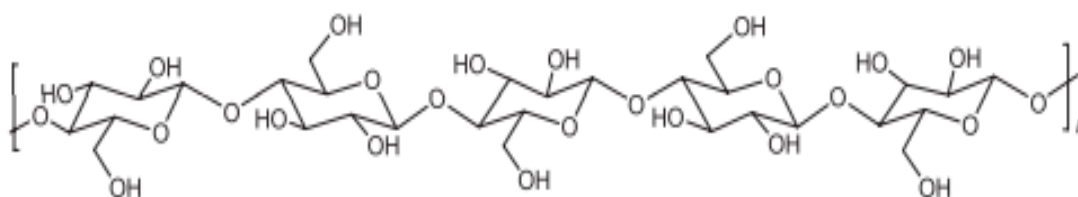
**Tabela 2 – Composição química de algumas biomassas lignocelulósicas (SANTOS *et al.*, 2012)**

Biomassa lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	43-47	25-35	16-24
Espiga de milho	45	35	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

### 3.2.1 Celulose

A celulose é considerada um polímero natural, com estrutura menos complexa (Figura 3) e o mais abundante dentre os polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica. Tem em sua estrutura três diferentes níveis organizacionais. O primeiro nível está associado a sequência de resíduos  $\beta$ -D-glicopiranosídicos unidos por meio de ligações covalente formando um polímero de anidroglicose  $\beta$ -D (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas. Outro nível organizacional é o que irá descrever a conformação molecular e é caracterizado pela distância das ligações e respectivos ângulos, bem como as ligações de hidrogênio intramoleculares presentes. O terceiro e último nível é aquele que define a associação das moléculas formando agregados como uma estrutura cristalina, que conferem alta resistência à tensão, tornando a celulose insolúvel em água e um grande número de solventes (CARDOSO, 2009; SANTOS *et al.*, 2012).

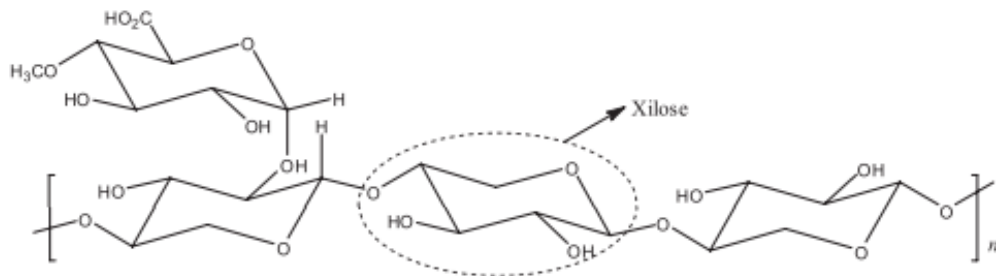
**Figura 3 – Representação esquemática da molécula de celulose (SANTOS *et al.*, 2012)**



### 3.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos mais complexos e é o segundo mais abundante da biomassa vegetal. É composto por D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico (Figura 4). A xilose é o açúcar mais abundante da hemicelulose, mas possui variações dependendo da espécie vegetal (TOMÉ, 2021). A hemicelulose possui estrutura mais semelhante à da celulose quando comparada à lignina e possui entre suas estruturas ramificações que interagem com a celulose conferindo a molécula maior estabilidade e flexibilidade. Além disso, possuem um caráter amorfo, atribuindo à molécula maior tendência a sofrer hidrólise ácida, que se deve ao fato de oferecerem maior acessibilidade aos ácidos minerais utilizados, muitas vezes, como catalisadores (CARDOSO, 2009; SANTOS *et al.*, 2012).

**Figura 4 – Representação esquemática da hemicelulose (SANTOS *et al.*, 2012)**

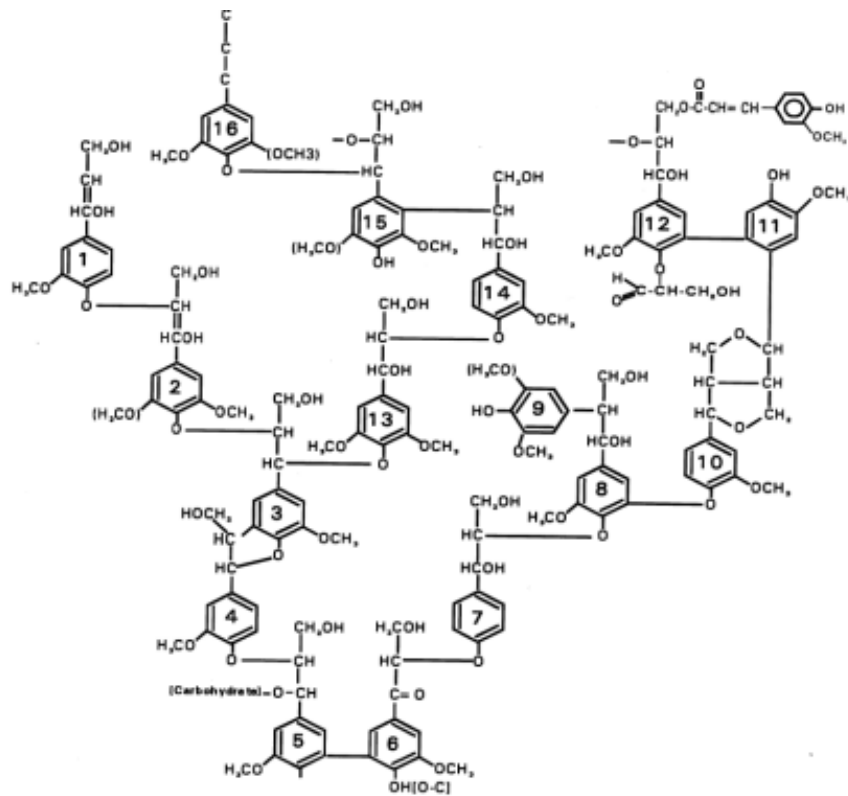


### 3.2.3 Lignina

A lignina é o terceiro componentes da biomassa lignocelulósica. É considerado também um heteropolímero amorfo, com estruturas globulares e é composto por três álcoois fenilpropanóides: o álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico que serão os precursores para formação de diferentes tipos de lignina (Figura 5). Suas unidades são conectadas por ligações carbono-carbono (C-C) e éter (C-O-C), não hidrolisadas em condições biológicas. A matriz celulose-hemicelulose irá dizer qual a composição dos constituintes da lignina que podem variar de uma biomassa vegetal para outra (CARDOSO, 2009; SANTOS *et al.*, 2012).

Quando ligada à celulose e hemicelulose, a lignina forma uma barreira impermeável e resistente aos ataques microbianos, dando um suporte estrutural importante para células vegetais, o que de certa forma pode prejudicar a utilização do resíduo vegetal nas indústrias em determinados processos, pois irá reduzir a capacidade de degradação química e enzimática, bem como o grau de degradabilidade dos materiais lignocelulósicos (CARDOSO, 2009).

**Figura 5 – Representação esquemática da lignina (SANTOS *et al.*, 2012)**



Atualmente, o recurso biológico renovável mais abundante é a biomassa lignocelulósica e devido ao fato de sua composição ser variável e heterogênea, a torna uma fonte com grande potencial para produção e obtenção de compostos químicos e bioquímicos diferentes (BILAL *et al.*, 2018). A biomassa lignocelulósica é composta por resíduos agrícolas, resíduos sólidos e agroindustriais, fazendo com que sua utilização contribua diretamente para a economia circular e para a sustentabilidade, mas devido as suas características estruturais, seu aproveitamento completo, requer processos de deslignificação, despolimerização da celulose e hemicelulose à açúcares, e para isso, é necessário pré-tratamentos dos resíduos lignocelulósicos (CARUS; DAMMER, 2018; SHERWOOD, 2020). Resíduos lignocelulósicos como casca de coco, bagaço de cana-de-açúcar e fibra de sisal, muito utilizados em processos de produção de enzimas por fungos, por exemplo, possuem diferentes composições de celulose, hemicelulose e lignina em suas estruturas (SILVA *et al.*, 2014).

### 3.2.4 Casca de coco

O Brasil está entre os maiores produtores mundial de cocos. Por um lado, há a inclusão de hábitos saudáveis no consumo da água do coco, mas por outro, há também um aumento na produção de subprodutos, as cascas de coco que compõem aproximadamente 85% do peso bruto

do coco. O resíduo do coco é um material orgânico, mas de difícil decomposição. Então de modo a reduzir os impactos negativos gerados para o meio ambiente, várias alternativas têm sido propostas para sua reutilização e, dentre elas, a produção de enzimas por fungos, onde estudos demonstrados por Maciel *et al.* (2010), revelou que o pó da casca de coco verde é um ótimo indutor na produção de celulases (CABRAL *et al.*, 2017; MACIEL *et al.*, 2010).

### **3.2.5 Bagaço de cana de açúcar**

A cana de açúcar é a principal matéria-prima para a produção de açúcar e etanol, portanto, é uma planta de bastante relevância para a economia brasileira, responsável pela geração de energia e emprego (CABRAL *et al.*, 2017). Após ser processada e produzir os produtos finais, são gerados os resíduos de bagaço de cana, que em partes são queimados para a geração de calor e energia e cerca de 20% não são aproveitados para fins energéticos (CARDOSO, 2009). O bagaço de cana de açúcar é o resíduo agroindustrial de maior estudo na área de durabilidade e resistência do material levando em conta seus componentes estruturais. Segundo Canilha *et al.* (2007) e dados expostos na Tabela 1, resíduos de bagaço de cana apresenta 46,8% de celulose, 27,5% de hemicelulose e 26,2% de lignina na sua composição, sendo um resíduo lignocelulósico promissor em aplicações biotecnológicas, atuando como substrato para produção de enzimas ligninolíticas fúngicas (ANTUNES, 2015; CANILHA *et al.*, 2007).

### **3.2.6 Fibra de sisal**

A fibra de sisal é uma fibra vegetal em grande abundância no Brasil. Possui alta resistência e é utilizada para confecção de cordas, tapetes, chapéus e outras peças artesanais. A Bahia está entre os maiores produtores de sisal e sua cultura de produção é de suma importância, principalmente no setor nordestino, devido a geração de emprego. Há poucos anos atrás houve um declínio de produção devido ao fato do baixo aproveitamento das fibras de sisais e estudos demonstraram a importância do estímulo na produção, promovendo o progresso tecnológico na aplicação biotecnológica, uma vez que sua composição obtém altos percentuais de celulose, hemicelulose e lignina. Hoje, diversos estudos são realizados para otimização das condições de cultivo de fungos produtores de enzimas utilizando fibras de sisal como substratos, a fim de aumentar a secreção das enzimas de interesse biotecnológico (CARDOSO, 2009).

## **3.3 Biorremediação e a aplicação de fungos basidiomicetos lignocelulolíticos**

A biorremediação é definida como uma técnica de processos biológicos utilizados para o controle, degradação, transformação ou remoção de poluentes em uma concentração de níveis

não detectáveis, não tóxicos ou aceitáveis pelo limite estabelecido pela legislação de controle ambiental. A biorremediação surge como uma alternativa viável, atrativa tecnologicamente e ambientalmente devido ao seu processo ser biológico, de baixo custo e a possibilidade de obtenção completa da degradação de componentes contaminantes em determinado meio (GIMENES, 2011; MATHEUS *et al.*, 2000).

A biorremediação utilizando fungos basidiomicetos é uma técnica favorável, com baixo custo e possibilidade completa de mineralização dos poluentes, mas há desafios relacionados na implementação desse processo em larga escala, a nível industrial (YAMANAKA *et al.*, 2008). Há a biorremediação *in situ*, onde é realizada no próprio local, sem que haja qualquer tipo de remoção do material contaminado e a biorremediação *ex situ*, com a necessidade de retirada de solo ou efluente do local contaminado para que haja tratamento em outro local (LACERDA, 2019). Com isso, existem uma diversidade de técnicas de biorremediação, com vantagens e desvantagens distintas e a escolha da técnica irá depender exclusivamente do tipo de microbiota que há no ambiente contaminado, suas condições, o tipo de contaminação e qual o nível de extensão. Dentre as técnicas de biorremediação para aceleração do processo de biodegradação, temos (GIMENES, 2011):

- ✓ Biorremediação intrínseca: técnica baseada em processos naturais para controle ou remoção de agentes contaminantes ou poluidores de solo e água. Ocorre através de processos físicos, químicos e biológicos em ambientes impactados, onde a degradação irá ocorrer através da microbiota autóctone com recursos disponíveis apenas no local.
- ✓ Bioestimulação: técnica com aplicação de nutrientes como fósforo e nitrogênio ou surfactantes para o estímulo da atividade microbiana e otimização das condições do crescimento dos microrganismos no local infectado, a fim de estimular o seu metabólito degradativo.
- ✓ Bioenriquecimento: técnica baseada na inoculação de microrganismos selecionados para degradar determinados tipos de poluentes e contaminantes em certo meio.
- ✓ Biofiltros: técnica que visa na mobilização de microrganismos em colunas de tratamento de ar ou efluentes líquidos.
- ✓ Bioventilação: técnica de introdução de oxigênio no solo para estimulação da ação dos microrganismos e consequente evaporação do poluente.
- ✓ Compostagem: é um processo biológico onde microrganismos convertem resíduos orgânicos em compostos de grandes benefícios ao meio ambiente, como os adubos naturais. A técnica ocorre através de um tratamento aeróbio termófilo, onde os



compostos contaminados se misturam com o substrato que contém microrganismos degradadores.

- ✓ Biorreatores: técnica destinada ao tratamento de solo e água com alta concentração de contaminantes. Há a presença de reatores com capacidade de controlar a aeração e a temperatura e promoverem um contato eficiente entre os microrganismos ou comunidades microbianas introduzidas no processo com a poluente.

A técnica de biorremediação para mineralização completa de poluentes possui parâmetros laboratoriais muitas das vezes não aplicáveis para biorreatores em um processo industrial, o que requer entender muito além dos fatores relacionados à engenharia do processo, mas também os aspectos relacionados a fisiologia do fungo aplicado, de modo a melhorar as condições de cultivo, crescimento dos fungos e produção de enzimas ligninolíticas envolvidas na conversão biológica dos poluentes (YAMANAKA, *et al.*, 2008).

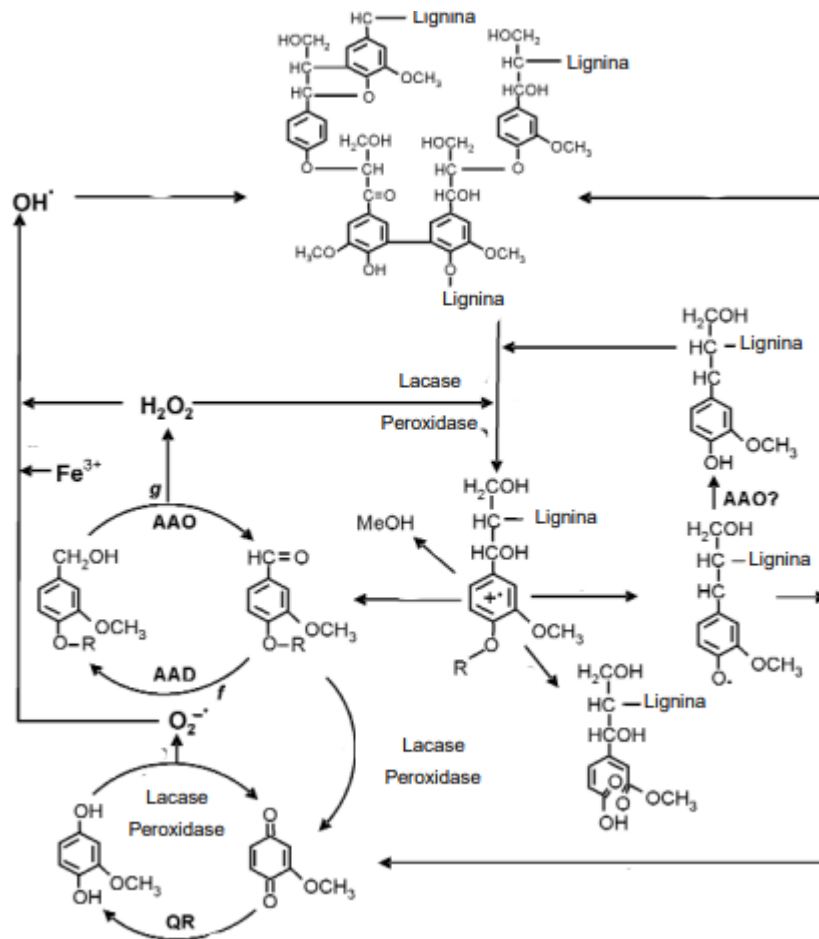
### **3.4 Biodegradação da lignina e de poluentes orgânicos por fungos basidiomicetos**

O amplo estudo dos sistemas ligninolíticos por pesquisadores, levaram ao conhecimento de que a composição e o tipo do substrato interferem diretamente na quantidade de enzimas produzidas pelos basidiomicetos (CHRISTIAN *et al.*, 2005; MOREDO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2004). Deve-se levar em contato também fatores como pH, temperatura, fonte de nitrogênio e carbono, pois podem afetar o crescimento fúngico, onde a baixa disponibilidade de nitrogênio se comporta como pré-requisito na deslignificação. A deficiência de nutrientes no meio faz com que as atividades enzimáticas apareçam como forma de metabolismo secundário (SONGULASHVILI *et al.*, 2007; TUOMELA *et al.*, 2000).

Enzimas responsáveis pelo ataque inicial da lignina devem ser extracelulares e não específicas, levando em conta a natureza e o tamanho da molécula inicial que sofrerá o ataque. Basidiomicetos de podridão branca possuem dois tipos de sistemas enzimáticos: o hidrolítico e o oxidativo. O sistema hidrolítico é o responsável por hidrolisar polissacarídeos, já o sistema oxidativo tem a função de promover a deslignificação ou degradação da lignina (JÖRGENSEN *et al.*, 2003; TUOMELLA *et al.*, 2000). Os fungos basidiomicetos tem a capacidade de produção de todas ou as principais enzimas extracelulares que fazem parte do sistema oxidativo: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase. A forte atividade oxidativa dessas enzimas fazem com que tenham alto potencial também na degradação de diversos poluentes ambientais como corantes azos e compostos xenobióticos. (BABOROVÁ *et al.*, 2006; XIAOBIN *et al.*, 2007). Como já mencionado anteriormente, a deslignificação por fungos basidiomicetos de podridão branca, pode ocorrer de maneira seletiva ou não seletiva (Figura

6). De forma seletiva, a lignina é removida sem perda marcante de celulose e de forma não seletiva há a degradação de todos os componentes que fazem parte da parede celular vegetal (SÁNCHEZ, 2009; TUOMELA *et al.*, 2000).

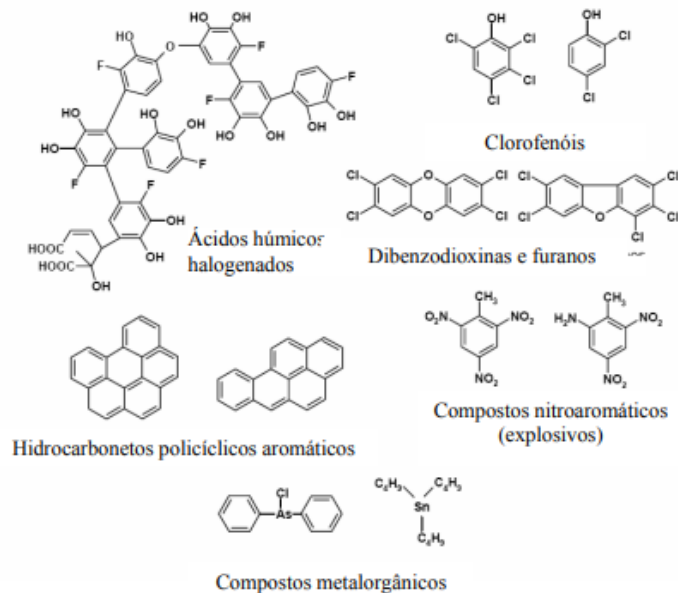
**Figura 6 – Biodegradação da lignina por fungos basidiomicetos de podridão branca (CARDOSO, 2009).**



No mecanismo acima é possível observar a ação concomitante das enzimas ligninolíticas oxidando o polímero da lignina gerando radicais aromáticos, que em sequência desenvolve diferentes reações não enzimáticas como quebra de C<sub>4</sub>-éter, clivagem de anéis aromáticos, quebra de C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub> e desmetilação. Pode ocorrer a repolimerização no polímero da lignina ou reoxidação pelas lacases ou peroxidases, produção de quinonas e outras. Os basidiomicetos podem também atuar na produção de outras enzimas oxidoreduzidas, como aril álcool oxidases (AAO) ou aril álcool desidrogenases que atuam diretamente na redução de oxigênio dissolvido no meio à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidando hidroxilas de substratos à carbonilas (CARDOSO, 2009).

Processos de degradação da celulose e hemicelulose ocorrem com facilidade, sendo de natureza hidrolítica. A deslignificação, ou degradação da lignina, consiste em removê-la da biomassa ligninocelulósica através de um processo oxidativo complexo e totalmente dependente das condições dos meios de cultivos ao qual o organismo está presente, afim de tornar disponível os polímeros de carboidratos. Esse processo pode ocorrer por meio de métodos químicos, físicos ou biológicos. Dentre eles, o processo biológico, realizados pelos fungos basidiomicetos, apresenta maior vantagem, pois tem o fator de produção de subprodutos potencialmente úteis, gerando quantidade mínimas de resíduos (CARDOSO, 2009; HAMMEL; CULLEN, 2008). Além disso, estudos voltados a deslignificação por basidiomicetos ligninolíticos forneceram informações importantes para a aplicabilidade destes em diversas pesquisas abrangendo a área de biodegradação de xenobióticos (Figura 7) (MOREIRA-NETO, 2006).

**Figura 7 – Exemplos de compostos xenobióticos degradados por basidiomicetos (MOREIRA-NETO, 2006)**



O processo de degradação da lignina pode ser explicado como um processo de multienzimático, como resultado da ação de diversas enzimas intracelulares e extracelulares, como enzimas peroxidases, lacases e oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio, além de alguns metabólitos de baixa massa molecular (MOREIRA-NETO, 2006).

Além disso, basidiomicetos ligninolíticos atuam na produção de enzimas oxidoreduzases (Tabela 3). Dentre elas temos as peroxidases: lignina peroxidases, manganês peroxidases que possuem ampla atuação. Há também a produção de flavina oxidases como a glicose oxidases,

piranose-2-oxidases, metanol oxidases e aril álcool oxidases que irão atuar diretamente na redução de oxigênio dissolvido no meio à peróxido de hidrogênio, seguido da oxidação de hidroxilas de substratos específicos à carbonilas. Outro grupo de oxidases contendo cobre, como as lacases, tem a capacidade de reduzir oxigênio dissolvido à água, através da oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos, dando origem a radicais catiônicos, radicais fenoxi ou quinonas. As glioxal oxidases e galactose oxidases, por sua vez, irão reduzir oxigênio à peróxido de hidrogênio, através da oxidação de álcool ou um aldeído específico (MOREIRA-NETO, 2006; GONZALES *et al.*, 2002).

**Tabela 3 – Enzimas que atuam da degradação de substratos lignocelulósicos (MOREIRA-NETO, 2006)**

Nome recomendado	Nome sistemático	EC	Reação
Endo-1,4- $\beta$ -glucanase	1,4-(1,3; 1,4)- $\beta$ -D-Glucan-4 glucanohidrolase	3.2.1.4	Endohidrólise de ligações 1,4- $\beta$ -D-glicosídicas
Exo-1,4- $\beta$ -glucanases	1,4- $\beta$ -D-Glucano celobiohidrolase	3.2.1.91	Hidrólise de ligações 1,4- $\beta$ -D-glicosídicas liberando celobiose
$\beta$ -glucosidase	1,4- $\beta$ -D-Glucano glicohidrolase	3.2.1.?	Hidrólise de ligações 1,4- $\beta$ -D-glicosídicas liberando glicose
	$\beta$ -D-Glucosideo glucohidrolase	3.2.1.21	Hidrólise de terminações não redutivas de resíduos $\beta$ D-glicose com liberação de $\beta$ -D-glicose
Endo-1,4- $\beta$ -xilanase	1,4- $\beta$ -D-Xilano xilanohidrolase	3.2.1.8	Endohidrólise de ligações 1,4- $\beta$ -D-xilosídicas em xilanos
$\beta$ -Xilosidase	1,4- $\beta$ -D-Xilano xilanohidrolase	3.2.1.37	Hidrólise de 1,4-D-xilanos para remover sucessivamente resíduos D-xilose
$\alpha$ -L-Arabinofuranosidase	$\alpha$ -L-Arabinofuranosideo arabinofuranohidrolase	3.2.1.55	Hidrólise de terminações não redutivas de resíduos $\alpha$ L-arabinofuranosideo em $\alpha$ -L-arabinosideos
Acetilesterase	Ester acético acetilhidrolase	3.1.1.6	Um éster acético + H <sub>2</sub> O = um álcool + acetato
$\alpha$ -Glucuronidase	$\alpha$ -D-Glucuronosideo glucuronosohidrolase	3.2.1.?	$\alpha$ -D-glucuronosideo + H <sub>2</sub> O = um álcool + Dglucuronato
Endo-1,4- $\beta$ -mananase	1,4-D-Manano mananohidrolase	3.2.1.78	Hidrólises aleatórias de ligações 1,4- $\beta$ -D-manosídicas em mananos
$\beta$ -Manosidase	$\beta$ -D-Manosideo manohidrolase	3.2.1.25	Hidrólise de terminações não redutivas de resíduos $\beta$ -D-manose em $\beta$ -D-manosideos
$\alpha$ -Galactosidase	$\alpha$ -D-Galactosideo galactohidrolase	3.2.1.22	Hidrólise de terminações de resíduos $\alpha$ -D-galactose em $\alpha$ -D-galactosideos

Lignina peroxidase	diarilpropano O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> oxidoreductases	1.11.1.14	Catalisa várias oxidações em cadeia laterais alquil, quebra de ligações C-C
Manganês peroxidase	Mn(II): H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> oxidoreductase	1.11.1.13	Cataliticamente dependente de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e íons Mn <sup>2+</sup>
Lacase	Benzenodiol:oxigênio oxidoreductase	1.10.3.2	4-Benzenodiol + O <sub>2</sub> = 4-benzosemiquinona + H <sub>2</sub> O
Horseradish peroxidase (peroxidase da raiz forte)	Doador:peróxido de hidrogênio oxidoreductase	1.11.1.7	Doador + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> = doador oxidado + 2H <sub>2</sub> O
Protocatecóico 3,4- dioxigenase	Protocatecoato:oxigênio 3,4- oxidoreductase	1.13.11.3	3,4-Dihidroxi benzoato + O <sub>2</sub> = 3-carboxi-cis,cis muconato
Catecol 1,2-dioxigenase	Catecol:oxigênio 1,2- oxidoreductase	1.13.11.1	Catecol + O <sub>2</sub> = cis,cis muconato
Superóxido dismutase	Superóxido:superóxido oxidoreductase	1.15.1.1	O <sub>2</sub> ..- + O <sub>2</sub> ..- + 2H <sup>+</sup> = O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Glioxal oxidase	Glioxalato:oxigênio oxidoreductase	1.2.3.5	Glioxalato + H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub> = oxalato + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Glicose-1-oxidase	β-D-Glicose:oxigênio 1- oxidoreductase	1.1.3.4	β-D-Glicose + O <sub>2</sub> = D-Glicano-1,5-lactano + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Aril álcool oxidase	Aril álcool:oxigênio oxidoreductase	1.1.3.7	Álcool aromático primário + O <sub>2</sub> = aldeído aromático + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Piranose-2-oxidase	Piranose:oxigênio 2- oxidoreductase	1.1.3.10	D-Glicose + O <sub>2</sub> = 2-desidro-D-glicose + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Celobiose:quinona oxidoreductase	Celobiose:quinona 1- oxidoreductase	1.1.5.1	Celobiose + quinona = celobiona-1,5-lactona + fenol
Celobiose desidrogenase	Celobiose:(acceptor) 1- oxidoreductase	1.1.99.18	Celobiose + acceptor = celobiona-1,5-lactona + acceptor reduzido

Os fungos ligninolíticos, atuam na produção de um complexo sistema de hidrolases atuantes no processo degradativo de celuloses, hemiceluloses e pectinas. Há dois tipos de exoglucanases (celobiohidrolases e glucohidrolases) e de endoglucanases, xilanases, mananases, glicosidases e acetilxilanases que irão degradar completamente os polissacarídeos da madeira.

Na degradação da lignina há presença de várias enzimas, o que não é muito diferente quando comparada a degradação da hemicelulose de madeira dura, onde o acetil xilano ramificado é convertido por meio de diversas enzimas: endo-1,4-β-xilanase, β-xilosidase, α-glucuronidase, α-L-arabinofuranosidase e acetilesterase. Para a hidrólise dos galactoglucomanos, que fazem parte da composição da hemicelulose em madeira mole, há a atuação das endo-1,4-β-mananase, β-manosidase, β-glicosidase e α-galactosidase (GONZALES *et al.*, 2002; MOREIRA-NETO, 2006).

As superóxidos dismutases (SOD) são enzimas que contem em sua composição ferro (FeSOD), manganês (MnSOD) ou zinco e cobre (CuZnSOD) no sítio ativo e auxiliam na

proteção da célula fúngica do estresse oxidativo provenientes do peróxido de hidrogênio, radicais superóxidos aniônicos e radicais hidroxila. Os radicais superóxidos aniônicos aparece com frequência na redução cíclica das quinonas e na atuação de lacases, MnP e LiP por fungos ligninolíticos. Espécies reativas de oxigênio atual tanto como agente oxidante, como redutore reagem com outros radicais presentes no meio produzidos por enzimas ligninolíticas, de forma a contribuir na transformação da lignina, como na quebra do anel benzênico ou desmetoxilação (GONZALES *et al.*, 2002; MOREIRA-NETO, 2006).

### 3.5 Enzimas ligninolíticas

Nos processos de biorremediação é necessário e de suma importância estabelecer os parâmetros (disponibilidade de oxigênio, concentração de carbono e nitrogênio, pH, temperatura, etc) de cultivos que podem interferir na atividade e produção enzimática dos fungos basidiomicetos aplicados, bem como, ter conhecimentos das características físico-químicas das enzimas ligninolíticas produzidas por esses fungos.

As enzimas produzidas podem ser inibidas por diversas substâncias químicas presentes no meio, sendo possível identificar quais enzimas ligninolíticas podem estar presentes a partir de testes qualitativos combinado de pH e temperaturas ótimas e a ação de inibidores enzimáticos. Em grande maioria, os fungos basidiomicetos toleram altas concentrações de poluentes orgânicos, sendo viável sua aplicação em processos de biorremediação. Mas é importante atentar-se as interferências vitais que esses poluentes orgânicos podem ter no metabolismo do fungo, bem como na produção e atividade das enzimas ligninolíticas produzidas (GIMENES, 2011; MOREIRA-NETO, 2006).

Os fungos, em maioria, atuam na produção de enzimas peroxidases e fenoloxidasas. O complexo enzimático inclui lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacases (fenoloxidasas). O complexo enzimático compreendidos pelas peroxidases (LiP e MnP) atuam na oxidação dos seus substratos com redução de um elétron e formação de radical catiônico. As enzimas lacases são consideradas fenoloxidasas constituintes de um grupo de enzimas oxidases complexantes de cobre. Enzimas ligninolíticas produzidas por fungos basidiomicetos depois de excretadas, irão atuar na oxidação de substratos presentes em ambientes externos às células. São enzimas produzidas durante o metabolismo secundário, já que a oxidação da lignina, assim como de poluentes, não fornece energia para o fungo (GIMENES, 2011; HOFRICHTER, 2002).

Vários estudos realizados demonstraram um número significativos de fungos produtores de ligninolíticas, dentre eles temos: *Trametes trogii* (MECHICHI *et al.*, 2006), *Schizophyllum* sp.

(XIAOBIN *et al.*, 2007), *Nematoloma frowardii* (ROGALSKI *et al.*, 2006), *Trametes villosa* (AHN *et al.*, 2007; BUKH *et al.*, 2006), *Pleurotus sajor-caju* (REDDY *et al.*, 2003; KAMIDA *et al.*, 2005), *Ganoderma* spp. (SILVA *et al.*, 2005), *Pycnoporus sanguineus* (VIKINESWARY *et al.*, 2006), *Pycnoporus cinnabarinus* (MEZA *et al.*, 2005), *Quercus petraea* (VALÁŠKOVÁ *et al.*, 2007); *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinoseum* e *Pleurotus calyptratus* (EICHLEROVÁ *et al.*, 2005).

### 3.5.1 Lignina Peroxidase

A LiP, descoberta em 1984, é uma enzima identificada primeiramente em *Phanerochaete chrysosporium* e é considerada uma glicoproteína extracelular com grupo prostético heme (contém Fe protoporfirínico IX) e é dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para atividade enzimática. A estrutura tridimensional de uma LiP é mostrada na Figura 8 (CARDOSO, 2009). No processo de degradação da lignina, a LiP é inicialmente oxidada por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e em seguida a degradação de unidades fenólicas e não fenólicas da lignina (aproximadamente 90%), gerando radicais catiônicos com alto potencial redox, podendo extrair um elétron do anel aromático na lignina, podendo gerar radicais catiônicos aromáticos, ou seja, os radicais catiônicos formados irão reagir de forma espontânea com nucleófilos (H<sub>2</sub>O) e como oxigênio molecular, quebrando ligações C-C e C-O, despolimerizando a lignina e abrindo anéis aromáticos. Durante a etapa catalítica, o Fe presente na composição do grupo heme da LiP sofre óxido-redução (Figura 9). Primeiramente há a oxidação do Ferro (III) para Ferro (IV), pela ação de peróxido de hidrogênio, gerando radical catiônico LiP (Composto I). A redução (agente redutor: álcool veratrílico ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) do composto I, com a transferência de um elétron, há a formação do composto II, contendo Ferro (IV). Por fim, a redução por um elétron retorna a enzima para seu estado inicial, de forma a completar o ciclo catalítico (CARDOSO, 2009; HAMMEL, CULLEN, 2008).

Em relação a sua aplicação, a lignina peroxidase tem importante atuação na indústria de papel e celulose na etapa de branqueamento da polpa e tratamento dos efluentes. Na indústria têxtil tem a função de melhorar o branqueamento em lavanderias, inibindo a transferência de cores durante a lavagem, bem como, atuar na remoção do corante da água utilizada na lavagem de tecidos que passam pelo processo de tingimento. Além disso, a baixa especificidade do complexo enzimático peroxidase, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, há a possibilidade de promover a oxidação de diversos poluentes orgânicos (CARDOSO, 2009; ESPÓSITO-AZEVEDO, 2010).

Figura 8 – Estrutura esquemática da lignina e estrutura tridimensional da lignina peroxidase (ANTUNES, 2015)

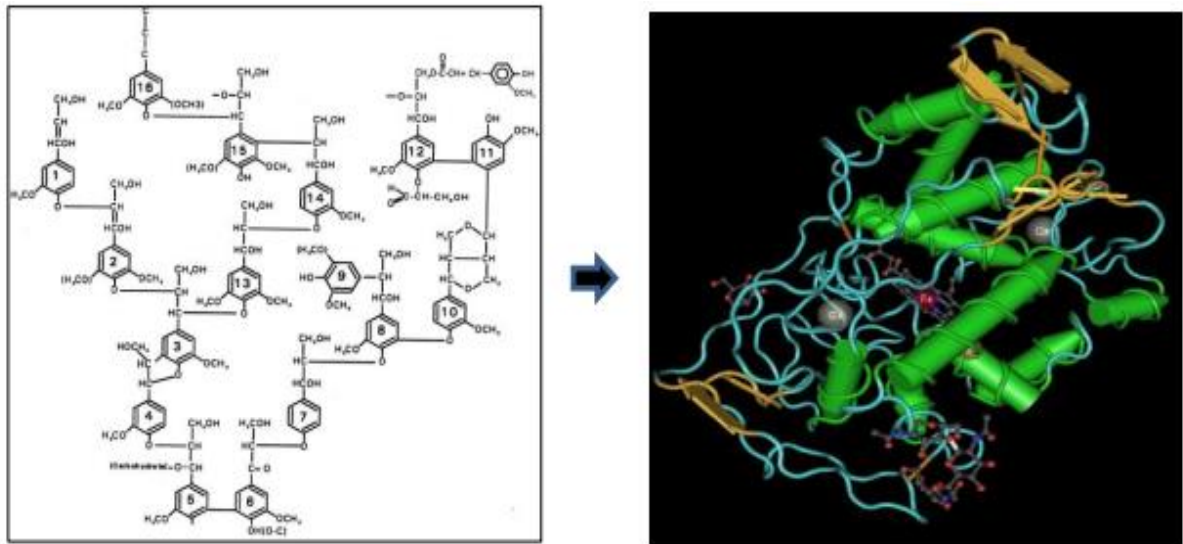
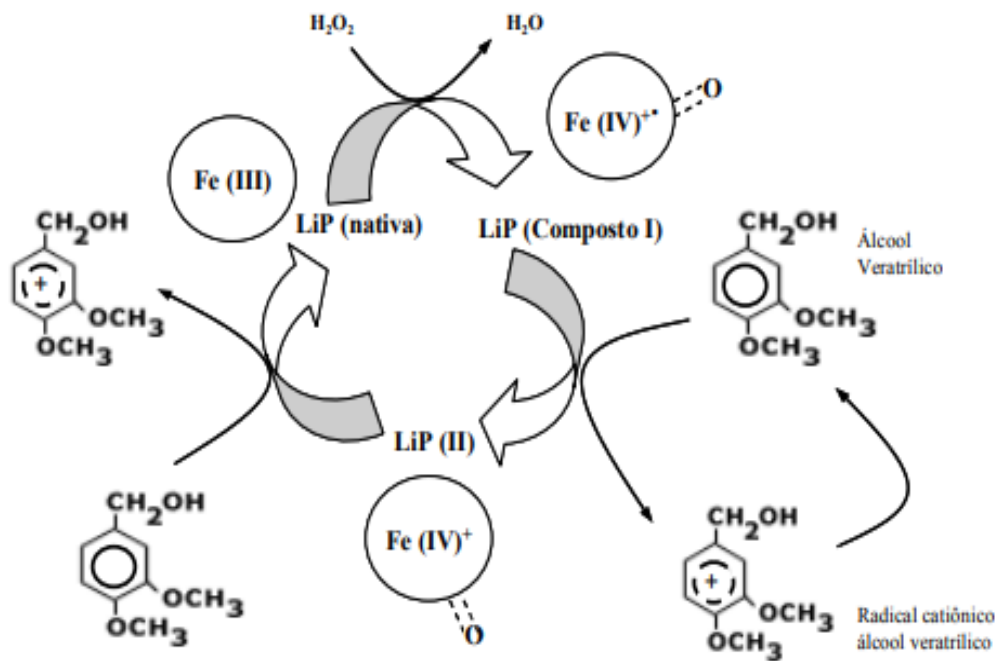


Figura 9 – Ciclo catalítico da LiP (ANTUNES, 2015)



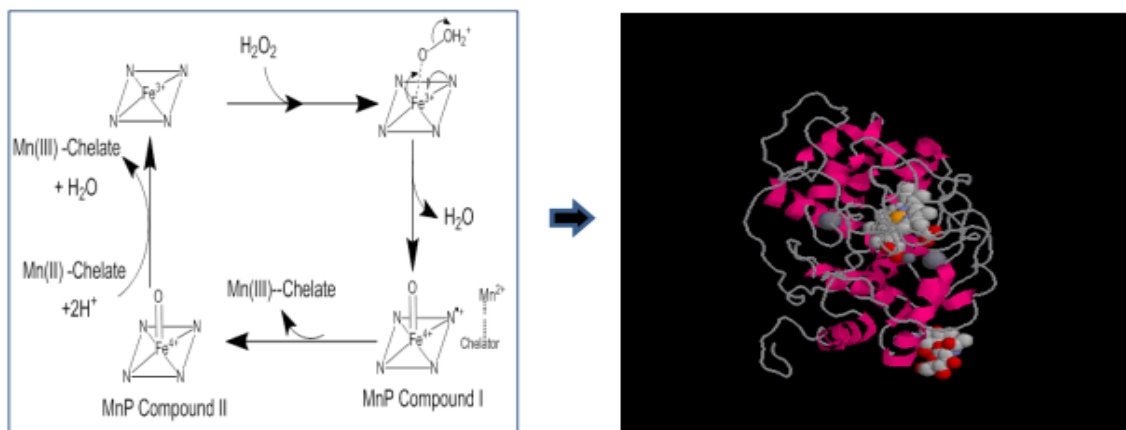
### 3.5.2 Manganês Peroxidase

A MnP (Figura 10) é considerada uma glicoproteína extracelular com grupo prostético heme e assim como a LiP, seu ciclo catalítico depende da presença de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Figura 11). Além do peróxido, enzimas MnP necessitam de  $\text{Mn}^{+2}$ , que é oxidado a  $\text{Mn}^{+3}$  e para estabilizar a sua formação é necessário quelantes orgânicos como: lactato, malato, oxalato ou malonato, ao qual forma um complexo oxidante ativo. Uma característica importante da ação

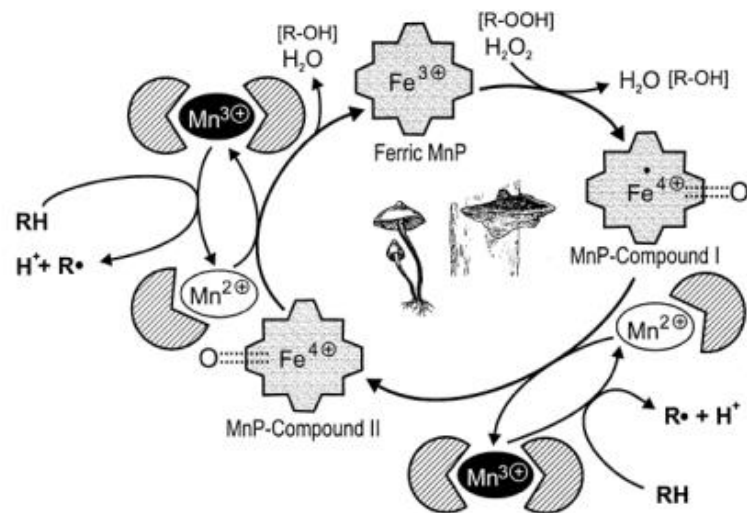


de MnP é esse propósito de reação, onde o poder oxidante de MnP é transferido para um mediador com baixo peso molecular, capaz de difundir-se dentro da parede celular lignificada, atacando a partir dela. O que é de extrema importância, já que a ligninocelulose possui permeabilidade muito baixa. Por isso, o  $Mn^{+3}$  formado e estabilizado, age como agente oxidante, com baixo peso molecular, que ataca moléculas orgânicas através da subtração de um elétron e o fato do  $Mn^{+3}$  ser inespecífico, o sistema MnP tem eficiência na oxidação de diversos poluentes orgânicos. A MnP é considerada uma enzima de suma importância na degradação da lignina e um ponto importante é que são produzidas, mais frequentemente quando comparadas com LiP, pela maioria dos fungos com fatores ambientais e disponibilidade de nutrientes regulados (ESPÓSITO-AZEVEDO, 2010; HAKALA *et al.*, 2005; HAMMEL & CULLEN, 2008; HOFRICHTER *et al.*, 2001; KAPICH *et al.*, 2005; ROGALSKI *et al.*, 2006; XIAOBIN *et al.*, 2007;).

**Figura 10 – Mecanismo estado inicial MnP e sua estrutura tridimensional (ANTUNES, 2015)**



**Figura 11 – Ciclo catalítico de MnP (ANTUNES, 2015)**

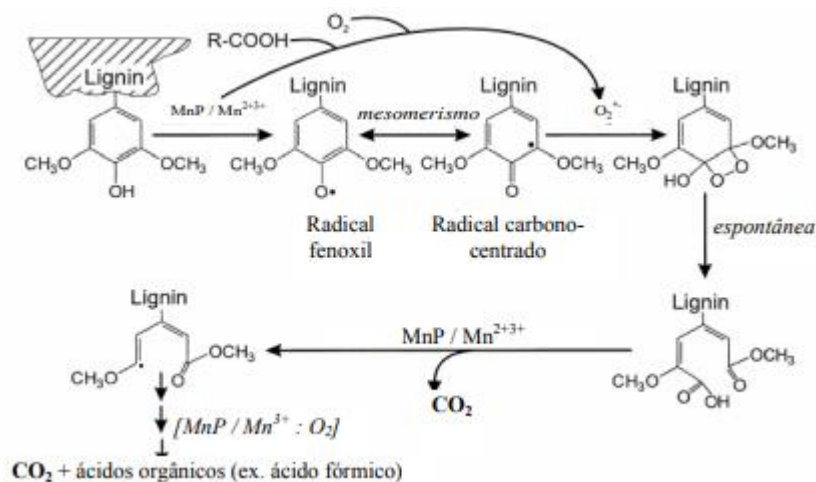


Além de os íons  $Mn^{+3}$  atuarem na transformação da lignina, há sistemas mediados por ácidos graxos insaturados e seus derivados lipídicos relacionados na degradação de estruturas não fenólicas de lignina por manganês peroxidase. Esses ácidos graxos insaturados que promovem a peroxidação de lipídeos estão presentes em ambientes naturais de fungos ligninolíticos, bem como, há evidências de sua presença na madeira. A atuação de enzimas manganês peroxidase durante processos de peroxidação lipídica está envolvida na degradação de compostos xenobióticos recalcitrantes (HOFRICHTER, 2002).

Hofrichter *et al* (2001), por exemplo, encontrou uma enzima MnP produzida por *Phlebia radiata* que foi capaz de mineralizar lignina sintética a  $CO_2$  e causar a fragmentação de madeira macia moída na presença de ácidos orgânicos e lipídios insaturados. Com isso, o conceito de que a degradação da lignina por MnP tem sido adotada por diversos microbiologistas, onde descrevem a despolimerização da lignina de alta massa molecular como um processo de combustão enzimática extracelular, com atuação inespecífica das enzimas ligninolíticas (MOREIRA-NETO, 2006).

Um esquema hipotético envolvendo a formação de  $CO_2$  a partir de catálise de estruturas de lignina por MnP é demonstrado na Figura 12.

**Figura 12 – Formação de  $CO_2$  por manganês peroxidase a partir de estruturas de lignina (MOREIRA-NETO, 2006).**



A partir do esquema é possível observar que no ponto inicial da reação tem-se um anel fenólico na lignina convertido a um radical fenoxil, partindo para ácidos orgânicos quelantes oxidados com a presença de  $O_2$  à radicais peroxil, liberando superóxidos que tende a reagir com o radical carbono, formando um peróxido éter instável. O éter formado sofre divisão do anel aromático, que resulta na formação de uma estrutura alifática, que compreende o grupo carboxílico livre. Por fim, o radical alifático reage com o dióxigênio disponível, sujeito ao ataque

de enzimas manganês peroxidase, resultando na formação de mais  $\text{CO}_2$  e ácidos orgânicos (MOREIRA-NETO, 2006).

### 3.5.3 Lacases

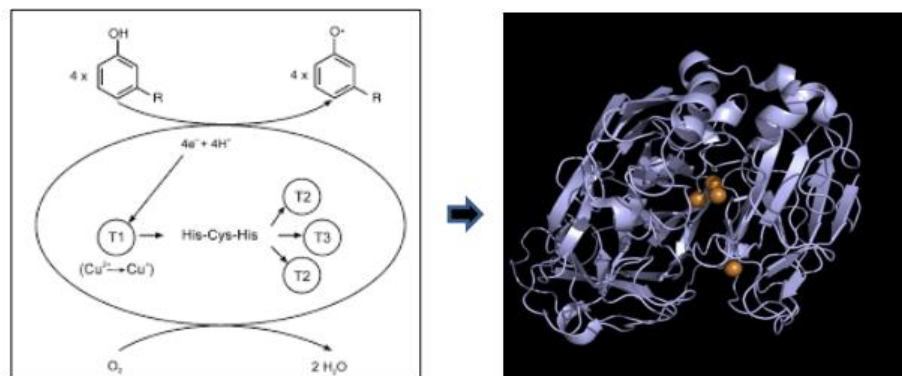
As lacases são consideradas fenoloxidases com três átomos de cobre em suas estruturas, presentes no sítio ativo (Figura 13). Possuem a capacidade de oxidar fenóis e outros compostos aromáticos, fazendo com que receba atenção em vários setores industriais, devido a sua aplicação na deslignificação, modificação das fibras de madeiras, síntese de produtos químicos, produção de etanol, biorremediação de ambientes contaminados, como água e solos (CARDOSO, 2009; MOREIRA-NETO, 2006).

**Figura 13 – Estrutura tridimensional da lacase: extremidade N-terminal (azul) à C-terminal (vermelho). Átomos de cobre em formato de esferas, sítios T1 em azul e par T3 em amarelo (MOREIRA-NETO, 2006).**



As enzimas lacases são produzidas por fungos, plantas superiores e secretadas pela maioria dos fungos basidiomicetos de decomposição branca. Essas enzimas catalisam a oxidação de um elétron com quatro moléculas, tanto de um portador redox ou do próprio substrato final, ao qual reduz quatro moléculas de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (Figura 14) (ANTUNES, 2015; CARDOSO, 2009).

**Figura 14 – Ciclo catalítico de lacases e estrutura tridimensional (ANTUNES, 2015).**



A produção de lacase pode ser afetada por diversos fatores durante o crescimento fúngico, como a composição do meio de cultura, relacionado a disponibilidade de nutrientes (carbono e nitrogênio), pH, taxa de aeração, temperatura e outros. Os fungos ligninolíticos expressam múltiplos genes de lacase codificadores de enzimas semelhantes com características físico-químicas diferentes, onde suas propriedades (bioquímicas e físico-químicas) como atividade, estabilidade, pH e temperatura ótimos, irão definir suas aplicações biotecnológicas (ANTUNES, 2015; MOREIRA-NETO, 2006).

Uma grande variedade de substratos que são oxidados por enzimas lacases com a presença de mediadores específicos e a grande capacidade de lacases fúngicas atuarem na degradação de compostos aromáticos recalcitrantes, dão um grande valor a esta classe enzimática, uma vez que, o desenvolvimento de tecnologias seguras no âmbito ambiental para indústrias de papéis, polpas biorremediação de solos e efluentes industriais são de grande interesse e portanto, há um beneficiamento desses setores na aplicação de enzimas lacases. Para isso, estudos estão sendo aplicados, de forma a entender o funcionamento dos mecanismos de lacases antigirem o potencial redox específico dessas enzimas. Pozdnyakova *et al.* (2004), por exemplo, observou que mais de 50% de deslignificação da polpa kraft ocorreu na combinação de lacase-ABTS e não por lacase sozinha, o que é de grande interesse na catálise enzimática aplicada para o branqueamento de polpa kraft. Outro estudo mencionado por Johannes e Majcherczyk (2000) demonstrou que lacase produzida por uma espécie do gênero *Trametes* catalisa a oxidação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) contendo três anéis aromáticos e de antraceno na presença de ABTS ou HBT (ANTUNES, 2015; CARDOSO, 2009; MOREIRA-NETO, 2006).

### **3.6 Seleção de fungos ligninolíticos produtores de enzimas de interesse industrial**

Os fungos de degradação branca vêm se destacando como uma alternativa eficaz no pré-tratamento biológico dos materiais lignocelulósicos, tendo em vista seu potencial para clivagem da lignina e despolimerização de carboidratos que compõem a parede celular vegetal (TOMÉ, 2021). Dentre esses fungos, CARNEIRO *et al.*, (2017), através de testes bioquímicos e análises de expressão gênica por qPCR (*Real time quantitative PCR*) demonstraram o alto potencial para produção de MnP e LiP pela linhagem *Trametes villosa* utilizando bagaço de cana como substrato lignocelulósico.

Silva *et al.* (2014) realizaram estudos com a metodologia de superfície de resposta empregada para otimizar condições de cultivo em substrato de bagaço de cana para secreção de enzimas MnP pelo fungo *Trametes villosa*, seguido da utilização do seu extrato bruto para a

deslignificação de fibras de sisal, casca de coco e bagaço de cana. As enzimas MnP utilizadas no processo de deslignificação teve como resultado do teor de lignina:  $35,05 \pm 1,45\%$  para bagaço de cana de açúcar,  $63,11 \pm 0,06\%$  para fibra de sisal e  $39,61 \pm 0,39\%$  para a casca de coco. Esses resultados mostram o alto pontecial de aplicação da enzima manganês peroxidase na remoção de lignina de resíduos vegetais.

Machado *et al.* (2005) avaliaram a produção de enzimas ligninolíticas utilizando descoloração do corante azul brilhante de Remazol R (RBBR), por 125 fungos basidiomicetos tropicais brasileiros. A maioria dos fungos descoloriu o RBBR, utilizado como substrato, durante a fase de crescimento e todos demonstraram atividade de peroxidases e lacases. Enzimas MnP foram produzidas por *Melanoporia nigra*, *Psilocybe castanella*, *Peniophora cinerea*, três cepas de *Trametes villosa*, *T. versicolor* e *Trichaptum byssogenum*. E duas linhagens de *Trametes villosa*, com comportamentos diferentes das atividades enzimáticas, apresentaram descoloração do RBBR durante o crescimento em solos contaminados com pentaclorofenol (PCF) e hexaclorobenzeno (HCB), apresentando maior descoloração na presença de organoclorados do que em solos não contaminados, o que as tornam adequadas a serem avaliadas diante a sua aplicação em processos de biorremediação de solos contaminados com PCF.

Silva *et al.* (2009) realizou estudos da biorremediação de solo contaminado com organoclorados por associação de oxidação química e biodegradação por *T. villosa* em reatores. Foi avaliada a eficiência da desalogenação de HCB por oxidação química com posterior tratamento com o fungo *Trametes villosa*, crescidos em bagaço de cana em biorreatores com 200 kg de solo. No experimento após 224 dias de inoculação foram determinadas concentrações de hexaclorobenzeno, hexaclorobutadieno (HCBU), hexacloroetano (HCE), pentacloroanizol (PCA), pentaclorobenzeno (PCB), pentaclorofenol (PCF), tetraclorobenzeno (TCB) e íons cloreto, além de avaliar atividade de lacase, fenoloxidase, umidade, temperatura e pH do solo. Como resultado, os autores observaram atividade de lacase e fenoloxidase e total remoção de HCBU e PCA. Embora o tratamento químico tenha diminuído a concentração de HCB no solo, compostos de maior toxicidade foram gerados, como Tetraclorodietoxibenzeno (TCDTB) e Triclorodietoxibenzeno (TriCEB), os quais não foram removidos pelo basidiomiceto *Trametes villosa*. É importante destacar que a produção de inóculo em resíduo lignocelulósico de bagaço de cana foi favorável para o desenvolvimento de *Trametes villosa*, pois é um meio de proteção aos efeitos tóxicos dos organoclorados presentes no solo, e por fim, é necessário atentar-se as condições ótimas para minimizar formações de produtos indesejáveis.

Estudo publicado por GIMENES (2009), na biodegradação de pentaclorofenol em solo por linhagens de *Trametes villosa*, demonstrou que as linhagens apresentaram taxa de degradação entre 24 e 63% em seis dias de incubação, resultando alta eficiência do basidiomiceto na degradação da concentração do poluente organoclorado PCF empregado no experimento. Esses resultados mostram que diferentes linhagens fúngicas de mesma espécie podem apresentar comportamento enzimático diferente, bem como, espécies fúngicas de basidiomicetos diferentes podem não ter a mesma eficiência. Foi possível observar o grande potencial de aplicação das enzimas lacases, peroxidases e celulases produzidas pelo fungo *Trametes villosa* em substratos lignocelulósicos na remoção de resíduos vegetais, bem como entender a aplicação das enzimas peroxidases em diversos ramos industriais, como na indústria de alimentos (produção de vanilina), nas indústrias de papel e celulose (branqueamento da polpa de kraft), indústrias têxteis (degradação de tintas e branqueamento), indústrias de biocombustíveis, atuando no pré-tratamento da biomassa vegetal e na biorremediação de solos contaminados com organoclorados e de hidrocarbonetos ou xenobióticos (CARNEIRO *et al.*, 2017; GIMENES, 2009; MACHADO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.* 2014; TOMÉ, 2021).

### **3.7 Condições ótimas de cultivo de fungos basidiomicetos**

As condições de cultivos devem ser sempre avaliadas e otimizadas para determinado tipo de resíduo e linhagem fúngica, uma vez que as enzimas ligninolíticas são caracterizadas como produtos secundários do metabolismo do fungo de acordo como se dá o seu processo de crescimento, ou seja, as condições de cultivos dirão o comportamento do fungo em determinado meio ao qual é exposto (BALLAMINUT, 2007; HAKALA *et al.*, 2005; MOREIRA-NETO, 2006; OKADA, 2010)

Em estudos realizados por TOMÉ (2021), sobre a biologia de sistemas do fungo *Trametes villosa*, demonstrou que o cultivo de fungos em diferentes substratos, apresentam genes codificadores de enzimas ligninolíticas e citocromo P450 diferencialmente expressos quando são cultivados em meios de cultura com a lignina como fonte de carbono. Além disso, revelou alguns padrões específicos de expressão gênica e produção de enzimas no cultivo de fungos em meios Água Lignina (AL), Bagaço de cana (BGC) e Ágar Extrato de Malte (MEA). Em análises genômicas e filogenéticas, foi identificado no fungo *Trametes villosa*, oito genes codificadores de Lacase, quatorze genes de LiP e seis genes de MnP, quatro de Versátil Peroxidase e um gene de Peroxidase genérica, além de enzimas GMC oxidorreductases, Galactose oxidase e Glioxal oxidase. E de acordo com esses genes produzidos, no meio AL, genes codificadores de lacase, LiP, MnP, glioxal oxidase e 1,4-benzoquinona redutase foram regulados de maneira positiva

quando comparado ao fungo cultivado nos meios BG e MEA, mostrando que essas enzimas fazem parte do processo de deslignificação. Quando cultivado no meio BG, *T. villosa* expressou três genes codificadores de MnP e um gene codificador de LiP e em relação ao meio MEA, os genes codificadores de enzimas Versátil Peroxidase e Piranose 2-oxidase foram expressos de formas diferentes comparados aos meios AL e BG. Com isso, pôde-se inferir que o fungo *T.villosa* possui genes codificadores de enzimas ligninolíticas expressos de formas diferentes de acordo com a fonte de carbono em disponibilidade no meio para o seu crescimento.

O cultivo dos fungos sobre substrato sólido (CSS) para a produção de enzimas, além de ser um processo de baixo custo, não apresenta necessidade de energia mecânica, possui tecnologia simples, maior produtividade e melhor circulação de oxigênio (TOMÉ, 2021). Estudos publicados por Jujian *et al.* (2001) demonstraram que a atividade de manganês peroxidase no fungo *Phanerochaete chrysosporium* cultivado em palha tratada por explosão a vapor, teve maiores resultados em cultura sólida do que na submersa. Outro exemplo de estudos demonstrados por Elisashvili *et al.* (2007), em cultura submersa não houve produção da enzima MnP por *Lentinus edodes*, enquanto em CSS favoreceu a produção da enzima.

Pesquisas realizadas por Marília ANTUNES (2009), demonstraram a capacidade de otimização do crescimento do fungo *Trametes villosa* utilizando substrato de grãos de trigo, casca de coco, fibra de sisal e bagaço de cana para secreção de enzimas lacases, MnP e LiP. O experimento de análise exploratório realizado para produção de manganês peroxidase por *T.villosa* indicou que a secreção dessas enzimas tem forte influência nas condições de cultivo as quais são realizadas.

A maioria das enzimas podem sofrer inibição por determinadas substâncias químicas presentes no meio de cultura. O pH ótimo de lacase, por exemplo, depende do substrato utilizado para determinação da atividade e também varia de acordo com a espécie (Tabela 4). Quando o ABTS é utilizado como substrato, o pH ótimo se encontra na faixa de pH 3 e 5 (MOREIRA-NETO, 2006).

**Tabela 4 – Valores de pH ótimo para produção de enzimas lacases por diferentes fungos basidiomicetos (MOREIRA-NETO, 2006).**

Fonte de lacase	Substrato para atividade	pH ótimo	Referência
<i>Ceriporiopsis</i>	ABTS	3	Fukushima & Kirk (1995)
<i>subvermispora L1</i>	Guaiacol	3	
	Ácido siríngico	3	
<i>Ceriporiopsis</i>	ABTS	3	Fukushima & Kirk (1995)
<i>subvermispora L2</i>	Guaiacol	5	

	Ácido siríngico	4	
<i>Coprinus friesii</i>	ABTS	5	Heinzkill et al. (1998)
<i>Coprinus cinereus</i>	ABTS	4	Schneider et al. (1999)
	Siringaldazina		
<i>Coriolus hirsutus</i>	ABTS	6,5	Shin & Lee (2000)
	DMF	2,5	
<i>Coriolopsis rígida</i>	ABTS	4	Saparrat et al. (2002)
	DMF	2,5	
<i>Lentinus tigrinus</i>	DMF	3	Lechner & Papinutti 2006
<i>Linhagem I-4</i> (família <i>Chaetomiaceae</i> )	Siringaldazina	3	Saito et al. (2003)
<i>Linhagem UD4</i>	ABTS	7	Jordaan et al. (2004)
	Guaiacol	4	
	DMAB-MBTH	6	
	Ácido siríngico	6	
<i>Panaeolus sphinctrinus</i>	ABTS	4,5	Heinzkill et al. (1998)
<i>Panaeolus papilionaceus</i>	ABTS	3	Heinzkill et al. (1998)
<i>Peniophora sp.</i>	Guaiacol	3	Niku-Paavola et al. (2004)
<i>Phellinus ribis</i>	DMF	4-6	Min et al. (2001)
	ABTS	5	
	Siringaldazina	6	
<i>Pleurotus ostreatus D1</i>	ABTS	4	Pozdnyakova et al. (2004)
	DMF	4	
	Siringaldazina	7	
<i>Pleurotus ostreatus</i> (POXA1)	ABTS	3	Palmieri et al. (1997)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (POXA2)	ABTS	3	Palmieri et al. (1997)
	Guaiacol	6	
<i>Pleurotus ostreatus</i> (POXC)	ABTS	3	Palmieri et al. (1997)
	Guaiacol	6	
<i>Polyporus pinsitus</i>	ABTS	3	Heinzkill et al. (1998)
<i>Psilocybe castanella</i> CCB444	ABTS	2,5	Coelho et al. (2005)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Guaiacol	4	Eggert et al. (1995)
<i>Rigidoporus lignosus</i>	ABTS	3	Bonomo et al. (1998)
<i>Sclerotium rolfsi</i>	ABTS	2,4	Ryan et al. (2003)
<i>Trametes trogii</i>	ABTS	2	Zouari-Mechichi et al. (2006)
	DMF	2,5	
<i>Trametes versicolor</i>	ABTS	5,5	Brown et al. (2002)
<i>Trametes villosa</i>	Siringaldazina	5 a 5,5	Yaver et al. (1996)
	ABTS	≤ 2,7	
<i>Trichophyton rubrum</i> LKY- 7	ABTS	3	Jung et al. (2002)
	Guaiacol	3,5	



As condições ótimas junto às características físico-químicas das enzimas (Tabela 5) produzidas por fungos basidiomicetos é de suma importância para suas aplicações em processos de biorremediação, bem como, a utilização dessas enzimas em setores industriais, tendo em vista que, suas aplicações devem estar dentro das condições ótimas, livre de interferentes, para que o processo ocorra de maneira eficiente e em quantidades desejáveis de enzimas produzidas (MOREIRA-NETO, 2006).

**Tabela 5 – Características das enzimas ligninolíticas (MOREIRA-NETO, 2006).**

EC	MnP	LiP	Lacase
Grupo prostético	Mn(II): oxidoreduases Heme	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Diarylpropano oxidoreduases Heme	O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <i>p</i> -benzenodiol oxidoreduases 1 Cobre tipo I, 1 cobre tipo II e 2 cobres pareados tipo III
MM (kDa)	32 – 62,5	38-47	49-110 (tetrâmeros ≤ 390)
Glicosilação	<i>N</i> -	<i>N</i> -	<i>N</i> -
Isoformas	Monômeros; acima de 11	Monômeros; acima de 15	Mono-, di-, tetrâmeros, vários
<i>pI</i>	2,8-7,2	3,2-4,7	2,6-4,5
Faixa de pH	2,6-4,5	2,0-5,0	2,0-8,5
E° (mV)	1510	1450	500-800
Requer H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sim	Sim	Não
Estabilidade	+++	–	+++
Mediadores naturais	Mn <sup>2+</sup> , Mn <sup>3+</sup>	AV, ECl-1,4DMB	3-HAA
Especificidade	Mn <sup>2+</sup>	Ampla, aromáticos, incluindo não fenólicos	Ampla, fenólicos
Mediadores secundários e sintéticos	Tióis, ácidos insaturados	graxos Não	ABTS, HBT e siringaldazina

Estudos realizados por MOREIRA-NETO (2006), na produção de enzimas ligninolíticas em solo contaminado com hexaclorobenzeno, demonstraram que o aumento da temperatura de reação promoveu também, um aumento nas atividades enzimáticas de peroxidases e lacases. Extratos obtidos de culturas com 12 dias de crescimento fúngico basidiomiceto, temperaturas ótimas de atividades enzimáticas peroxidases foram 60, 75 e 80°C em solo-HCB e 50°C em solo-controle, enquanto para lacases 55, 75 e 94°C em solo-HCB e 90°C em solo-controle. Em 19 dias de crescimento fúngico foi observada temperatura ótima para peroxidases a 90°C em solo-HCB e em solo-controle e para atividades lacases 75 a 94°C em solo-HCB e 70°C em solo-controle. Com isso, foi possível observar que as diferenças nas temperaturas ótimas de

atividades tanto de enzimas peroxidases, quanto em enzimas lacases, estão relacionadas com a influência de HCB na composição do extrato enzimático obtido das culturas fúngicas em solo.

O aumento da temperatura de reação promove também um aumento de agitação das moléculas e, conseqüentemente, um aumento das colisões que ocorrem entre o substrato e a enzima. Porém, acima da temperatura ótima de atividade de uma enzima ligninolítica produzida por qualquer fungo basidiomiceto, a velocidade de reação irá reduzir acentuadamente, isso porque ocorrerá a desnaturação da enzima pelo excesso de calor. A temperatura ótima de lacases produzidas por fungos basidiomicetos encontra-se na faixa de 40 a 70°C (Tabela 6) (MOREIRA-NETO, 2006).

**Tabela 6 – Temperatura ótima de lacases de alguns basidiomicetos (Adaptado de MOREIRA-NETO, 2006)**

Fonte de lacase	Temperatura ótima (°C)	Referência
<i>Corioloopsis fulvocinerea</i>	>50	Shleev et al. (2004)
<i>Coriolus hirsutus</i>	45	Shin & Lee (2000)
Linhagem I-4 (família <i>Chaetomiaceae</i> )	42	Saito et al. (2003)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	45-65	Palmieri et al. (1997)
<i>Psilocybe castanella</i> CCB444	55	Coelho et al. (2005)
<i>Trametes hirsuta</i>	>50	Shleev et al. (2004)
<i>Trametes ochraceae</i>	>50	Shleev et al. (2004)
<i>Trametes sp. linhagem AH28-2</i>	50	Xiao et al. (2003)

Por fim, sabendo-se que as propriedades cinéticas ( $K_m$  aparente) são de extrema importância para se conhecer as condições ótimas de atuação das enzimas ligninolíticas, é importante a aplicação de processos que relacionam as diferenças cinéticas entre as enzimas (MOREIRA-NETO, 2006). Portanto, estudos realizados ainda por Gill e Arora (2003) demonstraram que o  $H_2O_2$  pode causar inibição da atividade ligninolítica de fungos, onde a inibição da atividade enzimática de MnP aumentou, assim como houve também o aumento da concentração de peróxido no meio, o que pode ser explicado a partir da formação de radicais superóxidos e aniônicos e de radicais hidroxilas formadas pelo peróxido, ocasionando na degradação da proteína. Foram avaliados por eles também a influência dos metais durante a oxidação do ABTS por extratos do fungo e dentre os metais avaliados ( $MnSO_4$ ,  $FeCl_3$ ,  $FeSO_4$  e  $CuSO_4$ ), somente o  $MnSO_4$  e o  $FeCl_3$  causaram a inibição parcial da atividade enzimática. Porém, estudos mencionados por De Souza e Peralta (2003) e Lorenzo *et al.* (2005), demonstraram que

dependendo da concentração de  $\text{CuSO}_4$  pode haver tanto o estímulo da atividade *in vitro* de lacase, quanto podem causar a inibição pela interação com os grupos -SH presentes na enzima.

Com isso, apesar das limitações para a determinação de  $K_m$  aparente obtidos de extratos enzimáticos, as diferenças obtidas nos seus respectivos valores, tanto para peroxidases como em lacases, podem ser atribuídas pela presença de isoenzimas nos meios com diferenças nas propriedades cinéticas (MOREIRA-NETO, 2006).

Estudos realizados por Elisashvili e Kachlishvili (2009) e Cupul *et al.* (2014), o problema principal que gera atraso na implementação de enzimas ligninolíticas em várias aplicações biotecnológicas, estão relacionadas com o baixo rendimento de produção das enzimas ligninolíticas na maioria dos fungos basidiomicetos de podridão branca. A explicação desse fator está relacionada pelo fato de suas enzimas extracelulares constitutivas serem produzidas apenas em pequenas quantidades. Sendo assim, todos os estudos dedicados no processo de otimização da produção dessas enzimas são considerados válidos.

Estudos realizados por Silva *et al.* (2014) sobre a produção de manganês peroxidase por *T.villosa* em substrato barato e sua aplicação na remoção de lignina de resíduos agrícolas, teve como metodologia inicial o teste de dez isolados fúngicos quanto a sua capacidade em descolorir RBBR em placas de Petri com ágar e o corante, seguindo a metodologia descrita por Palimeri *et al.* (2005). Durante o experimento o isolado *Trametes villosa* teve melhor resultado com maior halo de descoloração. A cepa fúngica utilizada para seu experimento foi a *T.villosa* CCMB 651 depositada na Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB), em Feira de Santana. Diferente de outras espécies de *Trametes*, a *T.villosa* pode ser facilmente distinguida devido a flexibilidade de seus basidiomas e os grandes poros do himenóforo. Para otimização das condições de cultura para produção de manganês peroxidase, segundo os autores, foram avaliadas três variáveis independentes: temperatura, pH e teor de umidade em cinco níveis diferentes. Para extração da enzima MnP produzida, após o período de cultivo foi então realizada a extração aquosa das enzimas da biomassa fermentada, que consiste na adição de água destilada fria, mantendo-a em banho de gelo sob intervalos de agitação, seguida da etapa de separação do sobrenadante para determinação da atividade enzimática.

Seguindo a metodologia modificada de Kuwahara *et al.* (1984) e Silva *et al.* (2014) deu-se sequências aos procedimentos realizando a determinação da atividade de MnP através da oxidação do vermelho de fenol na presença de peróxido de hidrogênio. A partir dos experimentos de otimização aplicando software para averiguar a atividade específica, foram feitas aplicações de condições otimizadas (aplicação de bagaço de cana, com umidade de 80%, pH 9,4 e temperatura 20°C), os ensaios 9 e 4 (Tabela 7) apresentaram maior atividade bruta e

específica, e sendo o ensaio 9 com menor atividade específica, quando comparado ao ensaio 4, pode-se dizer que o alto teor protéico do extrato, possivelmente causado pela pH médio igual a 7, favoreceu a produção de outras proteínas.

**Tabela 7 – Atividade de *T.villosa* na produção de MnP (bruto e específico) na fermentação em estado sólido de bagaço de cana de açúcar (SILVA *et al.*, 2014).**

Ensaio	Temperatura (°C)	Teor de umidade (%)	pH	Atividade bruta (U/L)	Teor de proteína (mg/L)	Atividade específica (U/mg)
1	23	74	4,60	75,09	3825,28	0,020
2	23	74	9,38	112,70	865,14	0,130
3	23	86	4,60	0,00	2422,96	0,000
4	23	86	9,38	89,50	534,35	0,167
5	33	74	4,60	0,00	4100,93	0,000
6	33	74	9,38	71,68	1413,63	0,051
7	33	86	4,60	0,00	2921,97	0,000
8	33	86	9,38	31,96	638,96	0,050
9	20	80	7,00	117,33	825,56	0,142
10	36	80	7,00	0,08	1761,38	0,000
11	28	70	7,00	67,00	3303,65	0,020
12	28	90	7,00	0,00	404,30	0,000
13	28	80	3,00	0,00	3812,55	0,000
14	28	80	11,00	1,93	1526,72	0,001
15	28	80	7,00	87,28	747,81	0,117
16	28	80	7,00	71,91	770,43	0,093
17	28	80	7,00	82,30	675,71	0,122
18	28	80	7,00	81,18	722,36	0,112

Com isso, após a otimização das condições de cultivo em substrato sólido para secreção de MnP com atividade máxima de 117.327 U/L, mostrou-se 20 vezes maior do que valores em estudos realizados por Machado *et al.* (2005) para três linhagens de *Trametes villosa* cultivadas em condições de fermentação submersa em meio com adição de bagaço de cana de açúcar como substrato lignocelulósico. As condições ideais para a produção de enzimas para o bagaço de cana foram: 80% de umidade em pH 9,38 incubado a 20 °C por 15 dias (SILVA *et al.*, 2014).

#### 4 CONCLUSÃO

Por meio desse trabalho foi possível desenvolver um referencial teórico a respeito dos principais fungos basidiomicetos de podridão branca e observar o alto potencial de biorremediação, uma vez que, são produtores de enzimas específicas extracelulares que atuam na degradação de substrato e de poluentes orgânicos. Apesar do alto potencial biotecnológico,

existe a limitação principal, que são as aplicações biotecnológicas em escala industrial dessas enzimas, tendo em vista que seu rendimento é baixo em processos fermentativos.

A partir dos estudos demonstrados foi possível concluir que a otimização das condições de cultivo em substrato sólido apresentou resultados satisfatórios, em escalas muito maiores, quando comparado a métodos em que as condições de cultivo não foram otimizadas. Além disso os resultados mostraram que *Trametes villosa* possui alto potencial ligninolítico principalmente na produção de Manganês Peroxidase (MnP), levando em conta também o cultivo do fungo utilizando resíduos agroindustriais, que são substratos de baixo custo e com alta disponibilidade.

Esses resultados mostram que mais estudos voltados para a otimização das condições de cultivo dos fungos com o intuito de melhorar a atuação das enzimas ligninolíticas por eles produzidos, é de grande valia. Além de os resíduos vegetais serem matérias-primas renováveis e sustentáveis, onde sua bioconversão através da deslignificação, é uma alternativa viável para produção de diversos produtos bioquímicos de valor agregado. Há também a aplicação das enzimas MnP, LiP e lacases em processos industriais biotecnológicos de vários setores socioeconômicos.

## 5 REFERÊNCIAS

AHN, M.; ZIMMERMANB, A. R.; MARTÍNEZ, C. E.; ARCHIBALD, D. D; BOLLAG, J.; DEC, J. Characteristics of *Trametes villosa* laccase adsorbed on aluminum hydroxide. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 41, p. 141–148, 2007.

ANDRIANI, A. *et al.* Sequential production of ligninolytic, xylanolytic, and cellulolytic enzymes by *Trametes hirsuta* AA-017 under different biomass of Indonesian sorghum accessions-induced cultures. **Bioresource Technology Reports**, v. 12, p. 100562, dez. 2020.

ANTUNES, J. R. de Q. **Bagaço de cana-de-açúcar como substrato para produção de enzimas ligninolíticas fúngicas**. 73 f. Tese (Pós-graduação em Tecnologias Ambientais) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.

ATILANO-CAMINO, M. M. *et al.* Improving laccase production from *Trametes versicolor* using lignocellulosic residues as cosubstrates and evaluation of enzymes for blue wastewater biodegradation. **Journal of Environmental Management**, v. 275, n. August, p. 111231, dez. 2020.

BABOROVÁ, P.; MÖDER, M.; BALDRIAN, P. CAJTHAMLOVÁ, K.; CAJTHAML, T. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. **Research in Microbiology**. v. 157, p. 248–253, 2006.

BALLAMINUT, N. **Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB 274 empregado em biorremediação de solo**. 176 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica, São Paulo, 2007.

BILAL, M. *et al.* Engineering Ligninolytic Consortium for Bioconversion of Lignocelluloses to Ethanol and Chemicals. **Protein & Peptide Letters**, v. 25, n. 2, p. 108–119, 2 maio 2018.

BREXÓ, Ramon Peres. **Produção de enzimas ligninolíticas, glioxal oxidase e proteases por fungos marinhos**. 2013. 51 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2013.

BUKH, C.; LUND, M.; BJERRUM, M. J. Kinetic studies on the reaction between *Trametes villosa* laccase and dioxygen. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 100, p. 1547–1557, 2006.

CABRAL, M. M. S.; ABUD, A. K. de S.; ROCHA, M. S. R. dos S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; GOMES, M. A. Composição da fibra da casca de coco verde *in natura* e após pré-tratamentos químicos. **Engevista**, v. 19, n. 1, p. 1415-7314, 30 jan. 2017.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista analytica**, v.1, n.44, p.44-48, dez. 2009.

CARDOSO, M. L. **Estudo da produção *in vitro* de enzimas ligninocelulolíticas por fungo basidiomiceto cultivado sob fermentação sólida de resíduos vegetais**. 71 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

CARNEIRO, R. T. DE O. *et al.* Trametes villosa Lignin Peroxidase (TvLiP): Genetic and Molecular Characterization. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 179–188, 28 jan. 2017.

CARUS, M.; DAMMER, L. The Circular Bioeconomy—Concepts, Opportunities, and Limitations. **Industrial Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 83–91, abr. 2018.

CHRISTIAN, V.; SHRIVASTAVA, R.; SHUKLA, D. MODI, H.; VYAS, B. R. M. Mediator role of veratryl alcohol in the lignin peroxidase-catalyzed oxidative decolorization of Remazol brilliant blue R. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 36, p. 426–431, 2005.

CONIGLIO, R. O. *et al.* Enzymatic hydrolysis of barley straw for biofuel industry using a novel strain of *Trametes villosa* from Paranaense rainforest. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 8, p. 753–762, 1 set. 2020.

CONIGLIO, R. O. *et al.* Optimization of cellobiohydrolase production and secretome analysis of *Trametes villosa* LBM 033 suitable for lignocellulosic bioconversion. **Arab Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 26, n. 1, p. 182–192, 2 jan. 2019.

DÍAZ, G. V. *et al.* Secretomic analysis of cheap enzymatic cocktails of *Aspergillus niger* LBM 134 grown on cassava bagasse and sugarcane bagasse. **Mycologia**, v. 112, n. 4, p. 663–676, 3 jul. 2020.

EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; LISÁ, L.; NERUD, F. Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinsum* and *Pleurotus calypttratus*. **Chemosphere**. v. 60, p. 398- 404, 2005.

ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. DE. **Fungos - Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. 2a ed. Caxias do Sul: EDUCS, Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010.

FLOUDAS, D. *et al.* The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1715–1719, 29 jun. 2012.

GIMENES, L. J. **Biodegradação de pentaclorofenol por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel: análises bioquímicas e moleculares**. 105 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2011.

GONZALES, L.; HERNÁNDEZ, J. R.; PERESTELO, F.; CARNICERO, A.; FALCÓN, M.A. Relationship between mineralization of synthetic lignins and the generation of hydroxyl radicals by laccase and a low molecular weight substance produced by *Petriellidium fusoidium*. **Enzyme and Microbial Technology**. 30: 474-481.

GUGLIOTTA, A. M. **Utilização de basidiomicetos nativosna remoção de corantes em efluentes na indústria têxtil**. 2002. 115 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

HAKALA, T. K.; LUNDELL, T.; GALKINA, S.; MAIJALAA, P.; KALKKINEN, N.; HATAKKA, A. Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 36, p. 461–468, 2005.

HAMMEL, K. E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 11, p. 349–355, 2008.

HOFRICHTER, M.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A. Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 4588–4593, 2001.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**. 30: 454-466. 2002.

JAMES, T. Y. *et al.* Toward a Fully Resolved Fungal Tree of Life. **Annual review of microbiology**, v. 74, n. 1, p. 291–313, 8 set. 2020.

JORGENSEN, H.; ERRIKSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F.; OLSSON, L. Purification and characterisation of five cellulases and one xylanases from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 32, p. 851–861, 2003.

JUSTO, A.; HIBBETT, D. S. Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. **TAXON**, v. 60, n. 6, p. 1567–1583, dez. 2011.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. S. T.; ARMAS, E. D. BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE TÊXTIL POR *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**. v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KAPICH, A. N.; STEFFEN, K.; HOFRICHTER, M.; HATAKKA, A. Involvement of lipid peroxidation in the degradation of a non-phenolic lignin model compound by manganese peroxidase of the litter-decomposing fungus *Stropharia coronilla*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 330, p. 371–377, 2005.

LACERDA, Felipe; NAVONI, Julio Alejandro; AMARAL, Vviane Souza do. **Biorremediação: Educação em saúde e alternativas à poluição ambiental**. Editora IFRN, Natal, 2019.

LOPEZ, M. J.; VARGAS-GARCÍA, M. C.; SUÁREZ-ESTRELLA, F.; NICHOLS, N. N.; DIEN, B. S.; MORENO, J. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete



Coniochaeta ligniaria and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 794-800, 2007.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; MONTEIRO, R. T. R.; BONONI, V. L. R. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 21: 297-301, 2005.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**. 36 (3). Set. 2005.

MACIEL, T. C., OLIVEIRA, S. L. R. ; RODRIGUES, S. **Investigação do potencial produtor de celulasas de fungos isolados da casca do coco verde (Cocos nucifera L.) e de Trichoderma reesei NRRL 60 utilizando resíduo agroindustrial como substrato**. In: I Congresso do Instituto Nacional de Frutos Tropicais e II Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Aracaju, 2010.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed., Porto Alegre: Artmed, 2016. 987 p.

MÄKINEN, M. *et al.* Genome description of *Phlebia radiata* 79 with comparative genomics analysis on lignocellulose decomposition machinery of phlebioid fungi. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 430, 28 dez. 2019.

MATHEUS, D. R., BONONI, V. L. R.; MACHADO, K. M. G. **Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 415-421, 2000.

MECHICHI, T.; MHIRI, N.; SAYADI, S. Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. **Chemosphere**. v. 64, p. 998–1005, 2006.

MEZA, J. C.; LOMASCOLO, A.; CASALOT, L.; SIGOILLOT, J.; AURIA, R. Lacase productin by *Pycnporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: Influence of ethanl vapours as inducer. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 3365-3371, 2005.

MIYAUCHI, S. *et al.* Integrative visual omics of the white-rot fungus *Polyporus brumalis* exposes the biotechnological potential of its oxidative enzymes for delignifying raw plant biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 201, 23 dez. 2018.

MOREDO, N.; LORENZO, M.; DOMINGUEZ, A.; MOLDES, D.; CAMESELLE, C.; SANROMNÁ, M. A. Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of

*Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 19, p. 665–669, 2003.

MOREIRA-NETO, S. L. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p. 2006.

NAHE, L.; FATINA, S. N.; SHEIKH, M. A. H.; AZEEZ, L. A.; SIDDIQUEE, S.; ZAIN, N. M.; KARIM, S. M. R. **Cellulase Enzyme Production from Filamentous Fungi *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori* in Submerged Fermentation with Rice Straw**. **Journal of Fungi**. 7 (10), 868, 2021.

OKADA, W. S. **Otimização da produção de inóculo fúngico de *Psilocybe castanella* CCB 444 para biorremediação de solos**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 138 p, 2010.

PAËS, G. *et al.* Tracking of enzymatic biomass deconstruction by fungal secretomes highlights markers of lignocellulose recalcitrance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 76, 1 dez. 2019.

QIAN, Y. *et al.* Enhancement of Cellulase Production in *Trichoderma reesei* via Disruption of Multiple Protease Genes Identified by Comparative Secretomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–12, 3 dez. 2019.

RAJA, H. A. *et al.* Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, p. 756–770, 24 mar. 2017.

REDDY, G. V.; BABU, P. R.; KOMARAIHAH, P.; ROY, K. R. R. M.; KOTHARI, I. L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus species* (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**. v. 38, p. 1457-1462, 2003.

ROGALSKI, J.; SZCZODRAK, J.; JANUSZ, G. Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii*. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 469–476, 2006.

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

- SANTOS, F. A. *et al.* Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quim. Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 13 jan. 2012.
- SCHMIDT-DANNERT, C. Biocatalytic portfolio of Basidiomycota. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 31, p. 40–49, abr. 2016.
- SHERWOOD, J. The significance of biomass in a circular economy. **Bioresource Technology**, v. 300, p. 122755, mar. 2020.
- SILVA, M. L. C. *et al.* Production of Manganese Peroxidase by *Trametes villosa* on Unexpensive Substrate and Its Application in the Removal of Lignin from Agricultural Wastes. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 05, n. 14, p. 1067–1077, 2014.
- SILVA, R. R. da. **Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores**. Tese (Doutorado) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.
- SONGULASHVILI, G. ELISASHVILI, V.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; HADAR, Y. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 41, p. 57-61, 2007.
- SUN, X.; ZHANG, R.; ZHANG, Y. Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamide gels. **Journal of Basic Microbiology**. v. 44, p. 220–31, 2004.
- TOMÉ, L. M. R. **Biologia de sistemas de *Trametes villosa* CCMB561: Integração de análises ômicas na compreensão do metabolismo da lignocelulose**. Exame de qualificação (Pós-Graduação) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gérias, Minas Gerais, 2021.
- TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology** 72: 169-183, 2000.
- VALÁŠKOVÁ, V.; ŠNAJDRA, J.; BITTNERB, B.; CAJTHAMLA, T.; MERHAUTOVÁ, V.; HOFRICHTERB, M.; BALDRIAN, P. Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 39, p. 2651-2660, 2007.

VIKINESWARY, S.; ABDULLAH, N.; RENUVATHANI, M.; SEKARAN, M.; PANDEY, A.; JONES, E.B.G. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 171-177, 2006.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to Fungal Physiology. Fungi. Chichester, **UK: John Wiley & Sons, Ltd.** p. 1–34, 2005.

XIAOBIN C., RONG J.; PINGSHENG, L.; SHIQIAN, T.; QIN, Z.; WENZHONG, T.; XUDONG, L. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 41, p. 258–264, 2007.

YAMANAKA R.; SOARES C. F.; MATHEUS D. R.; MACHADO K. M. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. **Braz J Microbiol.** 2008; 39(1):78-84.

YOSHIDA, Aline Mayumi da Silva. **Potencial biotecnológico de fungos de origem marinha: produção de enzimas ligninolíticas e avaliação da toxicidade.** 35 f. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, 2015.