

LEANDRO DE SOUZA LOPES

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS
LIGNOCELULOLÍTICAS E LIPOLÍTICAS FÚNGICAS PRODUZIDAS EM
RESÍDUO DE MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L864p
2018
Lopes, Leandro de Souza, 1985-
Produção, purificação e caracterização de enzimas
lignocelulolíticas e lipolíticas fúngicas produzidas em resíduo de
macaúba (*Acrocomia aculeata*) / Leandro de Souza Lopes. –
Viçosa, MG, 2018.
viii, 79 f.: il. (algumas color.).

Orientador: Maria Catarina Megumi Kasuya.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Fungos. 2. Resíduos. 3. Macaúba. 4. Enzimas de fungos.
I. Kasuya, Maria Catarina Megumi, 1961-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

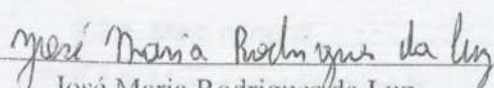
CDD 22. ed. 579.5

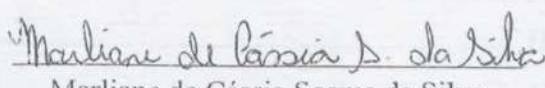
LEANDRO DE SOUZA LOPES

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS
LIGNOCELULOLÍTICAS E LIPOLÍTICAS FÚNGICAS PRODUZIDAS EM
RESÍDUO DE MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*)**

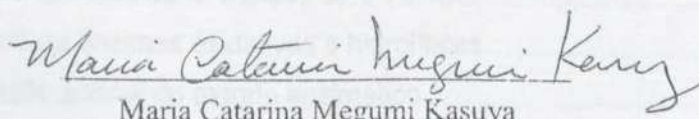
Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 27 de julho de 2018.


José Maria Rodrigues da Luz
(Coorientador)


Marliane de Cássia Soares da Silva
(Coorientadora)


Sabrina Feliciano Oliveira


Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. Introdução geral.....	1
1.1. Micro-organismos	2
1.2. Enzimas Lignocelulolíticas e lipolíticas	3
1.3. A macaúba.....	6
1.4. Referências	8
Artigo I: Produção, purificação e caracterização de enzimas lignocelulolíticas e lipolíticas produzidas por <i>Lentinula edodes</i> em resíduo de macaúba	11
1 Introdução.....	12
2. Material e métodos	14
2.1. Local de realização do trabalho.....	14
2.2. Inóculo.....	15
2.3. Obtenção das enzimas por fermentação em estado sólido.....	15
2.4. Determinação da biomassa fúngica	15
2.5. Medida do teor de proteínas solúveis.....	16
2.6. Determinação da atividade enzimática	16
2.6.1. Lignina peroxidase	16
2.6.2. Lacase	17
2.6.3. Manganês peroxidase	17
2.6.4. Celulases	17
2.6.5. Xilanases	18
2.7. Identificação da espécie produtora de lipases.....	18
2.7.1. Meio mineral	18
2.7.2. Meio com rodamina B	19
2.8. Purificação por exclusão molecular (G-100).....	20
2.9. Caracterização cinética do extrato proteico parcialmente purificado	20
2.10. Ensaio de descoloração do corante índigo.....	21
3. Resultados e discussão	21
3.1. Determinação da biomassa fúngica	21
3.2. Atividade lipolítica de <i>L. edodes</i> UFV 73.....	22
3.3. Atividade de enzimas oxidativas e hidrolíticas	23
3.4. Purificação parcial do extrato enzimático	25
3.5. Caracterização enzimática: Efeito da temperatura.....	28
3.6. Efeito do pH.....	30

3.7. Parâmetros cinéticos.....	32
3.8. Estabilidade térmica das enzimas	34
3.9. Aplicação do extrato enzimático de UFV 73.....	35
4. Conclusões.....	38
5. Referências.....	39
Artigo II: Produção, purificação e caracterização de enzimas lignocelulolíticas e lipolíticas produzidas por <i>Pleurotus spp.</i> em resíduo de coco de macaúba	44
1. Introdução	45
2. Material e métodos.....	47
2.1. Local de realização do trabalho.....	47
2.2. Inóculo.....	47
2.3. Obtenção das enzimas por fermentação em estado sólido.....	47
2.4. Determinação da biomassa fúngica	48
2.5. Teor de proteínas solúveis	48
2.6. Identificação do potencial de produção de lipases.....	48
2.6.1. Meio mineral	49
2.6.2. Meio com rodamina B	49
2.7. Determinação da atividade enzimática	50
2.7.1. Lignina peroxidase	50
2.7.2. Lacase	50
2.7.3. Manganês peroxidase	50
2.7.4. Celulases	51
2.7.5. Xilanases	51
2.8. Purificação por exclusão molecular (G-100).....	52
2.9. Caracterização cinética do extrato proteico parcialmente purificado	52
2.10. Ensaio de descoloração do corante índigo.....	53
3. Resultados e discussão	53
3.1. Biomassa fúngica.....	53
3.2. Atividade lipolítica.....	54
3.3. Atividade enzimática do extrato bruto.....	55
3.4. Purificação parcial do extrato enzimático (EEB)	58
3.5.1. Efeito da temperatura.....	63
3.5.2. Efeito do pH	65
3.5.3. Estabilidade térmica	67
3.5.4. Parâmetros cinéticos	69
3.6. Aplicação do EEPP de PLO 02, PLO 06 e PLE 05	72

4. Conclusão	73
5. Referências	74
CONCLUSÕES GERAIS	79

RESUMO

LOPES, Leandro de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Produção, purificação e caracterização de enzimas lignocelulolíticas e lipolíticas fúngicas produzidas em resíduo de macaúba (*Acrocomia aculeata*)**. Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Coorientadores: José Maria Rodrigues da Luz, Marliane de Cássia Soares da Silva e Wilton Soares Cardoso.

Espécies de basidiomicetos possuem a capacidade de crescer em uma série de resíduos agrícolas produzindo um complexo enzimático composto por várias enzimas lignocelulolíticas. Neste trabalho os fungos *Lentinula edodes* isolado UFV 73, *Pleurotus ostreatus* isolados PLO 02 e PLO 06, e *Pleurotus eryngii* isolado PLE 05, foram avaliados quanto a capacidade de produzirem enzimas lignocelulolíticas e lipolíticas quando crescidos em resíduo de coco de macaúba, e se essa produção era afetada pelo tempo de crescimento nesse substrato. Foi realizada a extração da proteína bruta (EEB) e este extrato foi submetido à purificação por cromatografia por exclusão molecular e posterior caracterização das enzimas quando à temperatura, pH, concentração do substrato e estabilidade térmica. Também foi avaliado se os fungos deste estudo apresentariam crescimento em meio mineral sólido no qual a única fonte de carbono foi óleo de oliva. Todos formaram halo alaranjado em meio com rodamina B, indicando a capacidade desse fungo em produzir enzimas com atividade lipolítica. O isolado UFV 73 apresentou atividade máxima de celulase, xilanase, lipase, lacase e manganês peroxidase (MnP) aos 37 dias de incubação. Após as etapas de purificação foram obtidos rendimentos de 489% (Lacase), 264% (MnP), 105% (celulase) e 9,5% (xilanase) em relação ao EEB. A faixa de pH ótimo variou entre as enzimas, sendo que lacase e lipase tiveram atividade máxima em pH 3 e 7, respectivamente. MnP, lacase e lipase tiveram atividade diretamente proporcional ao aumento da temperatura, enquanto, a atividade de celulase e xilanase não teve alteração em função desse parâmetro. A temperatura de maior atividade para MnP e lacase foi de 30 °C, 42 °C para lipase, 45 °C para xilanase, e a celulase manteve-se estável em todas as temperaturas analisadas. Entre os isolados de *Pleurotus*, o isolado PLO 02 foi o que apresentou maiores atividades de lacase e xilanase, enquanto o isolado PLO 06 foi o que apresentou maiores atividades de lignina peroxidase, manganês

peroxidase, celulase e lipase. O melhor resultado na purificação foi para a lacase alcançando rendimento de 105% (PLO 02), 315% (PLE 05) e 504% (PLO 06). As enzimas dos fungos do gênero *Pleurotus* apresentaram atividade constante em todas as temperaturas analisadas, na qual apenas lignina peroxidase e lipase tiveram picos de atividade em temperaturas próximas a 30 °C. As melhores atividades para as enzimas lacase, celulase e lipase de *Pleurotus* ssp. foram em pH 3. A xilanase permaneceu constante em todas as faixas de pH analisadas. A LiP e a MnP tiveram pico de atividade em pH 7. De uma forma geral, a atividade das enzimas de todos os isolados diminuiu nas primeiras duas horas de incubação (redução média de 79 % na atividade de celulase, 64% na de xilanase, 85% na de MnP, 87% na de lacase, 75% na de lipase e 71% na de LiP), permanecendo constante após esse período até as 16 h. As enzimas de todos os isolados seguiram a cinética de Michaelis-Menten. Dentre todos os fungos testados quanto a capacidade de degradar o corante índigo, o EEPP de PLE 05 foi o que demonstrou maior potencial para descoloração, alcançando uma eficiência de 100% após 24 h. Este é o primeiro estudo utilizando resíduos de coco de macaúba para a produção de enzimas lignocelulolíticas e lipases, através da fermentação em estado sólido por estes fungos, os quais apresentam alto potencial de utilização desses resíduos para a produção de enzimas.

ABSTRACT

LOPES, Leandro de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Production, purification and characterization of lignocellulolytic and lipolytic enzymes fungal produced in coconut residue macaw palm (*Acrocomia aculeata*)**. Advisor: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisors: José Maria Rodrigues da Luz, Marliane de Cássia Soares da Silva and Wilton Soares Cardoso.

The species of basidiomycetes are able to grow in agricultural residues by producing an enzymatic complex composed of lignocellulolytic enzymes. In this work, the fungi *Lentinula edodes* isolate UFV 73, *Pleurotus ostreatus* isolates PLO 02 and PLO 06, and *Pleurotus eryngii* isolate PLE 05 were evaluated for the ability to produce lignocellulolytic and lipolytic enzymes when grown in coconut residue of macaw palm, and if this production was affected by the growth time in this substrate. The crude protein (CEE) was extracted and this extract was purified by chromatography of molecular exclusion, and the enzymes were characterized according to temperature, pH, substrate concentration and thermal stability. It was also evaluated if fungi of this study were able to grow in solid mineral medium, in which the only source of carbon was olive oil. All of them formed orange halo in medium with rhodamine B, indicating the ability of this fungus to produce enzymes with lipolytic activity. UFV 73 showed maximum activity of cellulase, xylanase, lipase, laccase and manganese peroxidase (MnP) at 37 days of incubation. After the purification steps, increasing of yields of 489% for laccase, 264% for MnP, 105% for cellulase and 9.5% for xylanase were obtained in relation to CEE. The optimum pH range varied among the enzymes, and laccase and lipase presented maximum activity at pH 3 and 7, respectively. MnP, laccase and lipase presented activity directly proportional to the temperature increase, whereas the activity of cellulase and xylanase did not change as a function of this parameter. The highest activity for MnP and laccase was at 30 °C, 42 °C for lipase, 45 °C for xylanase, and for cellulase remained stable at all temperatures analyzed. Among *Pleurotus* isolates, PLO 02 showed the highest laccase and xylanase activity, while the PLO 06 showed the highest activity of lignin peroxidase LiP, MnP, cellulase and lipase. The best purification result was for laccase, achieving yield to 105% for PLO 02, 315% for PLE 05 and 504% for PLO 06. All enzymes of the *Pleurotus* isolates tested showed constant

activity at all temperatures, in which only lignin peroxidase and lipase had peaks of activity at temperatures close to 30 °C. The best activities for the laccase, cellulase and lipase enzymes of *Pleurotus* ssp. were at pH 3. The xylanase remained constant in all analyzed pH ranges. The LiP and MnP showed peak activity at pH 7. In general, the activity of the enzymes of all isolates decreased in the first two hours of incubation (mean reduction of 79% for cellulase, 64% for xylanase, 85% for MnP, 87% for laccase, 75% for lipase and 71% for LiP), remaining constant after this period during 16 h. The enzymes of all isolates followed the Michaelis-Menten kinetics. Among all the fungi tested for the ability to degrade the indigo dye, the PLE 05 PPEE showed the greatest potential for discoloration, reaching an efficiency of 100% after 24 h. This is the first study using coconut residues of macaw palm for production of lignocellulolytic enzymes and lipases, through the solid state fermentation by these fungi, which present high potential of use of these residues for the production of enzymes.

1. Introdução geral

Há uma tendência crescente à utilização de resíduos agroindustriais para a geração de produtos com valor agregado, como cogumelos comestíveis e medicinais, etanol, enzimas, ácidos orgânicos, entre outros.

Os fungos de podridão branca são eficientes degradadores dos resíduos lignocelulolíticos graças a sua capacidade de sintetizar enzimas hidrolíticas e oxidativas que são responsáveis pela degradação dos componentes principais da biomassa vegetal, incluindo a celulose, a hemicelulose e a lignina (Menezes et al., 2015).

As enzimas lignocelulolíticas são aplicadas em indústrias químicas, de alimentos, de celulose e papel, têxteis, de combustíveis, higiene, de alimentos para animais e agrícola (Manavalan et al., 2015). Para desenvolver tecnologias comercialmente significativas e de baixo custo de produção de enzimas lignocelulolíticas, várias abordagens podem ser exploradas. Uma abordagem interessante é a busca por fungos produtores de enzimas mais eficientes, como por exemplo uma enzima com taxa de conversão mais rápida com uma menor concentração do substrato. Outra abordagem é a utilização do potencial dos resíduos lignocelulósicos, alguns dos quais contendo concentrações significativas de indutores solúveis, garantindo uma produção eficiente de enzimas lignocelulolíticas (Manavalan et al., 2015).

Vários subprodutos da agroindústria e fungos de podridão branca são utilizados com sucesso para a produção dessas enzimas. Um resíduo que vem sendo gerado amplamente é o proveniente da extração do óleo do coco da palmeira macaúba. No processo de extração do óleo cerca de 24 t/ha/ano de resíduos são geradas na região do Alto do Paranaíba-MG (Conceição et al., 2013).

Este estudo tem o objetivo de avaliar a atividade lignocelulolítica e lipolítica de *L. edodes* (UFV 73), dois isolados de *Pleurotus ostreatus* (PLO 02 e PLO 06) e um de *Pleurotus eryngii* (PLE 05) cultivados em fermentação sólida no substrato proveniente de resíduos do processo de extração do óleo do coco da macaúba.

1.1. Micro-organismos

Os fungos de podridão branca (FPB) são um grupo de microrganismos que são capazes de degradar a lignina presente na biomassa vegetal. Os FPB são basidiomicetos tendo como exemplares espécies altamente exploradas economicamente como *Agaricus ssp.*, *Pleurotus ssp.* e *Lentinula* (Voběrková et al., 2018). *Agaricus* é o principal gênero explorado para a produção de cogumelos, contribuindo com 30% de todo cogumelo produzido mundialmente, seguido pelo gênero *Pleurotus* com 5 espécies contribuindo com 27% e em terceiro lugar *Lentinula edodes* com 17% (Royse, 2014).

Lentinula edodes, conhecido popularmente como shiitake é também uma boa fonte de carboidratos, proteínas e aminoácidos essenciais tendo baixo percentual de gordura, alta porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados e contém muitas vitaminas e minerais (Rahman et al., 2016). Esse fungo possui 18 tipos de aminoácidos, polissacarídeos, compostos imunomoduladores e anticancerígenos, sendo estes últimos utilizados junto a quimioterapia convencional (Bisen et al., 2010).

Por ser um fungo com a capacidade de degradar lignina, celulose e hemicelulose, shiitake pode ser cultivado numa variedade de resíduos advindos da agroindústria como serragem, lascas e cascas de eucalipto (Silva et al., 2005), grãos de centeio (Mata e Savoie, 1998), cascas de carvalho e blocos de serragem (Ryoo et al., 2017). Essa capacidade de degradar esses resíduos é devido a produção de um complexo enzimático composto por enzimas oxidativas e hidrolíticas, no qual a degradação da celulose varia de 35,4 a 74,0%; de hemicelulose, de 8,4 a 63,4%; e lignina entre 5,3 a 62,1% (Leatham, 1985).

Pleurotus ssp. são um grupo de fungos cosmopolitas crescendo em troncos de árvores em decomposição sendo conhecidos popularmente como cogumelos ostra, possuindo alto valor nutritivo e propriedades terapêuticas, além de uma variedade de aplicações biotecnológicas e ambientais (Knop et al., 2015). Esse gênero tem a capacidade de colonizar diversos resíduos advindos da agroindústria incluindo palha de arroz, palha de milho, palha de café, palha de trigo, casca de coco, casca de amendoim, bagaço de cana que são deixados no ambiente (Chanakya et al., 2015).

A síntese enzimática de *L. edodes* e *Pleurotus* ssp. está relacionada principalmente ao tipo de substrato utilizado para o seu cultivo. A concentração de enzima secretada pelo fungo é alterada pelo uso de substratos podendo ser produzidas celulasas (endoglicanase, exoglicase e beta-glicosidase), pectinases, hemicelulasas e ligninasas (Özçelik e Aysun, 2007). A produção destas enzimas pelo micélio é uma etapa crucial do processo de colonização do substrato e é um fator determinante para o rendimento produtivo dos cogumelos. Depois de sintetizadas, estas enzimas são secretadas no meio extracelular e estão envolvidas no processo de degradação do substrato (Regina, 2009).

1.2. Enzimas Lignocelulolíticas e lipolíticas

As enzimas lignolíticas oxidativas são classificadas em fenol oxidases e heme peroxidases. As enzimas fenol oxidases incluem as lacases, enquanto que as hemes peroxidases incluem manganês peroxidase, versatile peroxidase e lignina peroxidase. Também estão envolvidas na degradação da lignina, algumas enzimas acessórias, como a aril-álcool oxidase, glioxal oxidase e glicose-1-oxidase que geram o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) exigido pelas peroxidases, responsável pela oxidação inicial de compostos aromáticos (Falade et al., 2017).

A lignina peroxidase (LiP) é encontrada em muitos fungos de podridão branca e foi a primeira enzima lignolítica descrita por Tien e Kirk (1984). A LiP é uma glicoproteína que possui um átomo de ferro como grupo prostético. Sua massa molecular varia de 38 kDa a 43 kDa, possuindo 343 resíduos de aminoácidos, pontos isoelétricos variando de 3,3 a 4,7 e um pH ótimo em torno de 3,0 com álcool veratrílico como substrato. O pH ótimo ácido de LiP diferencia-a de outras peroxidases (Tien and Kirk 1984; Falade et al, 2017). A LiP tem a capacidade de oxidar compostos fenólicos e não fenólicos (Falade et al., 2017). Essa enzima possui um resíduo de triptofano exposto que faz a transferência de elétrons para os substratos e a variação desse resíduo é um fator capaz de modular a atividade enzimática (Furukawa et al., 2014).

A manganês peroxidase (MnP) foi descrita pela primeira vez por Kuwahara et al., (1984) no fungo *Phanerochaete chrysosporium*. A MnP contém um sítio catalítico de ligação ao Mn²⁺ que é formado por três resíduos ácidos

(dois Glu e um Asp). (Hammel e Cullen, 2008; Hofrichter et al., 2002). Essa peroxidase possui um grupo prostético heme, utiliza o H_2O_2 como co-substrato e é capaz de catalisar a oxidação de Mn^{2+} a Mn^{3+} . Este íon complexa-se com ácidos orgânicos como por exemplo, oxalato e/ou malonato e este complexo é capaz atacar a estrutura recalcitrante da lignina. Assim, MnP é uma enzima chave na degradação de lignina por fungos da podridão branca (Hofrichter, 2002). A MnP de *L. edodes* apresenta massa molecular no intervalo de 38 a 62 kDa e são consideradas ácidas (pH 3 a 5) de acordo com o ponto isoelétrico, embora, algumas enzimas neutras já tenham sido relatadas (Hofrichter, 2002). Essa enzima degrada principalmente compostos fenólicos, embora a oxidação de substratos não fenólicos tenha sido verificada durante o processo conhecido como peroxidação lipídica (Bao et al., 1994). A MnP é utilizada em estudos de biodegradação da lignina, (Hilden et al., 2000), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Bogan e Richard, 1995), ácidos húmicos (Hofrichter et al., 1998), corantes sintéticos e poluentes clorados (Hermann et al., 2013).

As lacases (LaCs) também fazem parte do complexo lignolítico dos fungos de podridão branca. Essas enzimas têm sido isoladas e purificadas a partir de fungos, bactérias, plantas, insetos e líquens (Awrence, 2004). As lacases fúngicas apresentam massa molecular entre 40 e 100 kDa e ponto isoelétrico em torno de pH 4,0 (Mansur et al., 2003). As LaCs pertencem à família das enzimas multicobre oxidases azuis por possuírem 4 átomos de cobre distribuídos em três domínios de seu sitio ativo (T1, T2 e T3) que são reduzidos enquanto o substrato é oxidado e a água é obtida como subproduto da redução do oxigênio (Subramanian et al., 2014). Dependendo do potencial redox (PR), as lacases são classificadas em PR baixo (0,4-0,6 V) e PR alto (0,6-0,8 V) (Klonowska et al., 2002; Subramanian et al., 2014).

Para que ocorra a oxidação da lignina, por qualquer dessas enzimas descritas, é necessário peróxido de hidrogênio. Este é produzido durante a ação de algumas enzimas como a Aril-álcool oxidases (AAO) que fornecem um suprimento constante de péroxido de hidrogênio que servirá como substrato para as peroxidases que degradam a lignina (Ferreira et al., 2015). O H_2O_2 é gerado durante a desidrogenação oxidativa de álcoois poliinsaturados usando oxigênio molecular como o acceptor final de elétrons (Ferreira, et al., 2015).

As celulasas têm sido amplamente estudadas quanto à sua importância na conversão de biomassa e outros materiais celulósicos que, de outra forma, são considerados resíduos. Essas enzimas são utilizadas na indústria de papel, indústria têxtil, biocombustível como fonte de energia renovável, alimentos para animais e detergentes (Behera et al., 2017).

Assim, como as enzimas ligninolíticas, as celulasas são um grupo de enzimas responsáveis pela degradação da parede celular vegetal. Elas catalisam a hidrólise da celulose, liberando produtos de baixa massa molecular como as hexoses. As celulasas incluem endoglicanases (Endo-1,4- β -glicanase, EGs), celobiohidrolases (Exocelobiohidrolase, CBHs) e β -glicosidases (BGs) (Dashtban et al., 2010). Em fungos, as enzimas desse complexo são classificadas conforme a região de ação na fibra celulolítica, compreendendo três classes de enzimas (Teeri, 1997): As endoglicanases clivam ligações internas nas microfibrilas localizadas nas regiões amorfas da celulose, diminuindo seu tamanho e gerando novas extremidades livres; As exoglicanases do tipo I atacam as extremidades redutoras. As exoglicanases do tipo II hidrolisam as extremidades não-redutoras da fibra, liberando glicose e celobiose como produtos. Esta celobiose liberada é hidrolisada à glicose pelas β -glucosidases (Teeri, 1997). Os fungos são os organismos mais amplamente estudados para produção de celulasas, devido à sua capacidade de produzir maiores quantidades desse complexo enzimático em comparação aos outros organismos (Dashtban et al., 2010).

Outra enzima importante na degradação da biomassa vegetal são as xilanases. Estas agem na porção hemicelulósica dos resíduos vegetais. As xilanases são enzimas extracelulares produzidas principalmente por bactérias e fungos que hidrolisam aleatoriamente as ligações β -(1 \rightarrow 4) da xilana e de xilooligossacarídeos (Beg et al., 2001). Essas enzimas são classificadas em dois grupos. O primeiro grupo inclui as enzimas de massa molecular baixa (< 30 kDa) e ponto isoelétrico básico e outro grupo é formado por aquelas de massa molecular elevada (>30 kDa) e ponto isoelétrico ácido. A maioria das xilanases apresentam massa molecular entre 6 a 80 kDa, estáveis entre 40 e 60 °C e pH ótimo na faixa de 4,5 a 6,5. Essas enzimas são amplamente utilizadas na indústria alimentícia para melhorar a qualidade das massas, na produção de

ração animal, indústrias de papel e celulose e na produção de biocombustíveis (Butt et. al., 2008).

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases) são outro grupo de enzimas produzidas por alguns fungos que catalizam a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos livres (Kumar et al., 2012). As lipases são enzimas que agem nas ligações ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa e cadeia curta, respectivamente (Sperb et al., 2015). As lipases comerciais são obtidas a partir de microrganismos que produzem e excretam uma grande variedade dessa enzima extracelularmente. Essas enzimas produzidas por microrganismos têm potencial para uma variedade de uso industrial, tal como na produção de alimentos, detergentes, no tratamento de águas contaminadas com resíduos, em medicamentos, cosméticos, indústria oleoquímica, laticínios, fabricação de papel, e produção de biosurfactantes pela síntese orgânica (Colla et al., 2010).

1.3. A macaúba

Acrocomia aculeata, mais conhecida como macaúba, é uma palmeira pertencente à família Arecaceae. Juntamente com outra espécie, *Elaeis guineans* são consideradas as palmáceas com maior potencial de produção de óleo no Brasil (Cardoso et al., 2017). A macaúba é encontrada em todos os estados brasileiros, se concentrando principalmente na região central no bioma cerrado onde mais de 44 espécies são listadas (Mirisola, 2009). É uma palmeira perene que se adapta a diferentes ecossistemas, encontrada mais comumente em regiões com chuvas variando entre 1500 e 2000 mm, temperaturas de 15 a 35 °C e altitudes de 150 a 1000 (Motta et al., 2002). Apesar do potencial na produção de óleo e ser a palmeira com maior dispersão no Brasil, sua exploração ainda é basicamente de atividades extrativistas (Cardoso et al., 2017).

Devido ao seu alto rendimento na produção de óleo, 6,2 ton/ha, 10 vezes mais que a soja, a macaúba tornou-se uma cultura atrativa economicamente (Tabela 1). Isso torna o óleo de macaúba uma das principais matéria-prima para a fabricação de biodiesel (Henderson et. al., 1997; Ciconini et. al., 2013; Da Silva e Teixeira, 2017). A composição da polpa e da semente possui, respectivamente:

umidade (62,24% e 14,88%), lipídeos (29,61% e 27,42%), proteínas (2,58% e 11,72%), carboidrato (6,57% e 46,91%) e cinzas (2,00% e 2,07%) (Silva, 1994).

Tabela 1- Rendimento potencial de biodiesel baseado nas características agrônômicas de cada espécie (litros por hectare).

Espécie	Litros
Soja (<i>Glicine max</i>)	420
Arroz (<i>Oriza sativa</i>)	770
Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	890
Amendoim (<i>Arachis hipogaea</i>)	990
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	1320
Pinhão bravo (<i>Jatropha curcas</i>)	1590
Abacate (<i>Persea americana</i>)	2460
Coco (<i>Cocos nucifera</i>)	2510
Macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>)	4200
Dendê (<i>Elaeis guineenses</i>)	5550

Fonte: Carvalho et al., 2011

No processo de extração do óleo, cerca de 23,7 toneladas de resíduos são geradas na região do Alto do Paranaíba-MG (Conceição et al., 2013). Uma opção para aproveitamento desses resíduos, poderia ser a produção de enzimas por fungos da podridão branca e produtores de cogumelos comestíveis, uma vez que os resíduos gerados na extração do óleo são ricos em carboidratos, proteínas e lipídeos (Silva, 1994).

1.4. Referências

- Awrence, D. A. L. Laccase: New Functions for an Old Enzyme. *Phytochemistry* 60 (2004): 551–65.
- Bao, W., et al. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS letters* 354.3 (1994): 297-300.
- Beg, Q., et al. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Applied microbiology and biotechnology*. 56.3 (2001): 326-338
- Behera, B. C., et al. Microbial Cellulases – Diversity & Biotechnology with Reference to Mangrove Environment: A Review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 15.1 (2017): 197–210.
- Bisen, P.S., Baghel, R.K., Sanodiya, B.S., Thakur, G.S., Prasad, G.B.K.S. *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*. 17 (2010): 2419–2430.
- Butt, M.S., et al. Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technology and Biotechnology*. 46.1 (2008): 22-31.
- Cardoso, A., Laviola, B.G., Santos, G.S., de Sousa, H.U., de Oliveira, H.B., Veras, L.C., e Favaro, S.P. Opportunities and challenges for sustainable production of *A. aculeata* through agroforestry systems. *Industrial Crops and Products*. (2017): 0 -1.
- Carvalho, K.J., A.L. Souza, and C. C. Machado. Ecologia, manejo, silvicultura e tecnologia da Macaúba. Convênio de Cooperação Técnica SECTES/FAPEMIG. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. (2011).
- Ciconini, G., et al. Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrado and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Industrial crops and products*. 45 (2013): 208 - 214.
- Chanakya, H. N., Malayil, S., & Vijayalakshmi, C. Cultivation of *Pleurotus* spp. on a combination of anaerobically digested plant material and various agro-residues. *Energy for sustainable development*. 27 (2015): 84 - 92.
- Colla, L.M., Rizzardi, J., Pinto, M.H., Rreinehr, C.O., Bertolin, T.E. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocess. *Bioresource Technology*. 101 (2010): 8308 - 8314.
- Conceição, L.D.H.C.S da, et al. Potencial da macaúba e avaliação de maciços. Embrapa Agroindústria de Alimentos-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: Congresso Brasileiro de Macaúba, 1., 2013, Patos de Minas. Consolidação da cadeia produtiva: anais. Brasília, DF: MAPA.2013.
- Dashtban, M. et al. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical reviews in biotechnology*. 30.4 (2010): 302-309.
- Da Silva, M.J., and M.G. Teixeira. An unexpected behavior of H3PMo12O40 heteropolyacid catalyst on the biphasic hydrolysis of vegetable oils. *RSC Advances*. 7.14 (2017): 8192-8199.
- Falade, A.O., et al. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiology Open*. 6.1 (2017): 1 - 14.
- Ferreira, P., et al. Aromatic stacking interactions govern catalysis in aryl-alcohol oxidase. *The FEBS journal*. 282.16 (2015): 3091-3106.

- Furukawa, T., Fatai O.B., Louise H. Microbial enzyme systems for lignin degradation and their transcriptional regulation. *Frontiers in biology*. 9.6 (2014): 448-471.
- Hammel, K.E., and D., Cullen. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current opinion in plant biology*. 11.3 (2008): 349 - 355.
- Henderson, A., Gloria G., and Rodrigo B. *Field guide to the palms of the Americas*. Princeton University Press. 16 (1997): 1 - 18.
- Hermann, K.L., et al. Expression of manganese peroxidase by *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* in solid state and submerged system fermentation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85.3 (2013): 965 - 973.
- Hildén, L., et al. Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation? *FEBS letters* 477.1-2 (2000): 79 - 83.
- Hofrichter, M., et al. Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. *FEBS letters*. 434.3 (1998): 362 - 366.
- Hofrichter, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP) Enzyme and Microbial Technology. 30 (2002): 454 – 466.
- Klonowska, Agnieszka et al. Characterization of a Low Redox Potential Laccase from the Basidiomycete c30. *European Journal of Biochemistry*. 269.024 (2002): 6119 – 25.
- Knop, D., Yarden, O., & Hadar, Y. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99 (2015): 1025 - 1038.
- Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Rina, C., Parshad, R., Gupta, V.K. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus sp.* strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Archives of Applied Science Research*. 4 (2012): 1763 - 1770.
- Kuwahara, Masaaki, et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS letters*. 169.2 (1984): 247 - 250.
- Leatham, G.F. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 5 (1985): 859-867.
- Manavalan, T. A. M, and K. Heese. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Current microbiology*. 70.4 (2015): 485 - 498.
- Mansur, M.A., et al. The White-Rot Fungus *Pleurotus Ostreatus* Secretes Laccase Isozymes with Different Substrate Specificities. *Mycologia*. 95.6 (2003): 1013–20.
- Mata, G., & Savoie, J. M. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14.4 (1998): 513 - 519.
- Menezes, C.R.De, and A.R., Barreto. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*. 19 (2015): 1365 – 91.
- Mirisola Filho, L.A. *Cultivo e Processamento do coco macaúba para produção de biodiesel*. Viçosa: Centro de Produções Técnicas. (2009).

- Motta, P. E. F. et al. Ocorrência de macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. Pesquisa agropecuária brasileira., Brasília. 37.7 (2002): 1023 – 1031.
- Özçelik, E.I., Aysun, P. Hazelnut Husk as a Substrate for the Cultivation of Shiitake Mushroom (*Lentinula Edodes*). Bioresource Technology. 98.14 (2007): 2652 – 58
- Rahman, M.A., Noorlidah, A., Norhaniza, A. *Lentinula edodes* (shiitake mushroom): An assessment of in vitro anti-atherosclerotic bio-functionality. Saudi Journal of Biological Sciences. (2016).
- Regina, M. Cinética do crescimento miceliano de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto. 2001. 87p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista. 2001; Botucatu.
- Royse, D. J. A global perspective on the high five: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* & *Flammulina*. In Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8). 1 (2014): 1 - 6.
- Ryoo, R., Wang, E. J., Jang, Y., Park, Y., & Ka, K. H. (2017). Cultivation Characteristics of *Lentinula edodes* Strains using Oak Tree Log and Sawdust Blocks in the Republic of Korea. 10 (2017).
- Silva, E. M., Machuca, A., & Milagres, A. M. F. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Letters in applied microbiology*. 40.4 (2015): 283 - 288.
- Silva, J. de C. Macaúba: fonte de matéria-prima para os setores alimentício, energético e industrial. Viçosa: CEDAF/DEF/UFV Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa. (1994): 41.
- Sperb, J.G.C. et al. Lipases e Biossurfactantes Por Fungos. Engevista. 17.3 (2015): 385 – 97.
- Subramanian, J., Thangavelu R., and Murugaiyan, K. Fungal laccases-properties and applications: a review. International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive. 5.2 (2014): 8 - 16.
- Tien, M., T.K., Kirk. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proceedings of the National Academy of Sciences. 81.8 (1984): 2280 - 2284.
- Teeri, T.T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. Trends in Biotechnology. 15.5 (1997): 160 - 167.
- Voběrková, S., Solčány, V., Vršanská, M., & Adam, V. Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross-linked aggregates. Chemosphere. (2018).

Artigo I: Produção, purificação e caracterização de enzimas lignocelulolíticas e lipolíticas produzidas por *Lentinula edodes* em resíduo de macaúba

Resumo

Lentinula edodes é um fungo de podridão branca produtor de cogumelos comestíveis do grupo de podridão branca. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade do isolado de *L. edodes* UFV 73 quanto à produção de enzimas lignocelulolíticas e lipolíticas, quando crescido em resíduo de coco de macaúba. Após a inoculação do fungo nesse substrato, amostras foram retiradas de cinco em cinco dias, totalizando 5 retiradas, e utilizadas para extração da enzima bruta (EEB), seguida de purificação por cromatografia por exclusão molecular. Posteriormente, as enzimas foram caracterizadas quanto à temperatura, pH, estabilidade e concentração do substrato. *L. edodes* apresentou crescimento em meio mínimo sólido no qual a única fonte de carbono era óleo de oliva, além da formação do halo alaranjado em meio com rodamina B que indica a capacidade de produzir enzimas lipolíticas. O cultivo de *L. edodes* em resíduo de macaúba demonstrou atividade enzimática máxima aos 37 dias de incubação. Após as etapas de purificação o rendimento da lacase foi de 489%, da MnP 264%, da celulase 105% e da xilanase de 9,5% em relação ao EEB. A temperatura ótima de atividade para a celulase não se alterou em toda a faixa analisada. A xilanase teve pico de 0,57 mmol L⁻¹min⁻¹ na temperatura de 45 °C. A MnP teve atividade máxima de 40 mmol L⁻¹min⁻¹ a 30 °C. A lacase teve atividade máxima de 181 mmol L⁻¹min⁻¹ a 60 °C e lipase pico de 0,11 mmol L⁻¹min⁻¹ a 37 °C. A faixa de pH ótimo variou entre as enzimas. A celulase e a xilanase mantiveram a atividade constante em todos os pHs. A MnP e Lacase tiveram atividade máxima em pH 3 alcançando 50 mmol L⁻¹min⁻¹ e 290,50 mmol L⁻¹min⁻¹, respectivamente. A lipase teve máximo de atividade em pH 7 com 46 mmol L⁻¹min⁻¹. MnP, lacase e lipase tiveram atividade diretamente proporcional ao aumento da temperatura, enquanto, a atividade de celulase e xilanase não tiveram alteração em função desse parâmetro. Todas as enzimas analisadas neste estudo seguiram a cinética de Michaelis-Menten. A celulase apresentou valores de 1,89 mg mL⁻¹ para K_M e V_{máx} de 0,0297 mmol L⁻¹min⁻¹; a xilanase 0,0695 mg mL⁻¹ para K_M e V_{máx} 0,173 mmol L⁻¹min⁻¹; A MnP 0,93 mg mL⁻¹ para K_M e V_{máx} de 18,69 mmol L⁻¹ min⁻¹; A lacase 272,7 mg mL⁻¹ para K_M e V_{máx} de 454,54 mmol L⁻¹min⁻¹; e a lipase 131 mg mL⁻¹ para K_M e V_{máx} de 24,39 mmol L⁻¹min⁻¹. De uma forma geral, as enzimas apresentaram um decaimento acentuado na atividade nas primeiras 4 h (redução de 88 % na atividade de celulase, 98% na de xilanase, 99% na de MnP, 99% na de lacase e 86% na de lipase), se estabilizando após esse período até as 16 h analisadas. O EEPP apresentou capacidade de descolorir o corante índigo numa taxa média de 40%, demonstrando, sua aplicabilidade no tratamento de efluentes contaminados por corantes de indústrias têxteis.

1 Introdução

Os resíduos agroindustriais são fontes abundantes de celulose, hemicelulose e lignina. Em muitos países esses resíduos são dispostos no meio ambiente sem tratamento adequado, causando muitos danos ao mesmo (Dashtban et al., 2009). Com a crescente expansão das atividades agroindustriais, grandes quantidades de resíduos lignocelulolíticos são gerados anualmente. No Brasil, 597 milhões de toneladas de resíduo são produzidos apenas da exploração do milho, cana-de-açúcar, arroz, mandioca, trigo, cítrico, coco e grama (Ferreira – Leitão et al., 2010). Muitos esforços vêm surgindo com o objetivo de converter esses resíduos em produtos de valor econômico, incluindo enzimas para aplicações industriais e biotecnológicas, apesar do custo para produzir as mesmas ainda ser muito alto. Uma possível solução para vencer esse obstáculo é o cultivo de fungos nesses resíduos, e a produção de enzimas como celulasas, hemicelulasas e ligninasas nos mesmos, reduzindo significativamente o custo alto do processo (Martins et al., 2011).

Um subproduto da agroindústria que tem sido gerado nos últimos anos é o resíduo do coco da macaúba (*Acrocomia aculeata*), que é formado a partir da extração do óleo do fruto dessa palmácea. Na região do Alto do Paranaíba, em Minas Gerais, cerca de 24 toneladas por ano desse resíduo vêm sendo gerado (Conceição et al., 2013). Pertencente à família Arecaceae, a macaúba é uma das espécies de palmácea com maior potencial de produção de óleo no Brasil (Cardoso et. al., 2017), podendo ser encontrada em todo território brasileiro, sendo encontrada principalmente no bioma cerrado onde mais de 44 espécies são listadas (Mirisola, 2009).

O basidiomiceto *Lentinula edodes*, pertence ao grupo de fungos de podridão branca por ter a capacidade de degradar a lignina, celulose e hemicelulose presente na biomassa vegetal. *L. edodes*, mais conhecido como shiitake, é o segundo fungo produtor de cogumelos mais consumido no mundo, sendo uma boa fonte de carboidratos, proteínas e aminoácidos essenciais, com baixo percentual de gorduras, alta porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados e também contém muitas vitaminas e minerais (Rahman et al., 2016). Por ser um fungo saprófita podemos encontrá-lo crescendo em troncos

de árvores em temperaturas entre 18 °C a 22 °C e umidade próxima a 90%. Graças a sua capacidade de degradar lignocelulose, *L. edodes* pode ser cultivado numa variedade de resíduos advindos da agroindústria.

L. edodes consegue degradar a biomassa vegetal graças a sua capacidade de secretar um complexo enzimático composto por oxidativas como lacase e manganês peroxidase e hidrolases compostas principalmente por celulases e xilanases (Montoya et al., 2015). A atividade e a quantidade de cada enzima secretada vai depender do tipo de substrato utilizado para o crescimento do fungo (Özçelik e Aysun, 2007). Essas enzimas possuem uma vasta aplicabilidade biotecnológica em várias áreas das indústrias e o mercado mundial desses catalizadores foi estimado em cerca de 2,6 a 3,0 bilhões de euros por ano com crescimento estimado de 8 bilhões em 2016 (Jaramillo et al., 2015). Algumas dessas aplicações estão resumidas na tabela 2.

Diante do exposto e do potencial de *L. edodes* de crescer e produzir o complexo enzimático lignocelulolítico em resíduos agroindustriais ricos em celulose, hemicelulose e lignina, o objetivo do presente trabalho é a produção de enzimas lignocelulolíticas e lipolíticas por *L. edodes* cultivado em resíduo do coco da macaúba, e posterior purificação e caracterização das mesmas.

Tabela 2. Relação de algumas aplicações das enzimas lignocelulolíticas de origem fúngica

Aplicação	Enzimas	Referência
Deslignificação	Lacase	Virk et al. 2012
	MnP	Virk et al. 2012
	LiP	Falade et. al.,2016
Bio-branqueamento	Lacase, MnP e xilanase	Saleem and Ahmed. 2018
Tratamento de efluentes	Lacase	Kunamneni et al. 2008
	MnP	Chen and Yien. 2015
	LiP	Falade et al.,2016
Remoção de fenóis de bebidas	Lacase	Minussi et al. 2007
	MnP	Oliveira et al. 2011
Estabilização de vinho e cerveja	Lacase	Minussi et al. 2007
Processamento de sucos de frutas	Lacase	Minussi et al. 2007
Biorremediação de compostos aromáticos	Lacase	Elisashvili et al. 2010
	MnP	Khambhaty et al. 2015
Biocombustíveis	Lacase	Shraddha et al. 2011
	MnP	Amin et al. 2010
	Celulase	Srivastava et al. 2017
	Xilanase	Dodd and Cann. 2009
	LiP	Falade et al.,2016
Ganho de peso em frangos	Xilanase	Gonzalez-Ortiz et at. 2017
Melhoria da qualidade de pães	Xilanase	Cunha et al. 2018
Clarificação de sucos	Xilanase	Shahrestani et al. 2016
Indústria têxtil	Celulase	Juturu and Wu, 2014
Indústria de detergentes	Celulase	Juturu and Wu, 2014
Alimentação animal	Celulase	Juturu and Wu, 2014

2. Material e métodos

2.1. Local de realização do trabalho

O trabalho foi realizado no Laboratório de Associações Micorrízicas / Departamento de Microbiologia / Instituto de Biotecnologia aplicada a Agropecuária – BIOAGRO / Universidade Federal de Viçosa–UFV.

2.2. Inóculo

O isolado UFV 73 de *L. edodes* utilizado no estudo pertence à coleção de fungos do Laboratório de Associações Micorrízicas / Departamento de Microbiologia / Instituto de Biotecnologia aplicada a Agropecuária – BIOAGRO / Universidade Federal de Viçosa–UFV. A estirpe foi cultivada em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido de 1 g L⁻¹ de lignina e mantido a 25 ± 1 °C por 15 dias em BOD.

2.3. Obtenção das enzimas por fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido ocorreu em frascos de 250 mL contendo 100 g do substrato de macaúba. Esse resíduo foi moído, umedecido e esterilizado por calor úmido durante 1 hora a 121 °C, por duas vezes, no intervalo de 48 h em frascos de vidro de 208 mL. Após isso, o resíduo foi inoculado com 10 gramas de fungo que foi crescido em sementes de sorgo por 15 dias a 25 °C. Após a colonização vertical do substrato pelo fungo, foram retirados 3 frascos de 5 em 5 dias para análises, totalizando 5 retiradas (25 dias). A colonização do fungo foi observada por meio da visualização do micélio ao olho nu.

O extrato enzimático bruto (EEB) foi preparado pela adição de 50 mL de tampão citrato de sódio (50 mmol L⁻¹, pH 4,8) em 25 g do substrato colonizado pelo fungo. Essa mistura foi homogeneizada em gral e centrifugada a 6000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi submetido a uma filtração em papel filtro (Whatman No.1 filter paper). O permeado foi utilizado para análises de atividade enzimática, determinação de proteínas solúveis e purificação das enzimas lignocelulolíticas.

2.4. Determinação da biomassa fúngica

A biomassa fúngica foi determinada pelo teor de ergosterol (Richardson e Logendra,1997). Amostras de 1 g do micélio/substrato foi misturado com areia

estéril (5-10 g). Essa mistura foi triturada em gral e 1 mL da solução de etanol (Merck) 95 % (v/v) foi adicionado para facilitar a homogeneização. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de centrífuga contendo 0,3 g de polivinilpirrolidona (PVP, Sigma) e 10 mL etanol. A solução foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com coluna Shimadzu fase reversa CLC-ODS 25 cm e detector de UV a 280 nm (Aminex HPX-87H, 9µm x 7.8 mm, Bio-Rad, Munich, Germany).

Para determinar a massa seca, 5 g do substrato colonizado foi mantido a 60 °C até a obtenção de uma massa constante (Barajas-Aceves et al., 2002).

2.5. Medida do teor de proteínas solúveis

As quantificações das proteínas solúveis nos EEB foram realizadas pela metodologia descrita por Bradford (1976). A curva padrão foi feita utilizando albumina sérica (1% p/v) com a concentração variando entre 0,05 a 9 µg mL⁻¹. Para cada reação foi utilizado 1,0 mL do reagente de Bradford (SIGMA, código B6916), 1 mL de EEB e 6 mL de água. Essa reação foi incubada por 10 min a 25 °C. A medida da absorvância foi realizada a 595 nm no espectrofotômetro (Multiskan Go – Thermo scientific).

2.6. Determinação da atividade enzimática

2.6.1. Lignina peroxidase

A atividade da lignina peroxidase foi determinada por espectrofotometria baseada na mudança de absorvância a 310 nm a 30 °C (Tien e Kirk, 1984). A reação continha 1,0 mL de tampão de tartarato (100 mmol L⁻¹, pH 3,5), 1 mL de álcool veratrílico (4 mmol L⁻¹), 250 µL de peróxido de hidrogênio (0,2 mol/L) e 100 µL de EEB.

2.6.2. Lacase

A atividade da lacase foi medida utilizando 2,2'-azino-bis-3-etilbenzoatizol-6-sulfônico (ABTS) a 30 °C (Buswell et. al., 1995). A reação para um volume final de 3 mL continha 2,3 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0), 0,1 mL de ABTS (1mmol L⁻¹) e 0,6 mL de EEB. Essa reação foi incubada em banho maria a 37 °C por 2,0 min. O comprimento de onda utilizado para medida da absorvância foi de 420 nm.

2.6.3. Manganês peroxidase

A atividade da MnP foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Kuwahara e colaboradores. (1984). Para a reação foi utilizado 500 µL de EEB, 100 µL de vermelho de fenol (1 g L⁻¹), 100 µL de lactato de sódio (250 mM, pH 4,5), 200 µL de soro de albumina bovino (1% p/v), 50 µL de peróxido de hidrogênio e 50 µL de sulfato de manganês. Essa reação foi incubada no banho maria a 37 °C por 15 min e, posteriormente, adicionado 40 µL de hidróxido de sódio (2M) e 2 mL de água. A absorvância da reação foi determinada a 610 nm.

2.6.4. Celulases

A atividade enzimática de celulase foi analisada de acordo com o método descrito por Mandels et al., (1976). Para a reação foi utilizado papel watman nº 1 cortado em tiras, 500 µL de tampão citrato de sódio (50 mmol L⁻¹, pH 4,8), 500 µL de EEB. Essa mistura de reação foi mantida por 12 h a 50 °C em banho maria. Para a caracterização da celulase foi utilizado como substrato 250 µL de carboximetilcelulose. O teor de açúcares redutores foi determinado pela adição de 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Em seguida, a mistura foi incubada em banho maria por 5 min a 100 °C. A reação foi diluída com a adição de 8 mL de água. O comprimento de onda utilizado para determinação da absorvância foi de 540 nm.

2.6.5. Xilanases

A atividade enzimática de xilanase foi analisada por método colorimétrico (Bailey et. Al., 1992). Para a reação foi utilizado 500 µL de tampão acetato de sódio, 250 µL EEB, 250 µL de xilana. Essa reação foi incubada por 20 min a 50 °C em banho maria. As etapas de determinação de açúcares redutores foram semelhantes aquelas descritas na atividade de celulase.

2.6.6. Lipases

A atividade lipolítica foi determinada pelo método proposto por Burkert et al., (2004), o qual se baseia na titulação com hidróxido de sódio (NaOH) dos ácidos graxos livres liberados pela ação da lipase presente no extrato enzimático sobre os triacilgliceróis do óleo de soja emulsionados em goma arábica. A mistura da reação continha 5 mL de emulsão de óleo de soja, 2 mL de tampão fosfato (10 mmol L⁻¹, pH 7,0) e 1 mL de EEB. Essa reação foi homogeneizada por 1 min e incubado a 37 ° C durante 30 min. Após a incubação, 10 mL da mistura acetona-etanol (1: 1 v / v) foi adicionada. Os ácidos graxos livres liberados foram titulados com NaOH (0,05 M).

2.7. Identificação da espécie produtora de lipases

Esse teste foi feito utilizando duas metodologias para validação da presença de lipase no EEB. O primeiro método foi a inoculação do fungo em meio mínimo sólido contendo óleo de oliva como única fonte de carbono. O segundo método foi feito em meio de cultura acrescido de rodamina B.

2.7.1. Meio mineral

Para verificarmos se *L. edodes* têm a capacidade de utilizar lipídeos como fonte de carbono o mesmo foi inoculado em meio mineral mínimo acrescido de 3% de óleo de oliva e incubado por 10 dias a 25 °C. Esse meio de cultura foi composto de sulfato de magnésio heptahidratado (0,25 mmol L⁻¹), fosfato

monopotássico ($0,04 \text{ mmol L}^{-1}$), nitrato de amônio ($4,0 \text{ mmol L}^{-1}$), nitrato de potássio (mmol L^{-1}), cloreto de cálcio dihidratado ($0,25 \text{ mmol L}^{-1}$), ácido bórico ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$), sulfato de zinco ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$), sulfato de cobre ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$), permanganato de amônio ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$), cloreto férrico ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) e 3% (v/v) de óleo de oliva. Esse meio foi esterilização por calor úmido em autoclave comercial por 15 min.

Nessa composição do meio de cultura pode haver traço de carbono, mas não suficiente para crescimento do fungo. Para eliminar essa hipótese foi feito um controle sem adição de óleo de oliva ao meio mineral, além do uso do método com rodamina B.

2.7.2. Meio com rodamina B

L. edodes foi inoculado em meio de cultura sólido com rodamina B e óleo de oliva, de acordo com a metodologia de Kouker e Karl (1987). O meio de cultura foi composto pelo corante rodamina B (0,001% m/v), caldo nutriente (8 g L^{-1}), ágar (10 g L^{-1}), cloreto de sódio (4 g L^{-1}) e óleo de oliva (3 % v/v) conforme recomendação de Kouker e Karl (1987). Os reagentes foram misturados e esterilizados em autoclave por 15 min. A rodamina B foi esterilizada por filtração em membrana ($2 \mu\text{m}$). O permeado foi adicionado ao meio de cultura previamente esterilizado por calor úmido.

As placas de Petri contendo o meio de cultura com rodamina B foram divididas perpendicularmente ao meio com uso de uma caneta. Em um dos lados da placa inoculou-se o isolado UFV 73 de *L. edodes* (um fragmento de 1 cm^2), e outra parte da placa foi feito uma estria simples de *Serratia marcescens* que foi utilizada como controle positivo para produção de lipase. As placas foram incubadas por 5 dias a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Após esse período essas placas foram submetidas à radiação ultravioleta ($\lambda=350 \text{ nm}$). A produção de lipase foi evidenciada pela formação de um halo alaranjado fluorescente na superfície das placas (Shelley et al., 1987). Esse halo foi medido com uma régua para estimativa da atividade enzimática.

2.8. Purificação por exclusão molecular (G-100)

Para a purificação, foram selecionados os três tempos de incubação com maior atividade enzimática. Os EEBs foram misturados e submetidos a uma precipitação com sulfato de amônio (40% de saturação) a 4 °C por 12 h. Após esse período, a solução foi centrifugada a 4000 rpm por 15 min. O precipitado foi armazenado a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e novamente precipitado com sulfato de amônio (80% de saturação) nas mesmas condições de temperatura, tempo de incubação, centrifugação e armazenamento da primeira precipitação. Os precipitados foram ressuspensos em tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹, pH 5,0) seguido por uma diálise durante 12 h contra esse mesmo tampão.

A mistura obtida após da etapa anterior foi aplicada à Coluna de Sephadex G-100 (80 cm x 2,0 cm) previamente equilibrada com o tampão da diálise. Após a eluição com tampão acetato de sódio (pH = 4,5) amostras foram coletadas a uma taxa de 2 mL min⁻¹ de 20 mL de extrato proteico parcialmente purificado (EPP) que foram analisadas quanto ao teor de proteínas solúveis e a atividade enzimática. O EPP foi também utilizado para a caracterização cinética das enzimas.

2.9. Caracterização cinética do extrato proteico parcialmente purificado

A caracterização das enzimas lignocelulolíticas e lipolíticas foi realizada a partir dos efeitos da temperatura de incubação, pH, concentração do substrato e estabilidade térmica.

A determinação da temperatura foi avaliada pela incubação das enzimas em seus respectivos substratos a 4, 15, 30, 45 e 60 °C.

Para avaliar o pH ótimo foram utilizados citrato de sódio (50 mmol⁻¹) e fosfato de sódio (50 mmol⁻¹) nos pH 3,0; 7,0 e 10, respectivamente para as lignocelulases e lipases.

O efeito da concentração do substrato enzimático na atividade das enzimas lignocelulolíticas foi realizado utilizando seus respectivos substratos nas concentrações de 1/8, 1/4, 1/2, 2, 4, 8, 16 e 30 vezes. Para lipase, esse efeito foi feito nas concentrações do substrato de 1/8, 1/4, 1/2, 2, 3, 4 e 5 vezes.

Para verificar a estabilidade térmica das enzimas presentes no EEPP, as mesmas foram incubadas por 30, 60, 120, 240, 480, 960 min nas suas respectivas temperaturas e Phs ótimos de atividade.

2.10. Ensaio de descoloração do corante índigo

O EEPP foi avaliado quanto à sua capacidade de descolorir o corante índigo. Em tubos de ensaio de 10 mL foi adicionado o corante índigo (0,2 g mL⁻¹) nos volumes de 400, 600 e 800 µl e completados com EEPP até o volume de 1 mL (Souza, 2012). A reação ocorreu por 5 min a 35 °C. Posteriormente foram feitas as medidas de absorvância em espectrofotômetro à 580 nm. As medidas foram feitas após 5 min e 5 h após a incubação.

3. Resultados e discussão

3.1. Determinação da biomassa fúngica

Aos 57 dias de incubação em resíduo do coco da macaúba foi observado um aumento de 9,5% na biomassa seca de *L. edodes* em relação ao controle não inoculado. Uma correlação positiva (94%) entre a biomassa fúngica e a produção de ergosterol durante o período de incubação do fungo pode ser observada nesse período (Figura 1).

A produção de ergosterol por *L. edodes* cultivado em coco de macaúba foi diretamente proporcional ao tempo de incubação com coeficiente de determinação superior a 90%. A utilização desse esterol para medida indireta da biomassa fúngica tem sido também realizado por outros autores (Asplund et al., 2018, Hagenbo et. al., 2018, Porep et al., 2014). Além disso, Van Kuijk et al.,

(2017) também observaram um aumento constante na biomassa de *L. edodes* cultivado em lascas de carvalho e palha de trigo durante 40 dias de incubação.

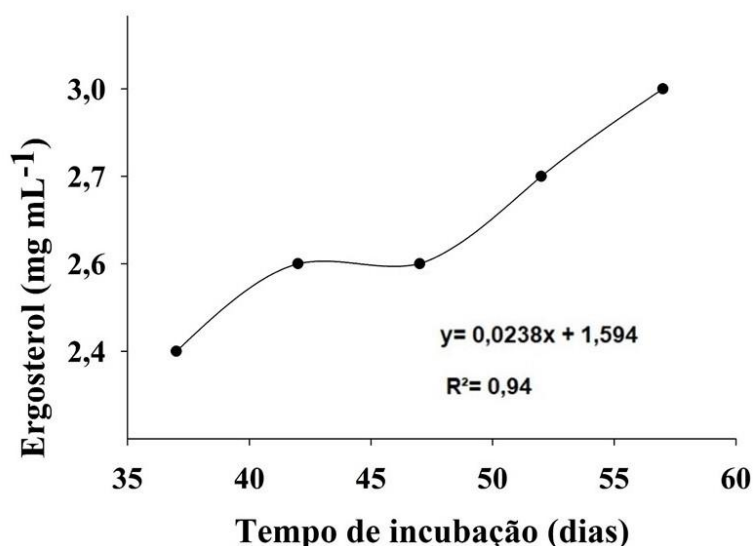


Figura 1. Produção de biomassa (mg mL⁻¹) produzida pelo fungo *Lentinula edodes* isolado UFV 73 cultivado em resíduo do coco da macaúba.

3.2. Atividade lipolítica de *L. edodes* UFV 73

No teste em meio mineral foi observado o crescimento micelial (Figura 2). Dessa forma pode-se constatar que *L. edodes* tem a capacidade de degradar lipídeos e utilizá-los como fonte de energia e carbono.



Figura 2. Crescimento do fungo *Lentinula edodes* isolado UFV73 em meio mínimo acrescido de 3% (v/v) de óleo de oliva após 10 dias de incubação a 25 °C.

L. edodes apresentou também resultado positivo no teste com rodamina B com a formação de um halo fluorescente alaranjado quando submetidos a luz UV (Figura 3). Esse halo é formado devido à reação dos ácidos graxos produzidos durante a hidrólise do óleo de oliva com a rodamina B, formando um complexo que é fluorescente na luz UV. Esse resultado ratifica a produção de lipase por esse fungo. Entretanto, na literatura ainda não foi descrito a produção de lipases por *L. edodes*, sendo este trabalho o primeiro a descrever tal capacidade. Estudos semelhantes foram feitos para alguns fungos isolados de ambientes contaminados com óleos onde conseguiram determinar a atividade lipolítica em *Trichothecium roseum* (Gopinath et al., 2013), *Penicillium* sp., *Rhizomucor* sp. e *Aspergillus* sp. (Rodrigues et al., 2016) e *Lentinus crinitus* (Cambri et al., 2016).

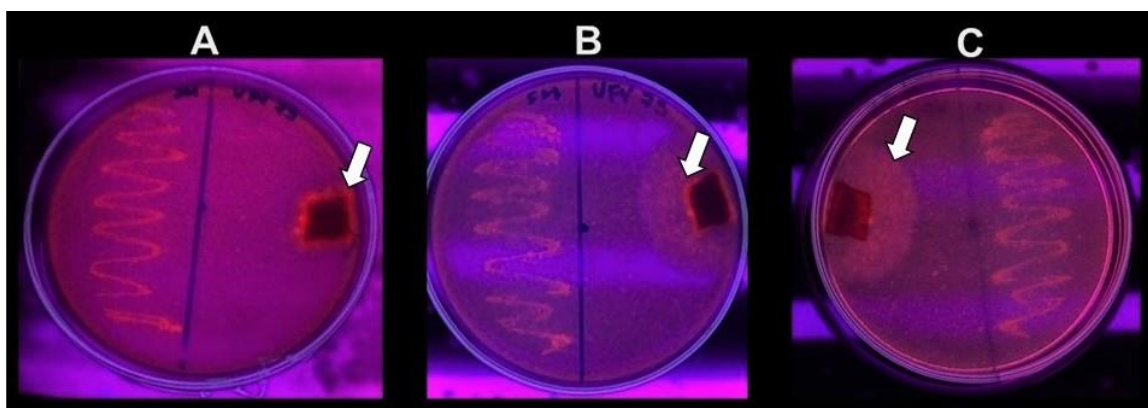


Figura 3. Produção de lipases pelo fungo *Lentinula edodes* UFV 73 em meio contendo rodamina B após 3 (A) e 5 (fundo da placa, B, e frente da placa, C) dias de incubação. A produção de lipases é identificada pela presença de halos alaranjados em volta da colônia fúngica.

3.3. Atividade de enzimas oxidativas e hidrolíticas

No extrato enzimático bruto (EEB) foi detectado atividade de celulase, xilanase, MnP, lacase e lipase (Figuras 4 e 5).

As atividades das enzimas hidrolíticas, celulase e xilanase foram similares aos das enzimas oxidativas (Figura 4). A atividade de lacase e manganês peroxidase teve seu ápice aos 37 dias decaindo posteriormente, devido à

diminuição do substrato disponível (Figura 4). Comportamento de forma semelhante foi relatado por Cavallazi e colaboradores (2004) no qual a maior atividade dessas enzimas foi verificada entre 28 e 35 dias. Resultado semelhante foi também demonstrado para celulases e xilanases no qual o pico de maior atividade para 3 isolados de *L. edodes* cultivados em palha de café foi na quinta semana de incubação (Mata et al., 2016). Para lacase e MnP de *L. edodes* isolado 3221 BE, os maiores valores de atividade foram após 25 dias de incubação em palha de trigo (Elisashvili et al., 2015) (Tabela 2).

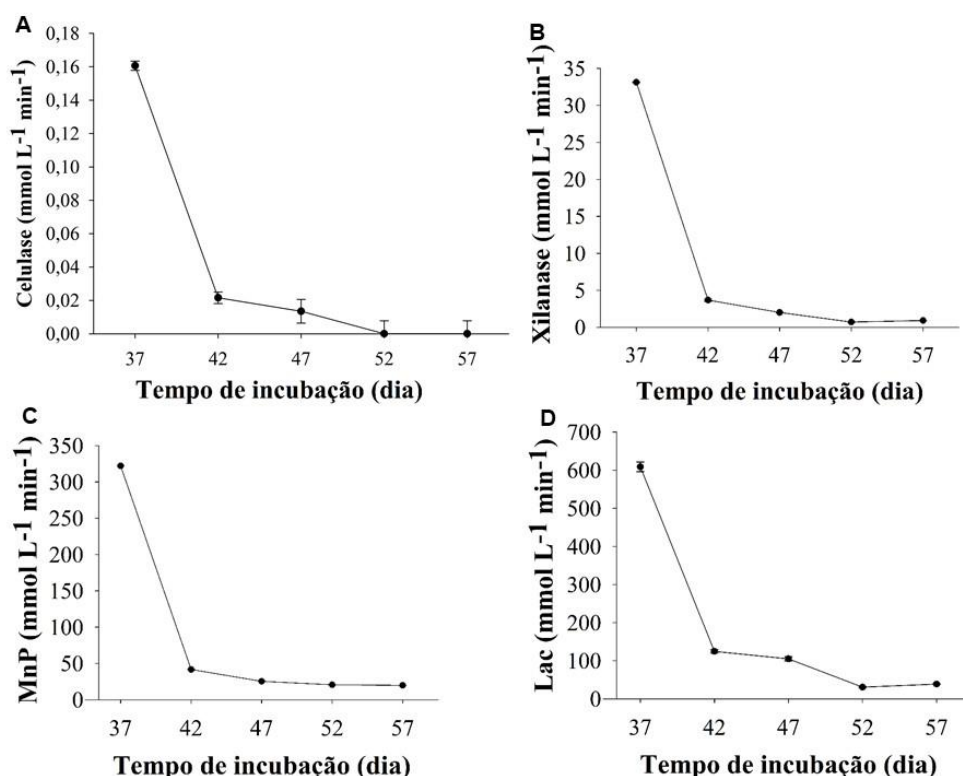


Figura 4. Atividade específica das enzimas do fungo *Lentinula edodes* UFV 73 quando cultivado em resíduo do coco da macaúba em diferentes tempos de incubação. (A) celulase, (B) xilanase, (C) manganês peroxidase (MnP) e (D) lacase (Lac).

No EEB de *L. edodes* foi também detectada a atividade lipolítica em todos os tempos de incubação sendo a maior atividade aos 37 dias (Figura 5). A produção de lipases é relatada em um grande número de microrganismos (Amin et al., 2011), porém, até este trabalho, não foi relatado a produção dessa enzima por *L. edodes*. Em *Ganoderma lucidum*, também um fungo basidiomiceto, a produção de lipase chega a 4838 U/g quando utilizado o p-nitrofenol palmitato

como substrato enzimático (Amin et al., 2011). Dentre os maiores produtores de lipases empregados na produção industrial podem ser citados *Aspergillus niger* (0,65 mM min⁻¹) e *Rhizopus oryzae* (0,22 mM min⁻¹) (Ramos-Sánchez et al., 2015). Valores menores que estes foram encontrados para o isolado UFV 73, tendo máximo de atividade aos 37 dias de incubação com produção de 0,11 mM min⁻¹. Em outro estudo no qual avaliaram a produção de lipase pelo método titulométrico para 7 isolados de *Aspergillus* sp. a atividade máxima encontrada foi de 0,000750 mM min⁻¹ (Roveda et al., 2010).

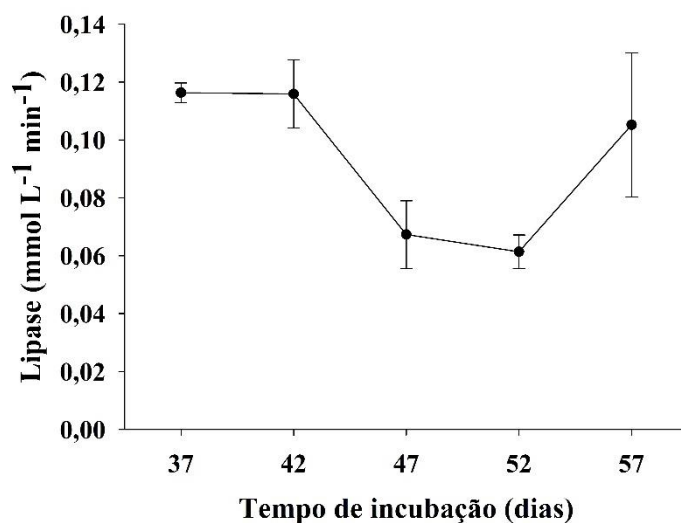


Figura 5. Atividade enzimática específica da lipase do fungo *Lentinula edodes* isolado UFV 73, durante o cultivo em resíduo do coco da macaúba.

Similarmente ao observado em outro estudo com *L. edodes* (Carvalho, 2011), não se detectou atividade de LiP no EEB (Figura 5, Tabela 2). Estudos mostram que o gene para síntese desta enzima não foi encontrado no genoma desse fungo (Sakamoto et al., 2017), o que reforça nosso resultado.

3.4. Purificação parcial do extrato enzimático

O EEB foi dialisado e eluído com tampão acetato de sódio em uma coluna SEPHADEX G-100 até não ser mais detectada a atividade enzimática (Tabela 3). O coeficiente de correlação entre o tempo que o tampão leva para passar na

coluna e a quantidade do mesmo eluído foi de 99%. Posteriormente, a atividade bruta e específica de ambas as etapas do processo de purificação foi feita.

Houve um aumento na atividade específica das enzimas lacase e MnP após a diálise e a coluna de exclusão molecular (Tabela 4). Também foi observado rendimentos de 489% e 264%, respectivamente, para lacase e MnP após a purificação em SEPHADEX G-100 (Tabela 4). Trabalhos semelhantes tiveram um rendimento de 2,5% (Nagai et al., 2009) e 24 % (Nagai et al., 2003) para lacases isoladas do micélio e corpo de frutificação, respectivamente, para *L. edodes* cultivado em serragem. No estudo de Boer e colaboradores (2006) o rendimento para a MnP foi de 26,6% para o mesmo fungo cultivado em sabugo de milho.

Para celulase e xilanase, o rendimento após a cromatografia de exclusão molecular foi de 105% e 9,5%, respectivamente (Tabela 4). Alguns trabalhos mostram um rendimento de 12% (Mishra et al., 1990b) e 135,6% (Lee et al., 2007) para xilanases produzidas por *L. edodes*. Não há relatos de trabalhos em que a celulase de *L. edodes* foi purificada. No basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* um rendimento de 8,63% de aproveitamento foi alcançado para esta enzima (Rodrigues, 2014). Apesar do rendimento ter aumentado para as celulases, a sua atividade total e específica diminuiu após a cromatografia, o que pode ser devido a atividade sinérgica. Ao contrário das lignolíticas que atuam sozinhas na degradação da lignina, as celulases (endoglucanases, exoglucanase, β – glicosidase) agem em conjunto para degradar a celulose em oligossacarídeos de baixo peso molecular (Carvalho, 2011). Quando o extrato bruto foi submetido à etapa de cromatografia essas enzimas poderiam ter sido separadas e eluídas em fases diferentes diminuindo suas interações com a fase estacionária e suas atividades (Rodrigues, 2014).

Tabela 2. Produção de enzimas lignocelulolíticas pelo fungo *L. edodes* UFV 73 em diferentes substratos e suas respectivas atividades específicas.

Enzima	Substrato	Atividade	Incubação (dias)	Referência
LiP	Casca de eucalipto	Não detectada	40	Cavallazi et al., (2004)
LiP	Farelo de arroz/serragem	Não detectada	40	Makkar et al. (2001)
MnP	Casca de eucalipto	115 U μg^{-1}	40	Cavallazi et al., (2004)
MnP	Palha de trigo	55 U/g	24-29	Elisashvili et al., (2015)
MnP	Folhas (<i>Fagus orientalis</i>)	5,3 U μg^{-1}	24-29	Elisashvili et al., (2015)
MnP	Serragem/casca de coco	6,92 U/g	20	Montoya et al. (2015)
Lacase	Casca de eucalipto	225 U μg^{-1}	40	Cavallazi et al., (2004)
Lacase	Palha de trigo	55 U/g	24-29	Elisashvili et al., (2015)
Lacase	Folhas (<i>Fagus orientalis</i>)	9,9 U/g	24-29	Elisashvili et al., (2015)
Lacase	Serragem/casca de coco	47,25 U/g	20	Montoya et al. (2015)
Xilanase	Casca de eucalipto	0,11 U μg^{-1}	40	Cavallazi et al., (2004)
Xilanase	Palha de trigo	80 Ux10/g	24-29	Elisashvili et al., (2015)
Xilanase	Folhas (<i>Fagus orientalis</i>)	38 Ux10/g	24-29	Elisashvili et al., (2015)
Xilanase	Casca de café	8,5 mU/g	36-42	Mata et al., (2016)
Celulase	Casca de eucalipto	2,6 U μg^{-1}	40	Cavallazi et al., (2004)
Celulase	Casca de café	2,35 mU/g	36-42	Mata et al., (2016)
Celulase	Serragem/casca de coco	99,29 U/g	20	Montoya et al., (2015)

Tabela 3. Fases e tempo de eluição do EEB de *Lentinula edodes*

Fases	Tempo na coluna (min)	Quantidade de tampão eluído (mL)
1	10	20
2	20	40
3	30	60
4	40	80
5	50	100
6	60	120
7	70	140

Tabela 4. Etapas de purificação parcial das enzimas lignocelulolíticas do extrato enzimático bruto obtido do substrato após cultivo de *L. edodes*.

Etapas da Purificação	Volume (mL)	Atividade (mM min ⁻¹)		Fator de purificação	Rendimento (%)
		Total	Específica		
MnP					
Extrato enzimático bruto	88	0,20	12	1,00	100
Precipitação/Diálise	80	0,21	12,5	1,03	106
SEPHADEX G-100	22	0,54	84,5	6,8	264
Lacase					
Extrato enzimático bruto	88	3,4	182	1,00	100
Precipitação/Diálise	80	14	423	2,3	395
SEPHADEX G-100	22	17	2606	6,2	489
Celulase					
Extrato enzimático bruto	88	0,0006	0,09	1,00	100
Precipitação/Diálise	80	0,0009	0,06	0,7	150
SEPHADEX G-100	22	0,0006	0,02	0,33	105
Xilanase					
Extrato enzimático bruto	88	0,13	7,8	1	100
Precipitação/Diálise	80	0,05	1,4	0,18	38
SEPHADEX G-100	22	0,012	1,9	1,4	9,5

3.5. Caracterização enzimática: Efeito da temperatura

A celulase manteve-se estável em todas as temperaturas, enquanto, a xilanase teve um aumento na atividade a 45 °C (Figura 6). A temperatura de maior atividade para xilanase observado por Lee e colaboradores (2007) foi entre 45 e 55 °C, enquanto para celulase de *P. sanguineus* teve aumento na atividade a partir de 20 °C com máxima de atividade aos 70 °C (Rodrigues, 2014).

A lipase produzida por *L. edodes* UFV 73 apresenta atividade crescente a partir de 4 °C, alcançando seu ápice aos 60 °C (Figura 6). Resultado semelhante foi encontrado por Mhetras et al., (2009) e Kareem et al., (2017) em lipase de *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, respectivamente, no qual houve aumento da atividade lipolítica até 50 °C.

A temperatura de incubação também influenciou na atividade das enzimas oxidativas (Figura 6). A atividade da lacase e MnP aumentou com o incremento da temperatura até 30 °C, ambas se estabilizando nas temperaturas posteriores.

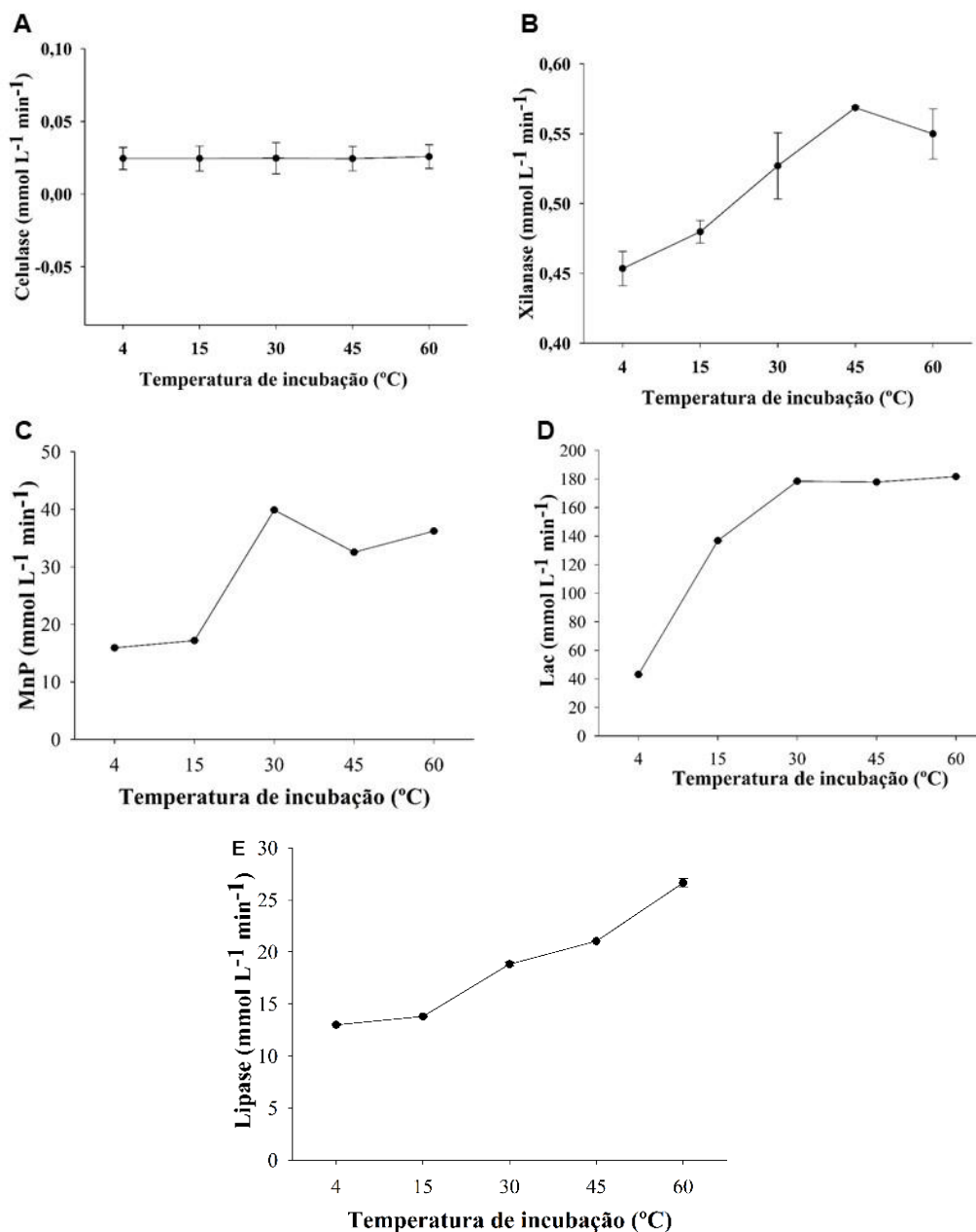


Figura 6. Efeito da temperatura sobre as atividades das enzimas (A) celulase, (B) xilanase, (C) manganês peroxidase (MnP), (D) lacase (Lac) e (E) lipase produzidas pelo fungo *Lentinula edodes* UFV 73.

Nos estudos de D'Annibale et al., (1999) e Nagai et al., (2002), a atividade máxima de lacase de *L. edodes* foi à 60 °C e 40 °C, respectivamente. Para MnP, a temperatura de maior atividade foi à 30 °C, estabilizando até 60 °C. Comportamento parecido foi encontrado no trabalho de Boer et al., (2006) no qual a atividade de MnP teve pico à 40 °C. Estes resultados indicam que as enzimas lignocelulolíticas deste estudo apresentam atividade em uma ampla faixa de temperaturas com o aumento significativo a partir dos 30 °C, exceto para celulase que se manteve constante em todas as temperaturas.

3.6. Efeito do pH

A celulase e a xilanase mantiveram-se estáveis nos pHs 3,7 e 10 (Figura 7 A e B). Lee et al., (2007) observaram resultado diferente para xilanase de *L. edodes* no qual a atividade aumentou até o pH 4 decaindo em pH alcalino. Rodrigues (2014) verificou que a celulase de *P. sanguineus* teve seu ápice de atividade em pH 5, diminuindo a medida que o pH se tornava alcalino.

Ao contrário das xilanases e celulases, as lipases não se mantiveram estáveis em todas as faixas de pH analisadas apresentando atividade em pH baixo com pico em pH 7 e inatividade em pH alcalino (Figura 7E). Corroborando com esses resultados lipases de *A. niger* e *A. flavus* apresentaram melhor atividade em pHs ácidos e neutros, respectivamente (Mhetras et. al., 2009, Kareem et al., 2017).

A lacase apresentou atividade ótima em pHs ácidos e atividade residual em pH neutro e alcalino (Figura 7D). O mesmo comportamento foi descrito por D'Annibale et al., (1999) e Nagai et al., (2002) para esta enzima. Segundo esses autores a lacase apresenta atividade máxima em pHs ácidos.

A MnP se manteve estável em todos os pHs testados com uma redução não significativa de atividade em pHs básicos (Figura 7C). Boer et al., (2006) verificaram comportamento semelhante com atividade máxima dessa enzima em pHs ácidos.

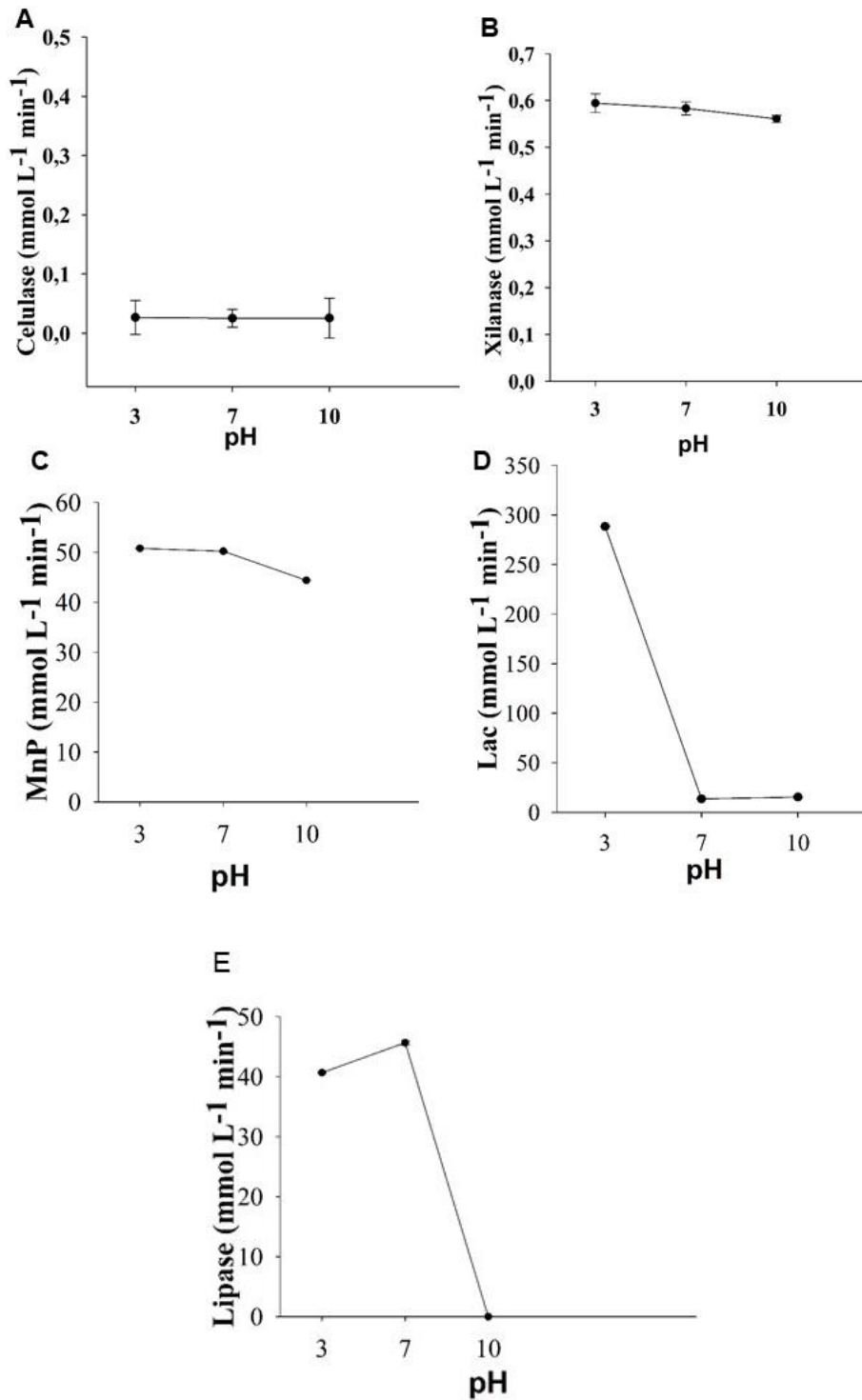


Figura 7. Efeito do pH sobre as atividades das enzimas (A) celulase, (B) xilanase, (C) maganês peroxidase (MnP), (D) lacase (Lac) e (E) lipase produzidas pelo fungo *Lentinula edodes* UFV 73.

3.7. Parâmetros cinéticos

As enzimas do EPP apresentaram curva de atividade em função da concentração do substrato semelhante à cinética de Michaelis-Menten (Figura 8). As reações catalisadas por essas enzimas apresentam uma saturação com o aumento da concentração do substrato e a velocidade de conversão não foi linear frente ao aumento da concentração do substrato (Figura 8).

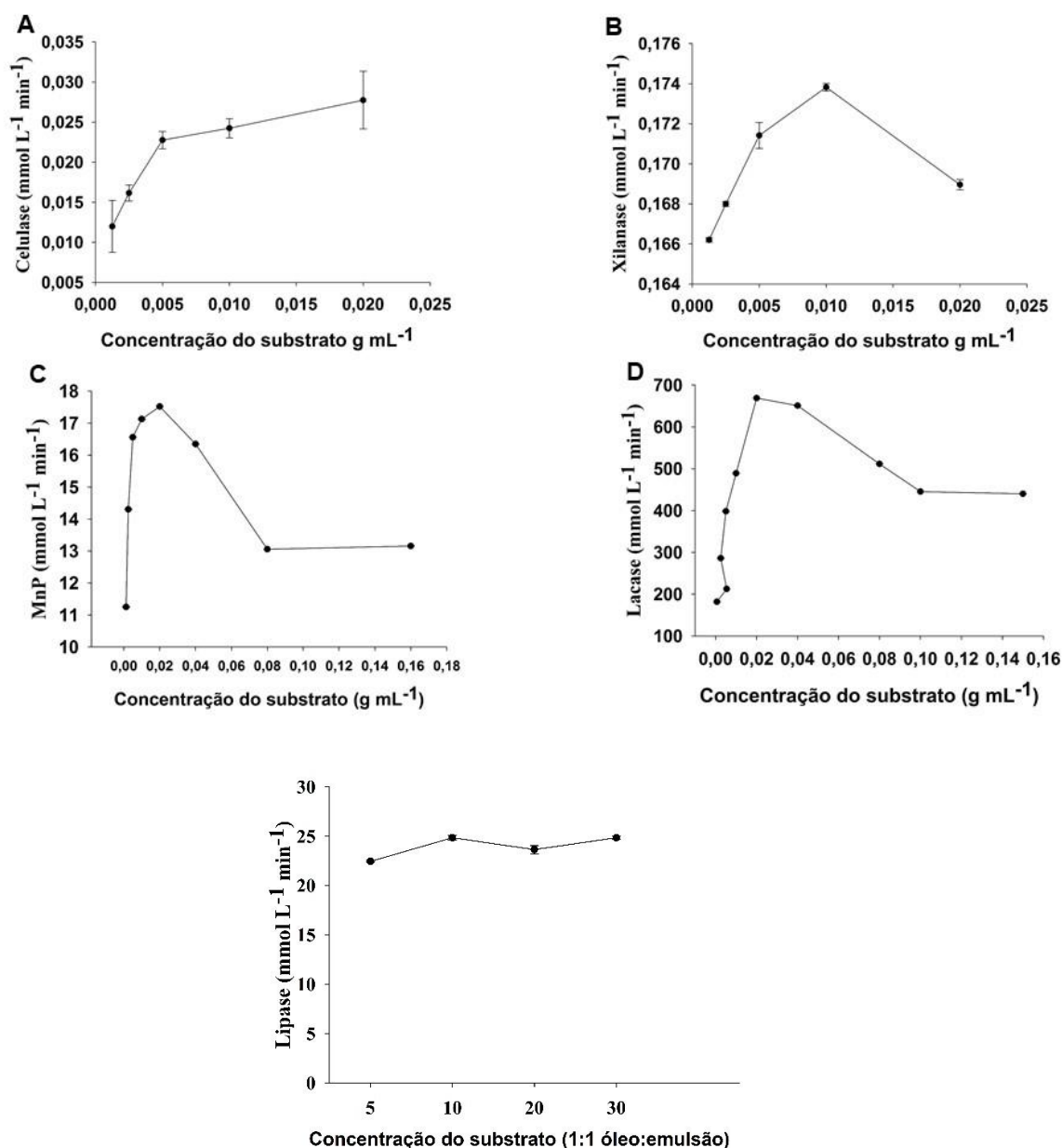


Figura 8. Efeito da concentração do substrato na atividade das enzimas (A) celulase, (B) xilanase, (C) manganês peroxidase (MnP), (D) lacase (Lac) e (E) lipase produzidas pelo fungo *Lentinula edodes* UFV 73, no resíduo de coco de macaúba, após a etapas de diálise e cromatografia de exclusão molecular.

A celulase apresentou maior atividade em 0,020 g mL⁻¹ de substrato (Figura 8A) e K_M de 1,89 mg mL⁻¹ (Tabela 5). Rodrigues (2014) encontrou um K_M de 5,7 mg mL⁻¹ para celulase de *P. sanguineus*, ou seja, a celulase deste fungo apresenta menor afinidade pelo substrato comparada a celulase de UFV 73.

A xilanase apresentou pico de atividade em 0,010 g mL⁻¹ de xilana (Figura 8B) e K_M de 0,0695 mg mL⁻¹ (Tabela 5). Valor maior de K_M foi encontrado para *Pleurotus eriingy* (0,12 mg mL⁻¹) e V_{max} de 1,45 U mL⁻¹ (Sugumaran et al., 2012). A MnP e Lacase apresentaram atividade máxima em concentrações de 0,020 g mL⁻¹ de seus substratos (Figura 8 C e D). Valores de K_M igual a 11,2 μM foi encontrado em lacase de *L. edodes* (Wong et al., 2013). Em *Ganoderma lucidum* valores iguais a 65,64 μM e 640 U mL⁻¹ foram encontrados para K_M e V_{máx}, respectivamente, para MnP (Bilal et al., 2015).

Tabela 5. Parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima (V_{máx}) das enzimas lignocelulolíticas e lipase do fungo *Lentinula edodes* UFV 73 cultivado em resíduo do coco de macaúba.

Enzimas	K _M (mg mL ⁻¹)	V _{máx} (mmol L ⁻¹ min ⁻¹)
Celulase	1,89	0,0297
Xilanase	0,0695	0,173
Lipase	131	24,39
Lacase	272,7	454,54
Manganês Peroxidase	0,93	18,69

A atividade lipolítica teve seu ápice em 4 g mL⁻¹ de substrato (Figura 8E) e um K_M de 131 mg mL⁻¹ demonstrando sua baixa afinidade pelo substrato quando comparado a lipase de *Geotrichum candidum* com valores variando de 28,73 mg mL⁻¹ a 94,93 mg mL⁻¹ para K_M e valores de 22,57 U mL⁻¹ a 37,59 U mL⁻¹ para V_{máx} (Maldonado, 2006).

3.8. Estabilidade térmica das enzimas

A atividade específica de celulase e xilanase tiveram um decaimento na atividade específica até às 4 h de incubação estabilizando depois disso (Figura 9A e B). Uma celulase extraída de *L. edodes* CC-17 manteve-se estável por 24 h de incubação (Pereira Junior et al., 2003). Mishra et al., (1990) caracterizaram uma xilanase de *L. edodes*, no qual se manteve estável após 24 h de incubação, demonstrando ser mais estável quanto a estabilidade térmica que a encontrada em UFV 73.

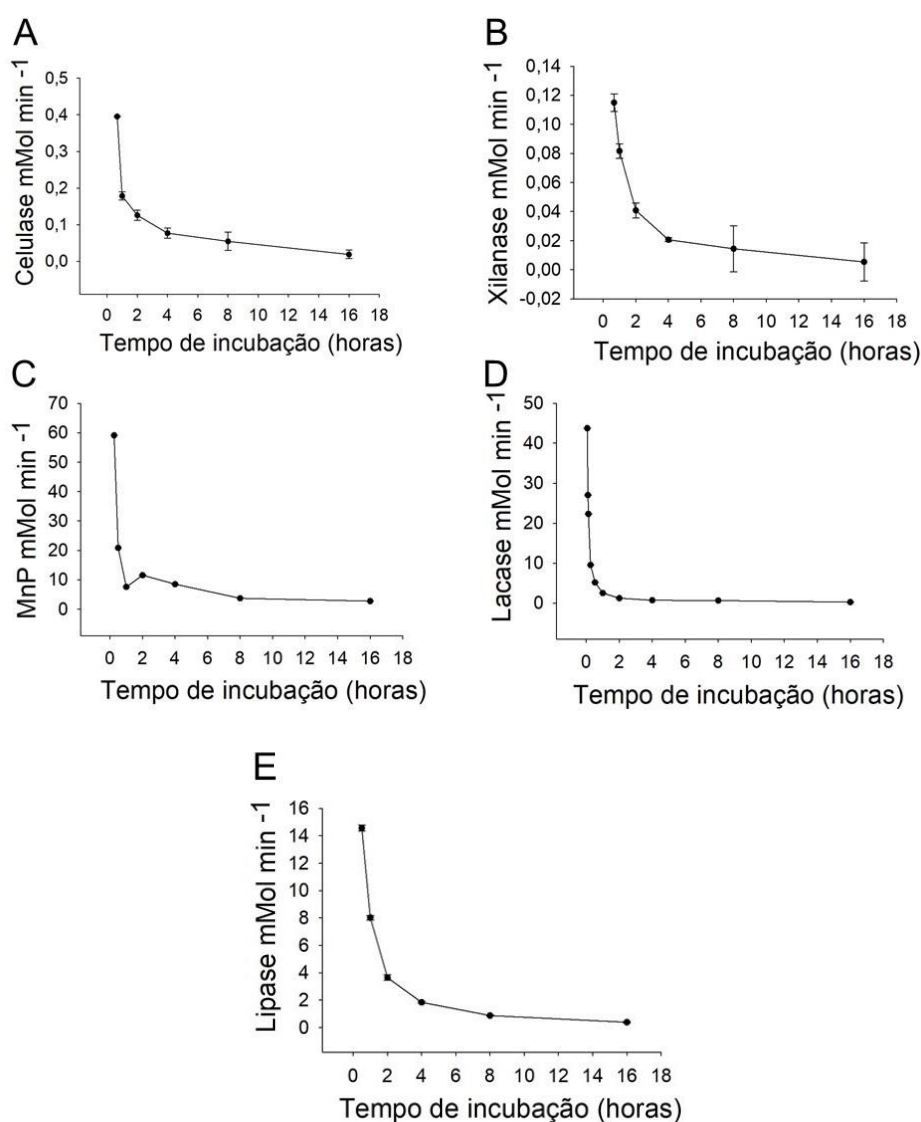


Figura 9. Efeito do tempo de incubação na atividade das enzimas (A) celulase, (B) xilanase, (C) manganês peroxidase (MnP), (D) lacase (Lac) e (E) lipase produzidas pelo fungo *Lentinula edodes* UFV 73, no resíduo do coco de macaúba, após a etapas de diálise e cromatografia de exclusão molecular.

A lacase extraída de UFV 73 teve um decaimento na atividade até por volta de uma hora de incubação estabilizando após esse período (Figura 9D). Uma Lacase encontrada no trabalho de D'Annibale et al., (1999) demonstrou uma queda constante na atividade até 20 h de incubação a 50 °C. A MnP se comportou de forma parecida à lacase, no qual sua atividade diminuiu até por volta de uma hora de incubação estabilizando após esse período (Figura 9C). Grabski et al., (1996) extraíram uma MnP de *L. edodes* no qual conseguiram detectar atividade enzimática após 60 dias de incubação a 4 °C. Isso demonstra a capacidade dessa enzima manter sua atividade estável em diferentes condições térmica.

A lipase teve seu ápice de atividade após 1 hora de incubação, decaindo após esse período (Figura 9E). Uma lipase extraída de *Aspergillus flavus* se manteve estável quando incubada a 40 °C por até 8 h (Colla et al., 2015), demonstrando sua maior termoestabilidade em relação a lipase isolada do fungo *L. edodes* isolado UFV 73.

3.9. Aplicação do extrato enzimático de UFV 73

O extrato enzimático extraído de *Lentinula edodes* cultivado em resíduo de coco da macaúba demonstrou capacidade de degradar o corante índigo (Figura 10). Pode-se notar que a descoloração do corante índigo foi mais acentuada no maior volume de extrato enzimático (600 µL), e a descoloração foi diminuindo à medida que se diminuiu o volume do extrato enzimático (Figura10).

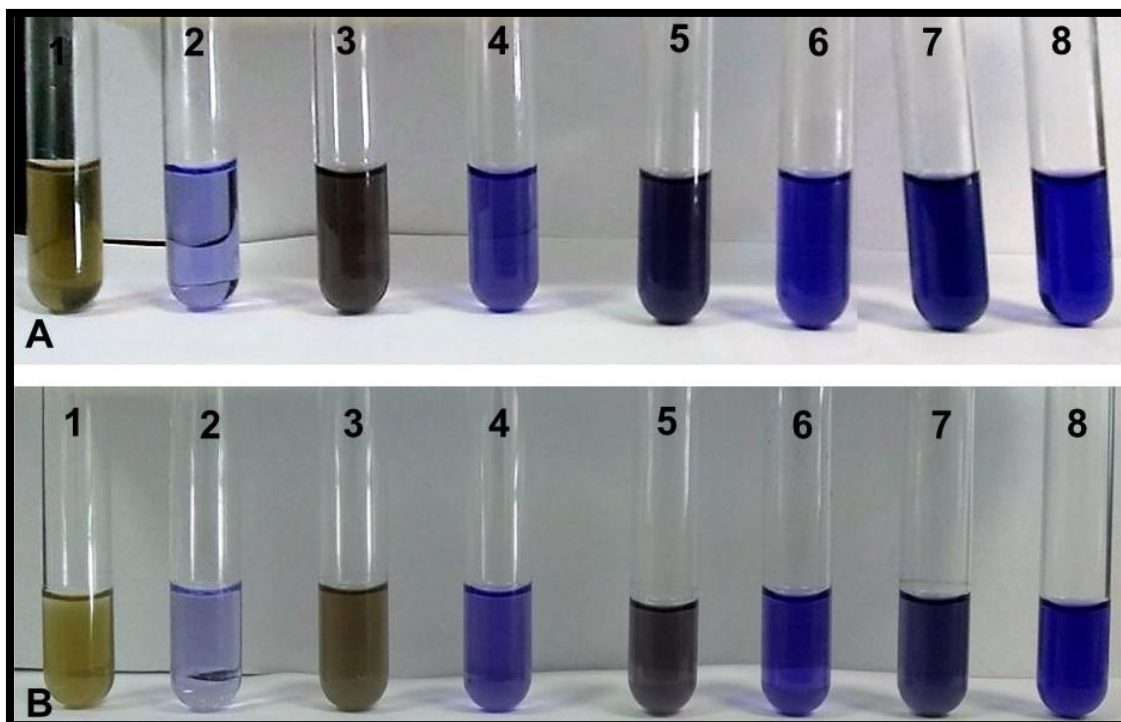


Figura 10. Degradação do corante índigo pelo extrato enzimático parcialmente purificado do fungo *Lentinula edodes* UFV 73 após 5 min de incubação (A) e 48 h de incubação (B) a 35 °C a pH 4,5. (A1 e B1) 200 µL de corante mais 800 µL de EEPP; (A2 e B2) 200 µL de corante mais 800 µL de tampão acetato de sódio; (A3 e B3) 400 µL de corante mais 600 µL de EEPP; (A4 e B4) 400 µL de corante mais 600 µL de tampão acetato de sódio e (A5 e B5) 600 µL de corante mais 400 µL de EEPP; (A6 e B6) 600 µL de corante mais 400 µL de tampão acetato de sódio e (A7 e B7) 800 µL de corante mais 200 µL de EEPP e (A8 e B8) 800 µL de corante mais 200 µL de tampão acetato de sódio.

A taxa de descoloração do corante índigo teve início após a adição do EEPP e teve tendência de se manter constante nas primeiras 24 h para os volumes de 400 µL de corante + 600 EEPP e 800 µL de corante + 200 µL de EEPP (Figura 11). Na mistura de 600 µL de corante + 400 EEPP a descoloração foi aumentando com o passar do tempo chegando a 40% de degradação do corante após 48 h de incubação. O isolado *L. edodes* INCQS 40220 crescido em meio líquido, no qual a única fonte de carbono foi uma mistura de três corantes (remazol vermelho, Drimaren azul e procion vermelho), demonstrou taxa de descoloração de 80% (Bergsten-Torralba et al., 2016). Neste caso a descoloração foi mais elevada do que a encontrada no EEPP de UFV 73, provavelmente porque o isolado INCQS 40220 além de crescer em contato com

o corante, sua única fonte de carbono era obtida do corante que estava presente no meio de cultura.

Outro fator que pode acarretar essa diferença na descoloração desses corantes é que a atividade enzimática de *L. edodes* está relacionada principalmente ao tipo de substrato utilizado para o seu cultivo. O perfil enzimático secretado pode ser alterado pelo uso de substratos (Özçelik e Aysun, 2007). *P. sanguineus* e *Pleurotus ostreatus* crescidos em meio mínimo, no qual a única fonte de carbono era o corante índigo, tiveram redução de 75 e 70% da cor, respectivamente, após 1 dia de incubação (Balan et al., 2001). A degradação do corante é realizada pelas enzimas lignolíticas presentes no EEPP. A lacase presente no extrato consegue degradar o índigo em isatina (indol-2,3-diona), que posteriormente é degradada ao ácido antranílico (ácido 2-aminobenzóico) (Balan et al., 2001).

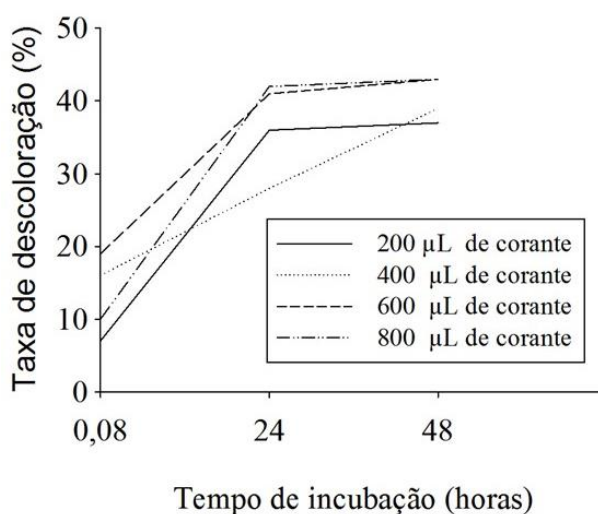


Figura 11. Taxa de descoloração medida pela absorvância das misturas de corante índigo e EEPP em três tempos de incubação a 35 °C. (A5 e B5) 600 µL de corante mais 400 µL de EEPP; (A6 e B6) 600 µL de corante mais 400 µL de tampão acetato de sódio e (A7 e B7) 800 µL de corante mais 200 µL de EEPP e (A8 e B8) 800 µL de corante mais 200 µL de tampão acetato de sódio.

4. Conclusões

L. edodes produzir o complexo de enzimas lignocelulolíticas e lipolíticas quando cultivado em resíduo de coco de macaúba. Este trabalho foi o primeiro a relatar atividade lipolítica em *L. edodes*. As enzimas secretadas apresentaram características interessantes que podem ser exploradas para emprego em processos biotecnológicos. Com base nos resultados obtidos para a descoloração do corante, há a possibilidade do uso do EEPP no emprego de tratamento de resíduos de indústrias têxteis.

5. Referências

- Amin, F., Bhatti, H. N., & Rehman, S. Optimization of growth parameters for lipase production by *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*. 10. 28 (2011): 5514-5523.
- Asplund, J., Kauserud, H., Bokhorst, S., Lie, M. H., Ohlson, M., & Nybakken, L. Fungal communities influence decomposition rates of plant litter from two dominant tree species. *Fungal Ecology*. 32 (2018): 1-8.
- Bailey, M. J., Peter B., and K. Poutanen. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of biotechnology* 23.3 (1992): 257-270.
- Balan DS, Monteiro RT. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. *J Biotechnol*. 89 (2001):141–145.
- Bergsten-Torrallba, L. R., Zamith, H. P. D. S., Conde, T. R., Aiub, C. A. F., Felzenszwalb, I., & Silva, M. D. Dye detoxification by *Lentinula edodes* INCQS 40220. 4.1 (2016): 92 – 99.
- Bilal, M., Asgher, M., & Ramzan, M. Purification and biochemical characterization of extracellular manganese peroxidase from *Ganoderma lucidum* IBL-05 and its application. *Scientific research and Essays*.10.14 (2015): 456-464.
- Boer, C. G., Obici, L., De Souza, C. G. M., & Peralta, R. M. Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. *Process Biochemistry*. 41.5 (2006): 1203-1207.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 (1976): 148-254.
- Burkert, J.F.D.M., Maugeri, F., and Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource technology*. 91.1 (2004): 77-84.
- Buswell, J.A., Cai, Y., and Chang, S.T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS microbiology letters*, 128.1 (1995): 81-87.
- Cambri, G., de Sousa, M. M. L., Fonseca, D. D. M., Marchini, F. K., da Silveira, J. L. M., & Paba, J. Analysis of the Biotechnological Potential of a *Lentinus crinitus* Isolate in the Light of Its Secretome. *Journal of proteome research*. 15.12 (2016): 4557-4568.
- Cardoso, A., Laviola, B.G., Santos, G.S., de Sousa, H.U., de Oliveira, H.B., Veras, L.C., e Favaro, S.P. Opportunities and challenges for sustainable production of *A. aculeata* through agroforestry systems. *Industrial Crops and Products*. (2017): 0 -1
- Carvalho, K.J., A.L. Souza, and C. C. Machado. *Ecologia, manejo, silvicultura e tecnologia da Macaúba*. Convênio de Cooperação Técnica SECTES/FAPEMIG. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. (2011).
- Cavallazzi, J.R.P., Brito, M.D., Oliveira, M.G.D., Villas-Bôas, S.G., Kasuya, M.C.M. Lignocellulolytic enzymes profile of three *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains during cultivation on *eucalyptus bark*-based medium. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 2 (2004): 291- 297.
- Chen, S.H., Yien Ting, A.S. Biodecolorization and biodegradation potential of recalcitrant triphenylmethane dyes by *Corioloropsis* sp. isolated from compost. *J. Environ. Manage*. 150 (2015): 274 - 280.

- Colla, L. M., Ficanha, A. M., Rizzardi, J., Bertolin, T. E., Reinehr, C. O., & Costa, J. A. V. Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. *BioMed research international*. 2015 (2015): 1 - 9.
- Conceição, L.D.H.C.S da, et al. Potencial da macaúba e avaliação de maciços. Embrapa Agroindústria de Alimentos-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: Congresso Brasileiro de Macaúba, 1., 2013, Patos de Minas. Consolidação da cadeia produtiva: anais. Brasília, DF: MAPA.2013.
- Cunha, C. C. D. Q. B., Gama, A. R., Cintra, L. C., Bataus, L. A. M., & Ulhoa, C. J. Improvement of bread making quality by supplementation with a recombinant xylanase produced by *Pichia pastoris*. *PloS one*. 13.2 (2018): e0192996.
- D'Annibale, A., Stazi, S. R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E., & Sermanni, G. G. Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochemistry*. 34.6 (1999): 697-706.
- Dashtban, M., Maki, M., Leung, K. T., Mao, C., & Qin, W. . Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical reviews in biotechnology*. 30.4 (2010): 302-309.
- de Almeida, D. G., Maria da Glória, C. S., de Cássia Mendonça, R., Maciel, C. D. C. S., & de Gusmão, N. B. Descoloração do corante Índigo Carmim e produção de Lacase por fungos filamentosos. *Scientia Plena*. 8.5 (2012): 1-9.
- Dodd, D., & Cann, I. K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy*. 1.1 (2009): 2 - 17.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Khardziani, T., & Agathos, S. N. (2010). Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 37.10 (2010): 1091 - 1096.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., & Asatiani, M. D. Shiitake medicinal mushroom, *Lentinus edodes* (higher Basidiomycetes) productivity and lignocellulolytic enzyme profiles during wheat straw and tree leaf bioconversion. *International journal of medicinal mushrooms*. 17.1 (2015): 77 - 86.
- Ferreira-Leitão, V.; Gottschalk, L.M.F.; Ferrara, M.A.; Nepomuceno, A.L.; Molinari, H.B.C; & Bom, E.P.S. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. *Waste and Biomass Valorization* 1.1 (2010): 1877 - 2641.
- Gonzalez-Ortiz, G., Sola-Oriol, D., Martinez-Mora, M., Perez, J. F., & Bedford, M. R. (2017). Response of broiler chickens fed wheat-based diets to xylanasesupplementation. *Poultry science*. 96.8 (2017): 2776 - 2785.
- Gopinath, S. C., Anbu, P., Lakshmipriya, T., & Hilda, A. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed research international*. 2013 (2013):1 - 10.
- Grabski, A. C., Rasmussen, J. K., Coleman, P. L., & Burgess, R. R. Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* on alkylaminated emphaze TM AB 1 polymer for generation of Mn 3+ as an oxidizing agent. *Applied biochemistry and biotechnology*. 60.1 (1996): 1 - 17.
- Hagenbo, A., Kvaschenko, J., Clemmensen, K. E., Lindahl, B. D., & Fransson, P. Fungal community shifts underpin declining mycelial production and turnover across a *Pinus sylvestris* chronosequence. *Journal of Ecology*. 106.2 (2018): 490 - 501.

- Jaramillo, P. M., Gomes, H. A., Monclaro, A. V., Silva, C. O., & Edivaldo Filho, X. F. Lignocellulose-degrading enzymes: An overview of the global market. *Fungal Bio-Molecules: Sources, Applications and Recent Developments*. 6 (2015): 75 – 85.
- Juturu, V., & Wu, J. C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 33 (2014): 188 - 203.
- Kareem, S. O., Adebayo, O. S., Balogun, S. A., Adeogun, A. I., & Akinde, S. B. (2017). Purification and Characterization of Lipase from *Aspergillus flavus* PW2961 using Magnetic Nanoparticles. *Nigerian Journal of Biotechnology*. 32.1 (2017): 77 - 82.
- Khambhaty Y, Ananth S, Sreeram KJ, Rao JR, Nair BU (2015) Dual utility of a novel, copper enhanced laccase from *Trichoderma aureoviridae*. *Int J Biol Macromol*. 29.81 (2015): 69 – 75.
- Kouker, G., and Jaeger, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and environmental microbiology*. 53.1 (1987): 211 - 213.
- Kunamneni A, Ghazi I, Camarero S, Ballesteros A, Plou FJ, Alcalde M. Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on poly-activated carriers. *Process Biochem*. 43 (2008):169 – 178
- Kuwahara, Masaaki, et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS letters*. 169.2 (1984): 247 - 250.
- Lee, J., Gwak, K., Kim, S., Kim, M., Choi, D., & Choi, I. Characterization of xylanase from *Lentinus edodes* M290 cultured on waste mushroom logs. *Journal of microbiology and biotechnology*. 17.11 (2007): 1811.
- Makkar, R. S., Tsuneda, A., Tokuyasu, K., & Mori, Y. *Lentinula edodes* produces a multicomponent protein complex containing manganese (II)-dependent peroxidase, laccase and β -glucosidase. *FEMS microbiology letters*. 200.2 (2001): 175 - 179.
- Maldonado, R. R. Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais. Dissertação. Campinas – SP, (2006).
- Mandels, M., Andreotti, R., Roche, C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng Symp*. 6 (1976): 21 – 33.
- Martins, D. A. B., do Prado, H. F. A., Leite, R. S. R., Ferreira, H., de Souza Moretti, M. M., da Silva, R., & Gomes, E. (2011). Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. In *Integrated Waste Management*. InTech. 2 (2011): 1 – 43.
- Mata, G., Salmones, D., and Pérez-Merlo R. Hydrolytic enzyme activities in shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) strains cultivated on coffee pulp. *Revista Argentina de microbiologia*. 48.3 (2016): 191 - 195.
- Mhetras, N. C., Bastawde, K. B., & Gokhale, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource technology*. 100.3 (2009): 1486 - 1490.
- Minussi RC, Rossi M, Bologna L, Rotilio D, Pastore GM, Duran N. Phenols removal in musts: strategy for wine stabilization by laccase. *J Mol Catal*. 45 (2007):102–107.

- Mirisola Filho, L.A. Cultivo e Processamento do coco macaúba para produção de biodiesel. Viçosa: Centro de Produções Técnicas. (2009).
- Mishra, C., Forrester, I. T., Kelley, B. D., Burgess, R. R., & Leatham, G. F. Characterization of a major xylanase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial solid lignocellulosic substrate. *Applied microbiology and biotechnology*. 33.2 (1990): 226 - 232b.
- Mishra, C., Forrester, I. T., Kelley, B. D., Burgess, R. R., & Leatham, G. F. Characterization of a major xylanase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial solid lignocellulosic substrate. *Applied microbiology and biotechnology*. 33.2 (1990b): 226 - 232.
- Montoya, S., Sánchez, Ó. J., & Levin, L. Production of lignocellulolytic enzymes from three white-rot fungi by solid-state fermentation and mathematical modeling. *African Journal of Biotechnology*. 14.15 (2015): 1304 - 1317
- Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., & Enei, H. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60.3 (2002): 327 - 335.
- Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Ogawa, M., Saito, K., Takesawa, T. & Sato, T. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology*. 149.9 (2003): 2455 - 2462.
- Nagai, M., Sakamoto, Y., Nakade, K., & Sato, T. Purification of a novel extracellular laccase from solid-state culture of the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Mycoscience*. 50.4 (2009): 308 - 312.
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*. 44.5 (2011): 1115 - 1126.
- Özçelik, E.I., Aysun, P. Hazelnut Husk as a Substrate for the Cultivation of Shiitake Mushroom (*Lentinula Edodes*). *Bioresource Technology*. 98.14 (2007): 2652 – 58.
- Pereira Júnior, J. A. D. S., Correia, M. J., & Oliveira, N. T. D. Cellulase activity of a *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. strain grown in media containing carboximetilcellulose or microcrystalline cellulose. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 46.3 (2003): 333-337.
- Porep, J. U., Walter, R., Kortekamp, A., & Carle, R. Ergosterol as an objective indicator for grape rot and fungal biomass in grapes. *Food Control*. 37 (2014): 77 - 84.
- Rahman, M.A., Noorlidah, A., Norhaniza, A. *Lentinula edodes* (shiitake mushroom): An assessment of in vitro anti-atherosclerotic bio-functionality. *Saudi Journal of Biological Sciences*. (2016).
- Ramos-Sánchez, L. B., Cujilema-Quitio, M. C., Julian-Ricardo, M. C., Cordova, J., & Fickers, P. Fungal lipase production by solid-state fermentation. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. 5.2 (2015): 1 - 9.
- Richardson, M.D., and Logendra, S. Ergosterol as an indicator of endophyte biomass in grass seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45.10 (1997): 3903-3907.
- Rodrigues, C., Cassini, S. T., Antunes, P. W., Keller, R. P., & Gonçalves, R. F. Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases com base na atividade lipásica e no potencial hidrolítico sobre óleo comestível de soja e espuma de caixa de gordura. *Engenharia Sanitária Ambiental*. 21.3 (2016): 507 - 518.

- Rodrigues, R. S. Produção, purificação e caracterização de celulasas e hemicelulasas do fungo da podridão-branca *Pycnoporus sanguineus* PF-2 (tese). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. (2014).
- Roveda, M., Hemkemeier, M., & Colla, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 30.1 (2010): 126 - 131.
- Sakamoto, Y., Nakade, K., Sato, S., Yoshida, K., Miyazaki, K., Natsume, S., & Konno, N. *Lentinula edodes* genome survey and postharvest transcriptome analysis. *Applied and environmental microbiology*. 83.10 (2017): e02990 - 16.
- Saleem, R., Khurshid, M., & Ahmed, S. Laccases, Manganese Peroxidases and Xylanases used for the bio-bleaching of paper pulp; an environmental friendly approach. *Protein and peptide letters*. (2018).
- Shahrestani, H., Taheri-Kafrani, A., Soozanipour, A., & Tavakoli, O. Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1, 3, 5-triazine-functionalized silica-encapsulated magnetic nanoparticles. *Biochemical engineering journal*. 109 (2016): 51 - 58.
- Shelley, A. W., Deeth, H. C., and MacRae, I. C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. *Journal of microbiological methods*. 6.3 (1987): 123 - 137.
- Shraddha Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, Kumar. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res*. (2011).
- Souza, Gleison de. Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação em compostos poluentes. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2012.
- Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P. K., Gupta, V. K., Molina, G., Rodriguez-Couto, S., & Ramteke, P. W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. (2017).
- Sugumaran, K.R; Srivastava S.N; Ponnusami V. Kinetics and Thermodynamics Characterization of *Pleurotus Eryngii* MTCC 1798 Xylanase and *Fusarium Oxysporum* MTCC 3300 Xylanase: A Comparison. 10.3 (2012): 1626 - 1636.
- Tien, M., T.K., Kirk. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 81.8 (1984): 2280 - 2284.
- Van Kuijk, S. J., Sonnenberg, A. S., Baars, J. J., Hendriks, W. H., José, C., Rencoret, J. & Cone, J. W. Chemical changes and increased degradability of wheat straw and oak wood chips treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Lentinula edodes*. *Biomass and Bioenergy*. 105 (2017): 381 - 391.
- Virk AP, Sharma P, Capalash N. Use of laccase in pulp and paper industry. *Biotechnol Prog*. 28.1 (2012): 21 – 32
- Wong, K. S., Cheung, M. K., Au, C. H., & Kwan, H. S. A novel *Lentinula edodes* laccase and its comparative enzymology suggest guaiacol-based laccase engineering for bioremediation. *PLoS One*. 8.6 (2013): e66426.

Artigo II: Produção, purificação e caracterização de enzimas lignocelulolíticas e lipolíticas produzidas por *Pleurotus spp.* em resíduo de coco de macaúba

Resumo

Neste estudo, *Pleurotus spp.*, isolados PLO 02, PLO 06 e PLE 05, foram avaliados quanto à capacidade de produção de enzimas lignocelulolíticas e lipolíticas quando crescidos em resíduo de coco de macaúba. Após a colonização completa do substrato, que ocorreu no 22º e 18º para os isolados de *P. ostreatus* e *P. eryngii*, respectivamente. Amostras foram retiradas de cinco em cinco dias, para avaliação das atividades de lacase (Lac), manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP), celulase, xilanase e lipase. A caracterização dessas enzimas foi feita quanto à temperatura de incubação, pH, concentração do substrato e estabilidade térmica. Após a extração da proteína bruta (EEB), esta foi parcialmente purificada (EEPP) em coluna de SEPHADEX G-100. A lacase apresentou maior rendimento, sendo 105% para PLO 02, 315% para PLE 05 e 504% para PLO 06. Todas as enzimas mantiveram as atividades em todas as temperaturas analisadas, com exceção da LiP e lipase cujas atividades foram maiores próximas a 30 °C. Em relação ao pH, as maiores atividades foram em pH ácido. De uma forma geral, as enzimas apresentaram um decaimento acentuado na atividade nas primeiras 2 h (redução de 75% na atividade de celulase, 65% na de xilanase, 80% na de MnP, 82% na de lacase, 68% na de lipase e 71% na de LiP), se estabilizando após esse período até as 16 h analisadas. Todas as enzimas analisadas obedeceram a cinética de Michaelis-Menten. Além disso, os EEPPs de *Pleurotus eryngii* tiveram em média 100% de descoloração do corante índigo após 24 h de incubação. Pode-se concluir que este resíduo é um bom substrato para a produção de enzimas lignocelulolíticas pelos diferentes isolados de *Pleurotus spp.* testados no qual o EEPP de todos apresentaram capacidade de descoloração do corante índigo com destaque para o isolado de *P. eryngii* em que a taxa de degradação foi de 100%.

1. Introdução

A crescente preocupação com a poluição e proteção ambiental tem sido um incentivo para a procura de uma nova forma de produção industrial mais limpa que maximize a produtividade e minimize a contaminação ambiental. Os fungos, em especial aqueles da podridão branca (FPB), possuem capacidade de degradar uma variedade de compostos orgânicos recalcitrantes (Ergun e Razive 2017).

Os FPB produzem um complexo enzimático oxidativo ligninolítico composto pelas enzimas: lacase (Lac), manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e outras enzimas acessórias. O complexo celulolítico é composto por xilanases e celulasas que degradam a hemicelulose e celulose, respectivamente (Ergun e Razive, 2017).

As enzimas oxidativas são enzimas que apresentam baixas especificidade pelo substrato, degradando desde compostos fenólicos e não fenólicos á lignina. Entretanto, o sistema hidrolítico é altamente específico convertendo a celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis (Akpınar e Urek, 2017).

As enzimas produzidas por fungos podem ser aplicadas em várias áreas industriais biotecnológicas, e o mercado enzimático vêm crescendo nas últimas décadas (Jaramillo et al., 2015). Segundo o mesmo autor, em 2016 o crescimento desse mercado será estimado em 8 bilhões de euros. Dentre as aplicações podemos citar: o branqueamento da celulose (Saleem e Ahmed, 2018), o tratamento de diversos efluentes (Chen e Yien, 2015) e indústria de alimentos (Gonzalez-Ortiz et al., 2017), na biorremediação (Khambhaty et al., 2015), na produção de biocombustíveis (Srivastava et al., 2017), na indústria têxtil, de detergente e de alimentação animal dentre outras (Juturu e Wu, 2014).

Dentro do grupo dos FPB, o gênero *Pleurotus* possui muitas espécies que produzem cogumelos comestíveis com alto valor nutricional, possuindo diversas propriedades terapêuticas e aplicações biotecnológicas (Knop, 2016). *Pleurotus* spp. produzem enzimas extracelulares que degradam todos os componentes da biomassa vegetal, incluindo celulose, hemicelulose e lignina (Xie, 2016). As

espécies deste gênero crescem na maioria das madeiras, em subprodutos de madeira (serradura, papel, lodo de polpa), palhas de cereais, espigas de milho, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de café (café, cascos, talos e folhas), cascas de algodão, polpa de soja e em muitos outros materiais (Kalmis e Sargin, 2004).

Um resíduo que tem ganhado destaque é o resíduo da macaúba que é gerado em grandes quantidades no Brasil. A Macaúba é uma cultura economicamente interessante devido ao seu alto rendimento na produção de óleo (5550 litros de óleo por ha, 13 vezes maior que a soja). Isso torna o óleo de macaúba como uma das principais matéria-prima para a fabricação de biodiesel (Henderson et. al., 1997; Ciconini et. al., 2013; Da Silva et al., 2017). No processo de extração do óleo, cerca de 14,5 toneladas de resíduos podem ser geradas por ano. Uma forma de agregar valor a esse resíduo, pode ser a produção de enzimas lignocelulolíticas e lipases por fungos de podridão branca e a produção de cogumelos comestíveis, uma vez que os resíduos gerados na extração do óleo são ricos em celulose, hemicelulose, lignina e lipídeos (Sobreira, 2011).

Acrocomia aculeata, também conhecida como macaúba, macaíba, bocaiuva, coco de catarro, coco de espinho, coco, cocotero, Totái e ko ko é uma espécie de palmeira, abundante no Brasil, e facilmente adaptada aos diferentes ecossistemas, como áreas degradadas ou intactas (da Motta et al., 2002). Pertencente à família Arecaceae, está distribuída ao longo das Américas tropical e subtropical, indo desde o México e Antilhas até o sul do Brasil, passando pelo Paraguai, Argentina e Bolívia. No Brasil é encontrada desde os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e passando por todo o centro-oeste, norte e nordeste, tendo as maiores concentrações em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Essa palmácea possui somente na região do Brasil Central, aproximadamente 11 gêneros, com pelo menos 44 espécies, dentre elas a *A. aculeata* (Carvalho, 2011).

Assim, este estudo teve o objetivo a produção de enzimas lignocelulolíticas e lipases, através de uma fermentação em estado sólido cultivando *Pleurotus* spp. em resíduo de coco de macaúba.

2. Material e métodos

2.1. Local de realização do trabalho

O trabalho foi realizado no Laboratório de Associações Micorrízicas / Departamento de Microbiologia / Instituto de Biotecnologia aplicada a Agropecuária – BIOAGRO / Universidade Federal de Viçosa–UFV.

2.2. Inóculo

Os fungos utilizados no estudo pertencem a coleção de fungos do Laboratório de Associações Micorrízicas / Departamento de Microbiologia / Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária – BIOAGRO / Universidade Federal de Viçosa–UFV. Foram utilizados dois isolados de *Pleurotus ostreatus* (PLO 02 e PLO 06) e um de *Pleurotus eryngii* (PLE 05). Esses fungos foram cultivados em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) acrescido de 1 g L⁻¹ de lignina. Essas placas foram mantidas a 25 ± 1 °C por 15 dias.

2.3. Obtenção das enzimas por fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido ocorreu em frascos de 250 mL contendo 100 g de resíduo de coco de macaúba. Esse resíduo foi moído, umedecido e esterilizado por calor úmido durante 1 hora a 121 °C, por duas vezes, no intervalo de 48 h. Após isso, o resíduo foi inoculado com 10 g de micélio crescido em grãos de sorgo por 15 dias a 25 °C. Após a colonização visual do substrato pelos fungos, foram retirados 3 frascos em intervalos de 5 dias para análises, iniciando-se no 22º dia após a incubação para PLO 02 e PLO 06 e 18º dia para PLE 05 totalizando 5 retiradas. A colonização do fungo foi observada por meio da visualização do micélio a olho desarmado.

O extrato enzimático bruto (EEB) foi preparado pela adição de 50 mL de tampão citrato de sódio (50 mmol L⁻¹, pH 4,8) em 25 g do substrato colonizado pelos fungos. Essa mistura foi homogeneizada em gral de porcelana e centrifugada a 6000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi submetido a uma filtração em papel filtro (Whatman N.º.1). O permeado foi utilizado para análises

de atividade enzimática, determinação de proteínas solúveis e purificação das enzimas.

2.4. Determinação da biomassa fúngica

A biomassa fúngica foi determinada pelo teor de ergosterol (Richardson e Logendra, 1997). Amostras de 1 g do micélio/substrato foi misturado a areia esterilizada (5-10 g). Essa mistura foi triturada em gral de porcelana e 1 mL da solução de etanol 95% (v/v) foi adicionado para facilitar a homogeneização. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de centrífuga contendo 0,3 g de polivinilpirrolidona (PVP, Sigma) e 10 mL etanol. A solução foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com coluna Shimadzu fase reversa CLC-ODS 25 cm e detector de UV a 254 nm (Aminex HPX-87H, 9µm x 7,8 mm, Bio-Rad, Munich, Germany).

Para determinar a massa seca, cinco gramas do substrato colonizado foram mantidos a 60 °C até a obtenção de uma massa constante (Barajas-Aceves et al., 2002).

2.5. Teor de proteínas solúveis

As quantificações das proteínas solúveis nos EEB e EEPP foram realizadas pela metodologia descrita por Bradford (1976). A curva padrão foi feita utilizando albumina sérica (1% p/v) com concentração variando entre 0,05 a 9 µg mL⁻¹. Para cada reação foi utilizado 1,0 mL do reagente de Bradford (SIGMA, código B6916), 1 mL de EEB/EEPP e 6 mL de água. Essa reação foi incubada por 10 min a 25 °C. A medida da absorvância foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro (Multiskan Go – Thermo scientific).

2.6. Identificação do potencial de produção de lipases

Esse teste foi realizado utilizando duas metodologias para validação da presença de lipase no EEB. O primeiro método foi a inoculação do fungo em

meio mínimo sólido contendo óleo de oliva como única fonte de carbono. O segundo método foi feito em meio de cultura acrescido de rodamina B.

No tratamento controle das reações enzimáticas não continha o EEB que foi substituído pelo tampão específico de cada enzima.

2.6.1. Meio mineral

A capacidade dos fungos de utilizar lipídeos como fonte de carbono foi feita pela incubação dos isolados em meio mineral mínimo acrescido de 3% de óleo de oliva por 10 dias a 25 °C. Esse meio de cultura foi composto de sulfato de magnésio heptahidratado (0,25 mmol L⁻¹), fosfato monobásico de potássio (0,04 mmol L⁻¹), nitrato de amônio (4,0 mmol L⁻¹), nitrato de potássio (mmol L⁻¹), cloreto de cálcio dihidratado (0,25 mmol L⁻¹), ácido bórico (0,01 mmol L⁻¹), sulfato de zinco (0,01 mmol L⁻¹), sulfato de cobre (0,01 mmol L⁻¹), permanganato de amônio (0,01 mmol L⁻¹), cloreto férrico (0,01 mmol L⁻¹) e 3% (v/v) de óleo de oliva como recomendado por Kouker e Jaeger (1987). Esse meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave por 15 min.

Nessa composição do meio de cultura pode haver traço de carbono, que não é proveniente do óleo de oliva, mas não suficiente para crescimento do fungo. Para eliminar essa hipótese foi feito um controle sem adição de óleo de oliva ao meio mineral, além do uso do método com rodamina B.

2.6.2. Meio com rodamina B

Os três isolados foram inoculados em meio de cultura sólido de acordo com a metodologia de Kouker e Jaeger (1987). O meio de cultura foi composto pelo corante rodamina B (0,001% m/v), caldo nutriente (8 g L⁻¹), ágar (10 g L⁻¹), cloreto de sódio (4 g L⁻¹) e óleo de oliva (3 % v/v). Os reagentes foram misturados e esterilizados em autoclave por 15 min. A rodamina B foi esterilizada por filtração em membrana (2 µm). O permeado foi adicionado ao meio de cultura previamente esterilizado por calor úmido.

As placas de Petri contendo o meio de cultura com rodamina B foram divididas perpendicularmente ao meio com uso de uma caneta. Em um dos lados da placa inoculou-se um dos isolados (um fragmento de 1 cm² de ágar com micélio), e outra parte da placa foi feita uma estria simples de *Serratia marcescens*. Essa bactéria foi utilizada como controle positivo para produção de lipase. As placas foram incubadas por 5 dias a 30 °C. Após esse período, essas placas foram observadas sob a radiação ultravioleta a 350 nm.

A produção de lipase foi evidenciada pela formação de um halo alaranjado fluorescente na superfície das placas (Shelley et al., 1987).

2.7. Determinação da atividade enzimática

2.7.1. Lignina peroxidase

A atividade da lignina peroxidase foi determinada por espectrofotometria baseada na mudança de absorvância a 310 nm a 30 °C (Tien e Kirk, 1984). A reação continha 1,0 mL de tampão de tartarato (100 mmol L⁻¹, pH 3,5), 1 mL de álcool veratrílico (4 mmol L⁻¹), 250 µL de peróxido de hidrogênio (0,2 mmol L⁻¹) e 100 µL de EEB.

2.7.2. Lacase

A atividade da lacase foi medida utilizando 2,2'-azino-bis-3-etilbenzoatizol-6-sulfônico (ABTS) a 30 °C (Buswell et. al., 1995). A reação para um volume final de 3 mL continha 2.300 µL de tampão acetato de sódio (0,1 mmol L⁻¹, pH 5,0), 100 µL de ABTS (1mmol L⁻¹) e 600 µL de EEB. Essa reação foi incubada em banho maria a 37 °C por 2,0 min. O comprimento de onda utilizado para medida da absorvância foi de 420 nm.

2.7.3. Manganês peroxidase

A atividade da MnP foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Kuwahara et. al., (1984). Para a reação foi utilizado 500 µL de EEB, 100 µL

de vermelho de fenol (1 g L^{-1}), $100 \text{ }\mu\text{L}$ de lactato de sódio (250 mM , pH 4,5), $200 \text{ }\mu\text{L}$ de soro de albumina bovino (1% p/v), $50 \text{ }\mu\text{L}$ de peróxido de hidrogênio e $50 \text{ }\mu\text{L}$ de sulfato de manganês. Essa reação foi incubada no banho maria a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min e, posteriormente, adicionado $40 \text{ }\mu\text{L}$ de hidróxido de sódio (2 mmol L^{-1}) e 2 mL de água. A absorvância da reação foi determinada a 610 nm .

2.7.4. Celulases

A atividade enzimática de celulase foi analisada de acordo com o método descrito por Mandels et. al., (1976). Para a reação foi utilizada $250 \text{ }\mu\text{L}$ carboximetil celulose, $500 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão citrato de sódio (50 mmol L^{-1} , pH 4,8), $250 \text{ }\mu\text{L}$ de extrato enzimático. Essa mistura de reação foi mantida por 20 min a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho maria. O teor de açúcares redutores foi determinado pela adição de 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Em seguida, a mistura foi incubada em banho maria por 5 min a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. A reação foi diluída com a adição de 8 mL de água. O comprimento de onda utilizado para determinação da absorvância foi de 540 nm .

2.7.5. Xilanases

A atividade enzimática de xilanase foi analisada por método colorimétrico (Bailey et. al., 1992). Para a reação foi utilizado $500 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão acetato de sódio, $250 \text{ }\mu\text{L}$ EEB, $250 \text{ }\mu\text{L}$ de xilana. Essa reação foi incubada por 20 min a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho maria. As etapas de determinação de açúcares redutores foram semelhantes aquelas descritas na atividade de celulase.

2.7.6. Lipases

A atividade lipolítica foi determinada pelo método proposto por Burkert et al., (2004), o qual se baseia na titulação com hidróxido de sódio (NaOH) dos ácidos graxos livres liberados pela ação da lipase presente no extrato enzimático sobre os triacilgliceróis do óleo de soja emulsionados em goma arábica. A

mistura da reação continha 5 mL de emulsão de óleo de soja, 2 mL de tampão fosfato (10 mmol L⁻¹, pH 7,0) e 1 mL de EEB. Essa reação foi homogeneizada por 1 min e incubado a 37 °C durante 30 min. Após a incubação, 10 mL da mistura acetona-etanol (1:1 v/v) foi adicionada. Os ácidos graxos livres liberados foram titulados com NaOH (0,05 M).

2.8. Purificação por exclusão molecular (G-100)

Para o passo de purificação, foram selecionados os três tempos de incubação com maior atividade enzimática. Os EEBs foram misturados e submetidos a uma precipitação com sulfato de amônio (40% de saturação) a 4 °C por 12 h. Após isso, a solução foi centrifugada a 4000 rpm por 15 min. O precipitado foi armazenado a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e novamente precipitado com sulfato de amônio (80% de saturação) nas mesmas condições de temperatura, tempo de incubação, centrifugação e armazenamento da primeira precipitação.

Os precipitados foram ressuspensos em tampão acetato de sódio (50 mmol L⁻¹, pH 5,0) seguido por uma diálise durante 12 h contra esse mesmo tampão. A mistura obtida após da etapa anterior foi aplicada a uma coluna de Sephadex G-100 (80 cm x 2,0 cm) previamente equilibrada com o tampão de diálise. Após a eluição com tampão acetato de sódio foram coletadas a uma taxa de 2 mL min⁻¹, 20 mL de extrato proteico parcialmente purificado (EEPP) que foram analisadas quanto o teor de proteínas solúveis e a atividade enzimática. O EEPP foi também utilizado para caracterização cinética das enzimas.

2.9. Caracterização cinética do extrato proteico parcialmente purificado

A caracterização das enzimas foi realizada a partir dos efeitos da temperatura de incubação, pH, concentração do substrato e estabilidade térmica.

A determinação da temperatura ótima foi avaliada pela incubação das enzimas em seus respectivos substratos em 4 °C, 15 °C, 30 °C, 45 °C e 60 °C.

Para avaliar o pH ótimo da atividade enzimática lignocelulolítica e lipases foram utilizados, respectivamente, citrato de sódio (50 mmol L⁻¹) e fosfato de sódio (50 mmol L⁻¹) nos pH 3,0; 7,0 e 10.

O efeito da concentração do substrato enzimático na atividade das enzimas lignocelulolíticas foi realizado utilizando seus respectivos substratos nas concentrações de 1/8, 1/4, 1/2, 2, 4, 8, 16 e 30 vezes. Para lipase, esse efeito foi feito nas concentrações do substrato de 1/8, 1/4, 1/2, 2, 3, 4 e 5 vezes.

Para verificar a estabilidade térmica as enzimas do EEPP foram incubadas por 30, 60, 120, 240, 480, 960 min em suas respectivas temperaturas já citadas na metodologia acima.

2.10. Ensaio de descoloração do corante índigo

O EEPP foi avaliado quanto à sua capacidade de descolorir o corante índigo. Em tubos de ensaio de 10 mL foi adicionado o corante índigo (0,2 g mL⁻¹) nos volumes de 400, 600 e 800 µl e completados com EEPP até o volume de 1 mL (Souza, 2012). A reação ocorreu por 24 h a 35 °C. Posteriormente, as absorvâncias foram determinadas a 580 nm após 5 min e 24 h de incubação.

3. Resultados e discussão

3.1. Biomassa fúngica

Os três isolados apresentaram uma correlação positiva maior que 70% entre a biomassa fúngica e a produção de ergosterol (Tabela1). PLE 05 teve cerca de 100 vezes maior conteúdo de ergosterol que os outros isolados. Além disso, a produção desse esterol foi diretamente proporcional ao tempo de incubação.

A determinação do ergosterol tem sido muito usada para mensurar o crescimento fúngico. A biomassa de *P. ostreatus* crescido em farelo de aveia e plásticos oxo-biodegradáveis também foi determinada pelo ergosterol (Barajas et al., 2002, da Luz et al., 2013).

Tabela 1. Massa seca e teor de ergosterol de PLO 02, PLO 06 e PLE 05 cultivado em resíduo do coco da macaúba.

Tempo de incubação (dia)	Massa seca (g)			Ergosterol (mg)		
	PLO 02	PLO 06	PLE 05	PLO 02	PLO 06	PLE 05
22	2,72	2,69	2,72	0,017	0,022	2,73
27	2,75	2,72	2,75	0,018	0,020	2,88
32	2,77	2,74	2,79	0,020	0,022	3,11
37	2,79	2,76	2,80	0,018	0,022	3,06
42	2,84	2,82	2,85	0,054	0,030	3,06

3.2. Atividade lipolítica

No primeiro teste, os fungos cresceram utilizando lipídeos como fonte de carbono e energia (Figura 1). PLE 05 teve menor crescimento micelial que PLO 02 e PLO 06.

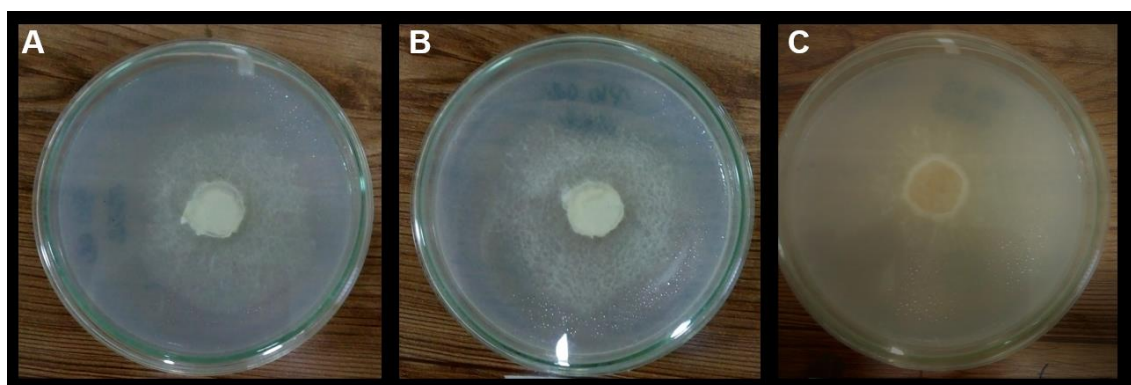


Figura 1. Crescimento micelial dos isolados de *Pleurotus ostreatus* PLO 02 (A), PLO 06 (B) e de *Pleurotus eryngii* PLE 05 (C) em meio mínimo acrescido de 3%(v/v) de óleo de oliva, após 10 dias de incubação a 25 °C.

No segundo teste, foi observado a formação de um halo fluorescente alaranjado sobre o meio de cultura que se deve à reação dos ácidos graxos produzidos durante a hidrólise enzimática com a rodamina B (Figura 2). Assim,

os três isolados são lipolíticos, pois houve a formação do halo alaranjado em torno das colônias fúngicas. Resultados semelhantes foram relatados para *Trichothecium roseum* (Gopinath et al., 2013), *Penicillium* sp., *Rhizomucor* sp. e *Aspergillus* sp. (Rodrigues, et al., 2016) e *Lentinus crinitus* (Cambri et al., 2016) que foram isolados de ambientes contaminados com óleo.

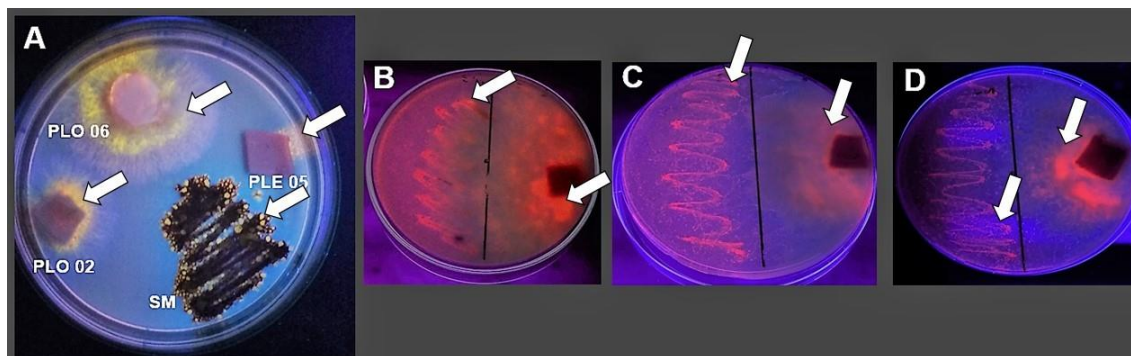


Figura 2. Produção de lipases por isolados de *Pleurotus ostreatus* (PLO 02 e PLO 06) e *Pleurotus eryngii* (PLE 05) em meio de cultura composto por rodamina B e óleo de oliva. (A) placa vista de frente com PLO 02, PLO 06, PLE 05 e *Serratia marcescens* (SM). Placas individuais de PLO 02 (B), PLO 06 (C) e PLE 05 (D) em meio contendo rodamina B (colônias à direita) e *S. marcescens* como controle positivo (estria à esquerda). A presença de halos alaranjados em torno da colônia indica a hidrólise dos lipídeos.

3.3. Atividade enzimática do extrato bruto

Verificou-se que atividade de lacase, LiP, MnP, xilanase, celulase e lipase no EEB dos três isolados.

A produção de lacase de PLO 06 e PLE 05 se manteve constante nos tempos de incubação. A quantidade de Lac produzida também foi similar entre esses dois fungos (Figura 3A). A atividade de lacase em PLO 02 foi constante até próximo dos 25 dias de incubação, tendo um aumento de aproximadamente 3 vezes aos 38 dias (Figura 3A). A lacase de *P. ostreatus* cultivado em grãos de trigo por 40 dias teve pico de atividade aos 20 dias, chegando a uma produtividade de $70 \mu\text{mol g}^{-1}$ de substrato (Montoya et al., 2015). Outra lacase isolada de *P. eryngii* cultivado em caules de bananeira triturado obteve picos de atividade de $160,25 \text{ U mL}^{-1}$ após 10 dias (Asgher e Bilal, 2016). PLO 02 se mostrou um eficiente produtor de lacase no resíduo do coco da macaúba quando comparado à PLO 06 e PLE 05.

As enzimas LiP e MnP de PLO 06 apresentaram pico de atividade aos 35 dias (Figura 3 B e C). A partir dos 35 dias, não se detectou atividade de LiP em PLO 02 e a atividade de MnP para PLO 02 e PLE 05 se manteve (Figura 3B). MnP de *P. ostreatus* cultivado em grãos de trigo teve produção constante durante os 40 dias (Montoya et al., 2015). Em outro trabalho, no qual *P. ostreatus* foi cultivado em torta de pinhão-manso a atividade de LiP chegou a $10,60 \text{ mmol mL}^{-1}$ após 7 dias (Oliveira et al., 2016). *P. eryngii* teve picos de atividade para LiP e MnP de $143,15 \text{ mL}^{-1}$ e $68,2 \text{ mL}^{-1}$, respectivamente, no quarto dia de incubação (Asgher e Bilal, 2016).

Apesar de serem produzidas em quantidades diferentes, a celulase e a xilanase de PLE 05 mantiveram a produção constante nos tempos de incubação. PLO 02 e PLO 06 tiveram picos de atividade em 37 e 33 dias, respectivamente, para xilanase (Figura 3D). Aos 37 dias, a celulase de PLO 06 teve maior atividade e a celulase de PLO 02 teve produção constante em todos os tempos de incubação (Figura 3E). As atividades enzimáticas podem variar com o isolado fúngico e o substrato. Assim, Montoya et al., (2015) observaram picos de atividade de celulase ($50 \mu\text{mol g}^{-1}$) aos 35 dias de incubação em *P. ostreatus* cultivado em grãos de trigo, enquanto Cardoso (2012) encontrou atividade de $0,00132$ e $0,00133 \text{ mmol g}^{-1}$ para celulase e xilanase, respectivamente, em *P. ostreatus* quando cultivado em palha de sorgo após 20 dias. Este mesmo autor identificou essas enzimas em *P. eryngii* com atividades de $0,00065$ e $0,00180 \text{ mmol g}^{-1}$ para celulase e xilanase, respectivamente. Altaf et al., (2016) obteve diferentes perfis de produção de xilanase em *P. eryngii* dependendo da fonte de carbono utilizada, obtendo a melhor produtividade utilizando xilana como fonte de carbono, com atividade chegando a $5 \mu\text{mol g}^{-1}$ após 10 dias de incubação.

Em todos os três isolados analisados foi detectado atividade lipolítica no EEB. A produção de lipase foi maior em PLO 06 e menor em PLO 02 e PLE 05 (Figura 3F), respectivamente, no qual a atividade nestes dois últimos se manteve constante nos tempos analisados. Em PLO 06 houve um pico de atividade aos 32 dias chegando a $2,5 \text{ mmol min}^{-1}$. Atividade menor para lipase foi encontrado por Piscitelli et al., (2017) em *P. ostreatus* cultivado em meio de cultura comercial

acrescido com água residual de azeitona tendo seu máximo de atividade aos 5 dias de incubação com pico de 0,03 mmol L⁻¹.

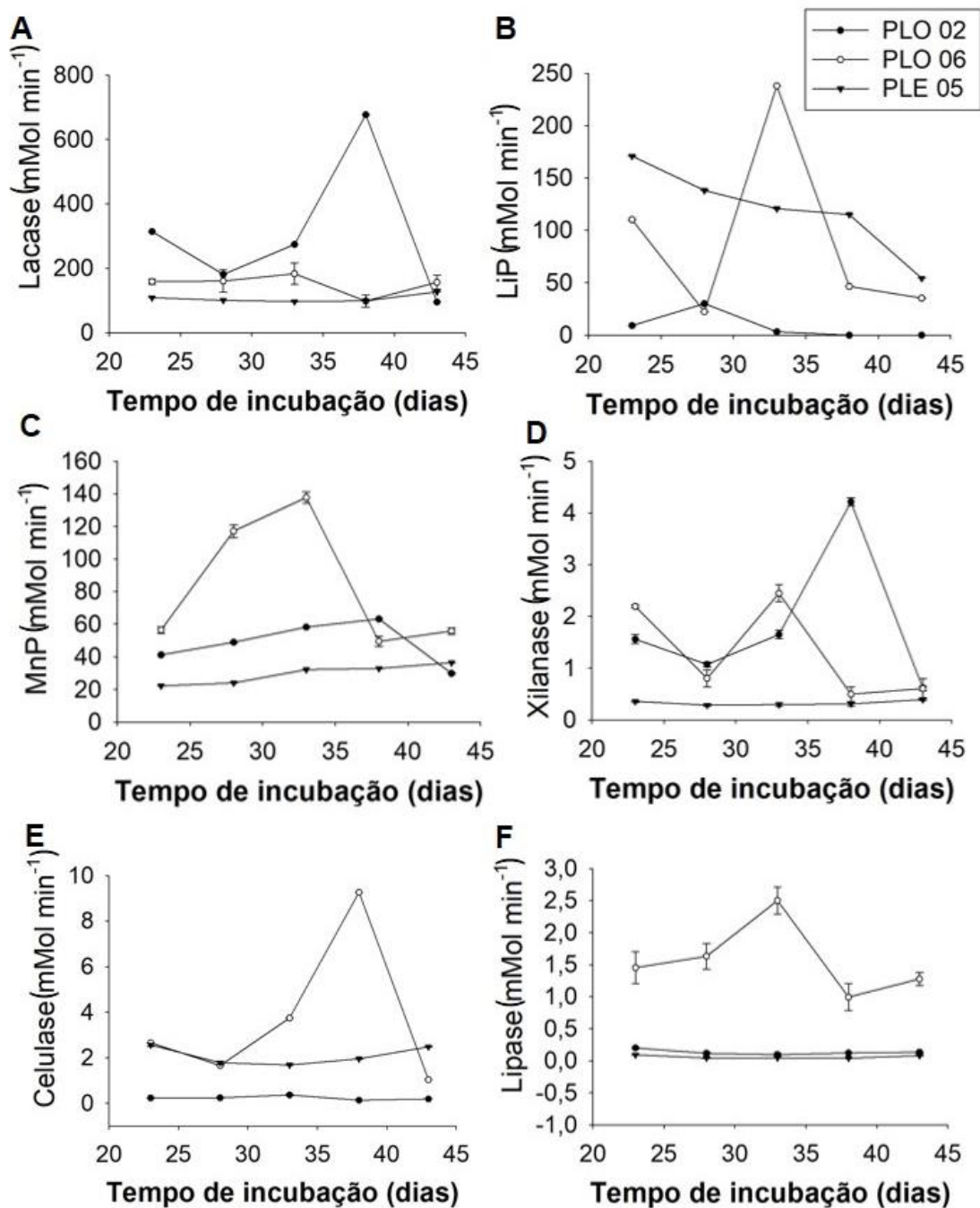


Figura 3. Atividade específica de lacase (A), lignina peroxidase (B), manganês peroxidase (C), xilanase (D), celulase (E) e lipase (F) de *Pleurotus ostreatus*, isolados PLO 02, PLO 06 e de *Pleurotus eryngii*, isolado PLE 05, quando cultivado em resíduo do coco da macaúba em diferentes tempos de incubação.

3.4. Purificação parcial do extrato enzimático (EEB)

O coeficiente de correlação entre o tempo de retenção e o volume do tampão foi de 99% (Tabela 2). Esse tempo de retenção foi cerca de 10 min.

Tabela 2. Fases e tempos de eluição do extrato enzimático bruto durante a purificação por exclusão molecular de *Pleurotus ostreatus* isolados PLO 02 e PLO 06 e *Pleurotus eryngii*.

Fases de eluição	Tempo na coluna (min)	Quantidade de tampão eluído (mL)
Fase 1	10	20
Fase 2	20	40
Fase 3	30	60
Fase 4	40	80
Fase 5	50	100
Fase 6	60	120
Fase 7	70	140

Após a purificação parcial foram detectados picos enzimáticos em 10 fases coletadas para PLO 02, sendo a fase 2 a única contendo todas as enzimas. Nessa mesma fase foi detectado o maior valor para proteínas solúveis, lacase e LiP (Figura 4A). A partir da fase 3, o valor das proteínas solúveis diminui e a atividade de MnP, xilanase, e celulase aumentaram. No PLO 06 foi encontrado atividade enzimática até a fase 6 de eluição. Na fase 5 foi observado os maiores picos de atividade enzimática, e maior concentração de proteínas solúveis (Figura 4B).

Em *P. eryngii* detectou-se atividade máxima enzimática na fase 2 de eluição, na qual encontram-se também, a presença de todas as enzimas (Figura 4 e Tabela 2). A partir da quarta fase não se detectou mais atividade enzimática, apenas para proteínas solúveis. Para cada fungo, a fase que continha maior atividade, principalmente das ligninases, foi submetida a posterior caracterização enzimática.

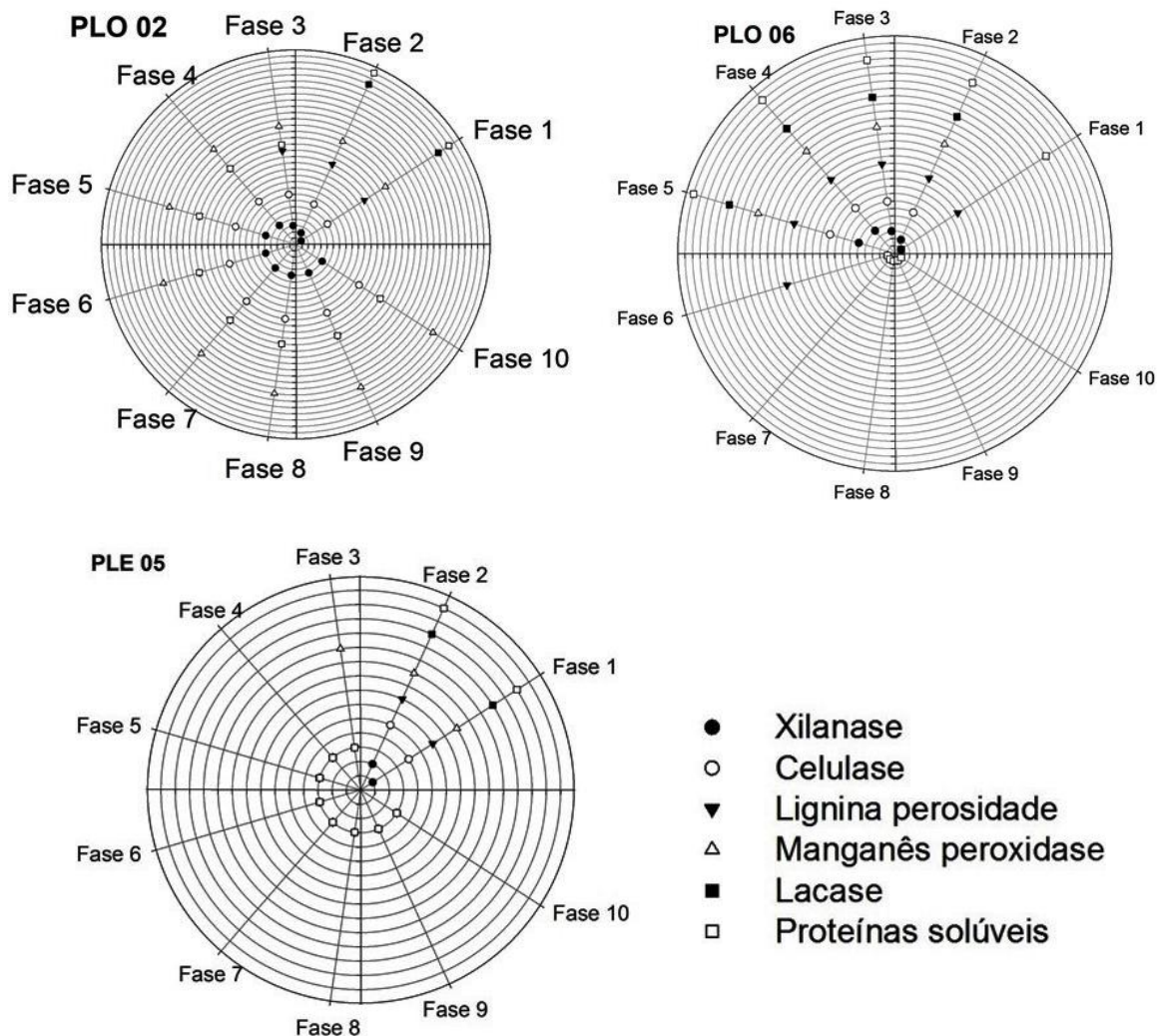


Figura 4. Perfil de eluição do extrato enzimático parcialmente purificado de *Pleurotus ostreatus* isolados PLO 02 e PLO 06 e *Pleurotus eryngii* cultivado em resíduo do coco de macaúba. Atividade em unidades arbitrárias.

No processo de purificação com SEPHADEX G-100 obteve-se aumento no rendimento para MnP apenas em PLO 06, com incremento de cerca de 3 vezes na sua atividade (Tabela 3). Rendimento de 1,2 vezes foi relatado para MnP de *P. ostreatus* crescido em meio de cultura comercial (Yehia, 2014). Já em *P. eryngii* cultivado em meio de cultura comercial acrescido de diferentes fontes de nitrogênio o rendimento para MnP foi de 0,5 vezes (Martinez et al., 1996).

A lacase presente no EEPP apresentou rendimentos de 105%, 504% e 315% para PLO 02, PLO 06 e PLE 05, respectivamente (Tabelas 3, 4 e 5). Rendimento de 77,6% foi relatado para *P. ostreatus* cultivado por 8 dias em palha

de trigo (Patel et al., 2014) e 16,6% de rendimento para *P. erynggii* cultivado em meio de cultura comercial (Yang et al., 2015).

Para a LiP o melhor resultado em termos de rendimento de purificação foi para o PLO 06, no qual houve um incremento 4 vezes na atividade de LiP (Tabela 4), seguido por 1,3 para PLO 02 (Tabela 3) e 2,2 para PLE 05 (Tabela 5). Incremento de 1,6 na atividade foi encontrado em LiP de *P. ostreatus* cultivado em torta de pinhão-manso (Oliveira et al., 2016). Em *Ganoderma lucidum* crescido em palha de trigo, o rendimento alcançou um aumento na atividade de cerca de 8 vezes para LiP (Bilal et al., 2015). De uma forma geral os fungos estudados apresentaram um bom rendimento na purificação de LiP quando comparado aos resultados relatados na literatura, demonstrando o potencial desses isolados na produção desta enzima e sua fácil purificação.

Para as enzimas hidrolíticas, celulase e xilanase, obteve-se aumento na atividade de 1,2 vezes para ambas as enzimas de PLO 02 (Tabela 3). Para PLO 06, o aumento na atividade foi de 2 vezes e 0,98 vezes para xilanase e celulase, respectivamente, e 5 e 1,9 de incremento nas atividades de xilanase e celulase de PLE 05. Acréscimo de 1,5 vezes na atividade de xilanase foi relatado em *P. ostreatus* crescido em meio base com xilana (Fikiru et al., 2016). Em *Aspergillus tamarii* crescido em bagaço de cevada, a purificação de uma xilanase rendeu um aumento de 7,43 vezes na sua atividade (Heinen et al., 2018). O rendimento para celulase de *P. ostreatus* cultivado em meio comercial foi de 17,9% (Okereke et al., 2017), valor menor do que o obtido por PLO 06 neste estudo, mostrando o potencial desse isolado na produção de celulasas.

Tabela 3. Volume, atividade total e específicas, fator de purificação e rendimento das enzimas nas diferentes etapas de purificação parcial das enzimas lignocelulolíticas do extrato enzimático bruto de *Pleurotus ostreatus* (PLO 02) cultivado em resíduo de coco de macaúba.

Etapas da Purificação	Volume (mL)	Atividade (mM min ⁻¹)		Fator de purificação	Rendimento (%)
		Total	Específica		
Manganês Peroxidase					
Extrato enzimático bruto	150	2,6	51	1,0	100
Precipitação/Diálise	103	0,3	20	0,4	11
SEPHADEX G-100	50	0,74	58	2,8	28
Lacase					
Extrato enzimático bruto	150	14,5	336	1,0	100
Precipitação/Diálise	103	215	6739	20	1481
SEPHADEX G-100	50	226	8043	1,2	105
Lignina Peroxidase					
Extrato enzimático bruto	150	1,2	19,6	1	100
Precipitação/Diálise	103	0,98	30,6	1,6	84
SEPHADEX G-100	50	1,1	40	1,3	96
Xilanase					
Extrato enzimático bruto	150	0,08	1,0	1	100
Precipitação/Diálise	103	0,03	1,0	0,94	40
SEPHADEX G-100	50	0,03	1,2	1,3	44
Celulase					
Extrato enzimático bruto	150	0,17	4,6	1,0	100
Precipitação/Diálise	103	0,05	0,15	0,03	28
SEPHADEX G-100	50	0,01	0,19	1,3	6,5

O baixo rendimento na purificação da celulase (endoglucanases, exoglucanase, β – glicosidase) deve-se à sua ação sinérgica para degradar a celulose em seus monômeros de baixo peso molecular (Carvalho, 2011). Ao submetemos o EEB à etapa de cromatografia as celulasas podem ter sido separadas e eluídas em fases diferentes diminuindo suas interações com a fase estacionária e suas atividades. Resultado similar a este também foi relatado por Rodrigues et. al., (2014) no qual não houve aumento na atividade de celulase no final da purificação. O mesmo pode ser constatado para a xilanase que se comporta de forma sinérgica para degradar a xilana presente na hemicelulose.

Tabela 4. Volume, atividade total e específicas, fator de purificação e rendimento das enzimas nas diferentes etapas de purificação parcial das enzimas lignocelulolíticas do extrato enzimático bruto de *Pleurotus ostreatus* (PLO 06) cultivado em resíduo de coco de macaúba.

Etapas da Purificação	Volume (mL)	Atividade (mM min ⁻¹)		Fator de purificação	Rendimento (%)
		Total	Específica		
Manganês Peroxidase					
Extrato enzimático bruto	176	8	104	1,0	100
Precipitação/Diálise	60	25	542	5,2	303
SEPHADEX G-100	50	28	546	1	270
Lacase					
Extrato enzimático bruto	176	13,7	167	1,0	100
Precipitação/Diálise	60	62,2	623	3,7	453
SEPHADEX G-100	50	69	782	1,3	504
Lignina Peroxidase					
Extrato enzimático bruto	176	5,9	73	1	100
Precipitação/Diálise	60	2,4	24	0,34	41
SEPHADEX G-100	50	8,7	98	4,0	147
Xilanase					
Extrato enzimático bruto	176	0,08	1,0	1	100
Precipitação/Diálise	60	0,19	1,9	1,8	221
SEPHADEX G-100	50	0,33	3,7	1,9	382
Celulase					
Extrato enzimático bruto	176	0,02	0,3	1,0	100
Precipitação/Diálise	60	0,03	0,3	1,1	150
SEPHADEX G-100	50	0,03	0,3	0,98	127

Tabela 5. Volume, atividade total e específicas, fator de purificação e rendimento das enzimas nas diferentes etapas de purificação parcial das enzimas lignocelulolíticas do extrato enzimático bruto de *Pleurotus eryngii* (PLE 05) cultivado em resíduo de coco de macaúba.

Etapas da Purificação	Volume (mL)	Atividade (mM min ⁻¹)		Fator de purificação	Rendimento (%)
		Total	Específica		
Manganês Peroxidase					
Extrato enzimático bruto	176	4,9	29	1,0	100
Precipitação/Diálise	60	0,7	0,14	0,005	14
SEPHADEX G-100	50	1,7	1,3	9,1	34
Lacase					
Extrato enzimático bruto	176	17,4	117	1,0	100
Precipitação/Diálise	60	45,6	154	1,3	262
SEPHADEX G-100	50	54,9	683	4,4	315
Lignina Peroxidase					
Extrato enzimático bruto	176	17,5	112,5	1	100
Precipitação/Diálise	60	18,3	3,8	0,034	104
SEPHADEX G-100	50	11,2	8,6	2,26	63
Xilanase					
Extrato enzimático bruto	176	0,05	0,37	1	100
Precipitação/Diálise	60	0,02	0,004	0,01	40
SEPHADEX G-100	50	0,02	0,02	5	40
Celulase					
Extrato enzimático bruto	176	0,37	2,5	1,0	100
Precipitação/Diálise	60	0,02	0,006	0,002	7,3
SEPHADEX G-100	50	0,01	0,01	1,9	3,8

3.5. Caracterização enzimática

3.5.1. Efeito da temperatura

Para os três isolados a atividade de lacase se manteve estável em todas as temperaturas, exceto para o PLO 02 que teve sua atividade aumentada nas temperaturas próximas de 50 °C (Figura 5A). Essa temperatura tem sido observada ser ótima para atividade de lacase de *P. ostreatus* cultivado em palha de trigo que também teve um pico de atividade em 50 °C (Patel et al., 2014) e de *P. eryngii* crescido em meio comercial (Yang et al., 2015).

A lignina peroxidase dos três isolados testados comportaram-se de forma diferente quanto a temperatura ótima de atividade. Para o PLO 02 houve pico de atividade em 15 °C. Para PLO 06 a atividade máxima foi em temperaturas

próximas a 30 °C e em PLE 05 não houve diferença quanto a atividade em nenhuma das temperaturas de incubação (Figura 5B). A variação de temperatura ótima desta enzima é relatada na literatura. Enquanto a LiP de *P. ostreatus* cultivado em torta de pinhão-manso foi termoestável em todas as temperaturas (Oliveira et al., 2016), quando cultivado em meio comercial a melhor temperatura foi a 35 °C (Sivakami et al. 2017). Dentre os três fungos, a LiP de PLE 05 foi a que demonstrou maior termoestabilidade nas temperaturas analisadas. Enzimas com maior termoestabilidade apresentam vantagens, como a diminuição da carga enzimática nos processos, maior tempo de atividade enzimática e assim diminuindo os custos do processo (Viikari et al., 2007)

A MnP manteve-se estável em todas as temperaturas analisadas para os três isolados (Figura 5C). Resultado semelhante foi encontrado em MnP de *Ganoderma lucidum* crescido em meio comercial no qual a atividade da enzima se manteve estável até 50 °C, decaindo em temperaturas superiores (Bilal et al., 2015). Entretanto, a manganês peroxidase de *P. ostreatus* crescido em meio comercial teve máximo de atividade a 25 °C (Yehia, 2014).

A xilanase e a celulase foram termoestáveis em todas as temperaturas testadas (Figura 5D). Uma xilanase de *P. ostreatus* cultivado em meio basal acrescido de xilana teve seu máximo de atividade a 50 °C (Fikiru et al., 2016). Comportamento similar foi encontrado para uma xilanase de *Trichoderma inhamatum* crescido em meio comercial somado de farelo de trigo (Silva et al., 2015). Em *P. florida* cultivado em diferentes fontes de carbono foi encontrado atividade máxima de celulase a 45 °C (Goyal e Soni, 2011). As enzimas Lacase, MnP, Xilanase e celulase dos três isolados demonstraram termoestabilidade em uma ampla faixa de temperatura reforçando seu potencial uso em diferentes indústrias.

As lipases de PLO 02, PLO 06 e PLE 05 tiveram comportamento similar nas temperaturas testadas. Em todos os casos, as lipases tiveram pico de atividade a 30 °C (Figura 5F). Resultado parecido foi demonstrado por Piscitelli et al., (2017) no qual duas lipases isoladas de *P. ostreatus* cultivado em meio de cultura comercial acrescido com água residual de azeitona, e expressas heterologamente na levedura *Pichia pastoris*, tiveram o máximo de atividade no intervalo de 30 a 40 °C. Lipase do basidiomiceto *Schizophyllum commune*

ISTL04 cultivado em sementes de *Leucaena leucocephala* teve aumento na atividade até 60 °C, diminuindo nas temperaturas superiores a esta (Singh et al., 2014).

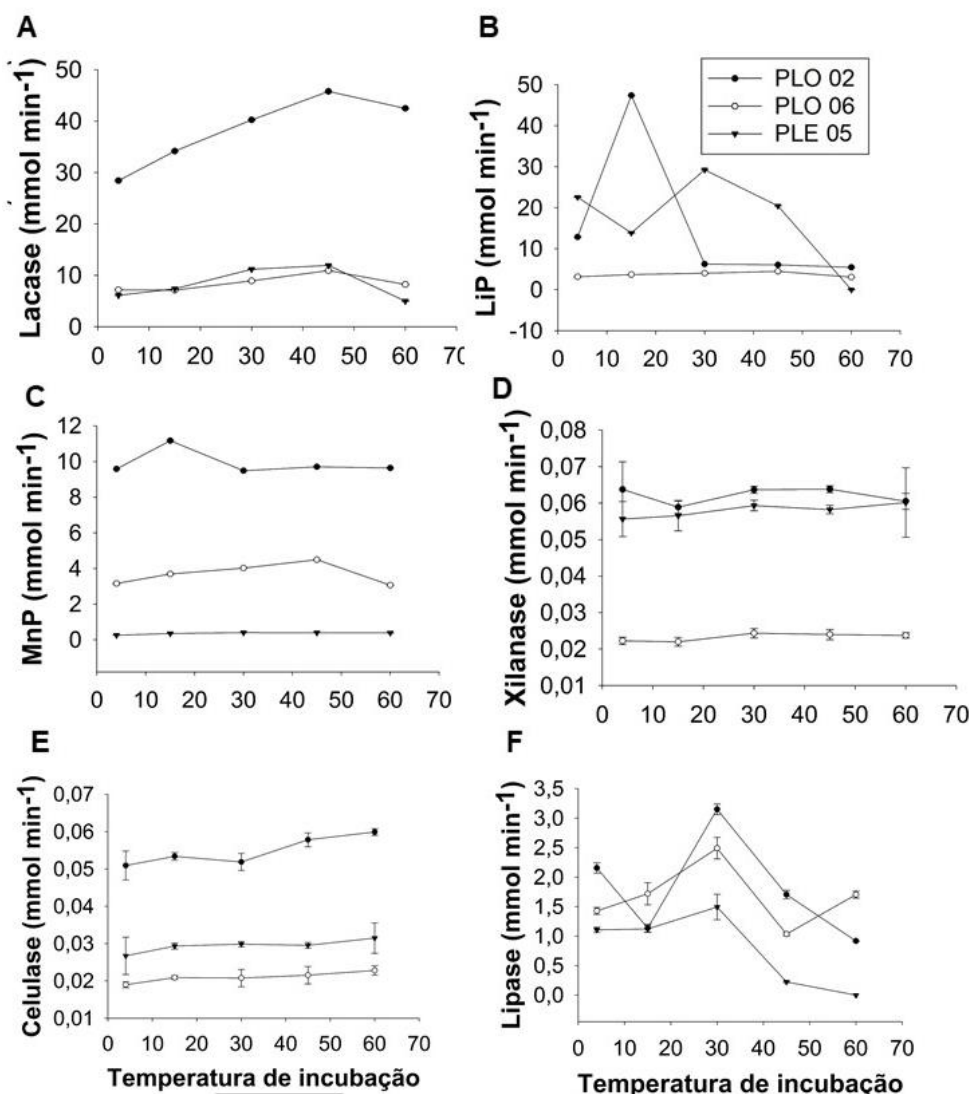


Figura 5. Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas do EEPP (A) lacase, (B) LiP, (C) MnP, (D)xilanase, (E) Celulase e (F) Lipase de *Pleurotus ostreatus* isolados PLO 02 e PLO 06 e *Pleurotus eryngii* cultivados em resíduo do coco de macaúba.

3.5.2. Efeito do pH

As atividades das lacases dos três isolados comportaram-se de forma similar quanto ao pH ótimo, tendo picos de atividade em pHs próximo a três (Figura 6A). Comportamento parecido foi encontrado em lacase de *P. eryngii* na

qual a maior atividade dessa enzima foi em pH igual a três e atividade decaindo a partir deste (Yang et al., 2015). Lacase de *P. ostreatus* cultivado em palha de trigo teve maior atividade em pH igual a 4,5 (Patel et al., 2014) valor um pouco acima do encontrado para os isolados PLO 02, PLO 06 e PLE 05. A diminuição na atividade das lacases em pH mais alto, pode ser causado devido a ionização dos aminoácidos críticos encontrados nessa enzima (Asp e Glu), inativando-as (Salony et al., 2006).

As atividades das LiPs comportaram-se de maneira diferente de acordo com os isolados. Em PLO 02 a atividade dessa enzima se manteve constante nos pHs testados (Figura 6B) e em PLO 06 e PLE 05 tiveram um pico de atividade em pH próximo do neutro. Oliveira et al., (2016) encontraram maior atividade em pH no intervalo de 5 a 7 para essa enzima de *P. ostreatus* quando cultivado em torta de pinhão - manso. Em *Ganoderma lucidum* crescido em meio comercial a atividade de LiP também foi maior em pHs no intervalo de 5 a 6 (Sivakami et al., 2017).

A enzima manganês peroxidase dos três isolados mantiveram-se estáveis nos pHs em que foram incubadas, apenas PLO 02 teve um aumento na atividade em pH 7 (Figura 6C). Valores maiores de atividade foram encontrados para MnP em pHs ácidos em *P. ostreatus* crescido em meio comercial (Yehia et al., 2014).

As xilanases e as celulases mantiveram-se estáveis em todos os pHs analisados (Figura 6D e E). Resultado semelhante foi encontrado em xilanase de *P. eryngii* no qual a enzima manteve atividade constante nas faixas de pHs de 4 a 10 analisadas (Altaf et al., 2016). Em *P. ostreatus* foi demonstrado atividade ótima para xilanase em pH 6 (Fikiru et al., 2016). Em *Pleurotus florida* cultivado em diferentes fontes de carbono foi encontrado atividade máxima de celulase em pHs na faixa de 4 a 5,5, diminuindo a atividade em pHs superiores a este (Goyal e Soni, 2011).

As lipases secretadas por PLO 06 e PLE 05 tiveram picos de atividade em pH 7. A maior atividade para PLO 02 foi em pH 3 (Figura 6F). Em todas as lipases a atividade diminuiu à medida que o pH se tornava alcalino, sendo não detectada atividade de lipase em pH 10 em PLE 05. Resultado semelhante foi encontrado para duas lipases isoladas de *P. ostreatus* no qual a atividade teve seu ápice em

pH 7, diminuindo a atividade à medida que o pH se tornava mais alcalino (Piscitelli et al., 2017). Lipase de *Schizophyllum commune* ISTL04 cultivado em sementes de *Leucaena leucocephala* teve maior atividade em pH alcalinos com máxima em pH 11 (Singh et al., 2014).

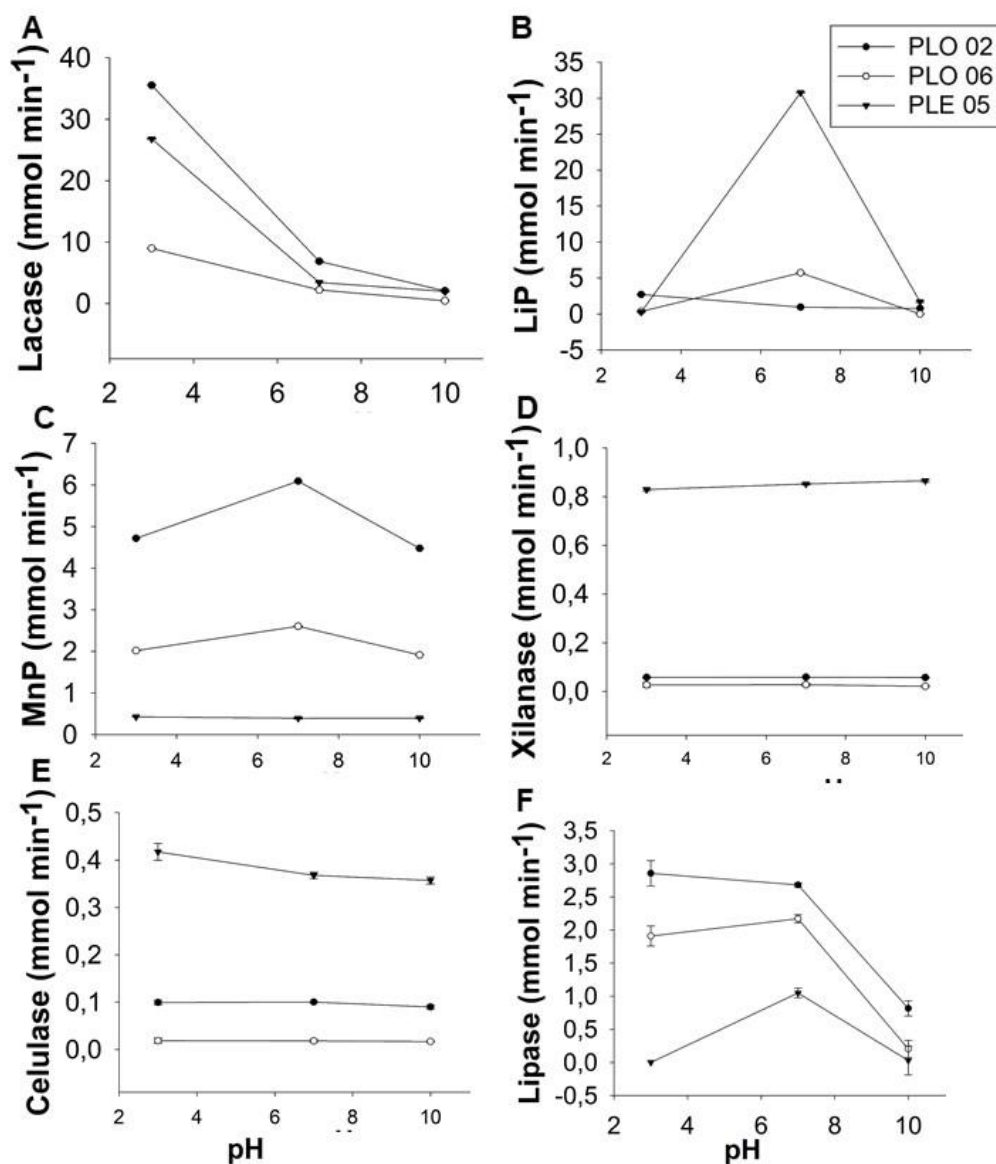


Figura 6. Efeito do pH sobre a atividade das enzimas do EEPP (A) lacase, (B) LiP, (C) MnP, (D) xilanase, (E) Celulase e (F) Lipase de *Pleurotus ostreatus* isolados PLO 02 e PLO 06 e *Pleurotus eryngii* cultivados em resíduo do coco de macaúba.

3.5.3. Estabilidade térmica

As enzimas dos três isolados analisados mantiveram-se estáveis nos tempos de incubação. Com exceção da lacase, que teve uma queda de atividade

até uma hora de incubação e depois manteve-se constante (Figura 7A). Os outros isolados tiveram uma redução na atividade até 4 h, estabilizando depois desse período (Figura 7). Comportamento semelhante foi encontrado para lacase de *P. ostreatus* crescido em palha de trigo no qual houve decaimento na atividade até uma hora de incubação estabilizando nas h posteriores (Patel et al., 2014). A LiP de *P. ostreatus* cultivado em meio comercial caracterizada por Sivakami et al. (2017) teve um aumento na atividade até 144 h, decaindo depois disso. Grabski et al., (1996) extraíram uma MnP de *L. edodes* no qual conseguiram detectar atividade enzimática após 60 d de incubação a 4 °C. Isso demonstra a capacidade dessa enzima em diferentes condições térmicas.

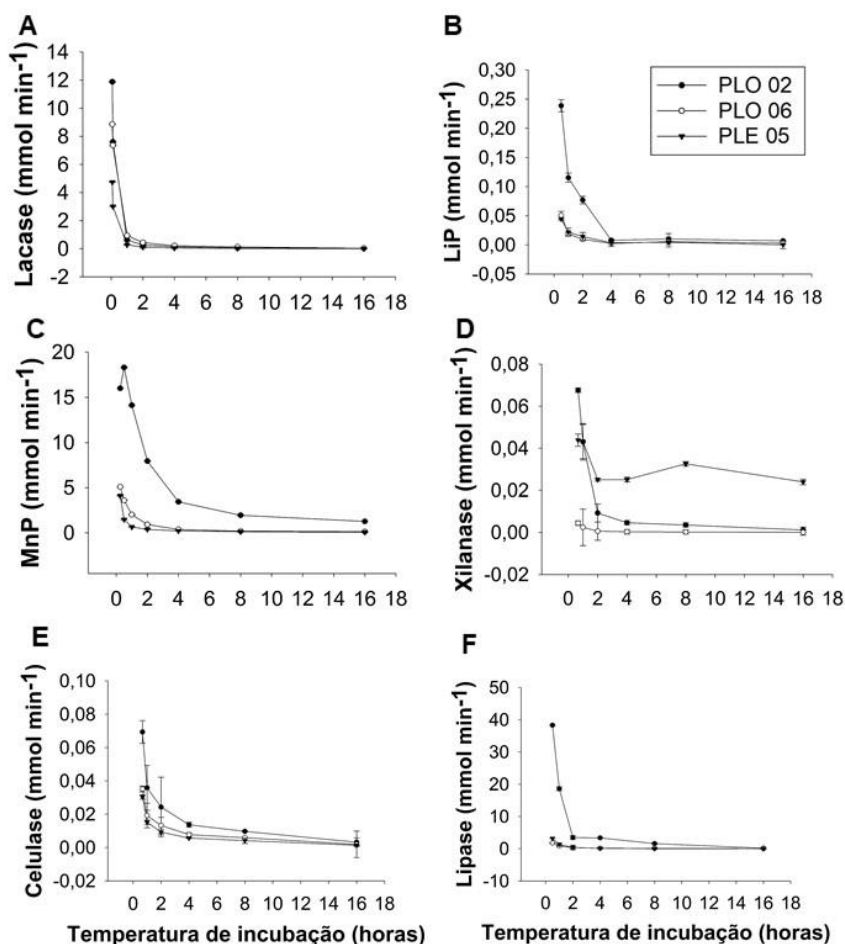


Figura 7. Efeito do tempo de incubação sobre a atividade das enzimas do EEPP (A) lacase, (B) LiP, (C) MnP, (D)xilanase, (E) Celulase e (F) Lipase de *Pleurotus ostreatus* isolados PLO 02 e PLO 06 e *Pleurotus eryngii* cultivados em resíduo do coco de macaúba cultivados em resíduo de macaúba.

A xilanase isolada de *P. eryngii* crescido em meio com xilana manteve atividade durante 288 h de incubação, diminuindo sua atividade após esse tempo (Altaf et al., 2016). Uma celulase extraída de *L. edodes* teve pico de atividade nas primeiras horas de incubação, decaindo após 24 h (Pereira Junior et al., 2003). Resultados semelhantes aos encontrados para as lipases de PLO 02, PLO 06 e PLE 05 foram relatados por Singh et al., (2014) no qual a lipase produzida por *S. commune* ISTL04 teve queda na atividade com o decorrer do tempo de incubação, mas teve atividade detectada após 5 h.

3.5.4. Parâmetros cinéticos

As curvas de atividade em função da concentração do substrato obtidas do EEP de PLO 02, PLO 06 e PLE 05 seguiram a cinética de Michaelis-Menten (Figura 8 e Tabela 6). As reações catalisadas por essas enzimas apresentam uma saturação com o aumento da concentração do substrato e a velocidade de conversão não foi linear frente ao aumento da concentração do substrato.

Dentre as lacases obtidas de PLO 02, PLO 06 e PLE 05 a que apresentou maior afinidade pelo substrato foi a lacase do PLE 05, ou seja, seu K_M foi o menor dentre a dos três isolados (Figura 8A e Tabela 6). Valor maior de K_M (46,51 mM) foi encontrado em lacase de *P. ostreatus* crescido em palha de trigo no qual o substrato usado também foi o ABTS, demonstrando assim, menor afinidade pelo substrato quando comparado à lacase encontrada nos três isolados aqui analisados. Em outro trabalho a mesma enzima produzida por *P. ostreatus* teve K_M de 0,021 mM, valor próximo do encontrado no nosso estudo (Jamil et al., 2018). Para as três LiP, os valores de K_M encontrados foram próximo entre si (Tabela 6). Dentre as LiPs analisadas, a produzida por PLO 06 apresentou maior afinidade pelo substrato e $V_{m\acute{a}x}$ de 9,32 mmol L⁻¹ min⁻¹ (Figura 8B). Em *P. ostreatus* cultivado em torta de pinhão-manso a K_M encontrada foi de 0,067 e $V_{m\acute{a}x}$ igual a 366 μmol min⁻¹ (Oliveira et al., 2016), valores maiores em relação aos obtidos neste estudo.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos, constante de Michaelis-Menten (K_M) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) das enzimas lignocelulolíticas e lipase de *Pleurotus ostreatus* isolados PLO 02 e PLO 06 e *Pleurotus eryngii* cultivados em resíduo do coco de macaúba.

Enzimas	PLO 02		PLO 06		PLE 05	
	K_M (mg mL ⁻¹)	$V_{m\acute{a}x}$ (mmol L ⁻¹ min ⁻¹)	K_M (mg mL ⁻¹)	$V_{m\acute{a}x}$ (mmol L ⁻¹ min ⁻¹)	K_M (mg mL ⁻¹)	$V_{m\acute{a}x}$ (mmol L ⁻¹ min ⁻¹)
Lacase	0,00150	31,40	0,00240	48,07	0,00057	57,400
LiP	0,00030	9,90	0,00028	9,32	0,00073	7,300
MnP	0,03200	17,00	0,01900	26,24	0,02200	73,00
Celulase	0,00120	0,26	0,00340	0,092	0,00160	0,064
Xilanase	0,00065	0,36	0,00600	0,38	0,00031	1,020
Lipase	0,06000	7,37	5,90000	15,20	3,70000	40,800

A constante de Michaelis – Menten para as MnPs obtidas de PLO 02, PLO 06 e PLE 05 tiveram valores parecidos (Figura 8C e Tabela 6). Valor semelhante aos encontrados aqui foram relatados para *P. ostreatus* cultivado em palha de trigo no qual a K_M foi igual a 0,033 mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 189 U mL⁻¹ (Aslam and Asgher, 2011).

Os parâmetros cinéticos para as xilanases também foram parecidos para os três isolados (Figura 8D). A xilanase de PLE 05 foi a que apresentou maior afinidade pelo substrato apresentando também a maior velocidade (Tabela 6). Em *P. ostreatus* cultivado em meio basal acrescido de xilana o valor para a K_M foi igual a 0,19 e $V_{m\acute{a}x}$ de 0,011 mM min⁻¹ (Fikiru et al., 2016). Valores baixos de K_M também foram obtidos de uma xilanase de *P. eryngii* crescido em meio complexo adicionado de amido, no qual foi encontrado valores de 1,45 U mL⁻¹ e 7,21 mg mL⁻¹ para K_M e $V_{m\acute{a}x}$, respectivamente (Sugumaram et al., 2012). Esses valores baixos de K_M para as xilanases estão de acordo com aquelas obtidas por enzimas microbianas, no qual os valores da constante de K_M ficaram entre 25 μ mL⁻¹ e 1700 μ mL⁻¹ (Fikiru et al., 2016).

A cinética enzimática para as celulases de PLO 02, PLO 06 e PLE 05 tiveram valores similares. A celulase de PLO 02 demonstrou ter maior afinidade pelo substrato e maior $V_{m\acute{a}x}$. Em *P.ostreatus* cultivado em meio complexo com sacarose os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ da enzima purificada foram de 0,063 mM e 0,0019 mM min⁻¹, respectivamente, utilizando carboximetilcelulose (Okereke et

al., 2017). Para as lipases analisadas, a produzida por PLO 02 apresentou maior afinidade pelo substrato (Figura 8F). Valores parecidos aos encontrados para lipase de PLO 02 foram demonstrados por Piscitelli et al., 2017, cujo uma das lipases produzidas por *P. ostreatus* teve K_M variando entre $0,035 \text{ mM min}^{-1}$ e $0,35 \text{ mM min}^{-1}$ dependendo do substrato utilizado.

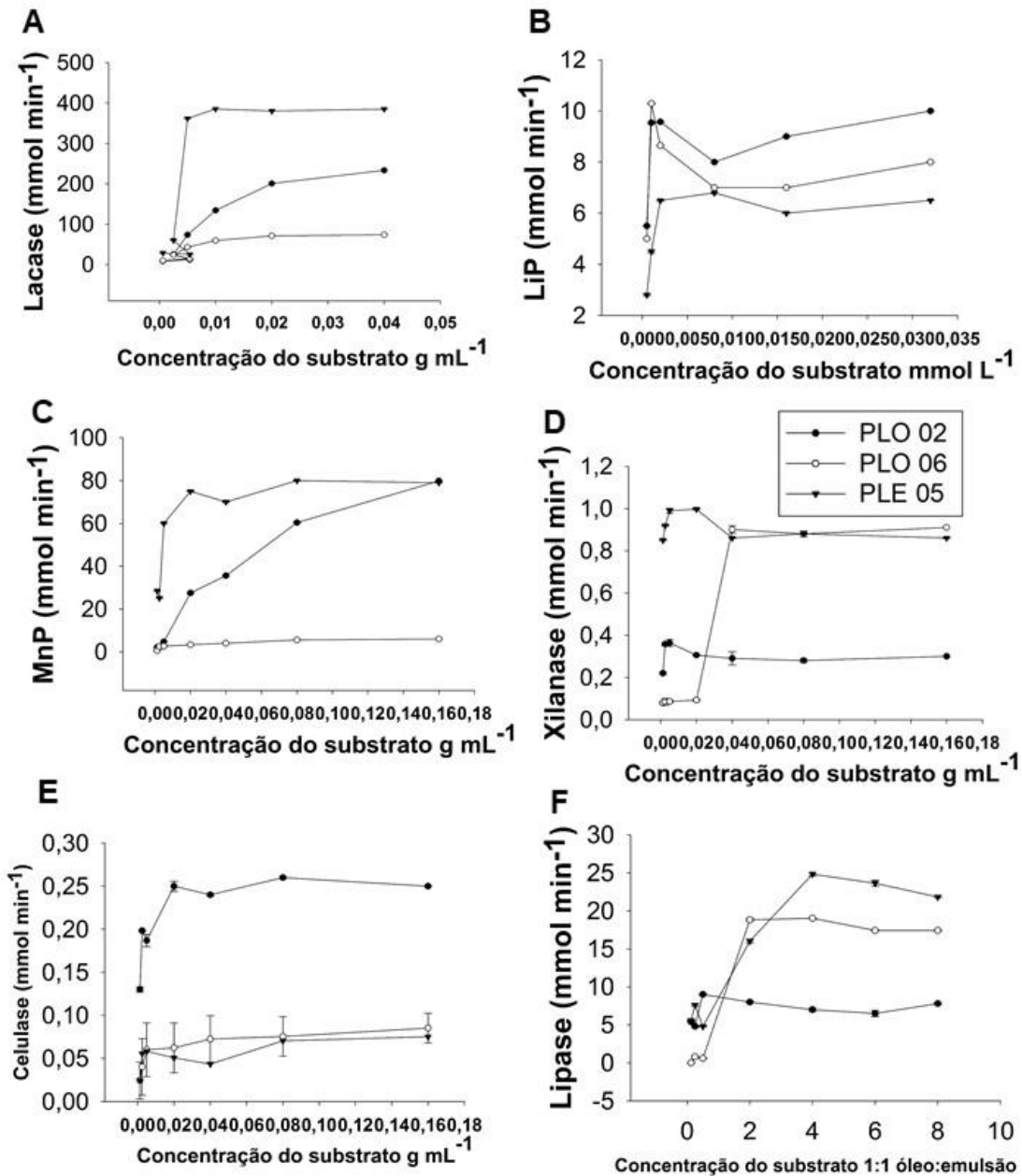


Figura 8. Atividade das enzimas lignocelulolíticas e lipase de *Pleurotus ostreatus* isolados PLO 02 e PLO 06 e *Pleurotus eryngii* cultivados em resíduo do coco de macaúba.

3.6. Aplicação do EEPP de PLO 02, PLO 06 e PLE 05

O EEPP de todos os três fungos conseguiu descolorir o corante. Pode-se notar que a descoloração foi diretamente proporcional ao aumento do tempo de incubação, independente do volume de corante usado na reação (Figura 9). PLO 02 alcançou taxas de 50% de descoloração após 24 h a 35 °C.

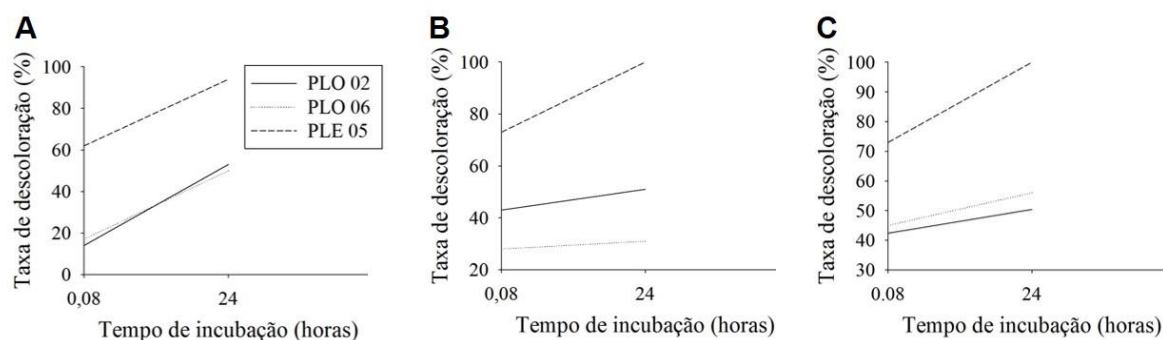


Figura 9. Taxa de descoloração pelo EEPP de *Pleurotus ostreatus* isolados PLO 02 e PLO 06 e *Pleurotus eryngii* cultivados em resíduo do coco de macaúba, após 24 h de incubação em diferentes proporções de EEPP e corante. (A) 400 µL de corante + 600 µL de EEPP; (B) 600 µL de corante + 400 µL de EEPP e (C) 800 µL de corante + 200 µL de EEPP.

O isolado PLO 06 teve uma taxa de descoloração máxima de 56% após 24 h de incubação a 35 °C (Figura 9).

Dentre os três isolados analisados quanto a capacidade do EEPP degradar o corante índigo, *P. eryngii* PLE 05 foi o que demonstrou maior potencial (Figura 10), degradando até 73% do corante em apenas 5 min, chegando a 100% de eficiência após 24 h a 35 °C. A descoloração pode ser verificada visualmente nas misturas de corante e EEPP. Pode-se observar uma diminuição acentuada da cor do corante (Figura 10). O extrato enzimático bruto de *P. ostreatus* crescido em cascas de semente de girassol conseguiu descolorir de 70% a 100% do corante índigo carmim a depender da concentração de corante (Papinutti e Forchiassin, 2010). Em outro trabalho no qual *P. ostreatus* e *P. sajor caju* foram cultivados em bagaço de cana-de-açúcar por 30 min, o extrato enzimático conseguiu uma taxa de descoloração de 53% e 73%, (Silva, 2014).

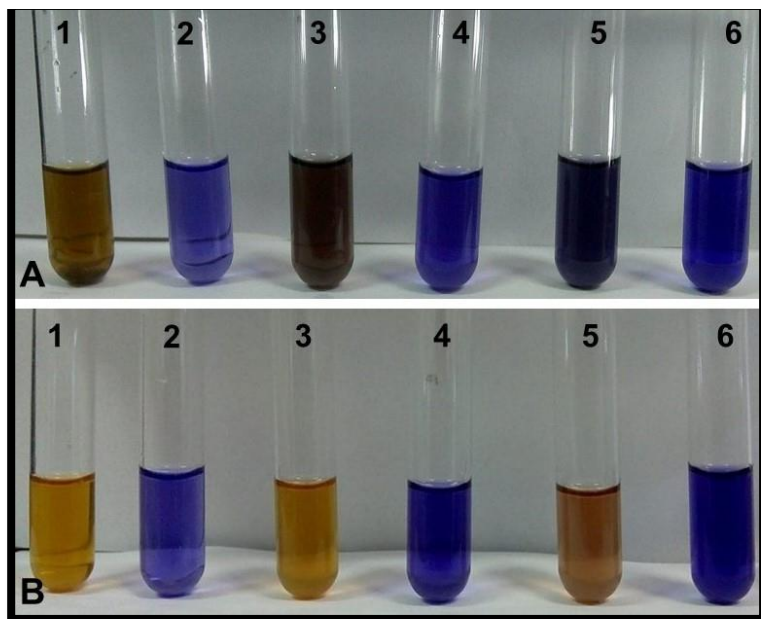


Figura 10. Degradação do corante índigo pelo extrato enzimático parcialmente purificado (EEPP) de PLE 05 após 5 min (A) e 24 h (B) de incubação. (1) 400 μ L de corante: 600 μ L de EEPP; (2) 400 μ L de corante : 600 μ L de tampão acetato de sódio; (3) 600 μ L de corante: 400 μ L de EEPP; (4) 600 μ L de corante: 400 μ L de tampão acetato de sódio; (5) 800 μ L de corante: 200 μ L de EEPP; e (6) 800 μ L de corante: 200 μ L de tampão acetato de sódio.

4. Conclusão

Pleurotus ostreatus (PLO 02 e PLO 06) e *Pleurotus eryngii* (PLE 05) apresentam capacidade de produzir o complexo enzimático lignocelulolíticos e lipolítico no resíduo do coco da macaúba. O rendimento no processo de purificação por exclusão molecular, entretanto e sua atividade varia com o isolado e a enzima. O extrato enzimático parcialmente purificado com maior potencial para aplicação no tratamento de efluentes contaminados com corantes é o extrato enzimático de *P. eryngii*, no qual consegue-se eficiência de 100% de descoloração. Os resíduos de coco de macaúba apresentam potencial para produção de enzimas de interesse industrial.

5. Referências

- Akpınar, M., & Urek, R. O. Peach and Cherry Agroindustrial Wastes: New and Economic Sources for the Production of Lignocellulolytic Enzymes. *Acta Chimica Slovenica*. 64.2 (2017): 422-430.
- Altaf, S. A., Sughra, M. G., Nasreen, K., Umar, D. M., Sher, M. M., Noor-e-Saba, K. M., ... & Lu, C. Characterization of crude xylanase produced by edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Journal Bioprocess Biotech*. 6.2 (2016): 1 - 6.
- Asgher, M., Khan, S. W., & Bilal, M. U. H. A. M. M. A. D. Optimization of lignocellulolytic enzyme production by *Pleurotus eryngii* WC888 utilizing agro-industrial residues and bioethanol production. *Romanian Biotechnological Letters*. 21.1 (2016): 11133.
- Aslam, S., & Asgher, M. Partial purification and characterization of ligninolytic enzymes produced by *Pleurotus ostreatus* during solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology*. 10.77 (2011): 17875 - 17883.
- Bailey, M. J., Peter B., and K. Poutanen. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of biotechnology*. 23.3 (1992): 257 - 270.
- Barajas-Aceves, M., Hassan, M., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. *Journal of Microbiological Methods*. 50.3 (2002): 227 - 236.
- Bilal, M., Asgher, M., & Ramzan, M. Purification and biochemical characterization of extracellular manganese peroxidase from *Ganoderma lucidum* IBL-05 and its application. *Scientific research and Essays*. 10.14 (2015): 456 - 464.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 (1976): 148 - 254.
- Buswell, J. A. et al. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford*. 12. 5 (1996): 537 - 542.
- Burkert, J.F.D.M., Maugeri, F., and Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource technology* 91.1 (2004): 77 - 84.
- Cambri, G., de Sousa, M. M. L., Fonseca, D. D. M., Marchini, F. K., da Silveira, J. L. M., & Paba, J. Analysis of the Biotechnological Potential of a *Lentinus crinitus* Isolate in the Light of Its Secretome. *Journal of proteome research*. 15.12 (2016): 4557 - 4568.
- Cardoso, W. S. Obtenção e caracterização de celulases de fungos da podridão branca em fermentação no estado sólido e sacarificação da palha de sorgo visando a produção de etanol. Tese (doutorado em bioquímica agrícola) – Universidade Federal de Viçosa. (2012).
- Carvalho, K.J., A.L. Souza, and C. C. Machado. Ecologia, manejo, silvicultura e tecnologia da Macaúba. Convênio de Cooperação Técnica SECTES/FAPEMIG. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (2011).
- Chen, S.H., Yien Ting, A.S. Biodecolorization and biodegradation potential of recalcitrant triphenylmethane dyes by *Corioliopsis* sp. isolated from compost. *J. Environ. Manage*. 150 (2015): 274 – 280.

- Ciconini, G., et al. Biometry and oil contents of *Acrocomia aculeata* fruits from the Cerrado and Pantanal biomes in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Industrial crops and products*. 45 (2013): 208 - 214.
- da Luz, J. M. R., Paes, S. A., Nunes, M. D., da Silva, M. D. C. S., & Kasuya, M. C. M. Degradation of oxo-biodegradable plastic by *Pleurotus ostreatus*. *Plos one*. 8.8 (2013): e69386.
- da Motta, P. E. F., Curi, N., de Oliveira Filho, A. T., & Gomes, J. B. V. Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37.7(2002): 10123 - 1031.
- Da Silva, M.J., and M.G. Teixeira. An unexpected behavior of H3PMo12O40 heteropolyacid catalyst on the biphasic hydrolysis of vegetable oils. *RSC Advances*. 7.14 (2017): 8192 - 8199.
- de Almeida, D. G., Maria da Glória, C. S., de Cássia Mendonça, R., Maciel, C. D. C. S., & de Gusmão, N. B. Descoloração do corante Índigo Carmim e produção de Lacase por fungos filamentosos. *Scientia Plena*. 8.5 (2012): 1 - 9.
- Ergun, S.O., Raziye, O.U. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science* 15.2 (2017): 273 - 277.
- Fikiru Getachew, F. Alemu, M. Kebede, A. Production, Purification and Characterization of Xylanase From Oyster Mushroom (*Pleurotus* Sp.). *Journal of Natural Sciences Research*. 6.13 (2016): 2224 – 3186.
- Gonzalez-Ortiz, G., Sola-Oriol, D., Martinez-Mora, M., Perez, J. F., & Bedford, M. R. Response of broiler chickens fed wheat-based diets to xylanase supplementation. *Poultry science*. 96.8 (2017): 2776 - 2785.
- Gopinath, S. C., Anbu, P., Lakshmipriya, T., & Hilda, A. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed research international*. 2013 (2013): 1 - 10.
- Goyal, M., & Soni, G. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*. *African Journal of Microbiology Research*. 5.10 (2011): 1131 - 1136.
- Grabski, A. C., Rasmussen, J. K., Coleman, P. L., & Burgess, R. R. Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* on alkylaminated emphaze TM AB 1 polymer for generation of Mn 3+ as an oxidizing agent. *Applied biochemistry and biotechnology*. 60.1 (1996): 1 - 17.
- Heinen, P. R., Bauermeister, A., Ribeiro, L. F., Messias, J. M., Almeida, P. Z., Vargas-Rechia, C. G., & Polizeli, M. L. T. M. GH11 xylanase from *Aspergillus tamarii* Kita: Purification by one-step chromatography and xylooligosaccharides hydrolysis monitored in real-time by mass spectrometry. *International journal of biological macromolecules*. 108 (2018) 291 - 299.
- Henderson, A., Gloria G., and Rodrigo B. Field guide to the palms of the Americas. Princeton University Press. 16 (1997): 1 - 18.
- Jamil, F., Asgher, M., Hussain, F., & Bhatti, H. N. Biodegradation of Synthetic Textile Dyes By Chitosan Beads Cross-Linked Laccase from *Pleurotus ostreatus* IBL-02. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*. 28.1(2018): 231 – 243.

- Jaramillo, P. M., Gomes, H. A., Monclaro, A. V., Silva, C. O., & Edivaldo Filho, X. F. Lignocellulose-degrading enzymes: An overview of the global market. *Fungal Bio-Molecules: Sources, Applications and Recent Developments*. 6 (2015): 75 – 85.
- Juturu, V., & Wu, J. C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 33 (2014): 188 - 203.
- Kalmış, E., & Sargin, S. Cultivation of two *Pleurotus* species on wheat straw substrates containing olive mill waste water. *International biodeterioration & biodegradation*. 53.1 (2004): 43 - 47.
- Kareem, S. O., Adebayo, O. S., Balogun, S. A., Adeogun, A. I., & Akinde, S. B. Purification and Characterization of Lipase from *Aspergillus flavus* PW2961 using Magnetic Nanoparticles. *Nigerian Journal of Biotechnology*. 32.1 (2017): 77 - 82.
- Khambhaty Y, Ananth S, Sreeram KJ, Rao JR, Nair BU (2015) Dual utility of a novel, copper enhanced laccase from *Trichoderma aureoviridae*. *Int J Biol Macromol*. 29.81 (2015): 69 – 75.
- Kouker, G., and Jaeger, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and environmental microbiology*. 53.1 (1987): 211 - 213.
- Knop, D., Levinson, D., Makovitzki, A., Agami, A., Lerer, E., Mimran, A., ... & Hadar, Y. Limits of versatility of versatile peroxidase. *Applied and environmental microbiology*. 82.14 (2016): 4070 - 4080.
- Kuwahara, Masaaki, et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS letters*. 169.2 (1984): 247 - 250.
- Martinez, M. J., Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F., & Martinez, A. T. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *The FEBS Journal*. 237.2 (1996): 424 - 432.
- Mandels, M., Andreotti, R., Roche, C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng Symp*. 6 (1976): 21 – 33.
- Mansour, A. A., Arnaud, T., Lu-Chau, T. A., Fdz-Polanco, M., Moreira, M. T., & Rivero, J. A. C. Review of solid state fermentation for lignocellulolytic enzyme production: challenges for environmental applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 15.1 (2016): 31 - 46.
- Mishra, C., Forrester, I. T., Kelley, B. D., Burgess, R. R., & Leatham, G. F. Characterization of a major xylanase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial solid lignocellulosic substrate. *Applied microbiology and biotechnology*. 33.2 (1990): 226 - 232
- Montoya, S., Sánchez, Ó. J., & Levin, L. Production of lignocellulolytic enzymes from three white-rot fungi by solid-state fermentation and mathematical modeling. *African Journal of Biotechnology*. 14.15 (2015): 1304 - 1317
- Okereke, O. E., Akanya, H. O., & Egwim, E. C. Purification and characterization of an acidophilic cellulase from *Pleurotus ostreatus* and its potential for agrowastes valorization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 12 (2017): 253 - 259.
- Oliveira, S. F., da Luz, J. M. R., Kasuya, M. C. M., Ladeira, L. O., & Junior, A. C. Enzymatic extract containing lignin peroxidase immobilized on carbon nanotubes: potential biocatalyst in dye decolourization. *Saudi Journal of Biological Sciences*. (2016): 3 - 9.

- Piscitelli, A., Tarallo, V., Guarino, L., Sannia, G., Birolo, L., & Pezzella, C. New lipases by mining of *Pleurotus ostreatus* genome. PLoS one. 12.9 (2017): e0185377.
- Patel, H., Gupte, S., Gahlout, M., & Gupte, A. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotus ostreatus* HP-1. 3 Biotech. 4.(2014): 77 - 84.
- Papinutti, L., & Forchiassin, F. Adsorption and decolorization of dyes using solid residues from *Pleurotus ostreatus* mushroom production. Biotechnology and Bioprocess Engineering.15.6 (2010): 1102-1109.
- Pereira Júnior, J. A. D. S., Correia, M. J., & Oliveira, N. T. D. Cellulase activity of a *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. strain grown in media containing carboxymethylcellulose or microcrystalline cellulose. Brazilian Archives of Biology and Technology. 46.3 (2003): 333 - 337.
- Richardson, M.D., and Logendra, S. Ergosterol as an indicator of endophyte biomass in grass seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45.10 (1997): 3903 - 3907.
- Rodrigues, C., Cassini, S. T., Antunes, P. W., Keller, R. P., & Gonçalves, R. F. Isolamento e seleção de fungos produtores de lipases com base na atividade lipásica e no potencial hidrolítico sobre óleo comestível de soja e espuma de caixa de gordura. Eng. sanit. Ambient. 21.3 (2016): 507 - 518.
- Saleem, R., Khurshid, M., & Ahmed, S. Laccases, Manganese Peroxidases and Xylanases used for the bio-bleaching of paper pulp; an environmental friendly approach. Protein and peptide letters. (2018).
- Salony S, Mishra V, Bisaria S. Production and characterization of laccase from *Cyathus bulleri* and its use in decolourisation of recalcitrant textile dyes. Appl Microbiol Biotechnol. 71 (2006): 646 – 653.
- Shelley, A. W., Deeth, H. C., and MacRae, I. C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. Journal of microbiological methods. 6.3 (1987): 123 - 137.
- Singh, M. K., Singh, J., Kumar, M., & Thakur, I. S. Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 110 (2014): 92 - 99.
- Sivakami, V., Ramachandran, B., Srivathsan, J., Kesavaperumal, G., Smily, B., & Kumar, D. M. Production and optimization of laccase and lignin peroxidase by newly isolated *Pleurotus ostreatus* LIG 19. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. 2.6 (2017): 875 - 881.
- Sobreira, H. F. Resíduos do coco da macaúba em substituição parcial ao milho e farelo de soja em rações para vacas mestiças lactantes. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. (2011).
- Souza, Gleison de. Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação em compostos poluentes. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2012.
- Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P. K., Gupta, V. K., Molina, G., Rodriguez-Couto, S., & Ramteke, P. W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. Renewable and Sustainable Energy Reviews. (2017).
- Sugumaram, K.R., S. N. Srivastava and V. Ponnusami. Kinetic and thermodynamic characterization of *Pleurotus eryngii* MTCC 1798 xylanase

- and *Fusarium oxysporum* MTCC3300 xylanase: A comparison. 10.3 (2012): 1626 - 1636.
- Tien, M., T.K., Kirk. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proceedings of the National Academy of Sciences. 81.8 (1984): 2280 - 2284.
- Viikari, L., Alapuranen, M., Puranen, T., Vehmaanperä, J., & Siika-Aho, M. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. In *Biofuels* (pp. 121-145). Springer Berlin Heidelberg.(2007): 121 – 145.
- Xie, C., Luo, W., Li, Z., Yan, L., Zhu, Z., Wang, J., ... & Peng, Y. Secretome analysis of *Pleurotus eryngii* reveals enzymatic composition for ramie stalk degradation. Electrophoresis. 37.2 (2016): 310 - 320.
- Yang, J., Zou, Y. J., Zhang, R. Y., & Hu, Q. X. Purification and property of laccase from *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*. Mycosystema. 3.16 (2015): 456 - 464.
- Yehia, R. S. Aflatoxin detoxification by manganese peroxidase purified from *Pleurotus ostreatus*. Brazilian Journal of Microbiology. 45.1 (2014): 127 - 134.

CONCLUSÕES GERAIS

Os fungos *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* isolados PLO 02 e PLO 06 e *Pleurotus eryngii* apresentaram capacidade de produzir o complexo enzimático lignocelulolítico e lipolítico no resíduo do coco da macaúba. O rendimento no processo de purificação por exclusão molecular foi variado de acordo com o isolado e a enzima. O extrato enzimático parcialmente purificado com maior potencial para aplicação no tratamento de efluentes contaminados com corantes foi extrato enzimático de *P. eryngii*, no qual conseguiu uma eficiência de 100% de descoloração.