



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA – PPGBIOTEC

ALDENORA DOS SANTOS VASCONCELOS

**BIOPROCESSAMENTO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL E MADEIREIRO DA
AMAZÔNIA VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
Ganoderma spp. PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS**

MANAUS

2022

ALDENORA DOS SANTOS VASCONCELOS

**BIOPROCESSAMENTO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL E MADEIREIRO DA
AMAZÔNIA VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
Ganoderma spp. PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Agroflorestal.

Orientadora: Dra. Ceci Sales-Campos

Coorientadora: Dra. Larissa Ramos Chevreuil

Coorientador: Dr. Sérgio Dantas de Oliveira Júnior

MANAUS

2022

Ficha Catalográfica

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

V331b Vasconcelos, Aldenora dos Santos
Bioprocessamento de resíduo agroindustrial e madeireiro da Amazônia via fermentação em estado sólido utilizando Ganoderma spp. para a produção de enzimas lignocelulolíticas / Aldenora dos Santos Vasconcelos . 2022
171 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Ceci Sales-Campos
Coorientadora: Larissa Ramos Chevreuil
Coorientador: Sérgio Dantas de Oliveira Júnior
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Cogumelos medicinais. 2. Hidrolases. 3. Ligninases. 4. Lignocelulose. 5. Biomassa Vegetal. I. Sales-Campos, Ceci. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

À minha mãe, a pessoa mais especial da minha vida, que sempre deu tudo de si para eu alcançar meus objetivos. Exemplo de mulher bondosa, batalhadora e dedicada.

À minha irmã Neuma, uma das pessoas que mais acreditou e investiu no meu potencial. Sempre me acolhe quando preciso.

À minha irmã Erica, minha melhor amiga, que sempre esteve ao meu lado e com ela eu sei que posso confiar.

À todas as pessoas incríveis que tive e tenho a sorte de ter em minha vida, que compartilham comigo os bons e maus momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Força Superior que rege esse universo misterioso e perfeito, nos dando a dádiva da vida.

Agradeço ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em especial ao Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis por toda a infraestrutura disponibilizada para a execução desse trabalho. Agradeço a toda a equipe maravilhosa desse laboratório: Vítor, Jefte, Giovanna, Danielle, Larissa, Lorena e Paula. Muito obrigada por toda troca de conhecimento e risada, pela amizade, pela companhia nos experimentos e nas diversões.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em especial ao PPG-BIOTEC por tornar essa conquista possível. Meus agradecimentos a todos os docentes que contribuíram para minha formação durante a pós-graduação.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Ceci Sales-Campos, por sempre acreditar no meu potencial e permitir que essa conquista fosse possível. Muito obrigada por me acolher em seu laboratório desde a iniciação científica, quando eu ainda estava no segundo período da faculdade. Agradeço a orientação e suporte na minha pesquisa e por compreender as minhas limitações, sempre viabilizando a melhor forma de execução do meu trabalho.

Agradeço à minha coorientadora Dra. Larissa Chevreuil, com certeza uma das pessoas mais importantes na minha formação científica. Grande parte da profissional que sou hoje devo a você, uma das pessoas mais inteligentes, dedicada e trabalhadora que conheço. Muito obrigada por nunca negar ajuda em meu trabalho, por todo o suporte fundamental necessário para a execução dessa pesquisa. Ter sua orientação é uma grande honra, desde a iniciação científica me moldando como verdadeira cientista.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Sérgio Dantas de Oliveira Júnior que tanto me ajudou em meus experimentos. Muito obrigada por tornar essa pesquisa possível, por sempre estar disposto em me ajudar e pela orientação tão presente durante toda a execução desse projeto. Obrigada por todo ensinamento e conversas.

Um agradecimento especial à Lorena, muito obrigada por toda a ajuda nesse trabalho, a sua contribuição foi mais que especial, serei eternamente grata.

Agradeço ao Rafael por todo o apoio e encorajamento durante minha jornada acadêmica e em todos os momentos, obrigada por sempre estar disposto a me ajudar e me acalmar.

Agradeço a Universidade do Estado do Amazonas (UEA) por permitir a minha formação como tecnóloga em biotecnologia. Muito obrigada a todos os excelentes docentes

do curso por todos os ensinamentos prestados, vocês também são responsáveis por essa conquista.

Agradeço ao Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos da Universidade do Estado do Amazonas (CMABio-UEA) por disponibilizar a infraestrutura de microscopia necessária para a execução desse trabalho.

Agradeço ao Diego, Jéssica e Jander por me apoiarem e me encorajarem nessa jornada da pós-graduação. Muito obrigada por todos os conselhos e por estarem na torcida pelo meu sucesso.

Agradeço também às minhas amigas Daiane e Laura por todo o apoio e pela amizade desde à graduação. Muito obrigada por sempre quererem o meu bem, sei que posso contar com vocês.

Agradeço também à CAPES, CNPq, FAPEAM e outras agências de fomento que disponibilizaram recursos aos laboratórios por onde passei.

A todos que de alguma forma especial contribuíram para a execução desse trabalho.

A escuridão me pegou e vaguei fora do pensamento e do tempo, as estrelas giravam acima e cada dia era tão longo quanto à idade da terra. Mas não era o fim, senti vida em mim novamente, havia sido enviado de volta até cumprir minha tarefa.

J. R. R. Tolkien

RESUMO

Espécies de *Ganoderma* são relatadas por produzirem enzimas lignocelulolíticas. Essas enzimas possuem alto valor agregado, e sua obtenção pode ser através do cultivo sólido de cogumelos em resíduos lignocelulósicos. Neste sentido, esse trabalho teve como objetivo avaliar a produção de enzimas lignocelulolíticas produzidas por *Ganoderma lucidum* e *G. tropicum* em fermentação sólida utilizando sementes de açaí (*Euterpe* sp.) e serragem de marupá (*Simarouba amara* Aublet). Os resíduos antes e após o processo fermentativo foram caracterizados quanto à composição centesimal, macro e micronutrientes, bem como modificações estruturais. As enzimas foram extraídas em água destilada (ligninases) e em tampão 0,1 M acetato de sódio (pH 5,0) (celulases) a cada 2 dias, em um período total de 30 dias. A estabilidade enzimática foi avaliada frente às variações de pH e temperatura, e na presença de íons metálicos. Após a fermentação dos fungos, de modo geral, observou-se aumento no teor de proteínas e carboidratos disponíveis e, redução de lipídios e fibras, assim como sinais de degradação da fibra lignocelulósica, principalmente no resíduo à base de marupá após fermentação de *G. tropicum*. Sementes de açaí foi o substrato mais eficiente na indução da síntese enzimática. A maior atividade de carboximetilcelulases (CMCases) foi observada no 14º dia de fermentação de *G. tropicum* (2,37 U/g) e no 8º dia para *G. lucidum* (1,92 U/g), quando cultivados em açaí. Ao passo que em marupá, as atividades máximas de CMCases foram observadas no 12º dia de fermentação, tanto para *G. tropicum* (1,42 U/g), quanto para *G. lucidum* (0,48 U/g). Os picos de atividade de FPases (celulases totais), na fermentação em açaí, foram de 0,04 U/g para *G. tropicum* e 0,21 U/g para *G. lucidum*, enquanto em marupá, as máximas atividade foram de 0,09 U/g para *G. tropicum* e 0,15 U/g para *G. lucidum*. Quanto às lacases, as fermentações em açaí exibiram atividade máxima no 8º dia, com valores de 29 U/mL para *G. tropicum* e 128 U/mL para *G. lucidum*. Em contrapartida, no substrato à base de marupá, a atividade máxima de lacase observada no 8º dia de fermentação de *G. lucidum* (23 U/mL) e 16º dia para *G. tropicum* (7 U/mL). No substrato à base de açaí, as maiores concentrações de peroxidases totais foram observadas no 12º dia para *G. tropicum* (37 U/mL) e *G. lucidum* (78 U/mL), ao passo que em marupá, as atividades máximas foram verificadas no 16º dia de fermentação de *G. tropicum* (12 U/mL) e 8º dia para *G. lucidum* (25 U/mL). A temperatura ótima de atividade de CMCases variou entre 30, 50 e 60 °C, enquanto para FPases foi em torno de 30 e 70 °C. As lacases demonstraram maior estabilidade até uma temperatura média de 50 °C, em relação às celulases. CMCases obtidas da fermentação em serragem de marupá foram estáveis à íons, enquanto FPases foram fortemente inibidas. *G. tropicum* produziu ligninases mais estáveis à íons. As enzimas ligninolíticas foram estáveis em diferentes faixas de pH. No geral, ambos os resíduos foram bons indutores da síntese de enzimas lignocelulolíticas por *G. lucidum* e *G. tropicum*, com destaque para as sementes de açaí.

Palavras-chaves: Cogumelos medicinais; Hidrolases; Ligninases; Lignocelulose; Biomassa Vegetal.

SUMMARY

Ganoderma species are reported to produce lignocellulolytic enzymes. These enzymes have high added value and can be obtained through solid mushroom cultivation in lignocellulosic residues. In this sense, this work aimed to evaluate the production of lignocellulolytic enzymes produced by *Ganoderma lucidum* and *G. tropicum* in solid fermentation using açai seeds (*Euterpe* sp.) and marupá sawdust (*Simarouba amara* Aublet). The residues before and after the fermentation process were characterized in terms of proximate composition, macro and micronutrients, as well as structural changes. The enzymes were extracted in distilled water (ligninases) and in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) (cellulases) every 2 days, for a total period of 30 days. Enzyme stability was evaluated against variations in pH and temperature, and in the presence of metal ions. After the fermentation of the fungi, in general, there was an increase in the content of proteins and available carbohydrates and a reduction of lipids and fibers, as well as signs of degradation of lignocellulosic fiber, mainly in the marupá-based residue after fermentation of *G. tropicum*. Acai seeds were the most efficient substrate in inducing enzyme synthesis. The highest activity of carboxymethylcellulases (CMCases) was observed on the 14th day of fermentation for *G. tropicum* (2.37 U/g) and on the 8th day for *G. lucidum* (1.92 U/g), when cultivated in açai. While in marupá, the maximum activities of CMCases were observed on the 12th day of fermentation, both for *G. tropicum* (1.42 U/g) and for *G. lucidum* (0.48 U/g). The peaks of activity of FPases (total cellulases), in the fermentation in açai, were of 0.04 U/g for *G. tropicum* and 0.21 U/g for *G. lucidum*, while in marupá, the maximum activity was of 0.09 U/g for *G. tropicum* and 0.15 U/g for *G. lucidum*. As for laccases, fermentations in açai showed maximum activity on the 8th day, with values of 29 U/mL for *G. tropicum* and 128 U/mL for *G. lucidum*. In contrast, in the marupá-based substrate, the maximum laccase activity was observed on the 8th day of fermentation for *G. lucidum* (23 U/mL) and on the 16th day for *G. tropicum* (7 U/mL). In the açai-based substrate, the highest concentrations of total peroxidases were observed on the 12th day for *G. tropicum* (37 U/mL) and *G. lucidum* (78 U/mL), while in marupá, the maximum activities were verified on the 16th day of fermentation for *G. tropicum* (12 U/mL) and on the 8th day for *G. lucidum* (25 U/mL). The optimal temperature for CMCases activity ranged between 30, 50 and 60 °C, while for FPases it was around 30 and 70 °C. Laccases showed greater stability up to an average temperature of 50 °C, compared to cellulases. CMCases obtained from fermentation in marupá sawdust were stable to ions, while FPases were strongly inhibited. *G. tropicum* produced more ion-stable ligninases. Ligninolytic enzymes were stable in different pH ranges. In general, both residues were good inducers of the synthesis of lignocellulolytic enzymes by *G. lucidum* and *G. tropicum*, with emphasis on açai seeds.

Keywords: Medicinal mushrooms; hydrolases; Ligninases; Lignocellulose; Vegetable Biomass.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo de vida de um cogumelo.....	25
Figura 2 – Estrutura de um cogumelo	26
Figura 3 – Morfologia de <i>Ganoderma lucidum</i>	29
Figura 4 – Morfologia de <i>Ganoderma tropicum</i>	33
Figura 5 – Estrutura tridimensional da lignocelulose	38
Figura 6 – Polímero de celulose contendo monômeros de glicose ligados por β -1,4 ligações glicosídicas	38
Figura 7 – Celulose microcristalina e amorfa	39
Figura 8 – Estrutura química de diferentes açúcares hemicelulósicos e ácidos de açúcar	41
Figura 9 – Estrutura química dos três componentes básicos de lignina	42
Figura 10 – Produção total de cogumelos no mundo	45
Figura 11 – Basidioma de <i>Ganoderma lucidum</i>	47
Figura 12 – Representação esquemática do complexo de celulasas atuando na celulose amorfa e cristalina	48
Figura 13 – Ciclo catalítico lacase-mediador.....	53
Figura 14 – Ciclo catalítico de LiPs.....	54
Figura 15 – Ciclo catalítico de MnPs.....	55
Figura 16 – Micrografias do substrato inicial de marupá nas resoluções de 130x (A), 750x (B), 800x (C), 1300x (D), 1400x (E) e 2500x (F).....	92
Figura 17 – Micrografias do substrato inicial de açaí nas resoluções de 130x (A), 750x (B), 800x (C), 1300x (D), 1400x (E) e 2500x (F).....	93
Figura 18 – Micrografias do substrato à base de marupá após a fermentação de <i>G. lucidum</i> , nas resoluções de 130x (A), 750x (B), 800x (C), 1300x (D), 1400x (E) e 2500x (F)	94
Figura 19 – Micrografias do substrato à base de açaí após a fermentação de <i>G. lucidum</i> , nas resoluções de 130x (A), 750x (B), 800x (C), 1300x (D), 1400x (E) e 2500x (F).....	95
Figura 20 – Micrografias do substrato à base de marupá após a fermentação de <i>G. tropicum</i> , nas resoluções de 130x (A), 750x (B), 800x (C), 1300x (D), 1400x (E) e 2500x (F).....	

Figura 21 – Micrografias do substrato à base de açaí após a fermentação de <i>G. tropicum</i> , nas resoluções de 130x (A), 750x (B), 800x (C), 1300x (D), 1400x (E) e 2500x (F).....	97
Figura 22 – Atividade de endoglucanases (carboximetilcelulases - CMCase) durante a fermentação em estado sólido de <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> , em substratos à base de resíduos de açaí e marupá.....	104
Figura 23 – Atividade de celulases totais (FPase) durante a fermentação em estado sólido de <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> , em substratos à base de resíduos de açaí e marupá.....	108
Figura 24 – Atividade de lacase durante a fermentação em estado sólido de <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> , em substratos à base de resíduos de açaí e marupá.....	110
Figura 25 – Atividade de peroxidases totais durante fermentação sólida de <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> , em substratos à base de resíduos de açaí e marupá.....	112
Figura 26 – Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de CMCases produzidas por <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes temperaturas.....	115
Figura 27 – Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de FPases produzidas por <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes temperaturas.....	116
Figura 28 – Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de lacases produzidas por <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes temperaturas.....	117
Figura 29 – Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de peroxidases totais, produzidas por <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes temperaturas.....	119
Figura 30 – Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de CMCases, produzidas por <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes íons.....	121
Figura 31 – Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de FPases produzidas por <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes íons.....	122
Figura 32 – Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de lacases, produzidas por <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes íons.....	123

Figura 33 – Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de peroxidases totais produzidas por <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes íons.....	124
Figura 34 – Efeito de pH sobre a atividade enzimática dos picos de atividade máxima de CMCases, produzidas por <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes faixas de pH.....	126
Figura 35 – Efeito de pH sobre a atividade enzimática dos picos de atividade máxima de FPases, produzidas por <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes faixas de pH.....	127
Figura 36 – Efeito de pH sobre a atividade enzimática dos picos de atividade máxima de lacases, produzidas por <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes faixas de pH.....	128
Figura 37 – Efeito de pH sobre a atividade enzimática dos picos de atividade máxima de peroxidases totais, produzidas por <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes faixas de pH.....	130
Figura 38 – Análise de SDS-PAGE do extrato bruto dos picos de produções das enzimas lignocelulolíticas.....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análises físico-químicas dos substratos iniciais e após a fermentação de <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> , em resíduos de sementes de açaí e serragem de marupá.....	75
Tabela 2 – Composição lignocelulósica dos substratos iniciais e após a fermentação de <i>G. lucidum</i> e <i>G. tropicum</i> , em resíduos de sementes de açaí e serragem de marupá.....	84
Tabela 3 – Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) nos substratos iniciais e após a fermentação de <i>Ganoderma lucidum</i> e <i>Ganoderma tropicum</i>	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔAbs	absorbância	g	grama
μL	microlitro	GHs	glucanohidrolases
μm	micromolar	H₂O₂	peróxido de Hidrogênio
μmol	micromol	K	potássio
%FDAasa	percentual de fibras em detergente ácido com base na amostra seca ao ar	KDa	Quilodalton
%FDAm_s	percentual de fibras em detergente ácido com base na matéria seca	LiP	Lignina peroxidase
%FDN_{ms}	percentual de fibras em detergente neutro com base na matéria seca	mA	miliampere
(NH₄)₂SO₄	sulfato de amônio	MgSO₄	sulfato de magnésio
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis[3-etil-benzothiazolino-6-sulfonico]	Mg	magnésio
Al	alumínio	MJ/kg	megajoule por quilograma
ANOVA	análise de variância	meq.g de Cr₂O₇²⁻	Volume de dicromato pipetado x normalidade da solução de dicromato
ASA	massa da amostra seca ao ar	meq.g de Fe²⁺	Volume de sulfato ferroso gasto na titulação x normalidade determinada pela prova em branco
atm	unidade de pressão atmosférica	MEV	Microscopia eletrônica de varredura
B	boro	mM	milimolar
BDA	Ágar Batata Dextrose	min	minuto
B.O.D.	demanda bioquímica de oxigênio	mm	milímetro
C	carbono	MnP	Manganês peroxidase
C₆H₁₀O_{5n}	fórmula química da celulose	MnSO₄	sulfato de manganês
C₈₁H₉₂O₂₈	fórmula química da lignina	Mn	manganês

Ca	cálcio	Mo	molibdênio
CaCO₃	carbonato de cálcio	N	nitrogênio
CBHs	celobiohidrolases	NaOH	hidróxido de sódio
Cl	cloro	NH₃	amônia
CMC	carboximetilcelulose	Nha	amônio
CMCase	carboximetilcelulase (endoglucanase)	nm	nanômetro
C/N	relação carbono:nitrogênio	O	oxigênio
CO₂	dióxido de carbono	P	fósforo
CT	carboidratos totais	PVs	Peroxidases versáteis
Cu	cobre	RB21	Reactive Blue 21
Cr₂O₇²⁻	íon dicromato	rpm	rotações por minuto
CuSO₄	Sulfato de cobre	S	Enxofre
D.C.	depois de Cristo	SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS)
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico	Se	selênio
EDS	espectroscopia de raios X por energia dispersiva	Si	silício
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético	T	tempo de fermentação em dias
Fc	fator de correção do HCl	Tris-HCl	Tris Hidrochloride
fd	fator de diluição	U	umidade/unidade enzimática
Fe	ferro	U/mL	quantidade de enzima livre ou imobilizada necessária para oxidar 1 μM de substrato por minuto em 1 mL
FDA	Fibra em Detergente Ácido	U/g	quantidade de enzima livre ou imobilizada necessária para oxidar 1 μM de substrato por minuto em 1 g
FDN	Fibra em Detergente Neutro	v/v	volume/volume

FeIV(O) Ferro de alta valência
FeSO₄ sulfato de ferroso II
Fpase Filter Paper-ase (celulases totais)

Zn zinco
ZnSO₄ sulfato de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. REFERENCIAL TEÓRICO	24
4.1. Macrofungos	24
4.1.1. <i>Ganoderma</i> spp.	28
4.2. Resíduos lignocelulósicos.....	33
4.2.1. Açai (<i>Euterpe</i> sp.)	35
4.2.2. Marupá (<i>Simarouba amara</i> Aubl.).....	36
4.2.3. Composição química.....	37
4.2.3.1. Celulose.....	38
4.2.3.2. Hemicelulose.....	40
4.2.3.3. Lignina	41
4.2.3.4. Extrativos	43
4.2.3.5. Cinzas e minerais	44
4.3. Fermentação em estado sólido de cogumelos.....	44
4.4. Enzimas lignocelulolíticas	47
4.2.1. Celulases.....	47
4.2.1.1. Endoglucanases	48
4.2.1.2. Celobiohidrolases (exoglucanases)	49
4.2.1.3. β -glucosidases	49
4.2.2. Hemicelulases.....	50
4.2.2.1. Endoxilanases.....	50
4.2.2.2. Arabinases	50
4.2.2.3. Xilosidases	51
4.2.2.4. Esterases	51
4.2.2.5. Enzimas auxiliares.....	51
4.2.3. Ligninases.....	52
4.2.3.1. Lacases	52
4.2.3.2. Ligninas peroxidases.....	53

4.2.3.3.	Manganês peroxidases.....	54
4.2.3.4.	Peroxidases versáteis.....	55
4.2.3.5.	Peroxidases corante-descolorantes.....	56
4.2.4.	Aplicações biotecnológicas das enzimas lignocelulolíticas	56
5.	MATERIAL E MÉTODOS	60
5.1.	Material biológico.....	60
5.2.	Fermentação em estado sólido do cogumelo	60
5.2.1.	Matriz primária.....	60
5.2.2.	Matriz secundária	60
5.2.3.	“Semente” ou “spawn”	60
5.2.4.	Fermentação em estado sólido.....	61
5.3.	Análise bromatológica das amostras.....	61
5.4.1.	Determinação do pH.....	61
5.4.2.	Determinação da umidade.....	61
5.3.1.	Cinzas.....	62
5.3.2.	Lipídios	62
5.3.3.	Carbono	63
5.3.4.	Nitrogênio total.....	64
5.3.5.	Proteína bruta.....	65
5.3.6.	Fibras.....	65
5.3.7.	Carboidratos totais e disponíveis	67
5.3.8.	Determinação de Macro e Micro minerais.....	67
5.4.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	68
5.5.	Preparo do extrato enzimático	68
5.5.1.	Celulases.....	68
5.5.2.	Ligninases.....	68
5.6.	Determinação da atividade de celulases	69
5.6.1.	Endoglucanases (CMCases - carboximetilcelulases).....	69
5.6.2.	Celulases totais (FPase - Filter Paper-ase).....	69
5.6.3.	Quantificação de açúcares redutores.....	69
5.7.	Determinação da atividade de ligninases	70
5.7.1.	Lacase	70
5.7.2.	Peroxidases totais.....	71

5.8.	Estabilidade enzimática	71
5.8.1.	Estabilidade térmica	71
5.8.2.	Estabilidade das enzimas na presença de íons metálicos	72
5.8.3.	Estabilidade de pH das enzimas	72
5.9.	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	73
5.9.	Análise estatística	73
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
6.1.	Análise físico-química dos substratos iniciais e pós-fermentação.....	74
6.2.	Composição lignocelulósica dos resíduos	82
6.3.	Caracterização microscópica	90
6.4.	Atividades enzimáticas	103
6.4.1.	Endoglucanases (CMCase).....	103
6.4.2.	Celulases totais (FPase)	106
6.4.3.	Lacases.....	108
6.4.4.	Peroxidases totais	111
6.5.	Caracterização enzimática	114
6.5.1.	Caracterização térmica	114
6.5.2.	Caracterização das enzimas na presença de íons.....	120
6.5.3.	Caracterização das enzimas frente variações de pH.....	125
6.6.	Caracterização dos extratos enzimáticos quanto à massa molecular das proteínas .	131
7.	CONCLUSÃO	134
8.	REFERENCIAL TEÓRICO	135

1. INTRODUÇÃO

Macrofungos são organismos apreciados em todo mundo desde os tempos antigos, com relatos de cultivo desde 1700 a.C., sendo considerados um produto de alto valor agregado, contribuindo para o desenvolvimento da economia global e, devido a isso, espera-se que o valor total do mercado global exceda US\$ 75 bilhões até 2026 (RAMAN et al., 2018; ZION MARKET RESEARCH, 2018;). Essa valorização se dá pelo fato dos macromicetos serem relatados como excretadores eficientes de compostos bioativos com diversas aplicações biotecnológicas, como β -D-glucanos, polissacarídeos, glicoproteínas, lectinas e terpenóides, responsáveis pelos seus atributos antioxidantes, anti-inflamatórios, anticancerígenos, imunomodulatórios, antimicrobianos, hepatoprotetores, antidiabéticos e vitamínicos (BARSEGHYAN; BARAZANI; SÁNCHEZ, 2017; RAI et al., 2021; STOJKOVIC et al., 2019; WASSER, 2016).

Espécies do gênero *Ganoderma*, em especial *G. lucidum*, também conhecida como Cogumelo Rei ou Reishi, destaca-se como o macrofungo medicinal mais conhecido e mais estudado, devido aos seus benefícios de promoção à saúde (BABY; JOHNSON; GOVINDAN, 2015; REN; ZHANG; ZHANG, 2021). Esse fungo vem sendo utilizado na medicina tradicional chinesa há mais de 2000 mil anos, denominado como cogumelo da imortalidade (CÖR; KNEZ; HRNČIČ, 2018), com relatos de mais de 400 metabólitos secundários bioativos produzidos por essa espécie, como polifenóis, ácidos lucidênicos e ganodéricos, polissacarídeos, dentre outras moléculas (AHMAD, 2018; LOYD et al., 2018). *G. tropicum* é outra espécie do gênero *Ganoderma* com potencial biotecnológico, com distribuição limitada aos trópicos, no entanto, há poucos relatos na literatura acerca desse fungo, sendo necessários estudos que visem a elucidação de sua composição química (CAO; WU; DAI, 2012).

Outra característica importante das espécies de *Ganoderma* é o fato de serem organismos saprófitos, assim como a maioria dos cogumelos, obtendo energia da matéria orgânica em decomposição, principalmente a partir da degradação da lignocelulose, por meio da secreção de enzimas lignocelulolíticas, exercendo um papel importante no ciclo do carbono (BILAL et al., 2017, ZHOU et al., 2018). Assim, devido a essa capacidade, esses organismos podem se desenvolver sob uma gama de resíduos agroindustriais (CHEN et al., 2021; SALES-CAMPOS et al., 2021; SALOMÃO et al., 2019).

Os resíduos vegetais são compostos, majoritariamente, de minerais e fibras lignocelulósicas (90%), constituídas de celulose (35-55%), hemicelulose (20-40%) e lignina

(10-25%) (OKOLIE et al., 2021). A celulose é um polímero linear formado por subunidades de D-glicoses unidas por ligações β -1,4 glicosídicas, originando microfibrilas de até 12.000 nanômetros (NANDA et al., 2015). Ao passo que, a hemicelulose é composta por uma mistura de polissacarídeos, pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos de açúcar (ácido glicurônico e galacturônico) e grupos acetila (OKOLIE et al., 2021). A lignina é um polímero altamente ramificado organizado em unidades manoméricas de fenilpropano (álcool p-cumarílico, coniferílico e álcool sinapílico) unidas por ligações fosfodiésteres (CHEN, 2014; REINOSO et al., 2018).

A biomassa lignocelulósica consiste em pelo menos 33% dos resíduos sólidos gerados anualmente em todo o globo e grande parte desse material é descartado por meio da queima, prática extremamente danosa ao meio ambiente, pois contribui para a emissão de gases do efeito estufa, sendo necessário o estudo de destinos adequados a estes resíduos (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2016; USMANI et al., 2021). Uma das abordagens apropriadas para este propósito é a fermentação em estado sólido, que consiste no crescimento de microrganismos em substratos sólidos em condições mínimas de água livre, permitindo utilizar o potencial dos resíduos lignocelulósicos, uma vez que podem apresentar concentrações significativas de carboidratos solúveis e indutores da síntese enzimática (SINGHANIA et al. 2009). Prática essa que vem se demonstrando promissora, tanto no que diz respeito à qualidade de produção do cogumelo, quanto na possível redução de impactos ambientais ocasionados pelo descarte desses resíduos na natureza (CHEN et al., 2021; SALES-CAMPOS et al., 2021; SALOMÃO et al., 2019).

O sucesso dos cogumelos na degradação da lignocelulose se dá pelo fato de possuírem um complexo lignocelulolítico completo, excretado pelas suas hifas vegetativas no substrato de crescimento (SAINI; SHARMA, 2021). As enzimas lignocelulolíticas podem ser divididas em hidrolíticas e oxidativas, sendo as hidrolases responsáveis pela degradação dos polímeros de celulose e hemicelulose e, o sistema oxidativo, encontrado principalmente em fungos da podridão branca, pela degradação da lignina (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

As celulasas rompem as ligações β -1,4 glicosídicas da celulose, liberando monômeros de glicose. Para isso, três enzimas agem em conjunto: endoglucanases, responsáveis por quebrar as ligações internas da celulose, gerando celo-oligossacarídeos, as exoglucanases atuam nas extremidades dos celo-oligossacarídeos originando celobiose e as β -glucosidases que hidrolisam as ligações 1,4, β -1,3 e β -1 de resíduos de celobiose, liberando subunidades de glicose (MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ

et al., 2020). As hemicelulases, por sua vez, compreendem um complexo de enzimas hidrolíticas degradadoras da hemicelulose, onde participam endoxilanasas que hidrolisam o polissacarídeo xilana e liberam xilooligossacarídeos e xilobiose, estes, por sua vez, serão fragmentados pelas xilosidases, liberando xilose (BROEKER et al., 2018; KUBICEK, 2012).

A degradação da lignina pelos macrofungos, de modo geral, envolve a participação de três enzimas oxidativas: a lignina peroxidase, a qual possui ferro no seu grupo prostético e necessita de H_2O_2 como cofator para a sua atividade catalítica (DE GONZALO et al., 2016). A manganês peroxidase, dependente de H_2O_2 , apresentando ciclo catalítico semelhante ao da lignina peroxidase, porém, necessita de Mn^{2+} para a oxidação do substrato (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020) e lacase, que contém cobre no seu sítio ativo, reduzindo O_2 a H_2O , sem a necessidade de H_2O_2 (HOEGGER et al., 2006).

As enzimas lignocelulolíticas representam 20% das enzimas comercializadas mundialmente (TOUSHIK et al., 2017) e possuem diversas aplicações industriais como no pré-tratamento de ração animal (AKINTUNDE et al., 2011), clarificação de sucos, vinhos e cervejas (AMIN et al., 2020), produção de compostos aromáticos para a indústria alimentícia (SOCCOL et al., 2017), remoção de poluentes orgânicos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) (KIM, 2019), produção de combustíveis de segunda geração (ZHANG et al., 2020), branqueamento da polpa de celulose (KUHAD et al., 2016), tratamento de tecidos na indústria têxtil (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020), dentre outras aplicações.

No entanto, a aplicação dessas enzimas na indústria requer quantidades significativas a baixo custo (KACHLISHVILI et al., 2012). A fermentação em estado sólido é uma prática vantajosa para obtenção dessas enzimas, além da menor presença de água inibir o crescimento de alguns contaminantes, somado a isso, as enzimas produzidas por esse processo possuem maior estabilidade térmica e de pH (MANDAL, 2015; SOCCOL et al., 2017). Assim, estudos envolvendo a fermentação em estado sólido de cogumelos a partir de resíduos agroindustriais tornam-se pertinentes, tanto do ponto de vista do reaproveitamento desses resíduos, como na redução de possíveis impactos ambientais gerados pelo descarte desses materiais, bem como proporcionam informações acerca das condições otimizadas de fermentação.

2. JUSTIFICATIVA

Os macrofungos são relatados como organismos produtores de diversos metabólitos bioativos, de promoção à saúde e bem-estar, além de serem utilizados em processos biotecnológicos diversos, devido a isso, esses fungos movimentam a economia global. Espécies do gênero *Ganoderma* são as mais amplamente estudadas e utilizadas dentre os cogumelos medicinais, produtoras de mais de 400 substâncias com propriedades benéficas ao homem, no entanto, seu uso é, principalmente, voltado para fins medicinais, sendo necessárias pesquisas que explorem a produção de moléculas para utilização em processos industriais.

Uma abordagem adequada para esse fim é o estudo da produção de enzimas lignocelulolíticas por esse microrganismo, visto que, assim como a grande maioria dos basidiomicetos, *Ganoderma* spp. são considerados organismos saprófitos, enquadrados como fungos da podridão branca, caracterizados por se alimentarem de matéria orgânica lignocelulósica em decomposição. O sucesso dessas espécies na degradação da lignocelulose se dá ao fato de possuírem um sofisticado complexo enzimático capaz de hidrolisar e oxidar a biomassa vegetal, liberando açúcares que podem ser utilizados como nutrientes para o desenvolvimento fúngico.

As enzimas envolvidas na decomposição da lignocelulose são compostos de alto valor agregado, possuindo diversas aplicações industriais, como nos setores têxteis, alimentícios, de biocombustíveis, cosméticos, de biorremediação, dentre outros. No entanto, a aplicação desses catalisadores na indústria requer a produção em grandes quantidades e a baixo custo, e uma forma de atender essa demanda é a fermentação em estado sólido, usando como substrato de fermentação os resíduos agroindustriais e madeireiros. Essa prática reduz os impactos ambientais que esses resíduos causariam se fossem descartados na natureza, os quais fornecem matéria-prima acessível, de baixo valor e com indutores enzimáticos eficientes, devido à natureza lignocelulósica do substrato. Somado a isso, enzimas obtidas por esse processo possuem maior estabilidade térmica e de pH.

Nesse sentido, pesquisas envolvendo a viabilidade de produção enzimática por cogumelos utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substratos nas fermentações em estado sólido são necessárias, sendo essa etapa primordial para uma futura aplicação dessas enzimas na indústria, por meio do estabelecimento das condições fermentativas adequadas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a produção de enzimas lignocelulolíticas (endo e exoglucanases, lacase e peroxidases totais) produzidas por *Ganoderma lucidum* e *Ganoderma tropicum*, utilizando resíduo de sementes de açaí (*Euterpe* sp.) e serragem de marupá (*Simarouba amara* Aubl.) como substrato de fermentação, visando a obtenção de enzimas de baixo custo por meio da agregação de valor aos resíduos lignocelulósicos, bem como demonstrar as modificações nesses substratos em decorrência do crescimento fúngico, de modo a gerar uma biomassa vegetal com possíveis aplicações na indústria de biorrefinaria.

3.2. Objetivos específicos

- Inferir acerca das alterações físico-químicas e de composição centesimal induzidas pela fermentação de *Ganoderma lucidum* e *Ganoderma tropicum* nos substratos à base de resíduos de sementes de açaí e serragem de marupá;
- Investigar a biodegradação dos resíduos ocasionada pela fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum* através da análise morfológica por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a viabilidade do resíduo de sementes de açaí e serragem de marupá como substratos de fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum*, visando a indução de síntese de enzimas lignocelulolíticas (endoglucanases-CMCase, celulases totais-FPase, lacases e peroxidases totais);
- Estabelecer as condições ótimas de atividade enzimática (temperatura, pH e presença de íons) nos extratos enzimáticos provenientes da fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum*;
- Caracterizar os extratos enzimáticos quanto à massa molecular das proteínas.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. Macrofungos

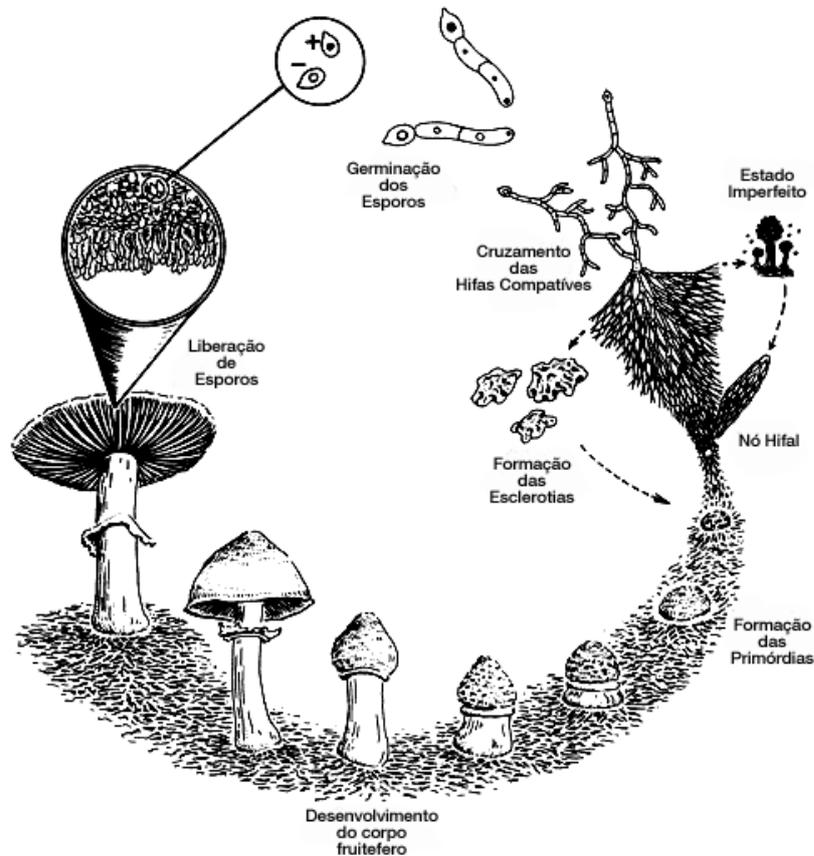
O termo macromiceto é utilizado para denominar macrofungos que são grandes o suficiente para serem observados à vista desarmada, pertencentes ao Filo Basidiomycota e Ascomycota, podendo ser epígeo (cresce na superfície do solo) ou hipógeo (cresce subterraneamente) (MILES; CHANG, 2004). Há cerca de 16,000 espécies de cogumelos registradas e, dessas, 7,000 apresentam algum grau de comestibilidade, sendo que 3,000 espécies são cogumelos comestíveis primários, e cerca de 700 são considerados medicinais (CHANG; WASSER, 2017; HAWKSWORTH, 2012; LI et al., 2021).

O desenvolvimento de cogumelos pode ser dividido em três fases, de acordo com seu ciclo de vida: esporo, micélio e basidioma (Figura 1). A primeira etapa do desenvolvimento de um macrofungo é a germinação dos esporos, que ocorre em condições adequadas de temperatura, umidade e nutrientes, dando origem a uma estrutura filamentososa denominada de micélio primário (haploide). Este micélio primário irá se ramificar, podendo fundir-se com outro micélio compatível, ocorrendo um fenômeno denominado de plasmogamia (fusão de células), gerando micélios secundários (diploides), que são células binucleadas. Até esta etapa do desenvolvimento fúngico, há a formação do micélio vegetativo, que se desenvolve no interior do substrato, sendo responsável pela absorção de nutrientes e sustentação do basidioma (MILES; CHANG, 2004; SÁNCHEZ, 2017).

Os micélios secundários darão origem ao basidioma, onde a partir desse, na região do himênio, irá ocorrer a formação de basídios, responsáveis por gerar novos esporos, por meio da fusão e recombinação de núcleos, fechando o ciclo reprodutivo desses organismos (MILES; CHANG, 2004; SOCCOL et al., 2016). Adicionalmente, o crescimento micelial está associado, principalmente, à liberação de enzimas hidrolíticas sobre o substrato ao qual esses fungos irão degradar, cabendo às hifas absorverem os nutrientes provenientes do ataque enzimático (SÁNCHEZ, 2017).

Os fungos pertencentes ao filo Basidiomycota podem possuir a morfologia típica de um cogumelo e representam a maior parte das espécies de macrofungos já registrados (Figura 2). Morfologicamente, um cogumelo é estruturado em píleo (ou chapéu), que se encontra apoiado sobre um estipe. Na superfície inferior do píleo se encontram as lamelas (estruturas radiadas revestidas pelo himênio), recobertas por basídios, responsáveis por produzir e sustentar os esporos (basidiósporos) até a maturação e liberação no ambiente (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; HUFFMAN et al., 2008).

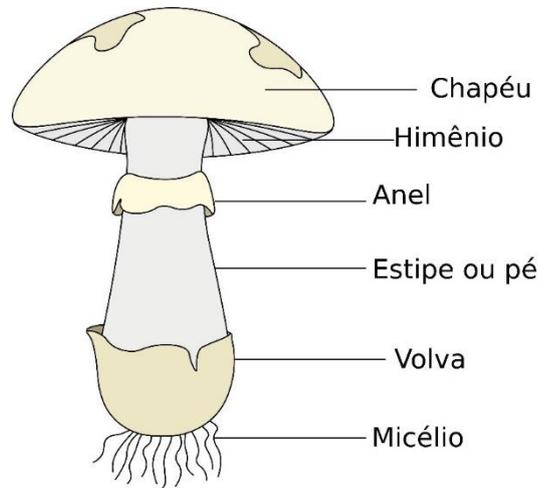
Figura 1. Ciclo de vida de um cogumelo



Fonte: TEONANACATL. **Ciclo de vida de cogumelo.** Disponível em: (<https://teonanacatl.org/biblioteca/ciclo-de-vida-dos-cogumelos-parte-2.3/>). Acesso em: 07/06/2021.

Basidiomicetos imaturos apresentam um tecido membranoso denominado de véu universal, que recobre de forma íntegra o basidioma. Ao longo do desenvolvimento fúngico, resquícios dessa membrana podem ser encontrados na base do cogumelo, formando uma estrutura em formato de “copo”, intitulada de volva. Um véu parcial também pode ser encontrado em alguns fungos, a partir da superfície da estipe até a extremidade do chapéu, sendo responsável por proteger o desenvolvimento do himênio, que após a sua desintegração, o remanescente é chamado de anel (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; MILES; CHANG, 2004).

Figura 2. Estrutura de um cogumelo



SHUTTERSTOCK. **Structure of mushroom.** Disponível em:
(<https://www.shutterstock.com/pt/imagevector/structure-mushroom-1109091593?studio=1>). Acesso em: 07.06.2021

Do ponto de vista ecológico, os cogumelos podem ser divididos em micorrízicos, parasitas e saprótrofos. Os macrofungos micorrízicos, como *Tuber melanosporum*, possuem uma relação de mutualismo com a vegetação a qual estão associados, recebendo grandes quantidades de carbono e garantindo à planta maior aporte de nutrientes. Há macrofungos parasitas, os quais vivem à custa de outro organismo, obtendo-lhe alimento para seu desenvolvimento e lhe causando danos, como é o caso *Ophiocordyceps unilateralis*, que cresce em formigas, induzindo comportamentos erráticos e a morte (MONGKOLSAMRIT et al., 2012; SÁNCHEZ, 2017).

A grande maioria dos cogumelos é saprótrofa, ou seja, obtém energia por meio da absorção de substâncias provenientes da matéria orgânica em estado de decomposição, principalmente compostos lignocelulósicos, sendo os basidiomicetos considerados os mais eficientes na conversão desse tipo de material, desempenhando um papel importante no ciclo do carbono (SÁNCHEZ, 2017; VASIL'CHENKO; BOLOBOVA; VASIL'CHENKO, 2004).

O sucesso desses fungos na degradação da lignocelulose se dá ao fato de possuírem um sofisticado complexo enzimático, excretado pelas hifas vegetativas no substrato de crescimento do fungo. As enzimas lignocelulolíticas podem ser divididas em hidrolíticas e oxidativas, sendo as hidrolases responsáveis pela degradação dos polissacarídeos celulose e hemicelulose, já o sistema oxidativo, encontrado somente em fungos de podridão branca, degrada a lignina. Devido à baixa especificidade das enzimas ligninolíticas (degradantes da

lignina) ao substrato, esses fungos podem ser aplicados na decomposição de poluentes ambientais persistentes, como compostos aromáticos clorados, hidrocarbonetos aromáticos heterocíclicos, vários corantes e polímeros sintéticos (SÁNCHEZ, 2009; ZHUO; FAN, 2021).

Além disso, os cogumelos são relatados como excretores eficientes de substâncias bioativas com diversas aplicações biotecnológicas, como β -D-glucanos, polissacarídeos, glicoproteínas, lectinas e terpenóides, responsáveis pelos seus atributos antioxidativos, anti-inflamatórios, anticancerígenos, imunomodulatórios, antimicrobianos, hepatoprotetores, antidiabéticos e vitamínicos (BARSEGHYAN; BARAZANI; WASSER, 2016; RAI et al., 2021; SÁNCHEZ, 2017; STOJKOVIC et al., 2019). Por isso, esses organismos vêm sendo usados como medicamento há mais de 5.000 anos (DUGGER; DICKSON, 2017; RAI et al., 2021; TAN et al., 2018).

Quanto às propriedades físico-químicas e funcionais, os cogumelos podem, ainda, ser categorizados em três grandes grupos, de acordo com a indústria de produção desses organismos: comestíveis (54%), medicinais (38%) e selvagens (8%) (ROYSE; BAARS; TAN, 2017). Os basidiomicetos comestíveis mais cultivados em todo o mundo são *Agaricus bisporus* (champignon), *Velutipes flammulina* (cogumelo enoki), *Lentinula edodes* (cogumelo shiitake) e *Pleurotus* spp. (ABDULLAH, 2019; FEENEY et al., 2014; SAMSUDIN; VALVERDE; HERNÁNDEZ-PÉREZ; PAREDES-LÓPEZ, 2017). Esses macromicetos são uma fonte valiosa de proteínas, aminoácidos essenciais, fibras alimentares, vitaminas (B₁, B₂, B₁₂, C e D) e minerais (cálcio [Ca], potássio [K], magnésio [Mg], sódio [Na], fósforo [P], cobre [Cu], ferro [Fe], manganês [Mn] e selênio [Se]), principalmente quando são ingeridos à fresco. Somado a isso, apresentam entre 20-45% de proteína (massa seca), baixos teores de lipídios e sódio, além de apresentarem todos os nove aminoácidos essenciais (KRITTANAWONG et al., 2021; THATOI; SINGDEVSACHAN, 2014).

Devido aos diversos benefícios relatados em cogumelos, esses organismos vêm sendo apreciados desde os tempos antigos, com relatos de cultivo desde 1.700 a.C., sendo um produto de valor agregado que contribui de forma significativa para o desenvolvimento da economia global (CHANG; WASSER S., 2017). No ano de 2013, a produção mundial total de cogumelos comestíveis e medicinais foi estimada em mais de 64 bilhões de toneladas, movimentando cerca de 34 bilhões de dólares (ROYSE; BAARS; TAN, 2017). Devido à crescente demanda por cogumelos, espera-se que o valor total do mercado global exceda US\$ 50 bilhões nos próximos anos (RAMAN et al., 2018), com estimativas de que o valor de

mercado mundial dos cogumelos comestíveis deva atingir US\$ 62,19 bilhões até 2023, crescendo cerca de 9,2% (NIEGO et al., 2021).

4.1.1. *Ganoderma* spp.

O gênero *Ganoderma* é o maior gênero da família Ganodermataceae Donk (Polyporales, Basidiomycota), primeiramente estabelecido por Karsten em 1881 (KARSTEN, 1881), onde só foi incluída, inicialmente, uma única espécie (*Ganoderma lucidum*), no entanto, há registros de uso desse fungo na medicina tradicional chinesa para promoção da saúde e longevidade há mais de dois milênios (PATERSON, 2006; YUN, 1999). Atualmente, existem mais de 100 espécies de *Ganoderma* registradas no mundo, entre as quais, 70 estão distribuídas na China, Japão e Península Coreana (MA et al., 2014). No entanto, espécies de *Ganoderma* são consideradas cosmopolitas, sendo mais frequentemente distribuídas em regiões temperadas e tropicais (CAO; YUAN, 2013).

Os produtos oriundos desse gênero ganharam notoriedades na última década na Europa, Malásia, América do Norte e Cingapura. Contudo, China, Japão e Coreia são os principais produtores e exportadores de *Ganoderma* e dos produtos à base desse fungo (CHANG; MILLS 2004). Só no Japão, em 1995, foi estimada a produção de 500 milhões de toneladas de *Ganoderma*, ao passo que, na China, em 1997 a produção chegou a 4,300 milhões de toneladas. O mercado mundial total de produtos oriundos de *Ganoderma* foi de 1,628 milhões dólares americanos em 1995 (CHANG; BUSWELL, 1999). Entre 2002 e 2003 a China produziu cerca de 49,200 milhões de toneladas.

Espécies de *Ganoderma* são consideradas causadoras da podridão branca, pois se alimentam decompondo materiais vegetais e, devido à esta característica, crescem sobre a superfície de diversas árvores, como palmeiras, seringueiras, pessegueiros, causando danos econômicos à produção dessas plantas, no entanto, exercem papel fundamental na ciclagem de carbono (ARIFFIN; IDRIS; SINGH, 2000; PAULA; BRIOSO, 2021).

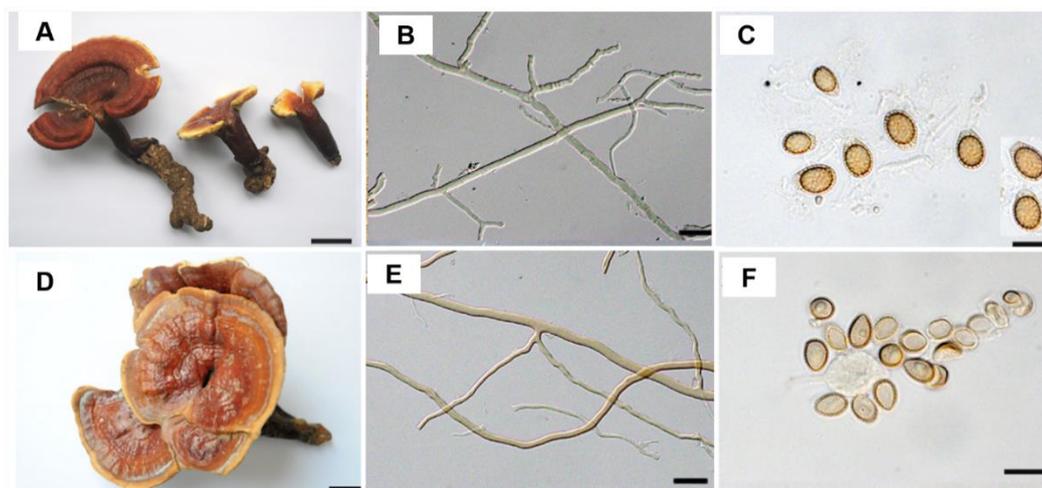
As espécies desse gênero apresentam basidioma que cresce em forma de leque sobre troncos de árvores vivas ou mortas, possuem a superfície com um brilho marrom, o basidiocarpo pode ser sustentado por estipe ou não, o píleo e a estipe apresentam aspecto lacado. Os basidiósporos são coloridos, ovoides, com ápice truncado, além disso, apresentam parede dupla, onde a parede interna é ornamentada, espessa e colorida e, a parede externa é lisa, fina e hialina (RYVARDEN, 2004; SHIN et al., 1986).

As propriedades químicas e farmacológicas de mais de 20 espécies de *Ganoderma* foram estudadas em todo mundo, incluindo *Ganoderma lucidum*, o mais pesquisado, assim

como *Ganoderma artum* e *Ganoderma tsugae* (CAO et al., 2018). Segundo pesquisas, esses organismos apresentam diversos efeitos benéficos, como antienvhecimento (WANG et al., 2017a), antitumoral (WANG et al., 2020), combate à neurastenia (TANG et al., 2005), antidiabético (RYU et al., 2020), combate à insuficiência cardíaca (ADEYI et al., 2021), combate à hepatite (LIU et al., 2017), dentre outras atividades. Como princípios ativos as espécies de *Ganoderma* apresentam polissacarídeos, triterpenóides, ácidos ganodéricos, alcalóides, ácidos graxos, germânio orgânico, ergosterol etc. (SHARMA et al., 2019a).

A espécie *Ganoderma lucidum*, também conhecida como Cogumelo Rei ou Reishi, tem sido utilizada como organismo modelo de *Ganoderma* spp., sendo a mais estudada devido aos seus diversos benefícios biotecnológicos (BABY; JOHNSON; GOVINDAN, 2015; REN; ZHANG; ZHANG, 2021), além disso, é o cogumelo medicinal mais conhecido (RIOS et al., 2012; SANODIYA et al., 2009). Taxonomicamente, esse fungo pertencente ao filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, ordem Polyporales, família Ganodermataceae e gênero *Ganoderma* (SIWULSKI et al., 2015). Também pode ser chamado como 'Lingzhi' em chinês, 'Reishi' em japonês e 'Yeongji' em coreano, podendo ocorrer em várias cores e formas (BABY; JOHNSON; GOVINDAN, 2015). Por ser um basidiomiceto, apresenta um ciclo de vida característico, com a formação de basidioma, esporos, hifas e micélio (Figura 3).

Figura 3. Morfologia de *Ganoderma lucidum*



(A) e (D): Basidioma, escala de 2 cm; (B) e (E): Hifas, barra de 20 µm; (C) e (F): Esporos, barra de 10 µm

Fonte: Wang et al. (2012)

O píleo apresenta diâmetro que varia de 30 a 250 mm e 0,5 a 3 cm de espessura, possui forma plana, arredondada, em formato de rim, com margens finas, que podem ser

curvadas para dentro, a superfície aparenta ser envernizada e rugosa, com cores amarelo-marrom ou amarelo-vermelho quando são jovens, tornando-se mais escuros com a idade. O estipe é brilhante, torcido irregularmente, com uma faixa de tamanho de 10 a 120 mm e assume a mesma cor do píleo ou mais escuro. Seus esporos são marrons e medem cerca de 6 a 10 μm , ovoides, duplamente recobertos, truncados em uma das extremidades com episporo macio e endósporo rígido. Seu micélio, quando cultivado em meio de cultura, é esbranquiçado, com aspecto algodinoso. Devido ao fato de seu basidioma possuir textura dura, lenhosa e espessa, não são enquadrados como comestíveis (JONG; BIRMINGHAM, 1992; SIWULSKI et al., 2015; SHARMA et al., 2019b).

Ganoderma lucidum vem sendo usado na medicina tradicional chinesa há mais de 2.000 mil anos, sendo conhecido como cogumelo da imortalidade, devido às suas propriedades biotecnológicas bem relatadas (CAI; LI; PEI, 2017; CÖR; KNEZ; HRNČIČ, 2018; LI et al., 2016). Estudos fitoquímicos evidenciam mais de 400 metabólitos secundários bioativos, com atividades comprovadas para a promoção da saúde e longevidade (AHMAD, 2018; LOYD et al., 2018). Dentre as substâncias isoladas, destacam-se polissacarídeos, incluindo β -d-glucanos, α -d-glucanos, α -d-mananas, ou polissacarídeos complexados com proteínas (CAI et al., 2021; REN; ZHANG; ZHANG, 2021), polifenóis e triterpenóides como meroterpenóides, ácidos lucidênicos e ácidos ganodéricos (GHAJARI; NABIUNI; AMINI, 2021).

Devido à presença desses compostos bioativos, que podem ser obtidos do basidioma, micélio e esporos, as espécies de *G. lucidum* são pesquisadas em diversos ensaios pré-clínicos para aplicações terapêuticas, como antioxidantes (RYU et al., 2020; ADEYI et al., 2021), anticancerígenos e antitumorais (BARBIERI et al., 2017; OPATTOVA et al., 2019; SHI et al., 2021), imunomodulador (ISHIMOTO et al., 2017), antiartríticos (PAN et al., 2017), hipoglicêmico (HUANG et al., 2021; LIU et al., 2019; YANG et al., 2018), cardioprotetor (SHAHER et al., 2020; VEENA; AJITH; JANARDHANAN, 2018; ZENG et al., 2018), anti-inflamatório (WU et al., 2019; SU et al., 2020), carcinostático (HEAH et al., 2020), antiangiogênico (CHEN et al., 2017; EL-KHASHAB, 2021), antiosteoporótico (YANG; FU; YANG, 2020), antinociceptivo (CHEN et al., 2020), pró-apoptótico (GILL; KUMAR, 2016; WANG et al., 2018), antialérgico (BHARDWAJ; KATYAL; SHARMA, 2014), antiviral (AKBAR; YAM, 2011; BHARADWAJ et al., 2019), antifúngico (NAVEENKUMAR et al., 2018), antibacteriano (LU et al., 2020), antiandrogênico (LIU et al., 2009), combate à

infertilidade masculina (GHAJARI; NABIUNI; AMINI, 2021), dentre outras atividades benéficas.

Outra característica fundamental de *G. lucidum*, que lhe confere mais possibilidades de aplicações biotecnológicas, é o fato de ser considerado um fungo da podridão branca, ou seja, possui a notável capacidade de degradar a lignina, ou substâncias semelhantes, dando uma aparência esbranquiçada aos materiais lignocelulósicos (BILAL et al., 2017). Fungos pertencentes à esta classificação são capazes de degradar tanto a lignina, quanto a celulose e hemicelulose que constituem a biomassa vegetal, por meio da produção sinérgica de enzimas lignocelulolíticas (SÁNCHEZ, 2009). Análises de genômica, transcriptômica e secretoma relataram que as espécies de *G. lucidum* possuem um eficiente aparato molecular e proteico para secreção de enzimas lignocelulolíticas (JAIN et al., 2020; MANAVALAN et al., 2012; ZHOU et al., 2018).

Zhou et al. (2018) observaram que *G. lucidum* quando cultivado em resíduos lignocelulósicos (uma mistura de resíduos de bordo, castanha e amora), suplementados com farelo de trigo e milho, sacarose e CaCO₃, excretavam em abundância enzimas degradadoras de lignina, principalmente durante o crescimento micelial, tal resultado foi associado à expressão de genes codificadores de enzimas ligninolíticas, em destaque à lacase, onde, após a quebra da lignina, houve um aumento gradual da hidrólise de celulose e hemicelulose, à medida que o basidioma se desenvolvia.

Manavalan et al. (2012) ao realizarem análise de secretoma das proteínas excretadas por *G. lucidum* cultivado em substrato sólido de bagaço de cana-de-açúcar, constataram a expressão de diversas enzimas lignocelulolíticas, incluindo celulasas (exo e endoglucanases, celobiase), hemicelulasas (alfa-manosidase e endoxilanase), manganês peroxidases, lignina peroxidases e lacases, fazendo desse fungo um potencial candidato para a produção de enzimas decompositoras da lignocelulose, liberando açúcares fermentáveis para a produção de biocombustíveis.

Jain et al. (2020) ao realizarem um estudo transcriptômico, genômico e proteômico de *G. lucidum*, constataram que esse organismo possui um arsenal de enzimas degradadoras da parede celular vegetal, como as oxirredutases, lacases, xilanases, celulasas, etc, responsáveis por auxiliar o fungo na sobrevivência e colonização do substrato nas mais diversas condições ambientais. Asgher, Sharif e Bhatti (2010) efetuaram o cultivo sólido de *G. lucidum* em diferentes resíduos agroindustriais (palha de trigo, palha de arroz, casca de banana, bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e espigas de milho), com o intuito de avaliar qual o melhor

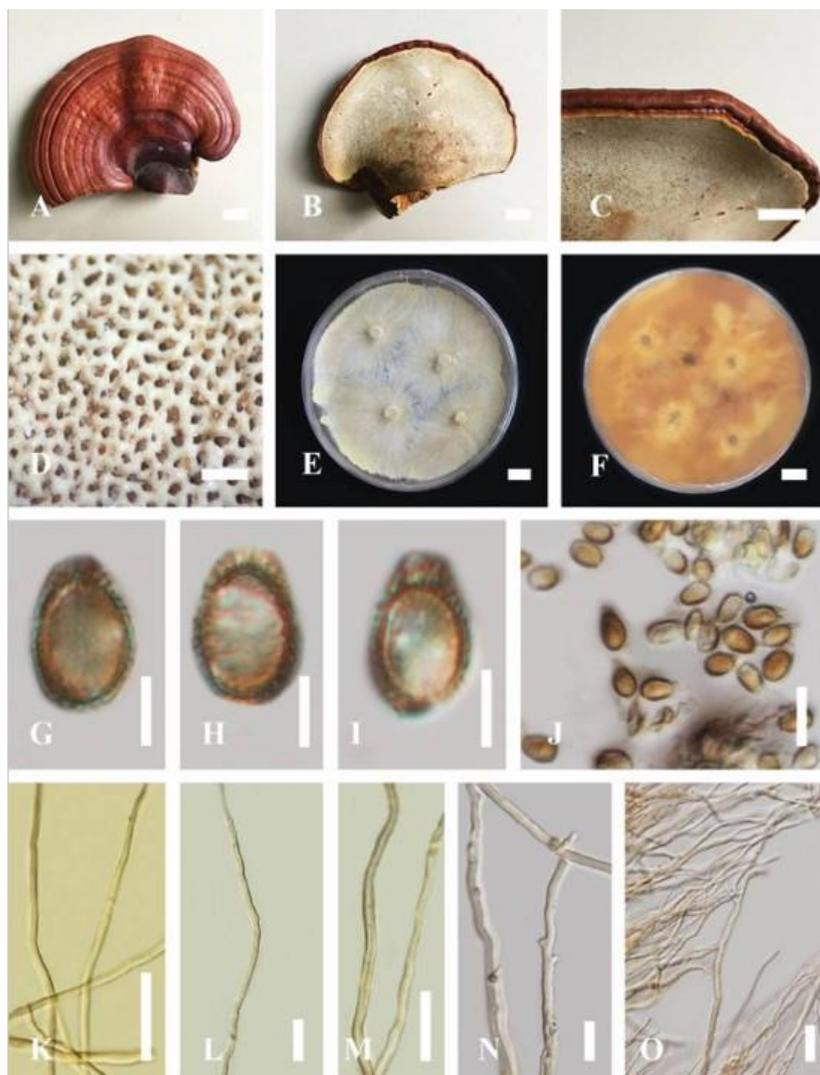
resíduo na indução enzimática e, concluíram que os cogumelos produzidos em palha de arroz foram os que mais sintetizaram ligninases. Postemsky et al. (2017) ao pesquisarem a capacidade de *G. lucidum* em produzir lacases sob fermentação em estado sólido, tendo como substrato palha de arroz ou trigo e cascas de sementes de girassol, constataram alta produção enzimática ($10,927 \text{ U kg}^{-1}$), principalmente do décimo dia de fermentação, em palha de arroz.

O complexo lignocelulolítico de *G. lucidum*, com destaque para as ligninases, também apresentam potenciais para aplicação nas áreas de biorremediação. Wang et al. (2021) demonstraram que uma lacase isolada do cogumelo Reishi apresentou promissora atividade degradante de alquilfenóis, poluentes de grande importância ambiental, pois são amplamente utilizados nas indústrias de fabricação de plástico e síntese de surfactantes não-iônicos.

G. tropicum é outra espécie do gênero *Ganoderma* com potencial biotecnológico, no entanto, há poucos relatos na literatura acerca desse fungo. A distribuição de *G. tropicum* é limitada aos trópicos (CAO; WU; DAI, 2012), possui características fenotípicas semelhantes com as de *G. lucidum*, com píleo dimidiado semicircular marrom escuro na base e ligeiramente marrom avermelhado no centro, e margens amareladas (LUANGHARN et al., 2019) (Figura 4).

G. tropicum foi relatado por possuir compostos fenólicos, ganodermatropinas A (1) e B (2) com atividade antimicrobiana (HU et al., 2013). Esse organismo também possui a capacidade de excreção de polissacarídeos com potencial para aplicações biotecnológicas (WU et al., 2013). Outros estudos acerca de *G. tropicum* realizaram o isolamento de novos compostos bioativos produzidos por essa espécie, como triterpenos lanostanoides (NGUYEN et al., 2020; ZHANG et al., 2015), nortriterpenóide (HU et al., 2014) e triterpenos tirucalanos (MA et al., 2016). Apesar de poucos registros na literatura acerca da atividade lignocelulolítica de *G. tropicum*, Saptarini e Hadisoebroto (2017) identificaram a capacidade dessa espécie em excretar endoglucanases, com atividade máxima em torno de 0,1 IU/mL.

Figura 4. Morfologia de *Ganoderma tropicum*



(A) e (B) Basidiocarpos maduros; (C) Margem; (D) Características dos poros; (E) e (F) Cultura após incubação a 25 °C por 21 dias; (G) - (J) Basidiósporos em KOH; (K) - (O) Hifas generativas. Barras de escala: 1 cm (A-C); 500 µm (D); 1 cm (E, F); 5 µm (G-I); 15 µm (J); 20 µm (K, L, O); 10 µm (M, N).

Fonte: Luangharn et al. (2019)

4.2. Resíduos lignocelulósicos

A quantidade global anual de resíduos sólidos é de, aproximadamente, 2,01 bilhões de toneladas e, até 2050, a previsão é de atingir 3,4 bilhões, dos quais pelo menos 33% não são gerenciados de forma adequada, sendo o descarte o principal desafio (KAZA et al., 2018; USMANI et al., 2021). Grande parte desse material é descartada por meio da queima, prática extremamente danosa ao meio ambiente, pois resulta na produção de amônia e metano,

contribuindo para a emissão de gases do efeito estufa (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2016; IQBAL, 2020).

Da biomassa gerada, 63% são resíduos lignocelulósicos (USMANI et al., 2021), podendo ser classificados em resíduos do agronegócio (por exemplo, palha de arroz, palha de trigo, caule de algodão, palha de milho etc.), biomassa florestal (por exemplo, lascas de madeira, troncos de madeira, casca, serragem etc.) e colheitas usadas para produção de energia (cana-de-açúcar, capim elefante, salgueiro, álamo etc.) (SINGH; NANDA; BERRUTI, 2020). A maioria do material residual gerado não é reaproveitada, o que poderia ser um recurso valioso para setores importantes, como a indústria de biorrefinaria, de forma que reduziria os impactos ambientais e contribuiria para a bioeconomia circular. Assim, a biotecnologia e o bioprocessamento fornecem alternativas para o destino e uso desses resíduos, que podem servir como matéria-prima para novos processos e produtos, por meio da bioconversão de suas moléculas, fontes ricas de energia, carbono e demais nutrientes (WOICIECHOWSKI et al., 2020).

A biomassa lignocelulósica pode ser utilizada como insumo para a produção de diversos produtos biotecnológicos, agregando valor a esse material (OKOLIE et al., 2021), como por exemplo, biocombustíveis (GOMEZ; HÖFFNER; BARTON, 2021; MATHANKER et al., 2020; SILVA et al., 2018; ZHANG et al., 2021). Os combustíveis feitos a partir de resíduos lignocelulósicos, também conhecidos como combustíveis de segunda geração, podem ser ótimas alternativas ao uso dos recursos não renováveis provenientes do petróleo, podendo existir em formas líquidas (bioetanol, *jet fuel*, biobutanol, biodiesel, etc.) e gasosas (gás sintético, biogás, biometano e biohidrogênio) (OKOLIE et al., 2021). O bioetanol, por exemplo, têm inúmeras vantagens, como a presença de 35% de oxigênio, responsável por melhorar a sua combustão, minimizando a emissão de gases poluentes, além de ter matéria-prima com bom custo-benefício (KIM; DALE, 2004).

A matéria vegetal também pode ser substrato para a elaboração de produtos químicos, como polímeros e resinas, onde a maioria das substâncias extraídas são propileno, benzeno, etileno, xileno e tolueno (HOWARD et al., 2003; OKOLIE et al., 2021). Xilitol é um dos itens fabricados utilizando esse tipo de insumo, formulado a partir da hidrólise da hemicelulose, rica em açúcares como xilose e arabinose, podendo ser uma alternativa à sacarose (RAHMAN et al., 2007).

Resíduos lignocelulósicos também podem ser reaproveitados para a geração de bioplásticos, indústria têxtil, saúde, aplicações eletrônicas e embalagens, reduzindo os

impactos ambientais adversos oriundos do uso de plásticos petroquímicos (THAKUR et al., 2018). Outro mercado de grande importância é o das enzimas excretadas por microrganismos que utilizam a biomassa como substrato, uma vez que pode apresentar concentrações significativas de carboidratos solúveis e indutores da síntese enzimática (ATILANO-CAMINO et al., 2020; LEE et al., 2021; XU et al., 2018).

4.2.1. Açaí (*Euterpe* sp.)

O açaí (*Euterpe* sp.) é um fruto proveniente de uma palmeira amplamente distribuída no norte da América do Sul, com predominância na região amazônica. Essa palmeira produz frutos esféricos, contendo um pericarpo simples de cor roxa e mesocarpo fibroso com 1 mm de espessura (LOPES et al., 2019; MARTINS et al., 2020). Devido à presença de compostos bioativos como antocianinas, com propriedades antioxidantes, antiproliferativas e anti-inflamatórias, e ao seu alto valor energético, esta fruta possui inúmeros benefícios à saúde e vem sendo denominada de “superfruta” (BOEIRA et al., 2020).

O fruto do açaí é apreciado, principalmente, na forma de suco de consistência pastosa, obtido do despulpamento do fruto por meio de extração mecânica em máquinas despulpadoras, ou de forma manual. A polpa é composta por cerca de 60% de lipídios, 30% de fibras alimentares e 10% de proteínas, sendo rica em minerais como potássio e cálcio, bem como em vitamina E (CEDRIM; BARROS; NASCIMENTO, 2018).

O Brasil é o maior produtor e exportador do suco de açaí do mundo (ALVES et al., 2021), sendo a região Norte responsável quase que inteiramente por toda a produção de açaí do país, com o estado do Pará e Amazonas detentores de 68% e 22% da produção, respectivamente (BARROS et al., 2021). Só em 2018, foram produzidas aproximadamente 1,5 milhão de toneladas de açaí no Brasil (IBGE, 2020)

No entanto, o processamento da polpa gera resíduos inerentes ao processo, pois a semente do açaí corresponde a cerca de 90% do fruto e, apenas 10% é aproveitado em forma de polpa (ROSSETTO et al., 2020; SOUSA RIBEIRO et al., 2018). Como consequência, mais de 1 milhão de toneladas de resíduos de açaí são gerados na região amazônica todo ano, com grande parte desses resíduos descartados de forma inadequada, sendo uma pequena porção reutilizada como sementeira, matéria-prima para artesanato ou fertilizante doméstico (MONTEIRO et al., 2019). Assim, a maior parte das sementes de açaí é considerada resíduo agroindustrial e é despejada em lixões a céu aberto ou em canais de esgoto, ocasionando

assoreamento e alagamentos, gerando um problema ambiental recorrente em regiões produtoras de açaí (ALCANTARA; PEREIRA, 2018).

Devido a essas questões ambientais, a aplicação industrial de sementes de açaí vem atraindo a atenção da comunidade científica, como na remoção de íons metálicos de fontes de água como carbono ativado (QUEIROZ et al., 2020), como catalisador para a produção de biocombustíveis (ARAÚJO et al., 2021), como biochar para condicionamento de solo (SATO et al., 2020), extração de manose (MONTEIRO et al., 2019), aplicação em sistemas de gaseificação de corrente para geração de energia elétrica (ITAI et al., 2014), potencial como fonte de biomassa e fitoquímicos (BURATTO; COCERO; MARTÍN, 2021), adsorvente para remoção de cafeína de matrizes aquáticas (ALMEIDA et al., 2021), formulação de placas ecológicas para a construção civil (MESQUITA et al., 2018). Adicionalmente, sementes de açaí são ricas em compostos fenólicos (VIGANÓ et al., 2022) que podem ser uma fonte para obtenção de extratos com propriedades terapêuticas, como no tratamento de câncer (MARTINEZ et al., 2018), prevenção de inflamação e estresse oxidativo (ROMÃO et al., 2020), prevenção da esteatose hepática e diabetes tipo 2 (SILVA et al., 2018), atividade antiadipogênico (TRINDADE et al., 2019), dentre outros.

Semente de açaí é considerada uma biomassa lignocelulósica composta por celulose, hemicelulose, lignina e proteínas. A concentração desses compostos varia de acordo com a safra, no entanto, a celulose é o polímero predominante (34-53%), seguida por lignina e hemicelulose (3-25% e 6-18%, respectivamente) e uma pequena quantidade de proteínas (4-7%) (BUFALINO et al., 2018; DE LIMA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2015). Devido a essa composição nutricional, essa biomassa vem sendo relatada como um promissor substrato para desenvolvimento de fungos da podridão branca (AGUIAR et al., 2021; AGUIAR et al., 2022; SALES-CAMPOS et al., 2020; SALES-CAMPOS et al., 2021). No entanto, poucos estudos relatam a utilização desse resíduo como fonte indutora da atividade de enzimas lignocelulolíticas produzidas por esses fungos.

4.2.2. Marupá (*Simarouba amara* Aubl.)

O marupá (*Simarouba amara* Aubl.) é uma espécie arbórea da família Simaroubaceae, que abriga 22 gêneros e cerca de 100 espécies (D'ARACE et al., 2021). Essa espécie está presente em toda a região amazônica, tanto em florestas primárias quanto secundárias, podendo ser encontrada desde o norte da América do Sul, até a região amazônica do Peru e Brasil (ARÓSTEGUI; PORTOCARRERO, 1992). No Brasil, o marupá se desenvolve em

matas de várzea, no entanto, pode ser encontrado em terra firme, bem como em capoeiras e em savanas arenosas (MOJENA, 2017). Há ocorrência registrada na região norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro) (DEVECCHI; PIRANI; THOMAS, 2020).

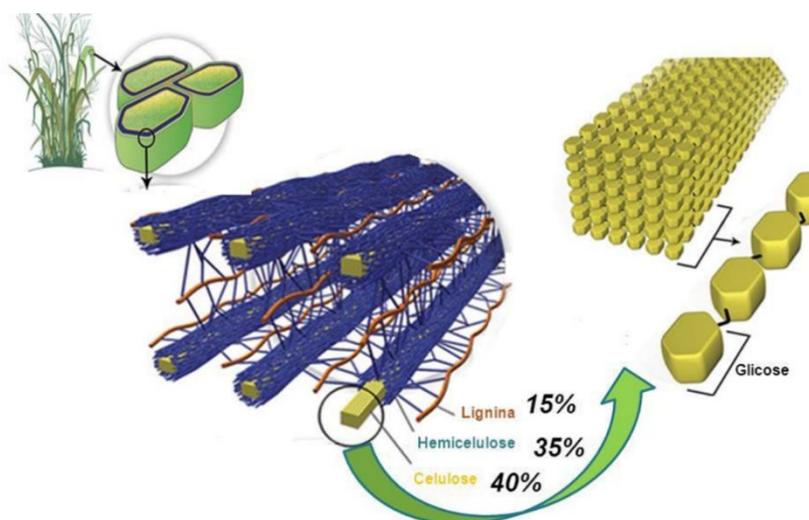
O marupá é uma árvore de médio a grande porte, com 50-100 cm de diâmetro e 25-35 metros de altura, possui caule cilíndrico, ramificado, com base reta e raízes redondas, sua madeira é leve e de fácil manuseio, além de apresentar resistência à insetos (D'ARACE, 2021). É uma planta de rápido crescimento e possui tolerância à luz direta (LORENZI, 2002). A madeira do marupá é utilizada para fins ornamentais, fabricação de instrumentos musicais, tratamentos medicinais, como no combate à malária, febres e disenteria, bem como na recuperação de áreas degradadas, fabricação de licores, fabricação de forros, brinquedos, compensados, dentre outras aplicações (D'ARACE, 2021).

A serragem do marupá, obtida a partir da exploração da sua madeira, pode ser considerada resíduo madeireiro, o qual é definido como qualquer biomassa acima do solo restante da colheita da madeira (EKER, 2011), como tocos, galhos e pequenas árvores (RINGMAN, 1996). Devido à sua composição lignocelulósica, característica da madeira, a serragem de marupá vem sendo relatada como um substrato eficiente para o desenvolvimento de cogumelos (AGUIAR et al., 2022; SALES-CAMPOS et al., 2010; SALES-CAMPOS et al., 2011). No entanto, ainda não há registros de estudos que utilizem essa biomassa como fonte indutora para obtenção de enzimas por fungos da podridão branca.

4.2.3. Composição química

Em relação à composição química, os resíduos lignocelulósicos consistem, em sua grande maioria (90%), em três constituintes principais, celulose (35-55%), hemicelulose (20-40%) e lignina (10-25%), responsáveis por suas estruturas tridimensionais (Figura 5) (OKOLIE et al., 2021). A disposição e a composição relativa desses elementos dependem da fonte e do tipo de material vegetal, assim como sua digestibilidade varia de acordo com a cristalinidade da celulose, grau de hidrofobicidade da lignina e acessibilidade da celulose envolvida na rede lignina-hemicelulose (SINGHVI; GOKHALE, 2019).

Figura 5. Estrutura tridimensional da lignocelulose

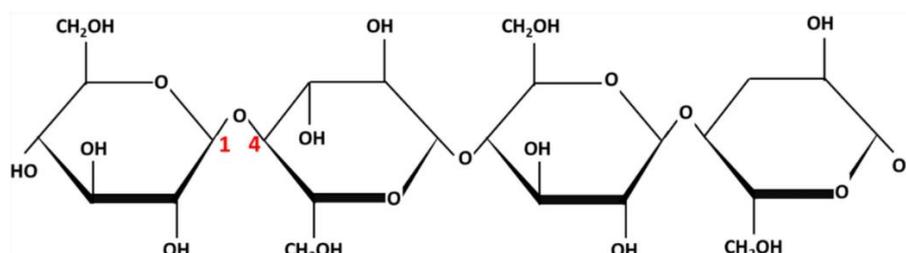


Fonte: Imperial College London. Disponível em: <https://www.imperial.ac.uk/news/143947/chemical-building-blocks-from-renewable-resources//>. Acesso em: 25 de jul. 2022.

4.2.3.1.Celulose

A celulose contém metade do carbono orgânico existente no planeta, sendo considerado o recurso orgânico renovável mais abundante, com produção anual que excede $7,5 \times 10^{10}$ toneladas (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010). É um polímero formado por numerosas subunidades de D-glicoses unidas por ligações β -1,4 glicosídicas, forças van der Waals e ligações de hidrogênio, formando cadeias lineares de até 12.000 nanômetros (Figura 6) (NANDA et al., 2015). A fórmula química da celulose é $C_6H_{10}O_5$, com massa molecular de 342,3 g/mol (OKOLIE et al., 2021) e, consiste em uma substância fibrosa, com as moléculas unidas por fortes ligações de hidrogênio, responsável por aumentar a rigidez da celulose, tornando-a altamente insolúvel à maioria dos solventes, além de conferir dureza às paredes celulares das plantas (MOON et al., 2011).

Figura 6. Polímero de celulose contendo monômeros de glicose ligados por β -1,4 ligações glicosídicas

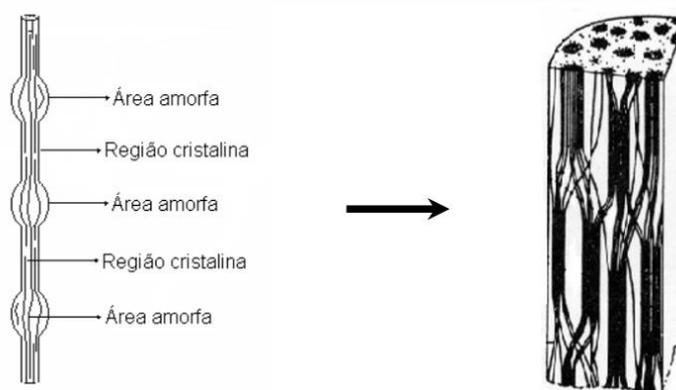


Fonte: (OKOLIE et al., 2021)

Na biossíntese da celulose, moléculas individuais são produzidas, que rotacionam ordenadamente, originando camadas delgadas que se cruzam formando um aspecto de redes,

denominadas de fibrilas, mantidas unidas por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas e oxigênio das moléculas vizinhas (MOON et al., 2011). As fibrilas se organizam em grandes unidades, denominadas de microfibrilas, com diâmetro de 5-50 nm e vários micrômetros de comprimento, estas, por sua vez, são responsáveis por formar as fibras de celulose. Essas microfibrilas de celulose são formadas por conjuntos lineares cristalinos de cadeias β - (1 \rightarrow 4) -D-glucano unidas entre si por ligações de hidrogênio e o grau dessas ligações indica o nível de cristalinidade da celulose, ou seja, uma rede tridimensional altamente estruturada e, conseqüentemente cristalina, é produzida quando todos os locais para ligação de hidrogênio entre as cadeias são preenchidos. As regiões desordenadas e com poucas ligações são denominadas de amorfas (Figura 7) (MOON et al., 2011; OKOLIE et al., 2021).

Figura 7. Celulose microcristalina e amorfa



Fonte: Boechat (2010)

A celulose microcristalina apresenta sete polimorfos interconversíveis, sendo eles a celulose I_{α} e I_{β} , II, III_1 , III_2 , IV_1 e IV_2 (O'SULLIVAN, 1997). A celulose I é conhecida como nativa e é naturalmente encontrada em bactérias, algas e plantas e é termodinamicamente metastável, podendo ser transformada em celulose II ou III (MOON et al., 2011). A celulose II apresenta estrutura monocíclica, originada a partir da regeneração da celulose I (solubilização em solvente e recristalização) ou mercerização (tratamento com uma base forte, geralmente solução de mercerização). A celulose II é utilizada na produção de celofane e fibras têxteis sintéticas (O'SULLIVAN, 1997). As celulosas I e II quando tratadas com solução de amônia ou amina, produzem as celulosas III_1 e III_2 , respectivamente, e o aquecimento subsequente dessas moléculas em glicerol à 206 °C origina as celulosas IV_1 e IV_2 (OKOLIE et al., 2021).

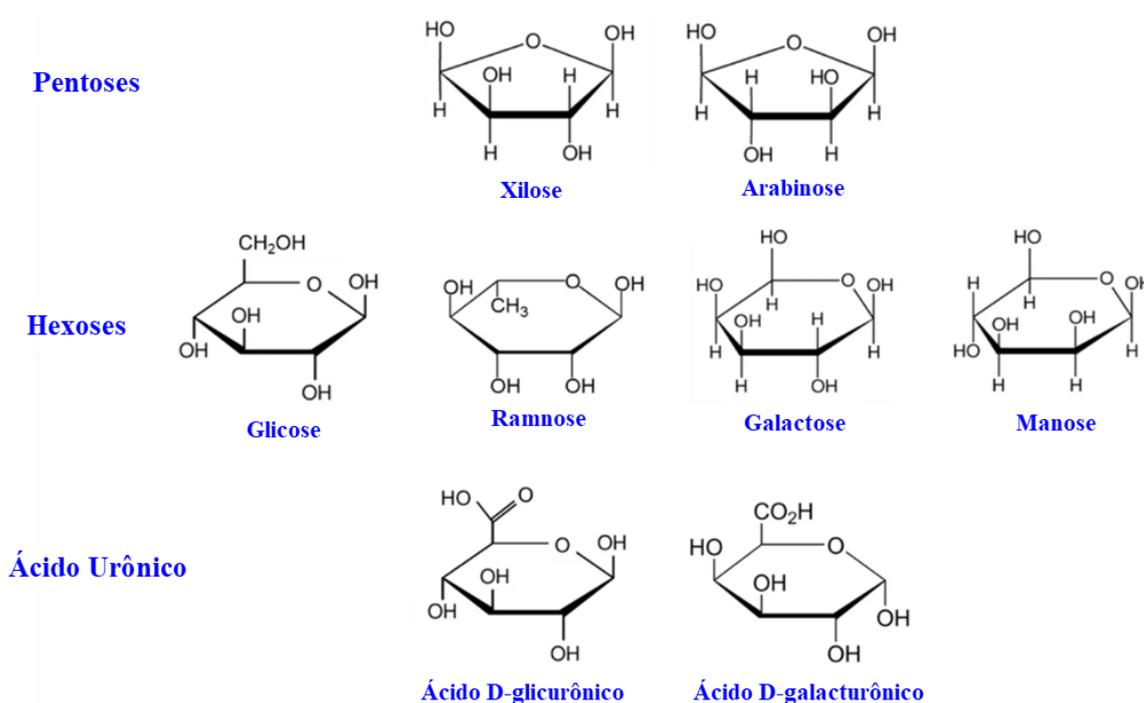
4.2.3.2. Hemicelulose

A hemicelulose é um polímero constituído por uma mistura de polissacarídeos, como as pentoses (xilose e arabinose), estas em maior quantidade, hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos de açúcar (ácido glicurônico e galacturônico), assim como grupos acetila (OKOLIE et al., 2021) (Figura 8). Devido ao seu menor grau de polimerização (100 a 200 unidades) e estrutura amorfa, a hemicelulose pode ser degradada facilmente em meio ácido ou quente, em comparação à celulose (CHEN, 2014). Esse biopolímero possui cadeia relativamente curta e é composto por 500 a 3000 manômetros de carboidratos intercalados com ácidos, sendo a xilose ($C_5H_{10}O_5$) o seu açúcar mais abundante, com peso molecular de 150,1 g/mol (GIBSON, 2012; OKOLIE et al., 2021).

As xilanas são os polissacarídeos mais abundantes encontrados na hemicelulose, sendo constituídas por unidades de β -D-xiloses unidas por ligações 1-4 glicosídicas. A composição desse biopolímero varia de acordo com a sua fonte, por exemplo, a xilana obtida da madeira de *Betula* sp. contém 89,3% de xilose, 1,4% de glicose, 1 % arabinose e 8,3% de ácido úrico anidro (KORMELINK; VORAGEN, 1993), já a xilana proveniente da fibra do milho abrange 48-54% de xilose, 33-35% de arabinose, 5-11% de galactose e 3-6% de ácido glucurônico (DONER; HICKS, 1997), o trigo possui 65,8% de xilose, 33,5% de arabinose, 0,3 % de glicose, 0,1 % de manose e 0,1 % de galactose (SAHA, 2003). A fonte de biomassa também ditará o teor de hemicelulose presente na matéria, sendo assim, madeiras macias e duras apresentam teor de hemicelulose de 18-23% e 10-15%, respectivamente, enquanto plantas herbáceas contém 20-25% (WANG et al., 2017b).

Xiloglucanos são outros componentes da hemicelulose, formados por unidades de β -D-glicopirranose unidas por ligações 1-4 glicosídicas, semelhante à celulose, no entanto, cerca de 75% dos resíduos glicosílicos de xiloglucano são substituídos por α -D-xilopirranose, onde, de modo geral, xilose, glicose e galactose são os principais componentes desses xiloglucanos, na razão 3:4:1, respectivamente (CHEN, 2014; YANG, 2008).

Figura 8. Estrutura química de diferentes açúcares hemicelulósicos e ácidos de açúcar



Fonte: (OKOLIE et al., 2021)

Outros polissacarídeos presentes na hemicelulose são as mananas, como glucomananas, galactomananas, ácido glucurônico e ácido galacturônico (YANG, 2008). Ligações β -1,4 glicosídicas são responsáveis por unir os resíduos de manose, já as galactomananas são formadas quando resíduos de galactose são agregados por ligações α -1,6, ao passo que glucomananas são cadeias mistas de glicose e manose, na proporção 1:3 (YANG, 2008). Arabinoglucouranoxilanas são polímeros que também podem ser encontrados na hemicelulose, sendo os principais componentes da biomassa não amadeirada, como é o caso de resíduos agrícolas e madeiras macias, possuindo em sua composição D-xilopiranoses unidos por ligações β (1,4), responsáveis por formar a cadeia principal e ramificações de α -L-arabinofuranosil e ácido glucopiranosil-urônico, conectados por ligações α 1-2 e α 1-3 (GÍRIO et al., 2010). A fonte de biomassa também ditará o teor de hemicelulose presente na matéria, sendo assim, madeiras macias e duras apresentam teor de hemicelulose de 18-23% e 10-15%, respectivamente, enquanto plantas herbáceas contêm 20-25%.

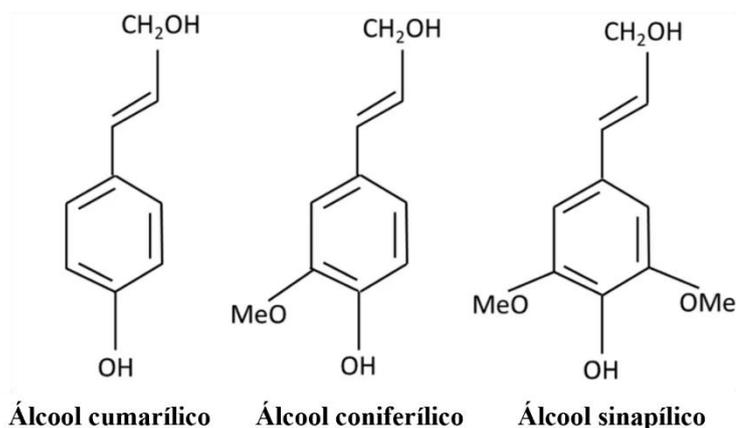
4.2.3.3. Lignina

A lignina ($C_{81}H_{92}O_{28}$) é um biopolímero constituído por unidades monoméricas de fenilpropano, juntas entre si de forma aleatória e não linear por ligações fosfodiéster, onde algumas dessas ligações também podem ser encontradas nas unidades finais dos manômeros,

constituídos de ácido ferúlico e p-cumárico (BURANOV; MAZZA, 2008; REINOSO et al., 2018). Assim, a junção da lignina com hemicelulose e celulose é responsável pela força e dureza do material vegetal (ZAKZESKI et al., 2010; FOUGERE et al., 2016).

As moléculas de fenilpropano são formadas principalmente por álcool p-cumarílico (4-(3-Hidroxi-prop-1-enil)fenol), álcool coniferílico (4-(3-hidroxi-1-propenil)-2-metoxifenol) e álcool sinapílico (4-(3-hydroxyprop-1-enyl)-2,6-dimethoxyphenol) (Figura 9) (PANDEY; KIM, 2011). Esses compostos químicos também podem ser denominados de p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), sendo a polimerização de hidroxifenil propano, guaiacil propano e siringil propano, respectivamente, responsável por originar essas moléculas (CHEN, 2014; GÍRIO et al., 2010).

Figura 9. Estrutura química dos três componentes básicos de lignina



Fonte: (OKOLIE et al., 2021)

A composição e quantidade da lignina varia de acordo com a biomassa, possuindo concentrações maiores em gramíneas, seguido por madeira dura e madeira macia, por exemplo (PANDEY; KIM, 2011). A lignina de madeira dura apresenta grandes quantidades de metoxila, pois possui quantidades semelhantes de guaiacil e siringil, já a lignina de madeira macia é composta por 90% de unidades guaiacil (OKOLIE et al., 2021).

As macromoléculas de lignina são formadas por cadeias ramificadas de compostos fenólicos de moléculas de fenilpropano dispostas nas ligações C – C e C – O – C, com cadeias laterais de grupos metoxila, hidroxila e aldeído terminal e, devido a isso, apresenta alto peso molecular (1513,6 g/mol) (NANDA et al., 2014; OKOLIE et al., 2021). Além disso, possui valor calorífico 30% maior que a celulose e a hemicelulose juntas (23,3–25,6 MJ / kg), uma vez que seus açúcares possuem baixo grau de oxidação, em comparação aos outros constituintes da lignocelulose (DEMIRBAS, 2004; NOVAES et al., 2010).

A presença da lignina na biomassa vegetal é um grande empecilho para a utilização da celulose e hemicelulose na obtenção de açúcares fermentáveis (OKOLIE et al., 2021). Sendo assim, a remoção da lignina para expor as microfibrilas de celulose e as estruturas da hemicelulose é fundamental, e uma alternativa eficiente é o uso de fungos de podridão branca, como é o caso dos basidiomicetos, considerados os organismos mais eficientes na oxidação da lignina, pois possuem um sistema enzimático sofisticado para esse fim (DASHTBAN et al., 2010). Adicionalmente, a lignina apresenta natureza hidrofóbica, sendo insolúvel em água, no entanto, é solúvel em soluções alcalinas, líquidos iônicos e solventes utilizados nos processos de extração por meio do sistema organosolvente (OKOLIE et al., 2021).

O processo de separação da lignina da parede celular ocasiona rupturas de algumas ligações químicas, acarretando modificações na estrutura primária desse polissacarídeo, por isso, é utilizado o termo protolignina para a lignina *in situ*, associada ao tecido vegetal e sem nenhum tipo de tratamento prévio. Desta forma, a elucidação da estrutura exata da protolignina ainda é um problema (LUPOI et al., 2015).

O método de extração influencia a estrutura da lignina e a sua composição química, por exemplo, o processo Kraft proporciona ligninas com menores teores de impurezas de enxofre, enquanto os processos ácidos sulfito ou bissulfito geram ligninas com uma quantidade significativa de grupos sulfonatos (LUPOI et al., 2015). Ligninas com maior grau de pureza são obtidas no processo organosolvente, pois não usa solventes que geram grandes contaminações na amostra, como o enxofre. Esse processo usa solventes orgânicos, como álcoois alifáticos, principalmente etanol e álcoois aromáticos, como é o caso do fenol para extrair a lignina à 170-220°C (ZAKZESKI et al., 2010).

4.2.3.4. Extrativos

Os extrativos são as moléculas não estruturais da biomassa lignocelulósica, hidrofílicos, solúveis em água ou solventes orgânicos como etanol ou hexano, podendo ser terpenoides, esteroides, gorduras, lipídios, proteínas, ceras e compostos fenólicos, como lignanas, taninos e estilbenos (OKOLIE et al., 2019).

Terpenoides, compostos derivados de isoprenos, são considerados os metabólitos secundários mais diversos secretados pelas plantas, com mais de 40.000 mil moléculas, tendo aplicações biotecnológicas bem relatadas, como uso em sabores e fragrâncias nas indústrias alimentícias e de cosméticos, bem como na indústria farmacêutica, como os canabinoides (AHARONI; JONGSMA; BOUWMEESTER, 2005; OKOLIE et al., 2021). Esses compostos

fenólicos visam proteger o vegetal de ataques microbianos e fúngicos e possuem estruturas semelhantes à da lignina, mas com quantidades maiores de guaiacil e siringil (OKOLIE et al., 2021).

Outro componente extrativo é a pectina, que pode ser encontrada entre os microfíamentos de celulose, tendo como precursores a protopectina e ácido péctico. O ácido péctico é solúvel em água e quando reage com o cálcio forma uma substância gelatinosa de pectinato de cálcio, possuindo uma cadeia linear de cerca de 100 ácidos galacturônicos unidos por ligações α -1,4 (OKOLIE et al., 2021). Por outro lado, a protopectina é insolúvel em água, mas quando sofre a ação de protopectinases e soluções ácidas ela é convertida em pectina (CHEN, 2014). Devido à formação de pontes de cálcio entre as moléculas de pectina, há a criação de uma estrutura reticulada, que desempenha papel fundamental no auxílio da livre circulação de água entre as células (OKOLIE et al., 2021).

4.2.3.5. Cinzas e minerais

O resíduo sólido inorgânico restante da queima total da biomassa vegetal a 550-570°C, em mufla, é denominado de cinza, constituído por minerais, como silicatos, carbonatos, fosfatos, cálcio, magnésio, sódio, potássio, etc. A sílica é um dos principais componentes das cinzas e nas plantas está presente na forma de silicato, responsável por auxiliar na rigidez dos tecidos de apoio de plantas de grande porte, como árvores (PETTERSSON et al., 2008; VASSILEV et al., 2012).

O teor de cinzas também é dependente do tipo de vegetal, por exemplo, madeiras tem uma quantidade menor de cinzas em comparação com os resíduos agrícolas (CHEN, 2014; NANDA et al., 2015). As cinzas podem conter algum grau de carbono que não foi queimado, devido à combustão incompleta do combustível, responsável por aumentar significativamente o volume das cinzas (JAMES et al., 2012). Adicionalmente, metais pesados voláteis encontrados nesse material podem acarretar danos ambientais graves para o meio ambiente, e devido à presença desses componentes, as cinzas possuem pouco potencial para usos biotecnológicos (JAMES et al., 2012).

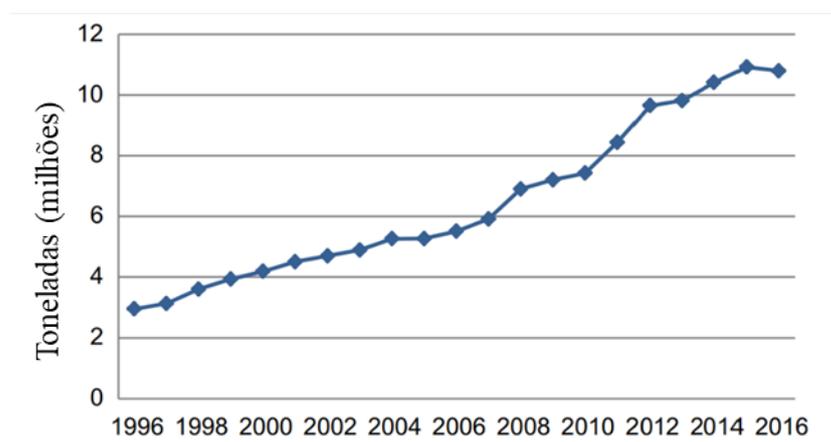
4.3. Fermentação em estado sólido de cogumelos

A indústria de cultivo e comercialização de cogumelos gera um lucro anual de US \$ 45 bilhões, sendo a China o país com maior produção, atingindo 70% do mercado mundial. Em um período de duas décadas, houve um aumento de 350% no cultivo global de cogumelos, pois no ano de 1996 a produção de macrofungos foi 2,9 milhões de toneladas, já

em 2016 alcançou 10,9 milhões (Figura 10), com aumento exponencial ao longo dos anos, indicando que esse mercado é bastante lucrativo (JULIAN; REYES; EGUCHI, 2019).

Os primeiros registros de cultivo de cogumelos pelos humanos são datados em 600 anos D.C., referentes à produção de espécies do gênero *Auricularia*, em países do sul da Ásia (CHANG, 1997). As espécies saprófitas foram as primeiras cultivadas em condições artificiais, com a seguinte ordem de aparecimento ao longo da história: *Auricularia auricula* (600 D.C.), *Flammulina velutipes* (800 D.C.), *Lentinula edodes* (1000 D.C.), *Agaricus bisporus* (1600 D.C.), *Volvariella volvacea* (1700 D.C.), *Tremella fuciformis* (1800 D.C) e *Pleurotus ostreatus* (1900 D.C) (MILES; CHANG, 2004).

Figura 10. Produção total de cogumelos no mundo



Fonte: Julian; Reyes; Eguchi (2019)

Uma das principais formas de cultivo de cogumelos é através da fermentação em estado sólido, que consiste no processo no qual os organismos se desenvolvem em um material não solúvel ou substratos sólidos na ausência ou quase ausência de água livre (BHARGAV et al., 2008). É uma técnica considerada sustentável, pois os principais substratos utilizados para cultivo são os resíduos lignocelulósicos, agregando valor a esse material de fácil obtenção e baixo custo, que apresenta alta composição nutricional, oferecendo condições adequadas para o desenvolvimento dos basidiomicetos. Cerais (arroz, trigo, cevada e milho), sementes de leguminosas, farelo de trigo, matéria lignocelulósica como palha, serragem, aparas de madeira e uma ampla variedade de materiais vegetais e animais são os substratos mais empregados no cultivo sólido (SADH; DUHAN; DUHAN, 2018).

Para o estabelecimento da fermentação em estado sólido, três fases primárias são necessárias: produção do “spawn” (também conhecido como semente), preparo do substrato e desenvolvimento do basidioma. A produção do spawn se inicia com o desenvolvimento de micélios (miceliação) do cogumelo em meio de cultura, denominado de matriz primária, com posterior inoculação em um substrato sólido, geralmente grãos (arroz sem casca, sorgo, trigo, etc), em sacos de polipropileno, parcialmente abertos para que possa ocorrer troca de ar. A produção de “spawn” deve ocorrer em condições totalmente estéreis, assim, uma matriz secundária de qualidade deve ser axênica ou livre de contaminação. Após miceliação, o “spawn” servirá de inóculo para montagem do cultivo (SADH; DUHAN; DUHAN, 2018).

Quanto ao preparo do substrato, a celulose, hemicelulose e lignina são as principais fontes de nutrientes utilizadas pelos cogumelos para o seu crescimento. Diferentes espécies de macrofungos possuem diversificadas exigências nutricionais, portanto, substratos condizentes às necessidades dos fungos devem ser utilizados. Por exemplo, *A. bisporus* requer uma alta fonte de nitrogênio e serrapilheira compostada como fonte de miceliação, já *Pleurotus* spp. e *L. edodes* requerem baixa concentração de nitrogênio e materiais lignocelulósicos não compostados. O valor de pH do meio varia de 6 a 8, dependendo da espécie (SADH; DUHAN; DUHAN, 2018).

As bases sólidas para a miceliação fúngica mais comumente utilizadas são os resíduos agrícolas, subprodutos industriais e florestais, como farelo de arroz, trigo e milho, serragem e esterco. A água deve ser adequadamente incorporada, fundamental para o crescimento micelial, devendo corresponder entre 60% e 35% de umidade para fontes madeireiras e 80% a 60% para os demais tipos. O tipo de cultivo adotado dependerá da exigência de cada espécie, por exemplo, *L. edodes* é inoculado diretamente em toras de madeira, sem nenhum pré-tratamento sofisticado, enquanto outros cogumelos requerem um ambiente axênico para o seu desenvolvimento (SADH; DUHAN; DUHAN, 2018).

Na formação do basidioma, duas fases distintas são observadas: a vegetativa e a reprodutiva. A fase vegetativa envolve a produção de um complexo enzimático aprimorado para a degradação do substrato, com o intuito de fornecimento de nutrientes necessários para a miceliação do fungo. Esse processo é dependente de alguns fatores, como temperatura, umidade, ventilação e luz e, em geral, os cogumelos se desenvolvem entre 20°C e 30 °C. A fase reprodutiva ocorre com a formação do basidioma e posterior liberação de esporos, podendo acontecer no escuro, no entanto, algumas espécies requerem luz para a formação dessa estrutura (SADH; DUHAN; DUHAN, 2018).

Na maioria dos casos, uma rápida exposição à luz é suficiente para estimular o crescimento micelial, ao passo que, alguns fungos, como *A. bisporus*, não dependem da luz para o amadurecimento. Devido à natureza aeróbica dos cogumelos, eles exigem uma ventilação adequada para adentrarem na fase reprodutiva. Assim, concentrações elevadas de CO₂ favorecem o crescimento vegetativo, mas exercem efeito contrário para o desenvolvimento do corpo de frutífero. Adicionalmente, temperaturas mais altas que o ideal beneficia o crescimento de microrganismos contaminantes e inibem o crescimento micelial, enquanto temperaturas muito baixas retardam a colonização do substrato, causando letargia no fungo. Portanto, a adequação de todos os parâmetros citados acima determina o sucesso do desenvolvimento do basidioma maduro (Figura 11) (SADH; DUHAN; DUHAN, 2018).

Figura 11. Basidioma de *Ganoderma lucidum*



WIKIMEDIA COMMONS. *Ganoderma lucidum*. Disponível em: (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Jreishi2.jpg>).

Acesso em: 07.07.2021

4.4. Enzimas lignocelulolíticas

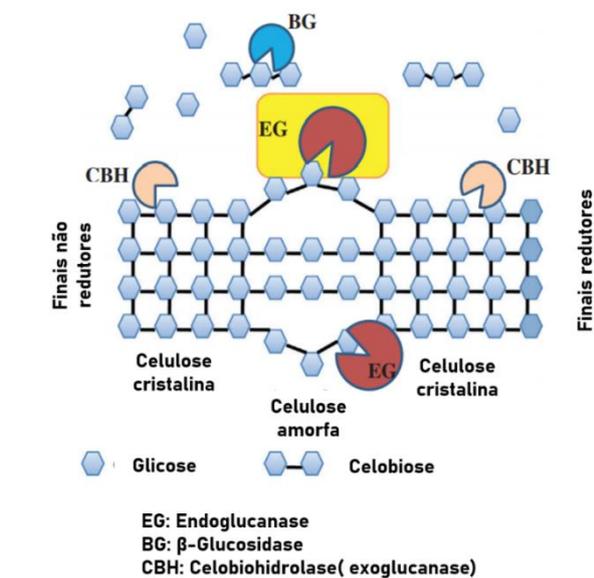
Vários organismos como fungos e bactérias são relatos como produtores de enzimas lignocelulolíticas, as quais possuem como substrato a celulose, hemicelulose e lignina, convertendo essas matrizes em açúcares fermentáveis que servirão como compostos químicos para a produção de diversos produtos biotecnológicos de valor agregado (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

4.2.1. Celulases

As celulases atuam na forma de um complexo enzimático, sendo responsáveis por degradarem a celulose sinergicamente, liberando monômeros de glicose que podem ser fermentados (Figura 12) (MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015). Três enzimas

diferentes estão envolvidas nesse processo: endoglucanases ou endo-1,4- β -D glucanases, exoglucanases ou exo-celobiohidrolase e β -glicosidasases.

Figura 12. Representação esquemática do complexo de celulases atuando na celulose amorfa e cristalina



Fonte: Srivastava; Mishra; Upadhyay (2020).

4.2.1.1. Endoglucanases

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) catalisam a quebra de ligações internas amorfas da fibra celulósica, de forma randômica, liberando celobiose ou celo-oligossacarídeos de diversos tamanhos e, conseqüentemente, terminais novos redutores (quando há a presença de uma hidroxila heterosídica livre) ou não redutores (quando a hidroxila heterosídica está ligada à glicose adjacente) (LYND et al., 2002).

A ação dessas enzimas ocorre em duas etapas, que consiste em glicosilação e desglicosilação. Os resíduos de dois aminoácidos do sítio ativo são utilizados na catálise, cada um deles contendo dois grupos COOH, onde um possui propriedade básica e outro ácida. Na glicosilação, há a formação de um intermediário enzimático glicosil, por meio de uma reação catalisada por um grupo COOH ácido, seguida por um ataque nucleofílico por outro grupo COOH. A etapa de desglicosilação envolve o ataque nucleofílico por meio de uma única molécula de água a uma ligação glicosídica, desprendendo as moléculas degradadas. O grupo COOH ácido participa da reação e, após a clivagem glicosídica é convertido em base, ao passo que o resíduo básico anterior se transforma em ácido (SRIVASTAVA; MISHRA; UPADHYAY, 2020; WATSON et al., 2009).

4.2.1.2. Celobiohidrolases (exoglucanases)

As exoglucanases (EC. 3.2.1.74), também conhecidas como celobiohidrolases são proteínas monoméricas com pouca ou nenhuma glicosilação, que podem ser divididas em celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs). As GHs são raras e hidrolisam diretamente o polímero celulose liberando glicose, já as GBHs liberam celobiose (dímero de glicose) das extremidades (CARVALHO et al., 2011).

Essas enzimas atuam nas extremidades redutoras e não redutoras da celulose cristalina, liberando unidades de celobiose, glucose e celotriose, produzindo uma redução lenta e gradual da polimerização, esse processo é conhecido como amorfogênese, que resulta no aumento da taxa de hidrólise da celulose, pois torna as regiões cristalinas mais expostas às β -glucosidases. Exoglucanases não conseguem atuar sobre a celulose amorfa, pois há um impedimento estereoquímico originado pelos grupos substituintes, como carboximetílico e hidroxietílico (BAYER et al., 2010; CARVALHO et al., 2011).

4.2.1.3. β -glucosidases

As β -glucosidases (EC 3.2.1.21), também conhecidas como celobiasas, são um conjunto de enzimas responsáveis por hidrolisar ligações 1,4, β -1,3 e β -1 de resíduos de celobiose gerados pelas ações das endoglucanases e celobiohidrolases, liberando monômeros de glicose no meio. Desta forma, as β -glucosidases não são celulases legítimas, pois não possuem a capacidade de atuar sobre os substratos insolúveis, mas contribuem de forma significativa para a eficiência da hidrólise da celulose (YAO et al., 2016; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

A hidrólise das ligações glicosídicas realizadas pelas β -glucosidases envolve dois mecanismos de ação: retenção ou inversão da quiralidade do carbono anomérico. Na retenção, uma molécula de água faz um ataque nucleofílico direto ao carbono anomérico, deslocando a aglicona, já na inversão esse processo é revertido, ocorrendo um duplo deslocamento usando um intermediário enzima-glicosil (MCCARTER; WITHERS, 1994). Ambos os mecanismos utilizam dois ácidos carboxílicos que se encontram no sítio ativo, na inversão um aminoácido ácido atuará como ácido geral e o outro como base geral, já na retenção, um aminoácido ácido será o nucleófilo, enquanto o outro será o ácido e base geral (CAIRNS; ESEN, 2010).

As β -glucosidases, assim como as celobiohidrolases, são inibidas quando há um aumento de monômeros de glicose no meio, acarretando o aumento de celobiose, o que pode

ser um problema em processos fermentativos controlados para geração de produto (CAIRNS; ESEN, 2010).

4.2.2. Hemicelulases

Há um complexo de enzimas que age na degradação da hemicelulose, a maioria são hidrolíticas e operam de forma paralela com as celulases. As primeiras enzimas a atuarem são as endoxilanases, responsáveis por hidrolisar a cadeia primária de xilana, através da quebra das ligações β -D-xilopiranosil, diminuindo a polimerização do substrato e liberando xilooligossacarídeos, xilobiose e xilose. Após isso, as xilosidases entram em ação, onde a partir das extremidades redutoras dos xilooligossacarídeos começam uma fragmentação gradual, resultando em xilose (KUBICEK, 2012; BROEKER et al., 2018).

4.2.2.1. Endoxilanases

As endoxilanases (EC 3.2.1.8), também conhecidas como endo- β -1,4-xilanase são glicohidrolases que rompem as ligações glicosídica β -1,4 na estrutura da xilana, através do mecanismo de duplo deslocamento do carbono anomérico. A xilana é hidrolisada pela endo-1,4-beta-xilanase, gerando xilo-oligossacarídeos, a endo-1,3-beta-xilanase age de forma semelhante, mas quebrando ligações 1 e 3 nos carbonos da xilana, originando xilobiose, xilotriose e xilotetraose. Os resíduos terminais da xilose são degradados pelas β -1,4-D-xilosídeo-xilo-hidrolase liberando α -D-xilose (CARLI et al., 2016; GERDAY; FELLER, 2005; LUO et al., 2016).

4.2.2.2. Arabinases

As arabinases hidrolisam as ligações glicosídicas 1-5 entre as cadeias laterais de α -L-arabinofuranosídeos, responsáveis por gerar os polissacarídeos de arabinose, levando à liberação de L-arabinose, para isso, duas enzimas principais estão envolvidas nesse processo, α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) e endo- α -arabinanase (EC 3.2.1.99) (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020). Essas enzimas agem de forma sinérgica, onde a endo- α -arabinanase degrada o esqueleto dorsal dos α -L-arabinofuranosídeos, produzindo arabino-oligossacarídeos ou L-arabinoses, ao passo que os arabino-oligossacarídeos gerados são hidrolisados completamente pela α -L-arabinofuranosidase (HONG; PARK; OH, 2009). Uma terceira enzima pode atuar, a exo-arabinanase (EC 3.2.1.), capaz de liberar o terminal arabinose não redutor ou arabino-oligossacarídeos de arabinano (CARAPITO et al., 2009; CHAN; BATT, 2008; WONG, 2009).

4.2.2.3. Xilosidases

As β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), também conhecidas como β -1,4-D-xilosídeo-xilohidrolase, são exoglicosidases que removem os resíduos de xilano das extremidades não redutoras de xilobiose e xilooligossacarídeos, essa etapa é fundamental, pois diminui a inibição pelo produto das endoxilanases, durante a catálise completa da xilana, uma vez que essas enzimas hidrolisam xilobiose e xilooligossacarídeos, liberando D-xilose no meio (DODD; CANN, 2009; JUTURU; WU, 2012). As xilosidases com base na sua estrutura proteica são divididas em sete famílias (GH 3, 28, 30, 39, 52 e 54) e seus mecanismos de catálise podem ser por inversão (família GH 43) ou retenção (família GH 3, 28, 30, 39, 52 e 54) da configuração estereoquímica do carbono anomérico (SHALLOM; SHOHAM, 2003; ZHOU et al., 2012).

4.2.2.4. Esterases

As acetilxilano esterases (EC 3.1.1.72) são responsáveis por remover os grupos acetil dos polissacarídeos da hemicelulose por meio da hidrólise das ligações éster (NAIDU; HLANGOTHI; JOHN, 2018). Essas enzimas catalisam grupos acetil da xilana polimérica, xilose acetilada, glicose acetilada, α -naftilacetato e p-nitrofenilacetato, não possuindo ação sobre manana ou pectina acetilada (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020). Outra esterase conhecida é a feruloil esterase (EC 3.1.1.73), que remove o ácido ferúlico de arabinoses, por meio da quebra das ligações éster de feruloílo com o xilano (SHALLOM; SHOHAM, 2003). As esterases são consideradas enzimas acessórias das hemicelulases, pois auxiliam no funcionamento adequado das xilanases (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

4.2.2.5. Enzimas auxiliares

Enzimas auxiliares são catalisadores necessários para otimizar o processo de hidrólise da hemicelulose por meio da clivagem de cadeias laterais, aumentando o rendimento dos açúcares fermentáveis (BERLIN et al., 2005; SELIG et al., 2008). Um exemplo dessas enzimas são as liqueninase (EC 3.2.1.73) que atuam hidrolisando ligações (1-4) β -D-glicosídicas em β -D-glucanos, ao passo que, as α -glucuronidases (EC 3.2.1.139) removem as cadeias laterais do ácido glucurônico, hidrolisando as ligações α 1,2-glicosídicas com o glucuronoxilano (GILBERT; STÅLBRAND; BRUMER, 2008; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

4.2.3. Ligninases

A lignina possui uma estrutura heteropolimérica amorfa e complexa, dando a esse polímero resistência à degradação (LI; PU; RAGAUSKAS, 2016). Várias vias podem levar à degradação da lignina, mas o sistema enzimático dos fungos da podridão branca é o mais eficiente. Esse sistema consiste na produção de enzimas ligninolíticas não específicas que atuam extracelularmente devido à variação da composição química e tamanho da lignina (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

4.2.3.1. Lacases

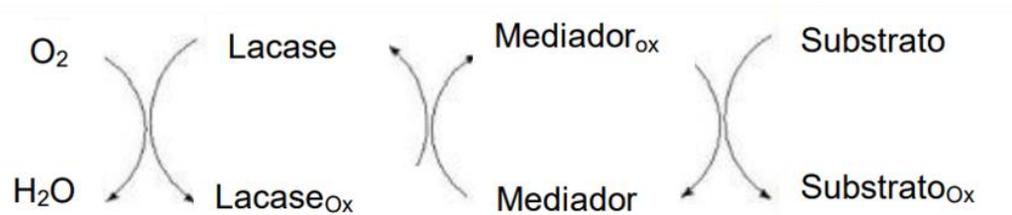
As lacases (CE 1.10.3.2) são glicoproteínas pertencentes a uma superfamília denominada de oxidases multi-cobre (HOEGGER et al., 2006), com massa molar de 50 a 130 kDa, apresentando em sua estrutura de 10 a 30% de carboidratos (glicose, manose, galactose e arabinose), responsáveis pela estabilidade conformacional da estrutura globular, contribuindo para a resistência a diversas faixas de temperatura, podendo ser utilizadas em processos industriais (BALDRIAN, 2006; YAROLOV et al., 1994).

Essas enzimas possuem a capacidade de oxidação de uma grande variedade de compostos fenólicos e não-fenólicos, por meio da transformação da molécula de O_2 em água no processo de redução de quatro elétrons (HAKULINEN; ROUVINEN, 2015). Os elétrons livres presentes no seu sítio ativo são provenientes de quatro íons de cobre, classificados como cobre tipo 1 (T1Cu), tipo 2 (T2Cu), tipo 3 (T3Cu) e tipo 4 (T4Cu), sendo responsáveis por oxidar diferentes compostos aromáticos e não aromáticos, como as aminas, que contém anéis fenólicos com grupos funcionais, como metoxi, amino, diamino e hidroxindóis e alguns outros compostos metálicos (CHANDRA; CHOWDHARY, 2015; FARAMARZI, 2017; REZAEI; SHAHVERDI). O cobre tipo 1 confere a coloração azulada à enzima, característica típica das proteínas multicobre, além disso, é considerado o doador de elétrons, uma vez que irá ser reduzido de Cu^{+2} a Cu^+ e, ao final da reação, retornará à forma nativa Cu^{+2} , promovendo a redução de O_2 em H_2O . Esse íon de cobre tem uma coordenação trigonal com dois resíduos de histidina e uma cisteína (BALDRIAN, 2006).

Esse sistema catalítico é denominado lacase-mediador, pois devido ao seu baixo potencial redox (0,5 – 0,8 V), a lacase sozinha não seria capaz de oxidar compostos aromáticos não fenólicos. Assim, o mediador atua como uma “ponte de elétrons”, sendo oxidado para um composto intermediário no início da reação. Após o fim do ciclo, o mediador

se afasta da enzima, cabendo ao intermediário oxidar o substrato, já que o mediador não pode oxidar diretamente (CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014) (Figura 13).

Figura 13. Ciclo catalítico lacase-mediador



Fonte: Christopher; Yao; Ji (2014).

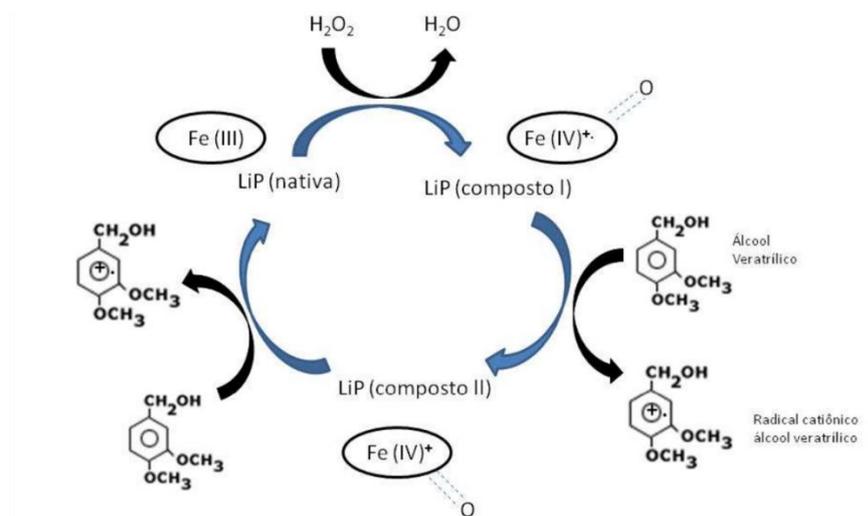
4.2.3.2. Ligninas peroxidases

A lignina peroxidase (EC.1.11.1.14) (LiP) é uma enzima relativamente não específica, capaz de oxidar substratos aromáticos fenólicos e não aromáticos, por meio da oxidação das ligações C-C e C-O-C na lignina, bem como outros compostos orgânicos (WONG, 2009). LiP são glicoproteínas globulares que possuem massa molecular variando de 38 a 42 kDa, com ponto isoelétrico em torno de 3,2-4,0 e pH ótimo de 3,0 (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

As ligninas peroxidases são hemoproteínas monoméricas e possuem dois domínios: C-terminal, também conhecido como distal, e N-terminal, o grupo heme (proximal) contendo Fe (III) está localizado entre os dois domínios. Quatro nitrogênios tetrapirrol e uma quinta ligação contendo histidina são responsáveis por pentacoordenar a enzima (HAMMEL; CULLEN, 2008). Essa enzima é considerada um catalisador primário da oxidação do polímero lignina, altamente dependente das concentrações de peróxido de hidrogênio, no entanto, nem todos os fungos de podridão branca possuem capacidade de sintetizá-las, cabendo às lacases exercerem esse papel (DE GONZALO et al., 2016).

Durante a catálise, o Fe do grupo heme de LiP enfrenta diferentes estágios de oxirredução, onde no primeiro, o Fe (III) é oxidado a Fe (IV), tendo H_2O_2 como agente redutor, que atua como cofator enzimático, gerando um radical catiônico (composto I oxidado) da LiP, com deficiência de dois elétrons. O composto II é formado pela redução do composto I, devido à perda de dois elétrons, transformando o Fe (III) em (IV) novamente, mas não mais atuando como radical livre. Uma última etapa, envolvendo a doação de um elétron por outro substrato, retorna a enzima para seu estado nativo, completando o ciclo (Figura 14) (MARTÍNEZ, 2002; WONG, 2009).

Figura 14. Ciclo catalítico de LiPs



Fonte: Moreira Neto (2016).

O álcool veratrílico é um metabólito que pode ser gerado junto com LiP, responsável por promover o aumento da atividade dessa enzima (FAISON; KIRK, 1985; SCHOEMAKER; LEISOLA, 1990). Este composto pode atuar como um mediador redox, ou seja, agente redutor, por meio da formação de um radical catiônico, quebrando ligações C α -C β , facilitando o processo de hidrólise (HATAKKA, 1994; GOLD, 1990; VALLI; WARIISHI).

4.2.3.3. Manganês peroxidases

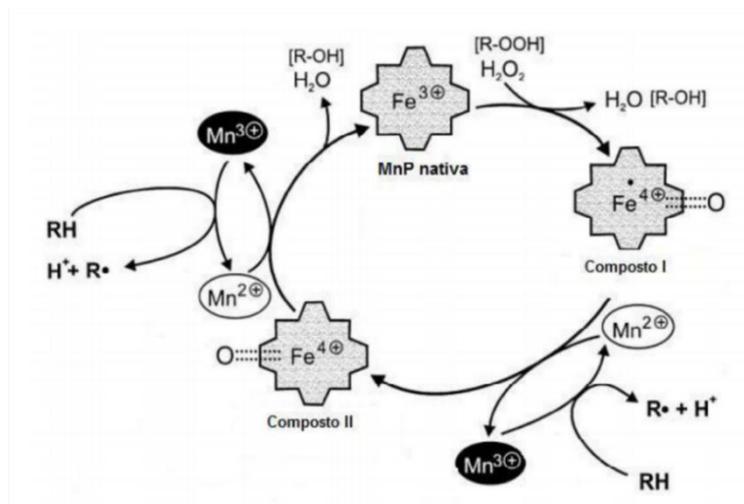
A manganês peroxidase (MnP) (EC. 1.11.1.13) é uma heme-proteína glicosilada, com várias isoformas, bastante comum entre os fungos de podridão branca, apresentando peso molecular em torno de 45 kDa, com pH ótimo inferior a 7 (HATAKKA, 1994). Possui ciclo catalítico semelhante à LiP, onde primeiramente o H_2O_2 oxida a enzima, produzindo uma molécula deficiente de dois elétrons, denominada de composto I. Posteriormente, um intermediário nomeado de composto II é formado na presença de Mn^{2+} , ou de outros doadores de elétrons que possuem potencial redox apropriado, em seguida, o mesmo Mn^{2+} é responsável por devolver à enzima a sua forma nativa.

Mn^{2+} também dará origem ao Mn^{3+} durante a catálise, o qual será estabilizado por ácidos orgânicos produzidos pelo organismo. Esse íon abstrai elétrons de vários compostos orgânicos de forma não específica, resultando em radicais bastante reativos, com alto poder de redução, que atacam estruturas recalcitrantes (KAWAI et al., 1995; HOFRICHTER, 2002). Os quelatos gerados por Mn^{3+} podem levar à formação de superóxido, podendo ser utilizado

como fonte alternativa ao H_2O_2 (HOFRICHTER et al., 1998; URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998). Mediadores de baixa massa molecular, como Mn^{3+} , agem oxidando diretamente moléculas fenólicas, ao passo que um sistema que utiliza mediadores de ácidos graxos insaturados, para gerar radicais intermediários reativos (radicais peroxil), degradam estruturas não fenólicas (JENSEN et al., 1996; HOFRICHTER, 2002).

Concentrações altas de H_2O_2 podem inibir temporariamente a atividade enzimática de MnP, por meio da formação de um composto intermediário chamado de composto III (Figura 15) (WARIISHI; AKILESWARAN; GOLD, 1988).

Figura 15. Ciclo catalítico de MnPs



Fonte: Hofrichter (2002).

4.2.3.4. Peroxidases versáteis

Peroxidases versáteis (PVs) (EC 1.11.1.16) são enzimas pertencentes à família das peroxidases secretadas por vários basidiomicetos de podridão branca (MIN et al., 2010; POGNI et al., 2005). PVs são capazes de realizar as atividades catalíticas específicas de MnP e Lip, permitindo oxidar compostos com alto potencial redox, sendo conhecidas como catalisadores “híbridos” MnP-LiP (ABDEL-HAMID; SOLBIATI; CANN, 2013; CAMARERO et al., 1999). Tais enzimas não realizam somente reações específicas para Mn (II) como as MnPs, permitindo também que sejam utilizadas na oxidação de substratos aromáticos de baixo potencial redox (ABDEL-HAMID; SOLBIATI; CANN, 2013).

Isso acontece devido ao fato de em seu sítio ativo haver resíduos de aminoácidos típicos das MnP, para ligação de Mn (II), assim como resíduos de aminoácidos encontrados no sítio ativo de LiP, envolvidos na interação com o álcool veratrílico e compostos aromáticos (MARTÍNEZ, 2009; WONG, 2009). O ciclo catalítico das peroxidases versáteis é semelhante ao da manganês e lignina peroxidase, envolvendo a acepção de elétrons por H₂O₂, com a formação e redução de moléculas intermediárias, conhecidas como composto I e composto II, até que haja o retorno à enzima nativa (WONG, 2009).

4.2.3.5. Peroxidases corante-descolorantes

As peroxidases corante-descolorantes (EC 1.11.1.19) são hemeproteínas pertencentes à três superfamílias: catalases-peroxidases, peroxidases-ciclooxygenases e peroxidase-peroxigenase (SINGH; ELTIS, 2015). Essas enzimas oxidam uma gama de substratos não fenólicos originalmente degradados pelas peroxidases padrões, resultando em *p*-Anisaldeído como seu principal produto (DE GONZALO et al., 2016), por meio da catálise de moléculas como ABTS (ácido 2,2'-azino-bis[3-etil-benzothiazolino-6-sulfônico]), DMP (2,6-dimetoxifenol), corantes sintéticos como Azure B e substâncias aromáticos metoxilados não fenólicos, como álcool veratrílico e β-caroteno (SINGH; ELTIS, 2015). Produtos como vanilina, guaiacol e dímeros de cresol também podem ser gerados durante a catálise (DE GONZALO et al., 2016). Elas receberam esse nome por serem utilizadas no tratamento de águas residuais, uma vez que possuem a capacidade de degradação de corantes com alto potencial redox, como antraquinonas, β-carotenos, sulfetos aromáticos e corantes azo (SANTOS et al., 2014).

Esses catalisadores possuem ferro em seu sítio ativo e seu ciclo catalítico é semelhante ao das peroxidases convencionais, onde o ferro reage com H₂O₂ para produzir o composto I, um intermediário com alta valência denominado de FeIV(O), com habilidade quelante. O composto I reage com o substrato redutor produzindo um intermediário (FeIV=O+•), chamado de composto II, e quando reage com um segundo substrato, produz FeIII, que permanece em estado de repouso (ROBERTS et al., 2011).

4.2.4. Aplicações biotecnológicas das enzimas lignocelulolíticas

O mercado mundial de enzimas é bastante lucrativo, podendo chegar a US \$ 7,0 bilhões em 2023, com uma taxa de crescimento anual de 4,9% (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020). As enzimas lignocelulolíticas representam 20% das enzimas

comercializadas mundialmente (TOUSHIK et al., 2017) e possuem diversas aplicações nas indústrias têxteis, alimentícia, animal, papel, biocombustível, farmacêutica etc., devido às suas altas taxas de degradação de fibras vegetais e compostos similares, sem liberar moléculas polifenólicas tóxicas no meio (LEITE et al., 2020).

A produção dessas enzimas por meio do cultivo sólido demonstra ser um processo vantajoso, uma vez que há bastante disponibilidade de resíduos lignocelulósicos que podem ser utilizados como substrato de cultivo fúngico, diminuindo o custo da matéria-prima, além de serem considerados excelentes indutores da síntese enzimática (LEITE et al., 2020). Apesar da fermentação em estado sólido ser um processo mais longo, maiores quantidades enzimáticas são obtidas por meio desse cultivo, em comparação com a fermentação submersa, favorecendo o processamento a jusante, além da menor presença de água, que também contribui para a inibição do crescimento de microrganismos contaminantes, necessitando de etapas de esterilização menos rigorosas (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004; MANAN; WEBB, 2017; SOCCOL et al., 2017).

Os processos a jusante (*Downstream processing*), que envolvem a extração enzimática dos cultivos sólidos, consistem na obtenção do extrato bruto, seguida pela filtração para remover os resíduos sólidos, ultracentrifugação para separar os restos do fungo e a concentração do produto por meio da liofilização, para obtenção da enzima sólida (CATALÁN; SÁNCHEZ, 2020; SOCCOL et al., 2017). Adicionalmente, em comparação com as enzimas obtidas a partir da fermentação submersa, as provenientes do cultivo sólido apresentam maior estabilidade frente à diferentes pHs e temperaturas, características fundamentais para aplicações industriais eficientes (MANDAL, 2015; SAQIB et al., 2012).

Essas enzimas também podem ser utilizadas visando aumentar o valor nutricional de alimentos, incluindo ração animal, com altos teores de fibras, por meio da degradação das ligações β -1,4 da celulose, liberando açúcares que podem ser degradados no intestino animal (GRAMINHA et al., 2008). Estudos anteriores relataram um aumento no crescimento de ruminantes, frangos e suínos alimentados com rações pré-tratadas com enzimas lignocelulolíticas (AKINTUNDE et al., 2011; HOOGE et al., 2010). Na alimentação humana, celulasas e xilanasas são frequentemente utilizadas na produção de suco, cerveja e vinho, pois são capazes de clarificar sucos de frutas e vegetais, uma vez que degradam seus materiais lignocelulósicos constitutivos (AMIN et al., 2020; DA SILVA et al., 2019; TOUSHIK et al., 2017). Adicionalmente, também são responsáveis por diminuir a viscosidade dessas bebidas,

facilitando os processos de filtração e, conseqüentemente, aumentando o rendimento (KARMAKAR; RAY, 2011).

As peroxidases degradadoras de lignina são empregadas na produção de compostos aromáticos a partir desse polímero (SOCCOL et al., 2017). A maior parte da baunilha sintética produzida mundialmente é proveniente de moléculas aromáticas encontradas na lignina, liberadas pela catálise realizada pelas ligninases (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020). Tais enzimas também podem degradar a lignina para a produção de ácido succínico, um produto químico de alto valor agregado aplicado em bebidas para melhorar o sabor (HONG et al., 2017).

Devido à não especificidade das ligninases, esses catalisadores podem ser aplicados na remoção de poluentes orgânicos com alto potencial redox, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), compostos farmacêuticos ativos (PHACs), pesticidas, corantes sintéticos e outros poluentes ambientais (HONG et al., 2017; SUNG; KHAN; KIM, 2019; TORRES-FARRADÁ et al., 2017). Uma lignina peroxidase excretada por *Ganoderma lucidum*, imobilizada em alginato, demonstrou a capacidade de descolorir entre 80 e 93% um corante têxtil, reduzindo a sua citotoxicidade hemolítica (SHAHEEN et al., 2017).

As ligninases também apresentam potencial para aplicação nas indústrias de cosméticos e dermatologia, sem efeitos colaterais, como por exemplo, no clareamento de manchas de pele (FALADE et al., 2017; SUNG; KHAN; KIM, 2019; ZHONG et al., 2015). Na indústria têxtil, as celulases são aplicadas para remover o excesso de corantes e microfibrilas que permanecem aderidas ao tecido de algodão, mesmo após vários ciclos de lavagem, também sendo utilizadas para restaurar a cor e a maciez das fibras, melhorando o aspecto físico dos tecidos (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

Enzimas lignocelulolíticas também podem ser usadas na produção de combustíveis de segunda geração, através do pré-tratamento enzimático da biomassa lignocelulósica, com o intuito de remoção da lignina, processo necessário para posterior hidrólise da celulose e hemicelulose, liberando açúcares que podem ser fermentados para geração de etanol (ZHANG et al., 2020). Na indústria de papel, as celulases e xilanases são empregadas no branqueamento da polpa de celulose, reduzindo o consumo de cloro e, conseqüentemente, os danos ambientais, além de melhorar o brilho da fibra (KUHAD et al., 2016; SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020). Esses catalisadores têm potencial para serem empregados no processo “*biopulping*” para obtenção da polpa de celulose na fabricação do

papel. Assim, essa técnica consiste na degradação da lignina, suavizando a madeira e obtendo um papel com mais resistência e qualidade (LÓPEZ; SILVA; SANTOS, 2017).

As celulasas também são utilizadas na produção de detergentes enzimáticos, que demonstram uma melhor ação de limpeza comparada aos detergentes tradicionais e, quando aplicadas nas roupas, diminuem os danos aos tecidos, além de melhorarem a cor e o brilho, por meio da remoção adequada de sujeira (LI; CHANG; LIU, 2018). Na agricultura, β -glucanases servem como inseticidas de patógenos vegetais de importância econômica, através da degradação da parede celular dos insetos (SINGH et al., 2016).

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis, pertencente à Coordenação de Tecnologia e Inovação (LCFC/COTEI), localizado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Campus I.

5.1. Material biológico

Neste estudo foram utilizadas as espécies *Ganoderma tropicum* (linhagem 1962), isolada na Amazônia (3°05'45.1"S 59°59'21.9"W, Petrópolis, Manaus – AM), e *Ganoderma lucidum* proveniente da Funghi & Flora. Ambas as espécies de cogumelos foram obtidas da Coleção de Culturas de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural-INPA. Como resíduos da agroindústria regional foram utilizadas sementes de açaí (*Euterpe* sp.), provenientes do despulpamento do fruto, cedidas por comerciantes locais da cidade de Manaus-AM, as quais foram lavadas, secas e trituradas (20 mesh), e serragem de marupá (*Simarouba amara* Aubl.), obtida em madeireiras locais, também seca e triturada. Os resíduos foram armazenados em temperatura ambiente até a utilização.

5.2. Fermentação em estado sólido do cogumelo

5.2.1. Matriz primária

Inicialmente, os fungos foram reativados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Ágar Batata Dextrose, Kasvi), com posterior incubação em câmara do tipo B.O.D., a 25 °C, por cerca de 7 dias ou até crescimento adequado no meio de cultura.

5.2.2. Matriz secundária

Discos de micélio (5 mm) da matriz primária foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, e incubados nas mesmas condições descritas anteriormente, até o desenvolvimento das colônias fúngicas.

5.2.3. “Semente” ou “spawn”

A matriz secundária serviu de inóculo para a produção da “semente” ou “spawn”. Para tanto, em frascos de plástico de 500 mL, foi adicionado 450 g de cada substrato a ser utilizado composto por 80% (m/m) de resíduo de semente de açaí ou serragem de marupá, acrescido de 2% (m/m) de carbonato de cálcio (CaCO₃) para correção do pH para 6,5, suplementado com

18% de uma mistura de farelos contendo arroz (60%), trigo (20%) e milho (20%). A umidade foi ajustada para 80% (m/v).

Posteriormente, esses frascos foram autoclavados a 121 °C, em 1 atm, durante 1 hora. Em seguida, foi inoculado 5% da matriz secundária nesses recipientes, com posterior incubação em B.O.D., a 25 °C, até a colonização fúngica. Os frascos colonizados pelo micélio foram utilizados como fonte de inóculo para os substratos da fermentação (SALES-CAMPOS et al., 2021).

5.2.4. Fermentação em estado sólido

Frascos de vidro de 250 mL contendo 50 g de substrato, preparado conforme descrito para o preparo do spawn, foram previamente autoclavados a 121 °C, em 1 atm, por 2 horas. Posteriormente, o “spawn” (5%), após miceliação completa do substrato (entre 30 e 50 dias), foi inoculado nesses recipientes. Os frascos foram envolvidos em sacos plásticos e fechados com esponjas, com posterior incubação em B.O.D., a 25 °C, durante um período total de 30 dias (SALES-CAMPOS et al., 2021).

5.3. Análise bromatológica das amostras

Foram realizadas análises, em triplicata, da composição centesimal dos substratos iniciais (sem a presença do inóculo fúngico) e dos substratos pós-fermentação, coletados ao final da fermentação (30 dias).

5.4.1. Determinação do pH

O pH foi determinado a partir de 1 g das amostras secas, antes e após fermentação, diluído em água destilada, utilizando um potenciômetro (medidor de pH) (IAL, 2008).

5.4.2. Determinação da umidade

A metodologia adotada para determinação do teor de umidade (U) foi a estabelecida por A.O.A.C. (2000). Para isso, 5 g de amostra foram secos em estufa por 5 horas, a 105 °C para obtenção da massa constante, após pesagem em balança analítica, esse valor foi utilizado na seguinte equação (1):

$$U (\%) = \frac{\text{Massa inicial da amostra} - \text{massa final da amostra}}{\text{Massa inicial da amostra}} \quad (1)$$

5.3.1. Cinzas

O teor de cinzas é uma medida referente ao conteúdo residual inorgânico, proveniente da queima da matéria orgânica em mufla a altas temperaturas (500-600 °C). Indica, principalmente, os valores dos resíduos minerais fixos (sódio, potássio, magnésio, cálcio, ferro, fósforo, cobre, cloreto, alumínio, zinco, manganês e outros compostos minerais) (ZAMBIAZI, 2010).

As análises foram realizadas em triplicata. Assim, em um cadinho, 2 g de cada amostra foram transferidos para uma mufla a 550 °C, onde permaneceram por 4 horas, até a completa carbonização e calcinação da matéria orgânica (A.O.A.C., 2000). Após esse período, as amostras calcinadas foram pesadas e os valores foram utilizados na seguinte equação, para obtenção do conteúdo de cinzas (2):

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{P3 - P1}{P2} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

P1= Massa do cadinho vazio (g);

P2= Massa da amostra inicial (g);

P3= Massa do cadinho + amostra calcinada (g).

5.3.2. Lipídios

Foi utilizada a metodologia Bligh and Dyer (CARVALHO; JONG, 2002) para a determinação dos lipídeos totais dos substratos. A quantificação de lipídeos está associada às propriedades físicas dessas moléculas, as quais podem ser não polares como glicerídeos (principalmente triacilglicerol) e colesterol, assim como lipídeos altamente polares, com destaque para alguns ácidos graxos livres. Assim, o isolamento desses compostos envolve o uso de vários solventes orgânicos e, a mistura dessas soluções deve ser adequadamente polar para dissolver lipídeos de natureza mais hidrofóbica, mas também não tão polar para ter afinidade com triacilgliceróis de natureza neutra (IVERSON; LANG; COOPER, 2001).

O primeiro método criado que partiu desse princípio foi estabelecido por Folch et al. (1957), onde foi utilizada uma mistura de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v). Bligh e Dyer (1959) estabeleceram uma metodologia baseada em Folch (1957), e se tornou um dos métodos mais recomendados para determinação de lipídios totais em tecidos biológicos, além de ser mais

vantajoso, uma vez que utiliza menores proporções dos solventes extratores, sob extração à frio.

Para a quantificação dos lipídeos totais, 3 g de amostra foram misturados com as soluções extratoras de clorofórmio (10 mL), metanol (20 mL) e água (8 mL), em um béquer de 100 mL, que foi agitado em um agitador rotativo por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio 1,5% e, a mistura foi deixada em repouso por 2 minutos, até que as camadas de gordura sejam separadas em funil de decantação. A camada superior foi descartada e 15 mL do líquido inferior foi transferido para um tubo Falcon contendo 1 g de sulfato de sódio anidro, posteriormente, esse líquido foi filtrado em um funil contendo papel filtro.

Foram transferidos 5 mL da solução obtida anteriormente para uma placa de Petri, com posterior secagem em estufa a 80 °C durante 20 minutos, para remoção dos solventes extratores. O componente residual foi resfriado em dessecador e pesado para obtenção da massa, que foi aplicada na seguinte equação (3), para determinação dos lipídeos totais:

$$\text{Lipídios totais (\%)} = \frac{\text{Massa dos lipídios (g)}}{\text{Massa da amostra (g)}} \times 4 \times 100 \quad (3)$$

Fator 4 = Quantidade de lipídeos que reagem com 5 ml do clorofórmio

5.3.3. Carbono

Para a quantificação do carbono inorgânico, foi adotado o método Walkley Black, conforme Mendonça e Matos (2005). Esta metodologia é um procedimento titulométrico, onde o carbono presente na amostra (0,010 g) é oxidado por uma solução oxidante íon dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) em ácido sulfúrico. O dicromato remanescente da oxidação, contendo o indicador difenilamina, foi titulado com uma solução de ferro reduzido ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), até obter o ponto de viragem.

Um ensaio em branco contendo 150 ml de água destilada, 5,0 ml de ácido fosfórico a 95% e 0,5 ml de difenilamina a 0,5% em ácido sulfúrico 1:4, foi realizado sempre antes do uso da solução de sulfato ferroso, para avaliar a sua concentração, devido à sua instabilidade.

Para o cálculo do teor de carbono foi utilizada a seguinte equação (4):

$$\% C = \frac{(\text{meq.g de } Cr_2O_7^{2-} - \text{meq.g de } Fe^{2+}) \times 0,003 \times (\% \text{ de matéria seca}) \times fd}{P} \quad (4)$$

Onde:

meq.g de $Cr_2O_7^{2-}$ = Volume de dicromato pipetado x normalidade da solução de dicromato

meq.g de Fe^{2+} = Volume de sulfato ferroso gasto na titulação x normalidade determinada pela prova em branco.

% umidade = Percentagem de matéria seca a 65/ 60 ° C

P = Peso da amostra tomado para a oxidação

fd = fator de diluição; normalmente 5,0 (cinco)

5.3.4. Nitrogênio total

O método de Kjeldahl (KJELDAHL, 1883) foi utilizado para determinação do nitrogênio total das amostras. Esta metodologia se baseia na transformação do nitrogênio presente na amostra, que através de digestão em ácido sulfúrico dará origem ao sulfato de amônio, este, por sua vez, após destilação em meio alcalino, será transformado em nitrogênio amoniacal. Após isso, o nitrogênio será quantificado por meio da titulação em ácido padronizado e multiplicado pelo fator adequado para transformação para proteína bruta.

O ensaio é dividido em três etapas: digestão, destilação e titulação.

- a) Digestão: em bloco digestor, foi adicionado 7 mL de ácido sulfúrico para 100 g de amostra, que foi aquecida 50 °C por 1 hora. Posteriormente, a temperatura foi elevada gradativamente até atingir 350 – 400 °C, quando o líquido se tornou azul-esverdeado, límpido e transparente, a reação foi finalizada e após resfriamento, 10 mL de água destilada foram adicionados à reação.

Durante esta etapa, o carbono foi transformado em dióxido de carbono (CO_2), o hidrogênio em água (H_2O) e o nitrogênio foi transformado em sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$).

- b) Destilação: a amostra em meio básico (NaOH 35%) foi destilada em destilador, e o produto dessa destilação foi recolhido em solução de ácido bórico 4% com 4 ou 5 gotas de indicador misto. Esta etapa objetiva a transformação do nitrogênio presente na solução sob a forma de sulfato de amônio (NH_4^+) para NH_3 gasoso. A partir do momento que o NaOH foi adicionado, ocorreu a liberação da amônia, esta, por sua

vez, foi separada da mistura por destilação. Este gás reagiu com o ácido bórico para formar o borato de amônio.

- c) Titulação: foi titulado o borato de amônio com uma solução de ácido sulfúrico padronizado até obter o ponto de viragem. Quanto maior o volume de ácido sulfúrico utilizado na titulação, maior a quantidade de nitrogênio encontrada na amostra. O volume da titulação foi utilizado para o cálculo da porcentagem de Nitrogênio (5).

$$\text{Nitrogênio (\%)} = \frac{V \times Fc \times 0,0014}{M} \quad (5)$$

Onde:

V = volume de HCl gasto na titulação, mL;

Fc = fator de correção do HCl;

M = massa da amostra (g).

5.3.5. Proteína bruta

O teor de proteína bruta presente nos substratos foi estimado por meio da multiplicação do valor de nitrogênio obtido na etapa anterior por um fator denominado de “fator de conversão Kjeldahl”, que no caso, foi o fator geral de 6,25, adotado para amostras em geral, o qual representa que as proteínas possuem 16% de nitrogênio (FURLANI; GODOY, 2005).

5.3.6. Fibras

Para quantificar as fibras insolúveis presentes nas amostras foi adotada a metodologia proposta por Van Soest (1960). Este método parte do princípio de que as plantas são constituídas por conteúdos celulares solúveis (lipídios, compostos nitrogenados, gorduras, amido e outros compostos solúveis em água) e insolúveis, que são as paredes celulares formadas por proteína insolúvel, hemicelulose, celulose e lignina. A partir disso, esse ensaio visa separar da fração solúvel, a fração insolúvel em detergentes neutros e ácidos, determinando a nomenclatura de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA).

O valor de FDN é referente à toda a parede celular, ou seja, celulose, hemicelulose e lignina, enquanto FDA quantifica somente celulose e lignina, assim, a diferença entre FDN e FDA é a presença ou não da hemicelulose (STELMOCK et al., 1985).

Para isso, 1 g de amostra foi pesado em cadinho filtrante de vidro e levado ao Extrator de Fibra Bruta - Modelo FIWE 6 - F30530200 (Velp Científica), onde foi adicionado 100 mL de solução FDN (lauril sulfato de sódio) e mantido sob ebulição durante 1 hora. Em seguida, foi realizada uma filtração à vácuo e a amostra lavada 3 vezes com água destilada fervente e 2 vezes com acetona P.A. gelada. Posteriormente, o material foi seco em estufa a 105 °C durante 24 horas, terminado esse processo, a amostra foi pesada em balança analítica, para determinar a massa de FDN. O mesmo procedimento foi adotado para a determinação de FDA, no entanto, a solução de FDN foi substituída por solução de FDA (ácido sulfúrico 1N).

A quantidade de fibras foi mensurada através da diferença de peso entre as amostras iniciais e finais, de acordo com as equações (6, 7, 8 e 9) abaixo:

Concentração FDN:

$$\%FDN_{asa} = \frac{FDN}{ASA} \times 100 \quad (6)$$

$$\%FDN_{ms} = \frac{\%FDN_{asa}}{\%ASE} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

$\%FDN_{asa}$ = percentual de fibras em detergente neutro com base na amostra seca ao ar

ASA = massa da amostra seca ao ar

$\%FDN_{ms}$ = percentual de fibras em detergente neutro com base na matéria seca

$\%ASE$ = percentual de amostra seca em estufa

Concentração FDA:

$$\%FDN_{asa} = \frac{FDA}{ASA} \times 100 \quad (8)$$

$$\%FDN_{ms} = \frac{\%FDA_{asa}}{\%ASE} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

$\%FDA_{asa}$ = percentual de fibras em detergente ácido com base na amostra seca ao ar

ASA = massa da amostra seca ao ar

$\%FDA_{ms}$ = percentual de fibras em detergente ácido com base na matéria seca

$\%ASE$ = percentual de amostra seca em estufa

Para estimar a quantidade de lignina presente na amostra, o material previamente tratado com as soluções de FDN e FDA, foi transferido novamente para o extrator de fibra, onde foi acrescido uma solução de permanganato de potássio (50 g/L), ficando em contato com a amostra por 1 hora. Posteriormente, a amostra foi filtrada, e uma solução desmineralizante ($H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$, dissolvido em etanol 95%) adicionada, permanecendo em contato com o material por 30 minutos ou até o seu branqueamento. Em seguida, a amostra foi lavada 3 vezes com álcool 80% e 2 vezes com acetona P.A., com posterior secagem em estufa a 105 °C por 24 horas e pesagem em balança analítica para obtenção o valor da lignina.

A amostra obtida nas etapas anteriores foi calcinada em mufla a 550 °C por 4 horas e pesada após resfriamento em dessecador, obtendo-se por diferença de peso o valor da celulose.

5.3.7. Carboidratos totais e disponíveis

Para o cálculo da porcentagem dos carboidratos totais (CT), foi utilizada a equação proposta por Sniffen et al. (1993), que calcula tanto as frações que são potencialmente degradáveis (carboidratos disponíveis) e as que incluem as fibras insolúveis, não degradáveis (carboidratos totais). Para isso, foi obtida a diferença (100 g) da umidade total pela concentração de proteína, lipídios e cinzas obtidas e, expresso em percentual (NEPA, 2006), através das seguintes equações (10 e 11):

$$\text{Carboidratos totais} = 100 - \text{umidade} - \text{proteína bruta} - \text{lipídeos} - \text{cinzas} \quad (10)$$

$$\text{Carboidratos disponíveis} = 100 - \text{umidade} - \text{proteína bruta} - \text{lipídeos} - \text{cinzas} - \text{Fibras} \quad (11)$$

5.3.8. Determinação de Macro e Micro minerais

A técnica analítica de espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) foi utilizada para determinação dos macros (N, K, Ca, Mg, P e S) e micronutrientes (Cl, Fe, B, Mn, Zn, Cu e Mo) dos resíduos antes e após a fermentação.

O detector de EDS utilizado foi acoplado a um microscópio eletrônico de varredura (MEV). Esse sistema se baseia no bombardeio da amostra com um feixe de elétrons de alta voltagem que, como consequência, emitirá raios-x característicos de cada elemento proveniente das amostras, permitindo, assim, caracterizar quimicamente o material analisado (COLPAN; NALBANT; ERCELIK, 2018).

5.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliação de porosidade e alterações morfológicas decorrentes da miceliação fúngica foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, amostras secas em estufa foram transferidas para stubs de alumínio, por meio da adesão a uma fita de carbono dupla face, com posterior metalização com cerca de 20 nm de uma camada condutiva de ouro utilizando o metalizador JEOL Smart Coater. Após metalização, os substratos antes e após a fermentação foram caracterizados estruturalmente através de obtenção de micrografias no microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM IT500HR, utilizando uma aceleração de voltagem de 5 kV, nos modos de elétrons secundários. Foram obtidas micrografias em diferentes aumentos: 130x, 750x, 800x, 1300x, 1400x e 2500x.

5.5. Preparo do extrato enzimático

5.5.1. Celulases

Para a obtenção dos extratos enzimáticos das celulases, foram coletados frascos da fermentação a cada 2 dias, em triplicata, durante um período total de 30 dias (0 a 30 dias). Para isso, 4,5 g de amostra foram submetidos às extrações em 25 mL em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) em shaker orbital a 100 rpm, 10 °C, durante 1 hora. Posteriormente, o conteúdo dos frascos foi filtrado e centrifugado a 5000 rpm, à 10 °C, durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados em freezer a -20 °C, até a realização das determinações de atividade enzimática (OLIVEIRA et al., 2022).

5.5.2. Ligninases

Para a obtenção dos extratos enzimáticos referente às enzimas ligninolíticas, foram coletados frascos da fermentação a cada 2 dias, em triplicata, durante um período total de 30 dias (0 a 30 dias), para obtenção da cinética de produção enzimática em relação ao tempo de crescimento do fungo. Para isso, as amostras de cada tempo (4,5 g) foram submetidas às extrações enzimáticas em 25 mL de água destilada, sob agitação a 160 rpm em shaker orbital a 10 °C, durante 40 minutos. Posteriormente, o material foi filtrado e centrifugado a 1500

rpm, durante 30 min. Os extratos foram armazenados em freezer a -20 °C até as determinações das atividades enzimáticas (OLIVEIRA et al., 2022).

5.6. Determinação da atividade de celulases

5.6.1. Endoglucanases (CMCases - carboximetilcelulases)

A metodologia descrita por Grose (1987) também foi adotada para a realização do ensaio que visa quantificar a atividade das endoglucanases. A carboximetilcelulose (CMC) 4%, em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) foi o substrato da reação enzimática, onde a mistura reacional foi composta por 500 µL de CMC e 500 µL do extrato enzimático. A mistura foi incubada em banho maria a 50 °C, durante 10 minutos. Após incubação, 250 µL do extrato enzimático foi adicionado a 250 µL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), para quantificação dos açúcares redutores liberados durante a hidrólise do substrato (metodologia descrita no item 5.7.3).

5.6.2. Celulases totais (FPase - Filter Paper-ase)

As exoglucanases foram mensuradas de acordo com o método proposto por Ghose (1987). Para isso, a reação enzimática foi composta por um disco (~50 mg) de papel filtro quantitativo *Whatman* nº 1 (ensaio de FPase ou Filter Paper-ase), o qual foi o substrato a ser hidrolisado, juntamente com 1 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 5,0) e 500 µL do extrato enzimático. A mistura reacional reagiu por 60 minutos, a 50 °C, até ser utilizada no método de DNS, para a quantificação da atividade enzimática, conforme o item 5.7.3.

5.6.3. Quantificação de açúcares redutores

O método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi adotado para a quantificação dos açúcares redutores liberados durante a hidrólise da celulose do papel filtro e da carboximetilcelulose pelos extratos enzimáticos. Com isso, foi possível determinar a atividade das celulases totais e endoglucanases, expressa em µmol de produto liberado/ minuto (U/g).

Para esse ensaio, 250 µL da mistura reacional obtida nos ensaios anteriores e 250 µL de DNS foram incubados em banho maria a 100 °C, por 5 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida por resfriamento em banho de gelo e, realizada a leitura das absorvâncias a 540 nm. O teor de açúcares redutores foi determinado a partir de uma curva padrão com glicose (MILLER, 1959).

O branco da reação foi composto de 250 µL de uma solução de CMC 4% para endoglucanases e 250 µL de tampão citrato de sódio para exoglucanases. Para o cálculo das

endo e exoglucanases foi utilizada a seguinte equação, variando apenas o tempo e volume do extrato enzimático utilizado em cada ensaio (12):

$$U/mL = \frac{\text{diluição} * x \Delta Abs x Fator ** \left(\frac{umol}{mL}\right) x VolM (mL)}{\text{tempo (min)} x Vol do sobrenadante (mL)} \quad (12)$$

Onde:

* Apenas se for necessário diluir o sobrenadante (solução de enzima)

** Fator obtido da curva padrão

ΔAbs : absorbância obtida no ensaio de DNS

VolM: volume total da reação utilizada na atividade da exoglucanase ou endoglucanase

Tempo (min): tempo total da reação na atividade da exoglucanase ou endoglucanase

Vol do sobrenadante (mL): volume do extrato enzimático usado na atividade da exoglucanase ou endoglucanases.

5.7.Determinação da atividade de ligninases

5.7.1. Lacase

A atividade de lacase foi determinada segundo metodologia de Wolfenden e Willson (1982), por meio do monitoramento da oxidação do 2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) pelo extrato enzimático a 25°C, em pH 5,0. Os ensaios da atividade de lacase foram realizados em microplacas de 96 poços, contendo 135 µL de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5; 30 µL de ABTS 5 mM e 135 µL de extrato enzimático. A oxidação do ABTS foi mensurada através de leituras em leitora de microplacas (Multidetecção Híbrido Synergy™ H1) a 420 nm.

As absorbâncias foram lidas a cada 5 segundos, em um intervalo de tempo total de 60 segundos, para obtenção da velocidade máxima da enzima, utilizada no cálculo da determinação da concentração enzimática, segundo a equação abaixo (13), onde o resultado foi expresso em U/mL. Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima livre ou imobilizada necessária para oxidar 1 µM de substrato por minuto.

$$U. mL^{-1} = \frac{Abs \times 60 \times V \text{ total} \cdot 10^6}{\epsilon \times V \text{ amostra}} \quad (13)$$

Onde:

t= 60 segundos

10^6 = conversão de mol para μmol (1.000,000)

ϵ = Ácido 2,2'-azino-bis[3-etil-benzothiazolino-6-sulfônico] (ABTS) = 36,000

5.7.2. Peroxidases totais

A atividade da peroxidase total foi estimada conforme a metodologia descrita por Heinzkill et al. (1998), por meio da oxidação 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) pelo H_2O_2 (cofator da reação enzimática) a 25 °C, em pH 5.

Para isso, o ensaio enzimático foi realizado em microplacas de 96 poços, contendo 135 μL de extrato enzimático; 105 μL de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5, 30 μL de H_2O_2 e 30 μL de ABTS 5 mM. A oxidação do álcool veratrílico foi monitorada em leitora de microplacas, através de leituras espectrofotométricas a 420 nm, a cada 5 segundos, em um intervalo de tempo total de 60 segundos, para a obtenção da velocidade máxima da enzima, utilizada na determinação da concentração enzimática, expressa em U/mL, por meio da utilização da equação abaixo (14).

$$U. mL^{-1} = \frac{Abs \times V \text{ total} \cdot 10^6}{\epsilon \times V \text{ amostra}} \quad (14)$$

Onde:

t= 60 segundos

10^6 = conversão de mol para μmol (1.000,000)

ϵ = Ácido 2,2'-azino-bis[3-etil-benzothiazolino-6-sulfônico] (ABTS) = 36,000

5.8. Estabilidade enzimática

5.8.1. Estabilidade térmica

O ensaio da estabilidade enzimática frente à variação de temperatura, dos melhores tempos de produção enzimática (tempos com maiores atividades enzimáticas), foi realizado

de acordo com a metodologia descrita por Oliveira et al. (2018). Para tanto, 250 µL do extrato enzimático foi incubado por 3 horas em banho maria em uma faixa de temperatura de 30 a 70 °C, com intervalos de 10 °C. Foram retirados 3 pontos amostrais a cada 1 hora de incubação em cada faixa de temperatura, os quais foram submetidos a quantificações das atividades enzimáticas de acordo com as metodologias descritas nos itens 5.6 e 5.7. A atividade enzimática na temperatura ótima foi assumida como 100% e foi utilizada como valor referencial para o cálculo dos demais valores percentuais de atividade enzimática residual.

5.8.2. Estabilidade das enzimas na presença de íons metálicos

A metodologia utilizada para determinação da estabilidade dos melhores tempos de produção enzimática perante íons metálicos foi a descrita por Dias et al. (2002). O extrato enzimático foi incubado na proporção 3:1 (v/v) com diferentes soluções de íons, durante 30 minutos e nas temperaturas ótimas de cada enzima. As soluções metálicas nas concentrações de 10 mM que foram utilizadas no ensaio são: sulfato de magnésio ((MgSO₄ (Mg²⁺))); sulfato de manganês ((MnSO₄ (Mn²⁺))); sulfato de ferroso II ((FeSO₄ (Fe²⁺))); sulfato de cobre ((CuSO₄ (Cu²⁺))); sulfato de zinco ((ZnSO₄ (Zn²⁺))) e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Terminado o período de incubação, as atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com os métodos descritos nos itens 5.6 e 5.7.

5.8.3. Estabilidade de pH das enzimas

O método descrito por Oliveira et al., (2018) foi adotado para realizar o ensaio de estabilidade de pH dos melhores tempos de produção enzimática (tempos com maiores atividades enzimáticas). As amostras foram incubadas em diferentes tampões, com pH variando de 2 a 10. Os tampões que foram utilizados nas reações são: glicina-HCl (2,0 a 3,0), acetato de sódio (4,0 a 5,0), fosfato de sódio (6,0 a 8,0) e glicina-NaOH (9,0 a 10,0).

Para a realização do ensaio, 250 µL de amostra e 250 µL de cada tampão foram incubados em banho maria à 25 °C, durante 1 hora. Terminado o período de incubação, as atividades de cada enzima foram determinadas de acordo com os métodos descritos nos itens 5.6 e 5.7. A atividade enzimática inferida no ensaio com pH ótimo da enzima foi utilizada como referencial para o cálculo para os demais valores de pH.

5.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O perfil proteico dos extratos brutos dos melhores tempos de produção de enzimas lignocelulolíticas, provenientes dos maiores picos de produção enzimática para cada condição de fermentação, foi obtido a partir da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme Laemmli (1970). Para isso, as amostras foram ressuspensas em tampão Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8) contendo 1% de SDS, 10% de glicerol, 1% de β -mercaptoetanol e 0,1% de azul de bromofenol, sendo, posteriormente, imersas em água em ebulição por 10 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida (15%).

A corrida eletroforética foi executada em uma cuba vertical de eletroforese (Bio-Rad), em tampão de corrida composto de Tris-HCl (25 mM), glicina (0,192 M) e SDS (0,1% m/v), aplicando-se uma voltagem de 200 volts e corrente elétrica de 15 mA por gel, durante três horas. Marcadores de peso molecular, na faixa de 10 a 225 kDa (Promega), foram utilizados para a estimativa da massa molecular das proteínas separadas no gel. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250, ácido acético (0,1% v/v), etanol e água destilada (1:4:5 v/v/v), por 2 horas e, posteriormente, descorados em uma solução contendo ácido acético glacial, etanol e água destilada (1:4:5 v/v/v).

5.9. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 4, compreendendo 2 resíduos lignocelulósicos, 2 espécies de *Ganoderma* e 4 enzimas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) (One way), e as médias comparadas entre si por meio do teste de Tukey. As análises estatísticas foram executadas utilizando o software Sisvar versão 5.6.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Análise físico-química dos substratos iniciais e pós-fermentação

Dentre os resíduos utilizados para a fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum*, o substrato à base de sementes de açaí apresentou valores mais ácidos de pH, em comparação com a serragem de marupá. Adicionalmente, houve diferenças estatísticas significativas do pH nos substratos ao final das fermentações, ocorrendo acidificação do meio, sendo os valores mais ácidos encontrados nos substratos à base de marupá, após o crescimento de *G. lucidum* e *G. tropicum*, com redução do pH de 25 e 36%, respectivamente (Tabela 1).

Devido à presença de ácidos graxos da cadeia curta, os resíduos lignocelulósicos possuem pH baixo, apresentando, predominantemente, valores dentro da faixa ácida (VILLAS-BÔAS; ESPOSITO; MITCHELL, 2002; KOUTROTSIOS et al., 2014; XIROS; SHAHAB; STUDER, 2019; SOLANILLA-DUQUE; SALAZAR-SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ HERRERA, 2021). Aguiar et al. (2021) estudaram diferentes substratos e métodos de desinfecção no cultivo de *P. ostreatus* e encontraram pH de 5,69 para sementes de açaí, ao passo que Maciel-Silva, Mussatto e Forster-Carneiro (2019) obtiveram o valor de 6,11. Sales-Campos et al. (2010) relatam pH de 6,7 para serragem de marupá. Dessa maneira, os dados de pH dos resíduos utilizados nesse estudo corroboram com o descrito na literatura para materiais lignocelulósicos.

Atila (2020) estudou diferentes substratos lignocelulósicos no cultivo de *G. lucidum*, em uma faixa de pH que variou entre 4,43 e 6,42, concluindo que esses valores foram adequados para o desenvolvimento dessa espécie. Postemsky et al. (2017) obtiveram sucesso no desenvolvimento de *G. lucidum* em resíduo de arroz e cascas de sementes de girassol, com pH de 6,7 e 6,0, respectivamente. Costa et al. (2019) constataram a capacidade de bioconversão de arroz vermelho (*Oryza sativa*) por *G. lucidum* em pH variando de 4,44 a 6,07, corroborando com os dados de Jayasinghe et al. (2008), que determinaram uma faixa ótima de crescimento micelial de *G. lucidum* entre 4 e 9.

Tabela 1. Análises físico-químicas dos substratos iniciais e após a fermentação (30 dias) de *G. lucidum* e *G. tropicum*, em resíduos de sementes de açaí e serragem de marupá.

Resíduos			pH	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Carbono (%)	Nitrogênio (%)	C/N*	Proteína bruta (%)
Substrato inicial			5,39 Ab ± 0,00	51,00 Ba ± 0,40	5,40 Ba ± 0,21	3,35 Aa ± 0,00	60,73 Ab ± 0,00	0,77 Ba ± 0,77	78,88 Ab ± 0,00	4,81 Ba ± 0,00
Açaí	Substrato pós-fermentação	<i>G. lucidum</i>	5,07 Ba ± 0,01	-	2,57 Cd ± 0,25	1,15 Bc ± 0,04	54,92 Ba ± 0,00	0,73 Cb ± 0,72	74,96 Ba ± 0,82	4,57 Cb ± 0,05
		<i>G. tropicum</i>	4,81 Cb ± 0,00	-	6,03 Aa ± 0,14	1,12 Bc ± 0,02	51,69 Ad ± 0,00	0,79 Aa ± 0,79	64,77 Cd ± 0,00	4,98 Aa ± 0,00
Substrato inicial			5,92 Aa ± 0,00	52,91 Ba ± 0,49	5,19 Aa ± 0,16	2,26 Ab ± 0,07	62,676Aa ± 0,64	0,42 Cb ± 0,42	147,64 Aa ± 4,15	2,65 Cb ± 0,05
Marupá	Substrato pós-fermentação	<i>G. lucidum</i>	4,43 Bc ± 0,00	-	4,40 Bc ± 0,27	1,33 Cb ± 0,05	53,41 Bb ± 0,37	0,72 Ab ± 0,73	73,37 Bb ± 0,51	4,55 Ab ± 0,00
		<i>G. tropicum</i>	3,78 Cd ± 0,00	-	5,17 Ab ± 0,17	1,76 Ba ± 0,11	50,18 Cc± 0,37	0,70 Bc ± 0,70	71,69 Bc ± 0,53	4,37 Bc ± 0,00

Letras maiúsculas comparam todas as amostras dentro de um mesmo resíduo e letras minúsculas comparam entre os substratos iniciais e substratos após a fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum*. Nível de significância $p < 0,05$. *Carbono/Nitrogênio

Os teores iniciais de umidade (51 e 52,91% para sementes de açaí e serragem de marupá, respectivamente) dos substratos utilizados nesse estudo estão de acordo com o descrito por Chang e Miles (2004) que determinaram que a umidade do meio deve variar entre 50 e 75% para o cultivo de cogumelo, no entanto, a faixa ótima de desenvolvimento fúngico está em torno de 60 a 65% (MAHARI et al., 2020). Aguiar et al. (2022) obtiveram valores semelhantes de umidade (52,44%) para semente de açaí e 72,51% para serragem de marupá, respectivamente.

O processo de colonização do substrato envolve a projeção e penetração das hifas na biomassa vegetal e isso pode estar diretamente associado ao teor de umidade, pois quando o nível é inferior ao ideal, a solubilidade dos nutrientes no substrato é reduzida, dificultando a absorção pelas hifas. Todavia, quantidades excessivas de água podem formar uma espessa camada líquida, que ocasionará uma aglomeração de partículas de substrato, dificultando a passagem de ar e das hifas (DESWAL; KHASA; KUHAD, 2011; YOON et al., 2014).

Valores de umidade inferiores a 60% e superiores a 80% não propiciam as melhores condições para o desenvolvimento fúngico, bem como para a produção enzimática (Orzua et al. 2009). Revankar, Desai e Lele (2007) ao realizarem a fermentação em estado sólido de *G. lucidum* em farelo de trigo, visando a produção de lacases, encontraram o valor de 70% de umidade do substrato de cultivo como o ideal para excreção dessa enzima pelo fungo. No entanto, há trabalhos que avaliam teores de umidade inferiores a 50% para obtenção de enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido, como é o caso de Aita et al. (2019) que avaliaram teores iniciais de umidade que variavam de 40 a 80% no cultivo de *Metarhizium anisopliae*, em resíduos de milho e farelo de soja, e constataram produção máxima de celulases na umidade inicial de 40%.

Desta forma, os dados de umidade dos substratos iniciais no presente estudo estão abaixo do recomendado na literatura, contudo, ainda foi possível observar miceliação e produção enzimática, sugerindo que o ajuste dessa variável poderá estimular ainda mais a colonização do substrato e, conseqüentemente, a secreção de enzimas lignocelulolíticas.

Em relação às cinzas, de modo geral, *G. lucidum* promoveu uma redução no percentual de cinzas após a fermentação dos substratos à base de açaí e marupá, ao passo que *G. tropicum* elevou os níveis de cinzas quando cultivado em resíduos de açaí (Tabela 1). É importante ressaltar que, o conteúdo de cinzas corresponde ao resíduo sólido inorgânico, como minerais, silicatos, carbonatos, fosfatos, cálcio, magnésio, sódio, potássio, dentre outros resultantes da

queima de todos os componentes orgânicos (SALES-CAMPOS et al., 2011; VASSILEV et al., 2010).

Valores semelhantes foram encontrados por Aguiar et al. (2022) para sementes de açaí, em que obtiveram teor de cinzas de 5,69%. No entanto, valor inferior foi constatado para serragem de marupá, em que os autores relataram uma concentração de 3,68%. Sales-Campos et al. (2010), ao estudar serragem de marupá suplementada com farelo de trigo, milho e arroz, inferiram o valor de 2,99% de cinzas.

Essa diferença pode estar associada à procedência do material, visto que as plantas apresentam variação na sua composição nutricional em função do tipo de solo em que crescem (EL-NAGGAR et al., 2019; NEINA, 2019; PINTO et al., 2014), bem como o período de coleta do resíduo e/ou mudanças de temperaturas também podem interferir na composição química (DE LIMA et al., 2021). Dessa forma, com a diminuição do conteúdo mineral neste estudo, pode-se pressupor que *G. lucidum* e *G. tropicum*, quando inoculados em serragem de marupá e sementes de açaí possuem preferência em metabolizar a matéria inorgânica, degradando o conteúdo orgânico com menos eficiência.

Os substratos à base de sementes de açaí e serragem de marupá apresentaram teores de lipídeos na ordem de 3,6 e 2,3%, respectivamente (Tabela 1). Após a fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum* em açaí, foi possível observar o consumo de lipídeos nos substratos em 66% para ambos os fungos, ao passo que em marupá, a redução do teor de lipídeos foi de 41% para *G. lucidum* e de 22% para *G. tropicum* (Tabela 1).

Comparando os teores de lipídeos com o trabalho de Aguiar et al. (2021), o substrato à base de açaí apresentou 1,32% de lipídios, sem nenhum tipo de suplementação. Enquanto Maciel-Silva, Mussatto e Forster-Carneiro (2019) relatam conteúdo de 3,33% de lipídios para sementes de açaí, corroborando com os dados desse estudo. Adicionalmente, Sales-Campos et al. (2010) ao estudarem as mesmas formulações de farelos, para suplementação da serragem de marupá encontraram 1,81% de conteúdo lipídico.

Shen et al. (2019), após 11 dias de fermentação por *G. lucidum* no substrato à base de okara (resíduo da formulação do leite de soja) observaram diminuição significativa de lipídeos, de 19,69% para 12,29%. Aguiar et al. (2022) ao cultivarem *P. ostreatus* em resíduos de plantas verificaram redução do conteúdo lipídico nos diferentes substratos, incluindo sementes de açaí (redução de até 63%) e serragem de marupá (redução de até 21%), após a fermentação do

cogumelo. Silva et al (2013) identificaram decréscimo das porcentagens de lipídeos em resíduos dos frutos de guavira e pequi após 20 dias de cultivo de *P. sajor-caju*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Nitayapat et al. (2015) que notaram redução de 32% do teor de gordura de resíduo de tangerina após bioconversão de *Lentinus polychrous*. *P. ostreatus* também foi relatado como redutor de 69% dos lipídeos de palha de banana (SILVEIRA; FURLAN; NINOW, 2008). É relatado que os fungos utilizam os lipídios como fonte energética para o desenvolvimento de biomassa como constituintes de fosfolipídios de membrana (DULF et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2011). A utilização de lipídios como fonte energética pelo fungo é um indicativo de preferência pela fração solúvel do substrato, mais facilmente metabolizável (HIDAYAT et al., 2022).

Os substratos iniciais apresentaram teor de carbono (C) na ordem de 60%, com redução de cerca de 15% após a fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum*. Em contrapartida, observou-se incremento das concentrações de nitrogênio em relação ao controle, exceto para *G. lucidum* quando cultivado em sementes de açaí, com um decréscimo de 5%. Os níveis mais elevados de nitrogênio nas amostras, em relação ao controle, foram os detectados no substrato composto de serragem de marupá, com aumento de 71 e 65% para *G. lucidum* e *tropicum*, respectivamente (Tabela 1).

O aumento no teor de nitrogênio pode ser decorrente da presença de micélio no substrato após a fermentação, pois há a presença de quitina na parede celular fúngica, a qual possui nitrogênio em sua composição, além disso, o fungo produz diversas proteínas relacionadas ao seu metabolismo, também responsáveis pelo aumento no teor desse elemento químico (ÖZTÜRK; ATILA, 2021). Apesar de o fungo utilizar o nitrogênio do meio para o seu desenvolvimento, devido aos fatores citados anteriormente, não há como mensurar o consumo de nitrogênio ao longo da fermentação. Em contrapartida, a quantidade de carbono do meio diminui à medida que se cultiva o cogumelo, como resultado da degradação da lignocelulose. Assim, devido à essa elevação dos níveis de nitrogênio e decréscimo da quantidade de carbono, há também diminuição da relação C/N (ÖZTÜRK; ATILA, 2021).

Aguiar et al. (2021) detectaram 0,45% de nitrogênio e 51,60% de carbono em sementes de açaí sem nenhum tipo de suplementação, já o substrato à base de serragem de pinus apresentou menor quantidade de nitrogênio e maior concentração de carbono, com 0,15% e 54,37%, respectivamente. Sales-Campos et al. (2010) constataram que a serragem de marupá,

suplementada com uma mistura de farelos arroz (60%), trigo (20%) e milho (20%), apresentou teor de 0,49% de nitrogênio e 44,39% de carbono. Aguiar et al. (2022), ao estudarem resíduos de plantas como substrato para o desenvolvimento de *P. ostreatus*, obtiveram teores de 1,44% e 0,51% de nitrogênio e 44,12% e 53,60% de carbono para semente de açaí e serragem de marupá, respectivamente, ambas suplementadas com 75% de farelo de arroz, 20% de trigo e 5% de milho. Maciel-Silva, Mussatto, Forster-Carneiro (2019) descreve sementes de açaí como pobres em nitrogênio (menos de 1%), dados esses que corroboram com os achados deste estudo.

De Lima et al. (2021), ao realizarem caracterizações físico-químicas do resíduo de açaí (semente e fibra) a fim de avaliar o potencial de produção de energia e bioprodutos, concluíram que esse material possui baixas concentrações de nitrogênio, necessitando de fontes adicionais, caso seja aplicado como substrato para cultivo de organismos. Alves et al. (2021) ao estudarem as sementes de açaí após processo de pirólise obtiveram níveis de 1,79% de nitrogênio.

A quantidade de nitrogênio presente no meio influencia diretamente o comportamento fúngico, uma vez que elevadas concentrações desse elemento dificultam a degradação da lignina e, por consequência, reprimem o acesso do fungo aos outros componentes da parede lignocelulósica, retardando, assim, o desenvolvimento micelial (DONINI et al., 2005). No entanto, há também estudos que relatam que o aumento do teor de nitrogênio, principalmente o orgânico, através de suplementação do substrato pode aumentar a eficiência biológica do cogumelo, indicando que diferentes espécies de fungos requerem quantidades distintas de nitrogênio (KOUTROTSIOS et al., 2014).

Diro, Daba e Temam (2021) estudaram a produção de celulases por *Pleurotus ostreatus* utilizando diferentes substratos lignocelulósicos, fontes de nitrogênio e condições físico-químicas, chegando à conclusão de que a origem e as concentrações da suplementação de nitrogênio afetavam diretamente a produção de celulases, sendo o nitrogênio orgânico mais eficiente na estimulação da produção dessas enzimas. Economou, Diamantopoulou e Philippoussis (2017) observaram que substratos com baixas relações C/N (maior teor de nitrogênio) induziram o aumento da formação de micélios de *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *L. edodes*, *G. adspersum* e *G. resinaceum* e, conseqüentemente, a produção de lacases.

A suplementação do meio com matéria orgânica rica em nitrogênio propicia um ambiente mais adequado para o desenvolvimento de macromicetos, permitindo, também, maior produção de lacases e peroxidases degradadoras da lignina (KOUTROTSIOS et al., 2014). Kurt e

Buyukalaca (2010) constataram que houve uma correlação positiva entre a excreção de lacase e carboximetilcelulasase por *P. ostreatus*, cultivado em substrato com maiores suplementações com farelo de trigo.

De modo geral, os valores totais de nitrogênio nos substratos em questão foram relativamente baixos (menores que 1%) e os teores de carboidratos (fontes de carbono) foram substancialmente altos (acima de 50%), favorecendo, assim, o estabelecimento de uma elevada relação Carbono:Nitrogênio, sendo superior a 70, com destaque para o substrato inicial à base de marupá (Tabela 1).

Valores altos de C/N podem desacelerar a formação de micélios no substrato e quantidades ínfimas ocasionam a inibição de alguns processos metabólicos (MACIEL-SILVA; MUSSATTO; FORSTER-CARNEIRO, 2019). Há comprovações de que a relação C/N inferior a 50 não permite que o fungo colonize o substrato por completo, além de não fornecer condições ideais para a secreção de enzimas degradadoras da lignocelulose (HSIEH; YANG, 2004; RASHAD et al., 2019; SOLANILLA-DUQUE; SALAZAR-SÁNCHEZ; RODRÍGUEZ HERRERA, 2021). Diante disso, as relações C/N encontradas no presente trabalho estão entre os valores ideais para obtenção de uma boa taxa de miceliação fúngica. No entanto, há dados controversos sobre a relação mais adequada de C/N para o desenvolvimento de macromicetos. Segundo Philippoussis (2009), a produção de enzimas lignolíticas foi estimulada em meio contendo maiores concentrações de C/N, em contrapartida, houve desaceleração do crescimento micelial. O substrato rico em nitrogênio também induziu a maior atividade lignolítica tanto para o gênero *Pleurotus*, (KNOP; YARDEN; HADAR, 2015) quanto para *Ganoderma* (DE MENEZES et al., 2016).

Nesse sentido, para cada espécie de cogumelo há quantidades ideais de C/N, onde para *G. lucidum* a razão ótima de C/N varia entre 70/1 e 80/1 (Hsieh e Yang (2004)). Dentre os substratos utilizados nesse estudo, o substrato com valor mais próximo ao ideal foi o à base de açáí. Contudo, Atila (2020) observou desenvolvimento de primórdios de *Ganoderma lucidum* em meio com proporções de C/N menores que 10 e maiores rendimentos de miceliação em C/N superior a 290.

Sales-Campos et al. (2010) ao realizarem caracterizações físico-químicas de resíduos madeireiros e agroindustriais da Amazônia, para o cultivo de *Pleurotus ostreatus*, verificaram que a serragem de marupá apresenta baixos teores de nitrogênio (0,29%), resultando em alta

relação C/N (161,39), sendo necessária a suplementação com farelos, ajustando a razão C/N para 90,59. Esses resultados corroboram com os achados de Chang e Miles (1989) que afirmam que tecidos lenhosos apresentam baixas quantidades de nitrogênio (0,03-1%), em comparação com herbáceas (0,58-1,71%), ocasionando níveis de C/N superiores a 150. Assim, os valores de carbono e nitrogênio encontrados nesse estudo para serragem de marupá estão na faixa descrita na literatura.

Maciel-Silva, Mussatto e Forster-Carneiro (2019) caracterizaram a biomassa residual do processamento do açaí para possíveis aplicações como produto energético de valor agregado e constataram a relação C/N superior a 35 para as sementes do fruto, já Teixeira et al. (2005) obteve uma relação de 48. Valores estes inferiores aos detectados no presente trabalho, este fato pode estar relacionado à suplementação do substrato com farelos vegetais, que tem como objetivo afetar diretamente o conteúdo de C/N, aumentando a produtividade do crescimento fúngico, bem como a excreção de enzimas lignocelulolíticas (CARRASCO et al., 2018; KOUTROTSIOS et al., 2014).

No que diz respeito à proteína bruta o substrato inicial à base de açaí apresentou teor proteico cerca de duas vezes superiores comparado a marupá. Após o crescimento dos fungos em açaí, observou-se estabilidade do teor proteico, com baixa redução de proteínas por *G. lucidum* e, pequeno incremento desse parâmetro por *G. tropicum*. Ao passo que, no substrato à base de marupá, houve um expressivo incremento de proteínas por *G. lucidum* e *G. tropicum* (Tabela 1).

Sementes de açaí são relatadas pobres em conteúdo proteico, variando entre 4% e 7% (RODRIGUES FILHO et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2015; BUFALINO et al., 2018; DE LIMA et al., 2021). Maciel-Silva et al. (2019) obtiveram teor de proteína de 5,27% para sementes de açaí, sem nenhum tipo de suplementação. Enquanto, Aguiar et al. (2022) descrevem valores de 9,01% de proteína bruta para sementes de açaí e 3,20% para serragem de marupá, suplementados com uma mistura de farelos. Sales-Campos et al. (2010) detectaram 1,75% de proteína bruta em serragem de marupá, sendo necessária a adição de uma formulação à base de farelos de arroz (60%), trigo (20%) e milho (20%), aumentando os teores proteicos para 3,06%, dados esses que vão de encontro ao obtido nessa pesquisa.

O aumento no conteúdo de proteína bruta após o cultivo de cogumelos pode estar associado à proteína fúngica produzida durante a fermentação, decorrente da hidrólise dos carboidratos do meio, gerando uma fonte de carbono para a síntese de micélios primários e

secundários ricos em proteína (NASEHI et al., 2017; ZERVAKIS et al., 2012). Adicionalmente, a presença de proteínas no meio de crescimento fúngico é fundamental para a devida atividade enzimática do fungo, tanto para a produção de enzimas responsáveis pela degradação do substrato, quanto para as relacionadas ao desenvolvimento micelial (ATOJI-HENRIQUE et al., 2017).

Atoji-Henrique et al. (2017), realizando o cultivo sólido de *G. lucidum* em casca e resíduo de soja e de milho perceberam que o excesso de proteína bruta (40% para resíduo de soja) não foi favorável ao desenvolvimento de *G. lucidum*, o qual obteve condições propícias para o seu desenvolvimento nos substratos contendo entre 10 e 11% de proteína bruta em sua composição (casca de soja e resíduos de milho, respectivamente). Zhou et al. (2015) constataram bom crescimento de *G. lucidum* em batata contendo 4,4% de proteína. Zilly et al. (2012) avaliaram a produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas por *G. lucidum*, em resíduos de maracujá e farelo de trigo, com 7,75 e 16,12% de proteína bruta, respectivamente. Os autores concluíram que esse microrganismo foi capaz de se desenvolver em ambos os substratos, com produção de lacases semelhantes, no entanto, o farelo de trigo estimulou a excreção de manganês peroxidase e endoxilanasas.

6.2. Composição lignocelulósica dos resíduos

Quanto à composição centesimal dos substratos da fermentação, observou-se maiores percentuais de fibras totais para marupá, sendo cerca de 2 vezes maiores que o verificado para o resíduo das sementes de açaí. Após a fermentação de *G. lucidum* houve um pequeno decréscimo no conteúdo de fibras totais do substrato à base de açaí, ao passo que *G. tropicum* não modificou o teor de fibras em nesse substrato (Tabela 2). No substrato à base de marupá, por sua vez, verificou-se redução de cerca de 15% do teor de fibras totais após o crescimento de *G. lucidum* e *G. tropicum* (Tabela 2).

Aguiar et al. (2022), obteve 36,77% de fibras para sementes de açaí e 53,12% para serragem de marupá, ambos suplementados com as mesmas formulações de farelos do estudo atual, no entanto, em proporções distintas, sugerindo que um alto teor de fibras é característico de resíduos amadeirados, devido ao maior teor de lignocelulose. Aguiar et al. (2021) em sementes de açaí sem suplementação, verificaram teor de fibras de 42,42%. Sales-Campos et al. (2010) obtiveram teor de 74,05% de fibras totais para serragem de marupá utilizando as mesmas

formulações e proporções de suplementação com farelos utilizados na presente pesquisa, indicando que a composição da mesma biomassa vegetal pode ser influenciada por diversos fatores, como sazonalidade, período de armazenamento e tratamentos térmicos (DE LIMA et al., 2021).

Tabela 2. Composição lignocelulósica dos substratos iniciais e após a fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum*, em resíduos de sementes de açaí e serragem de marupá.

Substrato	Fermentação	Fibras totais (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Carboidratos totais (%)	Carboidratos disponíveis (%)	
Açaí	Substrato inicial	31,54 Ab ± 0,79	58,73 Bb ± 0,40	14,69 Aa ± 4,57	4,40 Aa ± 0,20	79,94 Bb ± 0,00	48,33 Ca ± 1,00	
	Substrato pós-fermentação	<i>G. lucidum</i>	28,95 Bc ± 0,99	67,06 Aa ± 1,94	16,94 Aa ± 0,91	4,79 Aab ± 0,40	84,46 Aab ± 0,31	55,98 Aa ± 1,30
		<i>G. tropicum</i>	32,42 Ab ± 0,60	60,57 Bab ± 1,56	12,02 Ab ± 2,36	4,52 Aab ± 0,22	84,90 Aa ± 0,30	52,62 Bb ± 1,00
Marupá	Substrato inicial	61,92 Aa ± 136	68,34 Aa± 0,99	9,99 Aa ± 0,44	4,16 ABa ± 0,3	84,46 ABa ± 0,07	22,66 Bb ± 1,42	
	Substrato pós-fermentação	<i>G. lucidum</i>	52,21 Ba ± 0,53	61,83 ABab ± 4,47	12,50 Ab ± 0,92	5,31 Aa ± 1,20	83,40 Cb ± 0,64	31,40 Ac ± 0,29
		<i>G. tropicum</i>	52,24 Ba ± 1,22	59,58 Bb ± 1,62	10,05 Ab± 1,59	3,20 Bb ± 0,09	85,13 Aa ± 0,48	33,16 Ac ± 1,37

Letras maiúsculas comparam todas as amostras dentro de um mesmo resíduo e letras minúsculas comparam entre os substratos iniciais e substratos após a fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum*. Nível de significância $p < 0,05$.

Silva, Lacerda e Fonseca (2013) encontraram diminuição de 36,86% da fibra bruta de resíduos dos frutos de pequi e guavira após uma fermentação de 56 dias por *P. sajor-caju*, relacionando esse fato à excreção de enzimas degradadoras de lignocelulose pelo fungo. Aguiar et al. (2022) também encontraram reduções nos teores de fibras das sementes de açaí e serragem de marupá após o cultivo de diferentes linhagens de *P. ostreatus*. Shen et al. (2019) concluíram que *G. lucidum* foi capaz de reduzir significativamente o teor de fibra de okara, reduzindo de 43,16% para 28,72%.

A composição nutricional do substrato de cultivo de cogumelos não é o único fator responsável pelo sucesso da fermentação, os componentes precisam estarem disponíveis para metabolização (AGUIAR et al., 2022). Assim, para uma assimilação adequada do substrato durante o desenvolvimento fúngico, a concentração, organização e disponibilidade das fibras é fundamental (ALFIANTI et al., 2021).

Também é relatado que a presença de grandes quantidades de carboidratos solúveis é um fator limitante para a degradação das fibras insolúveis, devido à preferência do fungo pelos nutrientes mais facilmente metabolizáveis (MARTONO; DANRIANI; HARTINI, 2016). Isto pode estar relacionado a menor degradação das fibras do resíduo de açaí, visto que é a biomassa com maior quantidade de carboidratos disponíveis, bem como maior teor de lipídios e energia calórica (Tabelas 1 e 2).

Hidayat et al. (2022) também notaram a preferência de *G. lucidum* por fontes de carboidratos mais facilmente fermentáveis do resíduo de cacau, enquanto as fibras insolúveis eram mais difíceis de serem digeridas. O mesmo padrão foi observado por Araújo et al. (2020), que ao cultivarem *P. ostreatus* em resíduos de mandioca e beterraba constataram redução nas quantidades de carboidratos e aumento do teor de fibras.

Dentre os substratos iniciais, a serragem de marupá apresentou maior porcentagem de celulose, com diminuição dos percentuais após a fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum*, ao passo que, no substrato à base de açaí houve incremento do teor de celulose após o crescimento dos fungos (Tabela 2). Maciel-Silva, Mussatto e Forster-Carneiro (2019), detectaram a celulose como o componente mais abundante da lignocelulose em sementes de açaí, atingindo o teor de 43,81%, quantidade inferior à encontrada no presente estudo. Esse fato pode estar associado à suplementação do substrato com farelos. Outros estudos detectaram teores de celulose variando entre 44 e 47% para sementes de açaí (CAMARÃO; LOURENÇO JUNIOR, 1993; RODRIGUES

FILHO, 1993; OLIVEIRA; KOMESU; MACIEL FILHO, 2014). Aguiar et al. (2022) constataram 38,63% de celulose para sementes de açaí e 55,62% para serragem de marupá, ambos suplementados com mistura de farelos.

Os fungos são capazes de utilizarem os carboidratos da parede lignocelulósica por meio da secreção de enzimas lignocelulolíticas, como as celulases, liberando açúcares fermentáveis assimiláveis pelo fungo durante o seu desenvolvimento (AKINYELE; OLANIYI; AROTUPIN, 2011; TSAI et al., 2018). Adicionalmente, a celulose presente no meio atua como a principal fonte de carbono, com papel indutor para a produção de celulases pelo organismo (VALÁŠKOVÁ; BALDRIAN, 2006). Dessa forma, o decréscimo no conteúdo celulósico no substrato à base de marupá é um indicativo de atividade celulolítica das espécies de *Ganoderma* utilizadas nesse estudo.

Postemsky et al. (2017), ao realizarem o cultivo sólido de *G. lucidum* em cascas de arroz e sementes de girassol constataram aumento nas frações de celulose do substrato residual de cascas de arroz. Enquanto, Hariharan e Nambisan (2013) não encontram diferença relevante no conteúdo celulósico de folhas de abacaxi após a fermentação de *G. lucidum*.

O substrato inicial composto de sementes de açaí apresentou maior quantidade de hemicelulose, porém, não houve diferença estatística significativa (Tabela 2). A literatura não relata variações nas quantidades de hemicelulose em sementes de açaí, atingindo valores entre 6 e 19%, concentrações estas semelhantes às observadas no presente trabalho (BUFALINO et al., 2018; CAMARÃO; LOURENÇO JUNIOR, 1993; DE LIMA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2015; RODRIGUES FILHO).

Após a fermentação de *G. tropicum* observou-se redução do teor de hemicelulose no substrato de sementes de açaí. Nos substratos à base de serragem de marupá, verificou-se um pequeno incremento de hemicelulose após o crescimento dos fungos estudados (Tabela 2). Postemsky et al. (2017) também encontram incremento nos substratos residuais de *G. lucidum* quando cultivado em cascas de semente de girassol, partindo do valor inicial de 22-24% para 28-31%. Hariharan e Nambisan (2013) não encontraram diferença significativa na quantidade de hemicelulose nas folhas de abacaxi após a fermentação de *G. lucidum*.

Os substratos utilizados na fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum* exibiram valores semelhantes de lignina em suas composições, havendo redução deste polímero somente no

substrato composto de serragem de marupá, após a fermentação de *G. tropicum*, com incremento desse composto ao final da fermentação dos fungos nos demais substratos (Tabela 2).

Eliopoulos et al. (2022) encontraram um aumento de 5,58% para 7,12% do conteúdo de lignina em resíduo da indústria cervejeira após tratamento com *P. ostreatus*. Kuhar, Castiglia e Levin (2015) não constataram um padrão diferencial de perda de lignina de serragem de álamo ao final de uma fermentação de 14 dias em uma co-cultura de *G. lucidum* e *Trametes versicolor*, indicando que, provavelmente, fosse necessário um maior tempo de incubação, para correlacionar a degradação da lignina com a atividade de enzimas ligninolíticas, como a lacase.

As sementes de açaí são relatadas como uma biomassa de natureza lignocelulósica e, diferentes composições de polissacarídeos são descritas para esse material, com valores de celulose variando entre 34-53%, lignina em torno de 3-25% e hemicelulose entre 6-18% (BUFALINO et al., 2018; DE LIMA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2015). A literatura relata uma grande variação no teor de lignina em sementes de açaí (3-35%), todavia, a quantidade desse composto é considerada razoavelmente alta, atingindo, na maioria das vezes, porcentagens superiores a 25% (FORSTER-CARNEIRO, 2019; LIMA et al., 2021; MACIEL-SILVA; MUSSATTO, 2019; PESSOA et al., 2010). Aguiar et al. (2022) identificaram 6,41% de lignina para sementes de açaí e 10,81% para serragem de marupá, suplementados com 75% de farelo de arroz, 20% de trigo e 5% de milho, valores estes superiores em relação aos dados desse trabalho, podendo estar associado às diferentes formulações dos farelos.

Alguns fatores interferem diretamente na composição lignocelulósica da biomassa vegetal, como a sazonalidade, maturidade dos frutos, tipo de solo de crescimento da planta e alguns tratamentos prévios, como o hidrotérmico. Sendo assim, diferentes resíduos de sementes de açaí, dependendo do local e época da colheita e do período de armazenamento da biomassa, apresentam conteúdos lignocelulósicos distintos (LIMA et al., 2021). Nesse sentido, a baixa quantidade de lignina encontrada nesse estudo pode ser decorrente dessa soma de agentes físicos e ambientais, permitindo a obtenção de um resíduo mais fácil de ser degradado pelo microrganismo.

Sánchez e Montoya (2020) argumentam que a celulose e a hemicelulose são mais fortemente hidrolisadas após a formação dos basidiomas. Outros autores também relatam maior consumo de celulose durante a fase de formação do basidioma, sendo significativamente maior comparada à fase de colonização do substrato (BERCH et al., 2007; PATEL, 2014).

Adicionalmente, a literatura científica relata que a degradação das fibras lignocelulósicas pode ser limitada pela grande quantidade de carboidratos e, conseqüentemente, mais facilmente metabolizados pelo fungo, causando uma diminuição da degradação do conteúdo de lignocelulose, além de torná-la mais evidente (MARTONO; DANRIANI; HARTINI, 2016).

A utilização de resíduos lignocelulósicos como substratos para a fermentação de cogumelos depende da produção de hidrolases e oxidases degradantes dos compostos da parede celular da biomassa vegetal, convertendo-os em moléculas de baixo peso molecular, capazes de serem absorvidas pelos fungos (BUSWELL; CHANG, 1993). Contudo, a produção dessas enzimas por basidiomiceto e, conseqüentemente, o grau de degradação dos substratos lignocelulósicos é dependente da composição dos mesmos (ELISASHVILI et al., 2008).

Postemsky et al. (2017) obtiveram alto rendimento de produção de *G. lucidum* em cultivo sólido utilizando palha e cascas de arroz (hemicelulose de 36–40%, celulose de 13–23% e lignina de 6–10%) e cascas de sementes de girassol (hemicelulose de 22–24%, celulose de 21–24% e lignina de 24–28%), apresentando níveis semelhantes de eficiência biológica. Solanilla-Duque, Salazar-Sánchez e Rodríguez Herrera (2021) investigaram três resíduos lignocelulósicos (fibra de coco, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço pita), como fonte de carbono para o desenvolvimento de *G. lucidum* e determinaram que os resíduos de fibra de coco e bagaço de cana-de-açúcar, com teores de lignina de 5-6%, hemicelulose de 6-21% e celulose de 32-35%, proporcionaram melhor desempenho no desenvolvimento fúngico. Rashad et al. (2019) realizaram uma fermentação em estado sólido de *G. lucidum*, utilizando três diferentes formulações de seis resíduos agroindustriais, e os melhores rendimentos de produção do cogumelo foram obtidos no substrato (27% de talo de algodão, 27% de palha de arroz, 27% de bagaço de cana de açúcar, 18% de palha de trigo e 1% CaCO₃) compreendido por 39,85% de celulose, 17,73% e 9,32% de lignina.

Dentre os substratos iniciais, a serragem de marupá apresentou maior teor de carboidratos totais, diferindo estatisticamente das sementes de açaí. Após a fermentação dos fungos em marupá, observou-se pequeno incremento de carboidratos totais por *G. tropicum* e baixa redução dos teores por *G. lucidum*. Em contrapartida, no substrato à base de açaí, *G. lucidum* e *G. tropicum* elevaram a concentração de carboidratos totais no meio (Tabela 2).

Os carboidratos totais incluem tanto as frações potencialmente degradáveis (carboidratos disponíveis), quanto as fibras insolúveis da parede lignocelulósica, não degradáveis pela maioria dos organismos (SNIFFEN et al., 1993). Sendo assim, os carboidratos totais englobam mono e

oligossacarídeos, como estaquiose, rafinose, arabinose, galactose, manose e glicose (ALHOMODI et al., 2021).

Apesar do resíduo de açaí ter sido o substrato com menor teor de carboidratos totais, foi o que expressou maior quantidade de carboidratos disponíveis, sendo 2 vezes superiores à serragem de marupá (Tabela 2). Isto pode estar relacionado ao maior conteúdo celulósico encontrado no resíduo de marupá, característico de resíduos amadeirados pressupondo, assim, que a maior parte dos carboidratos dessa biomassa é proveniente da lignocelulose (AGUIAR et al, 2022).

A semente de açaí é relatada por ter uma camada externa fibrosa, de natureza lignocelulósica e um endosperma sólido envolvendo o embrião, contendo cerca de 70% de carboidratos (BICHARA; ROGEZ, 2011; RAMBO; SCHMIDT; FERREIRA, 2015). Esse conteúdo representa uma fonte renovável para produção de enzimas por fermentação em estado sólido, bem como uma alternativa na substituição de fontes não renováveis derivadas do petróleo (KAUR; KUHAD, 2019; SOCCOL et al., 2017).

Aguiar et al. (2022) destacaram que a biomassa amadeirada (serragem de marupá e pinus) foram os substratos com maiores teores de carboidratos totais, com valores de 87,56 e 81,53%, respectivamente, ao passo que sementes de açaí apresentaram 78,78%. Contudo, apesar de a serragem de marupá apresentar maior concentração de carboidratos totais, obteve o teor mais baixo de carboidratos disponíveis (35,45%), enquanto a serragem de pinus e sementes de açaí continham valores semelhantes de 42,01 e 40,48%, respectivamente.

Aguiar et al. (2021), ao avaliarem a concentração de carboidratos em serragem de pinus e sementes de açaí, sem nenhum tipo de suplementação, obtiveram 77,98% de carboidratos totais para resíduo de açaí e 82,85% para pinus, sendo este último substrato o detentor da menor concentração de carboidratos disponíveis (7,07%), enquanto o açaí continha 80,39% a mais de carboidratos disponíveis em sua composição (36,05%). Maciel-Silva, Mussatto e Forster-Carneiro (2019) observaram teor de 69,70% de carboidratos totais para sementes de açaí sem suplementação. Sales-Campos et al. (2010), ao analisarem formulações de serragens de marupá e pau-de-balsa inferiram 80,23 e 80,93% de carboidratos totais e 6,18 e 15,24% de carboidratos disponíveis, respectivamente.

Altas quantidades de carboidratos solúveis é um fator limitante para a degradação das fibras insolúveis pelos fungos, ocasionando baixa degradação da lignocelulose (AMANULLAH et al. 2014). Diante desse padrão, é possível prever que a alta quantidade de carboidratos

disponíveis nas sementes de açaí contribuiu para a insuficiente degradação das fibras de celulose e hemicelulose, levando o fungo a ter preferência pela fonte energética mais facilmente assimilável e, tornando a lignocelulose mais evidente, justificando o incremento no substrato após a fermentação dos cogumelos (Tabela 2). Em contrapartida, percebe-se um padrão de decréscimo de celulose na serragem de marupá após a fermentação das duas espécies de *Ganoderma*, podendo-se associar esse fato ao baixo conteúdo de carboidratos disponíveis na fibra. Assim, em razão de os carboidratos serem facilmente metabolizáveis, há um estímulo na velocidade de colonização do substrato pelo fungo, induzindo um menor tempo de miceliação e degradação dos componentes do meio (SALES-CAMPOS et al., 2010).

6.3. Caracterização microscópica

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para investigar possíveis alterações nos substratos após a fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum*, decorrente da degradação dos nutrientes do meio de cultivo. Para isso, foram realizadas obtenções de micrografias dos substratos iniciais de serragem de marupá (Figura 16) e sementes de açaí (Figura 17), bem como dos substratos pós-fermentação, (30 dias) de *G. lucidum* (Figuras 18 e 19) e *G. tropicum* (Figuras 20 e 21), utilizando os aumentos de 130 (A), 750 (B), 800 (C), 1300 (D), 1400 (E) e 2500 vezes (F).

O substrato inicial à base de serragem de marupá apresentou fibra lignocelulósica com padrão de organização perceptível (Figura 16A), sem grandes sinais de afrouxamento das fibras. Também foi constada a presença de grandes áreas com superfície de aspecto liso e sem poros irregulares (Figura 16C, D, E e F). Esse padrão altamente organizado pode estar relacionado à presença de ligações intramoleculares de hidrogênio entre a celulose, para a formação de microfibrilas altamente ordenadas e entrelaçadas com hemicelulose e lignina, ocasionando a formação de uma estrutura recalcitrante à degradação (BADGUJAR; BHANAGE, 2015; BRANDT et al., 2013; ZABED et al., 2016). Alayoubi et al. (2020), também identificaram a presença de microfibrilas individualizadas e organizadas em serragem de abeto e carvalho, apresentando morfologia compacta e ordenada.

A fibra inicial de semente de açaí, em comparação com serragem de marupá, possui menos áreas lisas e uniformes (Figura 17B), sendo possível observar uma morfologia mais irregular, contendo algumas rupturas (Figura 17C e D). Esses aspectos podem ser decorrentes do

processo de moagem do substrato e atrito das partículas (BARBOSA et al., 2019; COSTA et al., 2015). Além disso, foi avaliada a presença de partículas de tamanhos e formas variadas (Figura 17A). As saliências encontradas podem ser decorrentes da característica áspera da fibra vegetal (NASCIMENTO et al., 2012). Resultados semelhantes foram obtidos por Martins et al. (2021), onde identificaram estruturas irregulares e com sinais de rupturas e fragmentação em sementes de açaí, além da distribuição celular em diferentes tamanhos e formas.

Nesse resíduo, foram encontradas estruturas porosas e esféricas obstruídas por grânulos centralizados (Figura 17E), semelhante ao já relatado para sementes de açaí em estudos anteriores (MARTINS et al., 2021; MESQUITA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019). Essas estruturas são denominadas de canais de poço e os grânulos são constituídos por sílica, podendo ser encontradas tanto na superfície interna como externa (MARTINS et al., 2021).

Figura 16. Micrografias do substrato inicial de marupá nas resoluções de 130x (A), 750x (B), 800x (C), 1300x (D), 1400x (E) e 2500x (F).

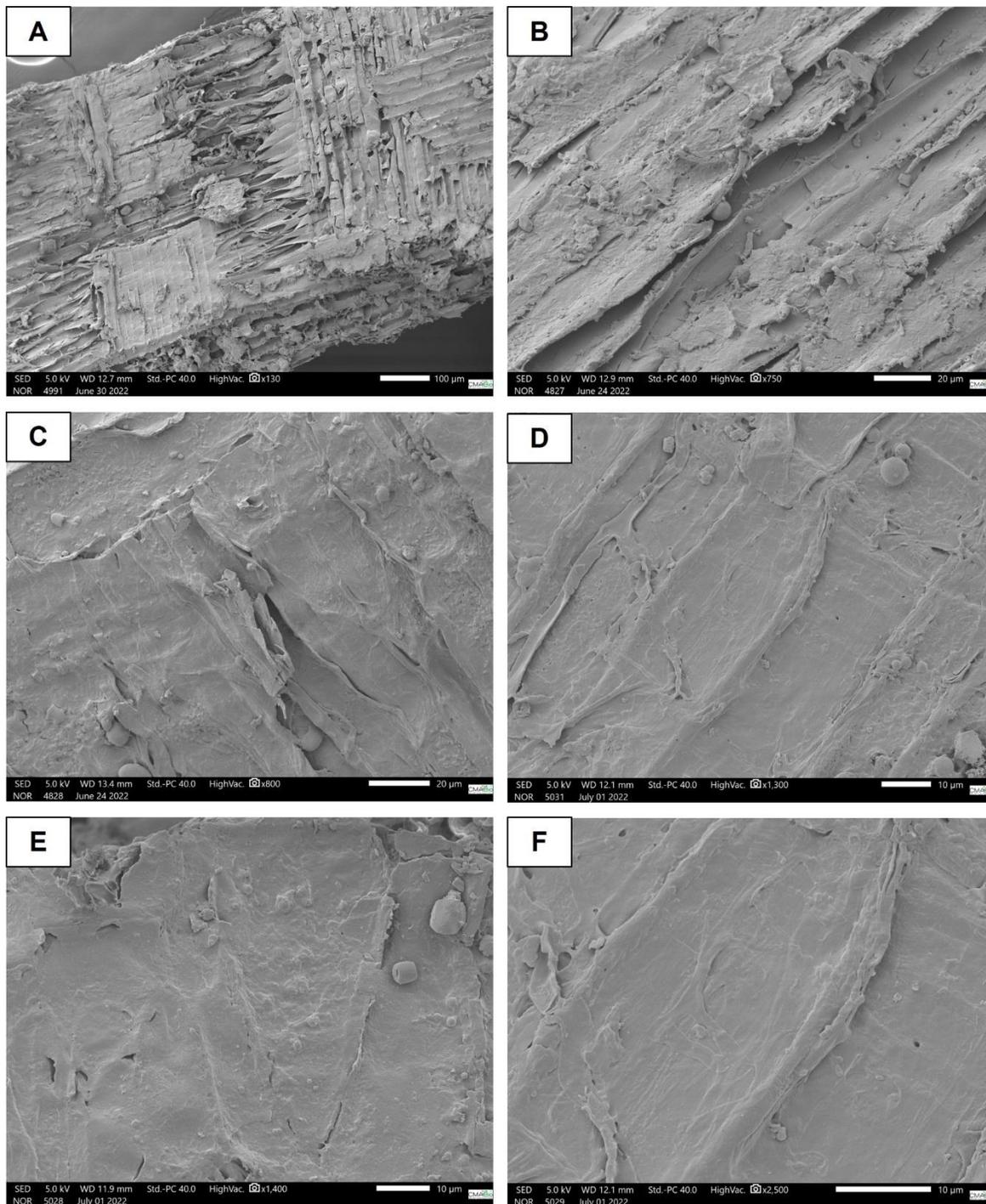


Figura 17. Micrografias do substrato inicial de açaí nas resoluções de 130x (A), 750x (B), 800x (C), 1300x (D), 1400x (E) e 2500x (F).

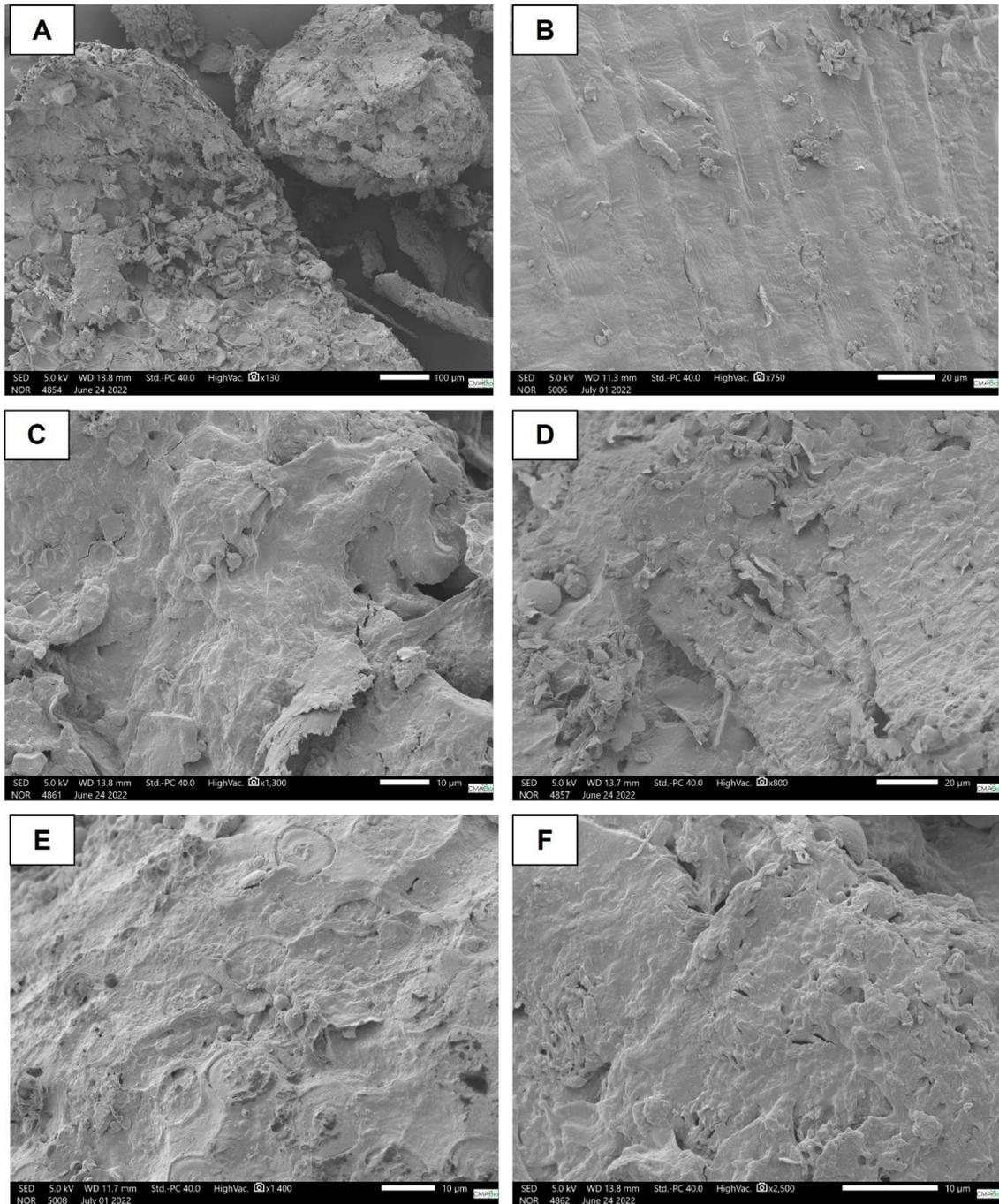


Figura 18. Micrografias do substrato à base de marupá após a fermentação de *G. lucidum*, nas resoluções de 130x (A), 750x (B), 800x (C), 1300x (D), 1400x (E) e 2500x (F).

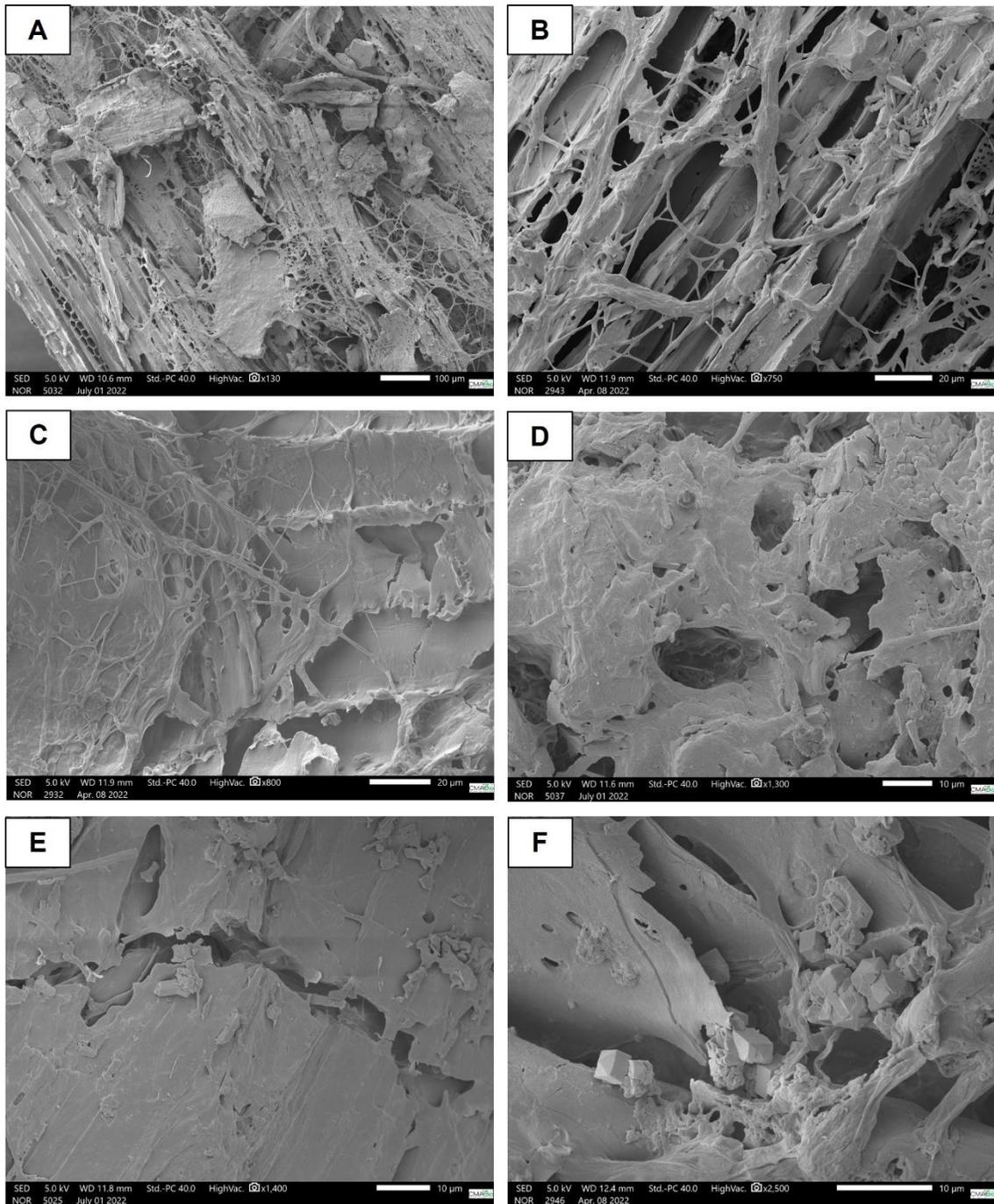


Figura 19. Micrografias do substrato à base de açaí após a fermentação de *G. lucidum*, nas resoluções de 130x (A), 750x (B), 800x (C), 1300x (D), 1400x (E) e 2500x (F).

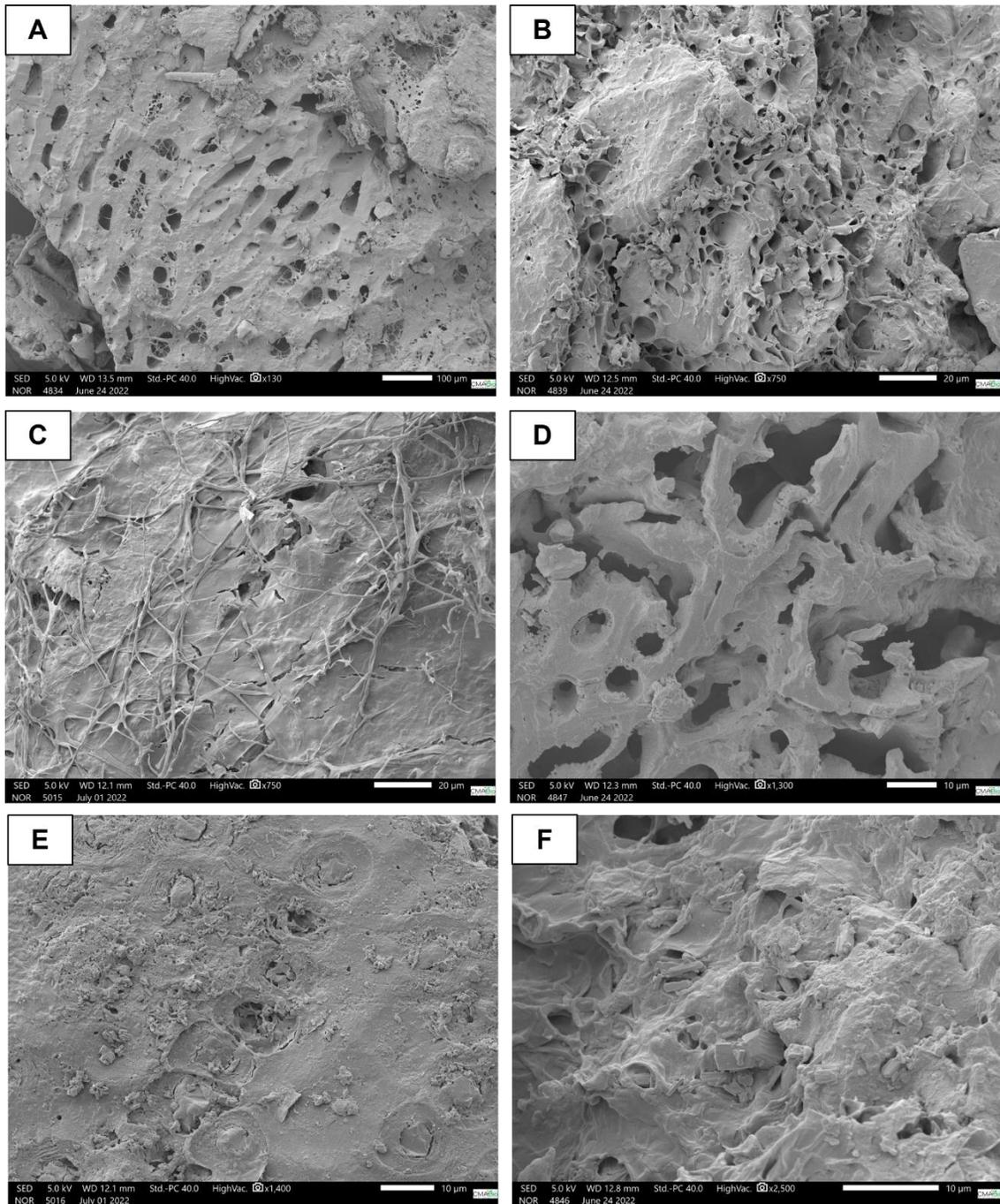


Figura 20. Micrografias do substrato à base de marupá após a fermentação de *G. tropicum*, nas resoluções de 130x (A), 750x (B), 800x (C), 1300x (D), 1400x (E) e 2500x (F).

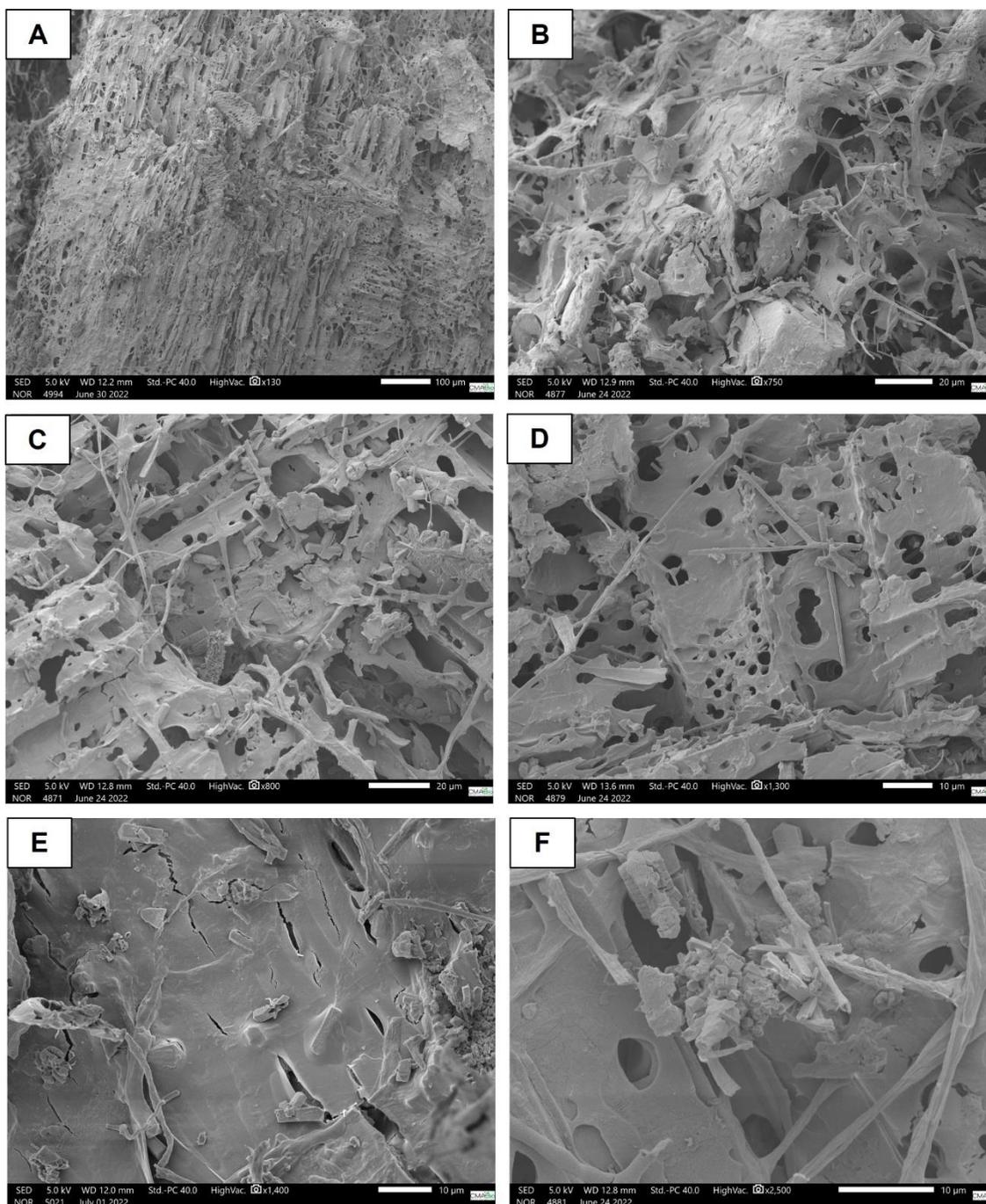
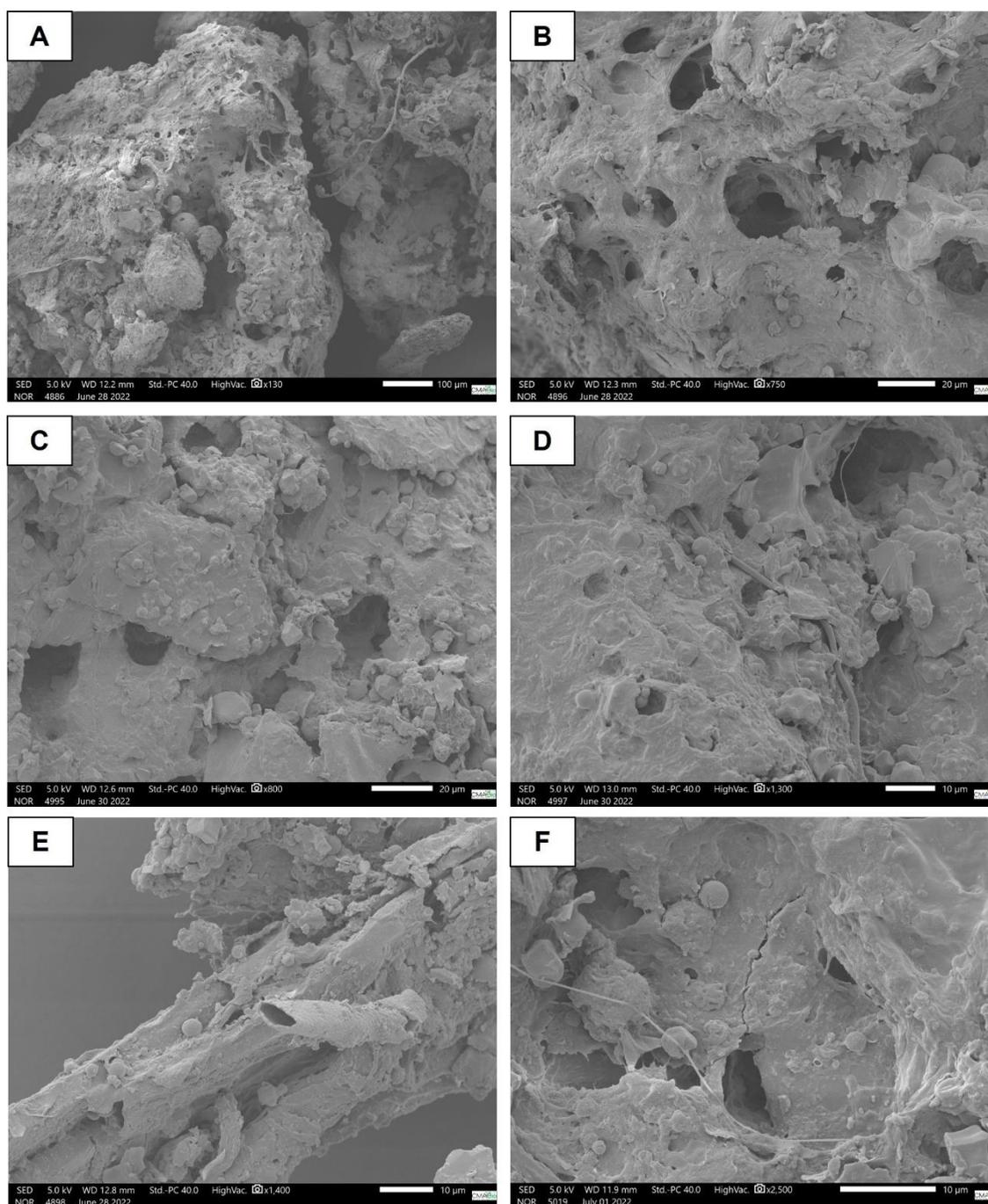


Figura 21. Micrografias do substrato à base de açaí após a fermentação de *G. tropicum*, nas resoluções de 130x (A), 750x (B), 800x (C), 1300x (D), 1400x (E) e 2500x (F).



Após a fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum* nos substratos à base de marupá e açaí foram encontrados visíveis sinais de degradação da parede lignocelulósica (Figuras 18, 19, 20 e 21). A superfície do resíduo vegetal, quando comparada aos controles (Figuras 16 e 17), perdeu

aspecto liso, plano e ordenado, sendo um indicativo do esmagamento da parede celular vegetal (PALANGI et al., 2022). Essa desordem do arranjo microfibrilar do resíduo vegetal é decorrente do afrouxamento das fibras, devido à remoção da lignocelulose (GRIMALDI et al., 2015; REZENDE et al., 2011). Adicionalmente, esse resultado é buscado no pré-tratamento da biomassa para aumentar a exposição da celulose e hemicelulose à degradação (GÍRIO et al., 2010).

O alargamento da fibra lignocelulósica é mais bem visualizado na Figura 18B, onde é possível verificar a presença de fissuras na superfície, envolvidas por micélio em toda a sua extensão. Lu et al. (2022) descrevem que parte da remoção do conteúdo lignocelulósico do talo de milho, após tratamento químico alcalino, ocasionou a presença de lacunas que enfraqueceram as ligações entre as fibras da palha, facilitando a penetração do micélio de *Auricularia auricula* e, conseqüentemente, degradação da celulose. Isso sugere que essa característica com maiores espaços, encontrada em serragem de marupá, propicia um meio mais facilmente hidrolisável pelo fungo. Palangi et al. (2022) também constataram uma desestruturação da parede celular da biomassa vegetal após tratamento com o cogumelo *Agaricus bisporus*. Faria et al. (2020) relataram maior grau de fragmentação de bagaço de cana-de-açúcar após cultivo de *Hemicolera grisea* var. *thermoidea*.

As alterações mais significativas verificadas pela análise de microscopia eletrônica nos substratos à base de marupá e açaí, após a fermentação fúngica, foram o surgimento de poros sobre toda a extensão do material (Figura 18D e F; Figura 19B e D; Figura 20C, D e F e Figura 21B, C e D). A associação entre o surgimento de poros irregulares sobre a superfície residual após tratamento fúngico e degradação da lignocelulose já é bem relatada (CORRÊA et al., 2016; FOO; HAMEED, 2012; NASCIMENTO et al., 2021).

Outro indicativo de degradação da fibra lignocelulósica pelo fungo é o surgimento de rachaduras bastante evidenciadas nas Figuras 18E, 19C, 29E e 21F. Faria et al. (2020) também detectaram aumento nas rachaduras, espaçamentos, fragmentações e afrouxamentos da biomassa vegetal após cultivo de *Hemicolera grisea* var. *thermoidea* e associaram essas modificações à produção de celulasas e xilanasas pelo fungo para o seu desenvolvimento. Resultados semelhantes foram constatados por Corrêa et al. (2016) que verificaram o surgimento de rachaduras em resíduo de espiga de milho após o tratamento com *P. ostreatus*.

Na fermentação conduzida por *G. tropicum* em sementes de açaí, foi possível observar a presença de gotículas arredondadas de pseudo-lignina (Figura 21D, E e F). Essas gotículas são formadas durante o processo de degradação do substrato, devido ao consumo de açúcares e fragmentos da lignina pelo fungo (CARVALHO et al., 2015). A pseudo-lignina pode prejudicar a hidrólise enzimática, pois realiza ligações covalentes às enzimas celulasas, reduzindo a capacidade de conversão da celulose em açúcares fermentáveis (SCHMATZ et al. 2021).

De modo geral, ao avaliar os sinais de degradação do substrato após o desenvolvimento fúngico em serragem de marupá e sementes de açaí, como porosidade, afrouxamento e desorganização da fibra, e surgimento de rachaduras, pode-se presumir que as maiores taxas de degradação da lignocelulose foram observadas no resíduo de marupá, principalmente após a fermentação por *G. tropicum*, corroborando com os resultados de teores de celulose (Tabela 2).

Quanto à composição elementar nos substratos à base de sementes de açaí e serragem de marupá, antes e após a fermentação de *G. tropicum* e *G. lucidum*, os mesmos elementos foram encontrados em ambos os substratos iniciais, exceto enxofre (S), observado apenas em sementes de açaí e, sódio (Na), detectado apenas em serragem de marupá. O elemento presente em maior concentração nos substratos iniciais foi o oxigênio (O), sendo superior no substrato de marupá (Tabela 3). Magnésio (Mg) foi o segundo elemento em maior concentração para sementes de açaí, ao passo que o fósforo (P) foi o segundo elemento mais presente em serragem de marupá. Em contrapartida, o teor de potássio (K) obtido para sementes de açaí foi 40,56% superior comparado ao encontrado para marupá. Cálcio (Ca) foi encontrado em maior percentual nas sementes de açaí, já a maior quantidade de silício (Si) foi obtida em resíduo de marupá. Alumínio (Al) foi um dos elementos químicos com menor concentração em ambos os substratos iniciais e sua presença pode estar associada à natureza metálica do *stub* (porta amostra), podendo ocasionar uma leitura residual dos elétrons de alumínio

Lima et al. (2021) detectaram 2% de Si para sementes de açaí sem nenhum tipo de suplementação, elemento esse depositado, principalmente, nos canais de poço (Figura 2E; 4E e 6D). Oliveira et al. (2019) também encontraram uma quantidade substancial de Si nos canais de poço de fibras brutas de sementes de açaí e pré-tratadas com NaOH. Os autores relataram a presença de partículas de sílica sob a forma de saliências globulares nas superfícies internas e externas dos canais de poço, estruturas essas observadas nas figuras 2E; 4E e 6D. A ocorrência de

sílica em palmeiras é comum, ocorrendo na forma de corpos silicosos, encontrados em células especiais chamadas de estegmata (HWANG et al., 2012; SCHMITT; WEINER; LIESE, 1995).

Tabela 3. Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) nos substratos iniciais e após a fermentação de *Ganoderma lucidum* e *Ganoderma tropicum*.

Amostras	Elemento	Concentração atômica (%)		
		Açaí	Marupá	
Substrato inicial	O	90,48	88,82	
	P	2,46	2,87	
	Mg	2,63	2,79	
	K	1,43	0,85	
	Ca	1,21	1,09	
	Si	0,92	1,46	
	Al	0,53	0,80	
	S	0,33	-	
	Na	-	1,32	
Substratos pós-fermentação	<i>G. lucidum</i>	O	75,25	92,23
		P	0,95	1,63
		Mg	1,56	1,34
		K	0,87	1,33
		Ca	-	1,64
	<i>G. tropicum</i>	Si	0,70	-
		Al	0,66	-
		C	20	1,64
		O	85,53	94,42
		P	1,33	1,16
<i>G. tropicum</i>	Mg	0,97	1,99	
	K	1,14	0,43	
	Ca	10,15	1,25	
	Si	0,48	-	
	Al	-	0,75	
	S	0,25	-	
	Cl	0,15	-	

Também foi detectada a presença de Si (silício) no substrato inicial de serragem de marupá e, a presença desse elemento no vegetal pode estar associada à função de proteção contra predadores e doenças, bem como proteção tecidual contra o estresse hídrico e flutuações de

temperatura (SILVA; POTIGUARA, 2009). O fósforo (P), encontrado em quantidades semelhantes para os substratos iniciais de sementes de açaí e serragem de marupá, é relatado como um dos macronutrientes essenciais para o desenvolvimento vegetal, responsável por diversos processos celulares, sendo este elemento absorvido do solo (ZHANG; LIU, Y.; WANG, 2019). O magnésio (Mg) também exerce papel fundamental dos tecidos vegetais, e sua presença se justifica por ser um dos componentes da clorofila, atuando na fotossíntese, ativando enzimas, auxiliando na tradução do DNA, no metabolismo de carboidratos e transporte de fósforo (LASA et al., 2000; NGUYEN; MANEEPONG; SURANILPONG, 2016).

A presença de K nos dois resíduos vegetais está diretamente associada à capacidade de fotossíntese (TRÄNKNER; TAVAKOL; JÁKLI, 2018) e crescimento da planta (SISTR; SOUKUP; TYLOVA, 2019), resposta à estresses ambientais (DREYER; GOMEZ-PORRAS; RIEDELSBERGER, 2017; HAN; AN; YUAN, 2005), homeostase (HAN; AN; YUAN, 2005) e modulação metabólica (CUIN; DREYER; MICHARD, 2018). Outro componente detectado nos dois substratos foi o Ca, o qual é relatado como um componente essencial da parede celular vegetal, aumentando a dureza e a integridade, pois atua na formação de pectato de cálcio, além disso, age como contra-cátion para a entrada e saída de ânions no vacúolo e estimula o alongamento de plantas (BHARTI et al., 2021), também está relacionado à atividade de diversas enzimas, manutenção e movimento dos cromossomos (BURSTROM, 1968; WHITE; BROADLEY, 2003).

O enxofre (S), encontrado apenas no resíduo de açaí, é componente dos aminoácidos cisteína e metionina nas plantas (NASSER et al., 2020) e, sua deficiência, afeta diretamente a síntese proteica (CANTARELLA; MONTEZANO, 2010). O sódio (Na), presente apenas em serragem de marupá não é um elemento essencial para o desenvolvimento vegetal, porém, atua na regulação da pressão osmótica, podendo ser substituído por potássio (K) (CHAKRABORTY et al., 2022; KEISHAM; MUKHERJEE; BHATLA, 2018). O oxigênio encontrado em grandes quantidades nas biomassas vegetais desse estudo é constituinte fundamental da lignocelulose, sendo encontrado na fórmula molecular da celulose, hemicelulose e lignina (REINOSO et al., 2018; OKOLIE et al., 2021).

Os minerais são fundamentais para o desenvolvimento fúngico, podendo afetar o grau de miceliação do fungo, quando em quantidades não adequadas no meio (WANG; SAKODA; SUZUKI, 2001). O Ca foi completamente exaurido do substrato de açaí após a fermentação de *G.*

lucidum, ao passo que após a fermentação de *G. tropicum* houve um aumento de cerca de 8 vezes desse elemento, comparada à concentração inicial. No substrato à base de marupá observou-se um incremento de Ca após o crescimento dos fungos (Tabela 3).

Quanto ao teor de oxigênio (O), após a fermentação dos fungos em açai, observou-se uma diminuição da concentração, enquanto em marupá verificou-se um aumento de cerca de 5% em relação à concentração inicial (Tabela 3). Outro aumento detectado foi para potássio (K), nos substratos após a fermentação de *G. tropicum* em açai e de *G. lucidum* em marupá, com aumentos de 20 e 56%, respectivamente. Nos demais resíduos, após as fermentações fúngicas verificou-se redução dos teores de potássio (K) (Tabela 3). O elemento alumínio (Al) foi completamente consumido após a fermentação de *G. tropicum* em açai e de *G. lucidum* em marupá, ao passo que carbono (C) foi encontrado apenas em sementes de açai, após o crescimento de *G. lucidum* (Tabela 3).

Vale destacar que a técnica de EDS, apesar de ser vantajosa, pois oferece uma análise qualitativa e semiquantitativa com rapidez e agilidade, podendo ser analisadas áreas de tamanho microm, apresenta limitações, como baixa sensibilidade a oligoelementos com peso atômico inferior ao do Na (SEVERIN, 2004; VIEIRA et al., 2021). Além disso, durante a excitação eletrônica pode haver perda de elementos voláteis (VIEIRA et al., 2021). Apesar da melhoria na resolução do detector de EDS para fornecimento de dados mais confiáveis e precisos, outras técnicas podem ser utilizadas para contornar esse problema, como a espectroscopia por comprimento de onda dispersivo (WDS) (VIEIRA et al., 2021). Sendo assim, as flutuações e não detecções de elementos presentes neste estudo podem estar associadas às limitações da técnica de EDS.

O aumento do conteúdo de minerais após a fermentação de basidiomicetos vem sendo relatado. Akinfemi e Ogunwole (2012), ao cultivarem *P. ostreatus* em palha de sorgo inferiram aumentos de 50% para P e 15,8% para K, ao passo que em resíduo de palha de arroz os incrementos foram de 275% para P, 350% para Ca, 100% para Mg e 150% para Zn. Araújo et al. (2020) concluíram que após 35 dias de fermentação em resíduos de mandioca e beterraba por *P. ostreatus*, houve incremento nas quantidades de minerais. Carvalho et al. (2014) sugerem que o aumento do conteúdo de minerais na biomassa residual é decorrente da diminuição da matéria orgânica, como a lignocelulose, que foi consumida pelo fungo durante a miceliação.

As concentrações dos demais minerais foi reduzida no substrato pós-fermentação, onde alguns elementos encontrados nas formulações iniciais não foram detectados após a fermentação dos fungos. Si e Na observados no substrato à base de sementes de açaí antes da inoculação fúngica não foram encontrados nos resíduos pós-fermentação e, os demais elementos sofreram redução de pelo menos 43,20% (Tabela 3). Esses dados corroboram com os achados de Mhlongo, Mnisi e Mlambo (2021) que detectaram redução no conteúdo de macro e micronutrientes em resíduo de uva após fermentação de *P. ostreatus*, sugerindo que esse ocorrido pode estar associado à degradação do conteúdo mineral durante o processo de desenvolvimento fúngico, sugerindo, assim, uma preferência pelo conteúdo inorgânico. Sales-Campos et al. (2009) também relataram queda no conteúdo de P e K de resíduos vegetais tratados com *P. ostreatus*.

6.4. Atividades enzimáticas

6.4.1. Endoglucanases (CMCase)

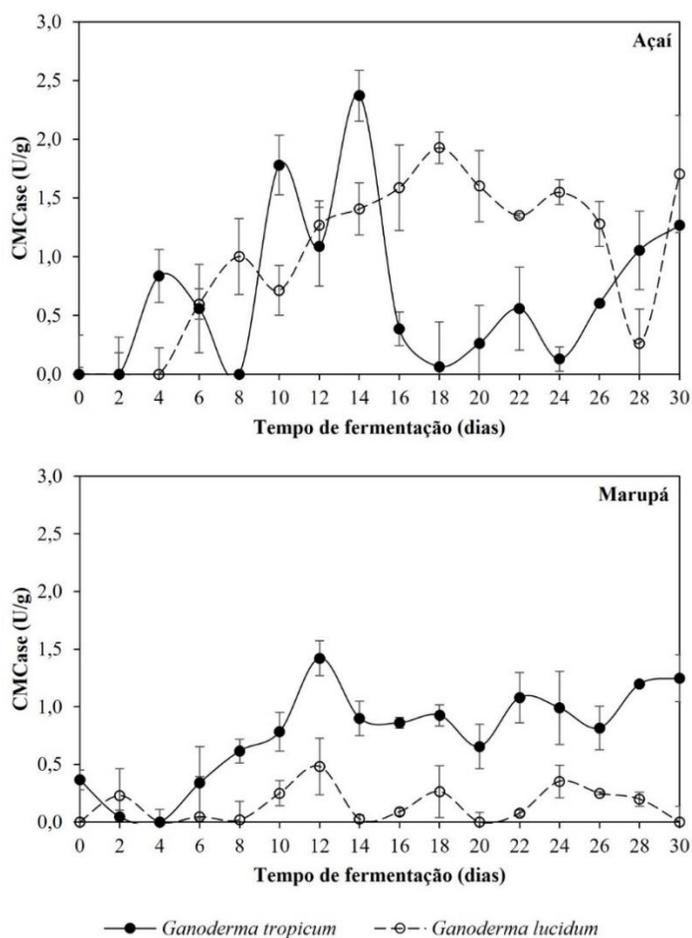
A excreção de endoglucanases, também conhecidas como carboximetilcelulases (CMCase) por *G. lucidum* e *G. tropicum* em fermentação sólida utilizando sementes de açaí e serragem de marupá como substratos indutores de atividade enzimática não seguiu um padrão linear, verificando-se acréscimos e decréscimos ao longo do período fermentativo. No entanto, pode-se observar menor atividade enzimática até 8º dia de fermentação para ambos os substratos, com valor máximo de 1 U/g para *G. lucidum* em sementes de açaí. Posteriormente, verifica-se 4 picos distintos de atividade de CMCase, proveniente de *G. tropicum* cultivado em açaí, com valores máximos de 1,78 e 2,37 U/g no 10º e 14º dia de fermentação, respectivamente, enquanto *G. lucidum* apresentou atividade máxima de 1,93 U/g ao 18º dia (Figura 22). No substrato à base de marupá observou-se 3 picos distintos ao longo das fermentações, sendo os valores obtidos na fermentação de *G. tropicum* cerca de 3 vezes superiores comparados aos de *G. lucidum* (Figura 22).

Manavalan et al. (2012) também não encontraram perfil linear de produção de enzimas oxidativas e hidrolíticas produzidas por *G. lucidum*, em cultivo sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar, apresentando perfil contendo picos enzimáticos seguidos por decréscimos.

Ganoderma sp. é descrito como detentor de um aparato enzimático eficiente de degradação da lignocelulose, tanto em fermentação sólida, quanto submersa (GAUNA et al.,

2021; JAIN et al., 2020; LIAN et al., 2022; MAKARENKOVA et al., 2021; SHARMA et al., 2019; ZHOU et al., 2018).

Figura 22. Atividade de endoglucanases (carboximetilcelulases - CMCase) durante a fermentação em estado sólido de *G. lucidum* e *G. tropicum*, em substratos à base de resíduos de açaí e marupá.



O tempo necessário para colonização do substrato pelo fungo e, conseqüentemente, produção enzimática, pode ser influenciado pelo tipo de meio utilizado, suplementação, espécies e cepas fúngicas (KHAN et al., 2017). Rashad et al. (2019) relatam que *G. lucidum* não foi capaz de colonizar totalmente nenhuma das biomassas vegetais avaliadas após o 21º dia de fermentação, em decorrência da desaceleração no processo de bioconversão. Os autores levantaram algumas possibilidades para essa desaceleração, como: (1) esgotamento dos nutrientes de mais fácil metabolização pelo fungo antes da degradação da lignocelulose (MATA; SAVOIE,

1998); (2) inibição das atividades de xilanases em decorrência da presença de altos níveis de açúcares solúveis no resíduo (TEUNISSEN et al., 1993) e (3) ação tóxica sobre os fungos de derivados furanos e ácidos orgânicos gerados durante a bioconversão do substrato (ALVES et al., 1998). Assim, esses achados corroboram com o perfil enzimático detectado nesse estudo, onde as maiores médias enzimáticas ocorreram antes do 20º dia do processo fermentativo.

Manavalan et al. (2012) encontraram valores superiores de endoglucanase produzida por *G. lucidum* em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, atingindo pico enzimático de 26 U/g no 20º dia da fermentação e, ao final (entre o 40 e 45º), observaram aumento na expressão dessa enzima, com valores semelhantes aos do pico enzimático. Herмосilla et al. (2017) ao realizarem o cultivo sólido de *G. lobatum* em palha de trigo obtiveram produção máxima de 7 U/g de endoglucanase.

Os valores enzimáticos de CMCase detectados neste trabalho foram superiores aos encontrados por Melanouri, Dedousi e Diamantopoulou (2022), onde ao avaliarem diferentes resíduos vegetais como substratos para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *P. ostreatus* e *P. eryngii*, incluindo serragem de madeira de faia e álamo, encontraram valores que variavam entre 0,008 e 0,199 U/g.

A utilização de fungos da podridão branca, como *Ganoderma* sp., visando a obtenção de celulasas é indicada por alguns autores como mais eficiente em comparação a fungos filamentosos, visto que esses microrganismos possuem limitações na produção do consórcio enzimático completo de celulasas (endo e exoglucanases), necessitando da associação de um ou mais organismos para a obtenção das três celulasas principais (MANAVALAN et al., 2012). Corroborando com essa afirmação, a maior concentração enzimática de endoglucanase detectada no presente estudo (2,37 U/g) foi superior a encontrada por Oliveira et al. (2019), que obtiveram valor máximo de 0,897 U/g para *Penicillium roqueforti* em fermentação em estado sólido utilizando casca de cacau.

Confrontando os dois substratos de fermentação utilizados nesse estudo como indutores da síntese de endoglucanase por *G. lucidum* e *G. tropicum*, o resíduo de açaí foi mais eficiente, com atividade enzimática 66% superior em relação à serragem de marupá (Figura 22). Sementes de açaí são consideradas uma biomassa de natureza lignocelulósica, sendo a celulose o componente majoritário (Lima et al. 2021). Barros et al. (2021) relatam que sementes de açaí correspondem a uma nova excelente fonte para obtenção de celulose.

Oliveira et al. (2022) demonstraram a capacidade indutora de sementes de açaí para obtenção de celulases por *G. lucidum*, obtendo atividade máxima de 1,9 U/g no 26º dia do processo fermentativo. Sementes de açaí também foram utilizadas como substrato para o cultivo de macromicetos por Lima (2019), visando a produção de enzimas lignocelulolíticas, incluindo endoglucanases, atingindo produção máxima de 0,386 U.gss⁻¹ (grama por substrato seco). Apesar de serem encontrados menos de 10 estudos que utilizam esse resíduo para a produção de celulases por meio de processos fermentativos, o potencial dessa biomassa como substrato para o cultivo de macromicetos vem sendo relatada (AGUIAR et al., 2021; AGUIAR et al., 2022; SALES-CAMPOS et al., 2020; SALES-CAMPOS et al., 2021;).

A diferença composicional entre os resíduos lignocelulósicos influencia diretamente a expressão de celulases por basidiomicetos (BENTIL et al., 2018). Essa maior produção enzimática detectada na fermentação utilizando sementes de açaí como substrato pode estar relacionada à relação C/N de 78,88 (Tabela 1), pois segundo Hsieh e Yang (2004), a razão ótima de C/N para o desenvolvimento de *G. lucidum* varia entre 70:1 e 80:1. Além disso, o resíduo de açaí apresentou maior conteúdo proteico (4,81%), em comparação com serragem de marupá, com 2,65% (Tabela 1). Atoji-Henrique et al. (2017) relatam que a presença em quantidades adequadas de proteína no meio é fundamental para a produção de enzimas relacionadas à degradação do substrato pelo fungo. Bentil et al. (2018) presumem que altas taxas de produção de endoglucanases por basidiomicetos podem ser em decorrência dos açúcares solúveis prontamente disponíveis no substrato para metabolização, esse achado está de acordo com os dados encontrados no presente trabalho, visto que a concentração de carboidratos disponíveis em resíduo de açaí foi duas vezes superior à de marupá (Tabela 2).

6.4.2. Celulases totais (FPase)

FPases (*Filter Paper Enzyme*) são assim denominadas em virtude de se utilizar papel filtro como substrato de enzimas celulolíticas, uma vez que consiste em material fibroso de média cristalinidade, sendo bastante utilizado para demonstrar a degradação da celulose por microorganismos (Wang et al. 2012).

Diante disso, de modo geral, houve baixa excreção de FPases em ambos os resíduos avaliados, no entanto, no substrato à base de açaí observou-se atividade de FPase apenas no 2º dia de fermentação, com a atividade enzimática no extrato de *G. lucidum* 4 vezes superior à *G.*

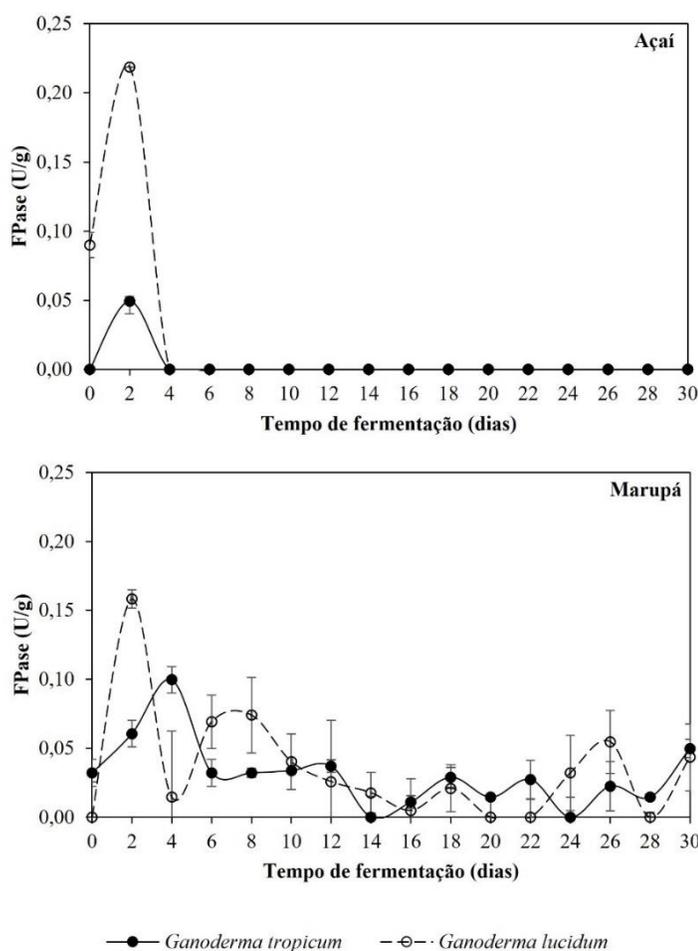
tropicum (Figura 23). No substrato composto por marupá verificou-se uma variação na atividade de FPase ao longo de 30 dias de fermentação, onde *G. lucidum* apresentou 4 picos distintos, com destaque para o pico no 2º dia de fermentação, ao passo que *G. tropicum* exibiu vários picos, contudo, o mais proeminente foi no 4º dia de fermentação. Comparando as atividades entre as diferentes espécies, *G. lucidum* exibiu valores cerca de 33% superiores, comparado ao obtido para *G. tropicum* (Figura 23).

Há poucos registros na literatura que utilizam esse método de determinação de celulasas totais para espécies de *Ganoderma*, bem como para os demais fungos da podridão branca, no entanto, os valores encontrados nesse estudo são considerados inferiores aos achados de Rodrigues et al. (2020), onde ao realizarem o cultivo de *G. lucidum* em meio BDA (batata dextrose ágar), observaram produção de FPase a partir do 3º dia, com pico máximo de atividade no 8º dia, atingindo valores de, aproximadamente, 5 U/g. Oliveira et al. (2022) também observaram baixa produção de FPase por *G. lucidum* em resíduo de serragem de marupá e açai, sendo registrada atividade máxima de 0,244 U/g quando esta espécie fermentou o resíduo de açai.

Os resultados da baixa atividade de FPase detectados nesse trabalho podem estar associados às limitações do método, devido à utilização do papel de filtro *Whatman* N°. 1 como substrato para enzimas celulolíticas (DRAKE et al., 2020). Drake et al. (2020) ao avaliarem a eficiência do método de FPase, concluíram que o desempenho hidrolítico do papel *Whatman* N°.1 em relação às outras biomassas celulósicas utilizadas como modelo foi significativamente inferior. Os autores associaram essa regressão enzimática a uma soma de fatores inerentes ao processo de fabricação do papel, como os tratamentos químicos e os processos de secagem, ocasionando mudanças na organização e tamanho da fibra, volume de poros e acessibilidade a celulose. Além disso, a hornificação durante o processo de secagem do papel torna o substrato seco menos suscetível à hidrólise (HUBBE, 2014; LUO; ZHU, 2010).

Drake et al. (2020) relatam, ainda, que as alterações das concentrações iniciais de hemicelulose e lignina decorrentes do pré-tratamento da biomassa para a formulação do papel afetam diretamente a atividade enzimática. Outro fator limitante é o tempo de reação de 60 minutos do ensaio, pois a hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos mais complexos requer o tempo de incubação de pelo menos 24 horas, ou mais (DRAKE et al., 2020).

Figura 23. Atividade de celulases totais (FPase) durante a fermentação em estado sólido de *G. lucidum* e *G. tropicum*, em substratos à base de resíduos de açaí e marupá.



Diante desse contexto, não se pode afirmar que *G. lucidum* e *G. tropicum* não produzem um bom coquetel enzimático de endo e exoglucanases quando cultivados em resíduo de açaí e serragem de marupá, devido às limitações do método de FPase realizado, sendo necessário a utilização de um ensaio de quantificação de celulases totais mais eficiente. Drake et al. (2020) sugerem que a forma mais representativa de avaliação da hidrólise do substrato celulósico seria a aplicação do próprio substrato envolvido na hidrólise enzimática no ensaio e não de um substituto.

6.4.3. Lacases

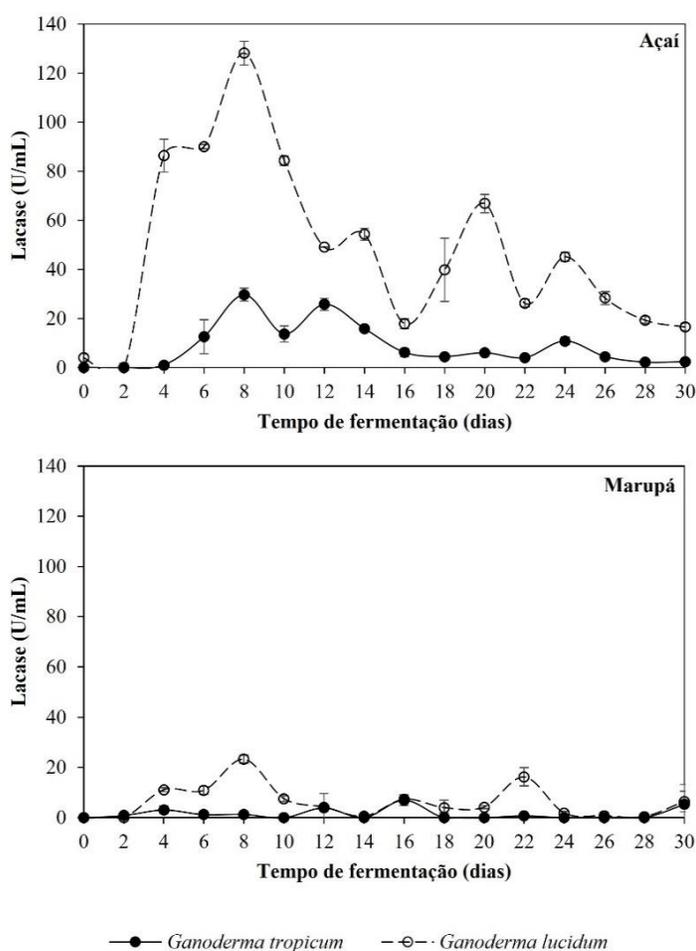
A excreção de lacases por *G. lucidum* e *G. tropicum* foi visivelmente estimulada quando os fungos foram cultivados no substrato à base de açaí, sendo a atividade máxima observada no

8º dia de fermentação de *G. lucidum*, sendo cerca de 5 vezes superior, comparada à atividade obtida em marupá. Confrontando as diferentes espécies, a atividade de lacases para *G. lucidum* foi, aproximadamente, 77% superior à *G. tropicum*, com destaque para o 8º e 20º de fermentação. Adicionalmente, *G. tropicum* apresentou picos de atividade de lacase mais proeminentes no 8º e 12º dia de fermentação em açai. Quanto à fermentação em substrato à base de marupá, observou-se que esse resíduo não favoreceu a indução de lacase pelos fungos estudados, visto que *G. tropicum* apresentou atividade máxima de 7 U/mL no 16º dia de fermentação. *G. lucidum* exibiu atividades máximas de 23 e 16 U/mL no 8º e 22º dia de fermentação, respectivamente (Figura 24).

A presença de lignina aumenta a recalcitrância dos demais componentes da parede celular vegetal, como celulose e hemicelulose (OKOLIE et al., 2021). Sendo assim, a remoção da lignina da biomassa lignocelulósica é de suma importância para exposição das fibras de celulose e hemicelulose, visando a obtenção de açúcares fermentáveis tanto para o desenvolvimento fúngico, quanto para outros processos do setor industrial (ALARCÓN et al., 2022; RESENDIZ-VAZQUEZ et al., 2022; SCHMATZ et al., 2021; MA et al., 2022; WANG et al., 2018). Desta maneira, o sistema oxidativo de fungos da podridão branca tem se tornado uma eficiente alternativa para a degradação da lignina de resíduos vegetais (SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ et al., 2020).

Espécies de *Ganoderma* são relatadas por possuírem um eficiente arsenal de enzimas ligninolíticas, incluindo as lacases (ASGHER; SHARIF; BHATTI, 2010; HARIHARAN; NAMBISAN, 2013; JAIN et al., 2020; MANAVALAN et al., 2012; ZHOU et al., 2018). Os resultados encontrados nesse estudo foram superiores aos de Manavalan et al. (2013) onde os autores isolaram e caracterizaram uma lacase de *G. lucidum* cultivado em fermentação submersa em condições otimizadas, através do uso de álcoois, indutores aromáticos, sulfato de cobre e várias biomassas lignocelulósicas, obtendo concentração enzimática máxima de 74,84 U/mL em uma formulação composta por casca de tamarindo com etanol (3%, v/v), CuSO₄ (0,4 mM) e ácido gálico (1 mM).

Figura 24. Atividade de lacase durante a fermentação em estado sólido de *G. lucidum* e *G. tropicum*, em substratos à base de resíduos de açaí e marupá.



Latif et al. (2021) também encontraram menor concentração de lacase do que a registrada no presente estudo, onde ao avaliarem a produção dessa enzima por uma linhagem de *G. lucidum* mutada pela técnica de UV e cultivada em meio contendo farelo de trigo, peptona, $MnSO_4$ e $ZnSO_4$ e fragmentos de tecidos corados com corante Reactive Blue 21 (RB21), obtiveram produção máxima de 75 U/mL. Diamantopoulou, Gardeli e Papanikolaou (2021) realizaram a fermentação sólida de *G. resinaceum* em meio basal contendo águas residuais de moinhos de oliva e obtiveram produção máxima de lacase no 10º dia de fermentação (cerca de 15 U/mL) e atribuíram esse tempo à necessidade do fungo de se adaptar ao meio.

Sadeghian-Abadi et al. (2019) estudando *Lentinus tigrinus* cultivado em casca de pistache, outro fungo da podridão branca, detectaram atividade máxima de 20 U/mL no 7º dia do

cultivo. Ganash et al. (2021) realizaram o cultivo sólido de *P. ostreatus* em resíduo de milho (restolho, espiga e silagem) e obtiveram produção máxima de lacase de 11,45 e 4,55 U/mL no 15º dia de fermentação, nos substratos à base de silagem e restolho, respectivamente, com evidente decréscimo da atividade após esse período, associando esse padrão à maior taxa de crescimento micelial no início do cultivo, com posterior redução na fase de formação do basidioma, que ocorreu após a segunda semana.

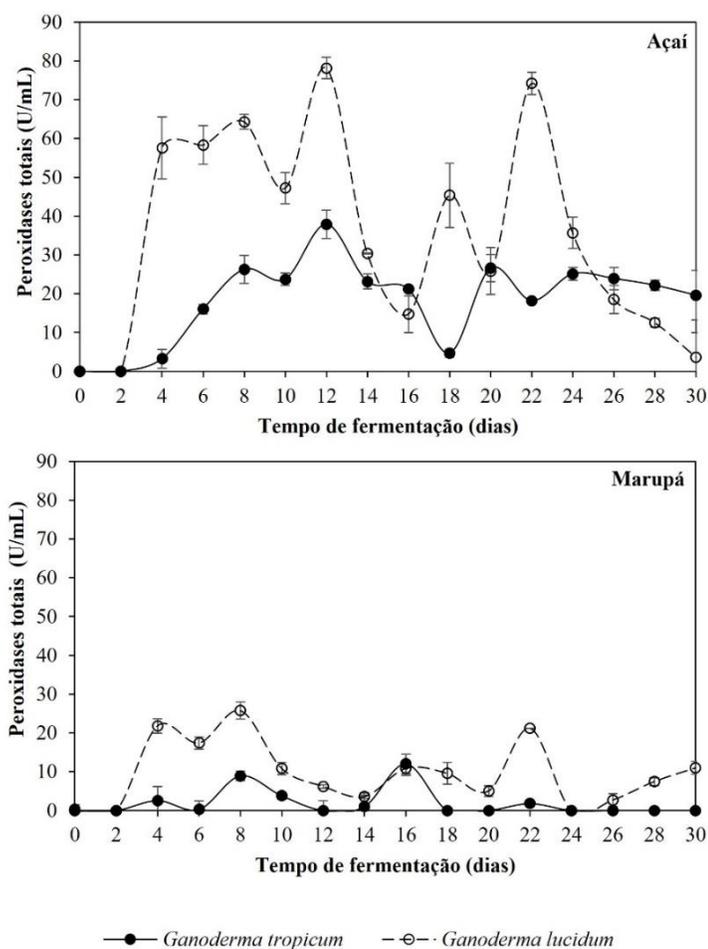
Chmelová et al. (2022) constaram que a presença de compostos aromáticos estruturalmente semelhantes aos monômeros de lignina exercem efeito positivo sobre a produção de lacases por fungos da podridão branca. Há diversos registros na literatura que relatam a presença de quantidades significativas de compostos fenólicos em sementes de açaí (BARROS et al., 2015; MARTINS et al., 2021; MELO et al., 2021; VIGANÓ et al., 2022). Diante disso, um dos possíveis fatores responsáveis pela maior eficiência de resíduo de açaí como indutor da atividade de lacase por *G. lucidum* e *G. tropicum* pode ser em decorrência da presença de compostos aromáticos nessa biomassa, visto que esta enzima pode oxidar uma variedade de compostos fenólicos, incluindo aqueles que não fazem parte da composição da lignina (HAKULINEN; ROUVINEN, 2015).

Outra justificativa para a maior produção de lacase por *G. lucidum* e *G. tropicum* em resíduo de açaí é a menor relação C/N (Tabela 1) e, conseqüentemente, maior concentração de N em relação ao substrato composto de serragem de marupá. Economou, Diamantopoulou e Philippoussis (2017) observaram que substratos contendo relações reduzidas de C/N favoreceram o aumento de biomassa micelial e expressão de lacase. Outros estudos relatam que o tipo e a fonte de nitrogênio influenciam diretamente a atividade de lacases provenientes de fungos degradadores da lignocelulose (ELISASHVILI; KACHLISHVILI; PENNINCKX, 2008; UMAR; AHMED, 2022).

6.4.4. Peroxidases totais

A viabilidade de produção de enzimas ligninolíticas dependentes de H₂O₂ por *G. lucidum* e *G. tropicum* foram superiores no substrato à base de açaí, com picos de atividades para *G. lucidum* e *G. tropicum* sendo cerca de 66% e 68% superior ao observado no marupá, respectivamente (Figura 25).

Figura 25. Atividade de peroxidases totais durante fermentação sólida de *G. lucidum* e *G. tropicum*, em substratos à base de resíduos de açaí e marupá.



Avaliando os fungos no mesmo substrato, *G. lucidum* apresentou 4 picos majoritários de atividade de peroxidases, destacando-se os picos obtidos no 12° e 22° dia de fermentação. *G. tropicum* também apresentou 4 picos majoritários, com ênfase no 12° dia de fermentação, porém com atividades inferiores ao relatado para *G. lucidum* (Figura 25).

No substrato composto de marupá, *G. lucidum* apresentou maiores atividades de peroxidases no 4°, 8° e 22° dia de fermentação. Ao passo que *G. tropicum* exibiu atividade apenas no 8° e 16° dia de fermentação (Figura 25). Diante desses resultados, pode-se inferir que, dentre os fungos analisados, *G. lucidum* foi o mais eficiente na produção de peroxidases totais, excretando até duas vezes mais enzimas que *G. tropicum*. Já em relação aos substratos testados, o

resíduo de açaí foi o melhor indutor da atividade de peroxidases totais, tanto para *G. lucidum*, quanto para *G. tropicum*, pois a produção nesse substrato foi cerca de 3 vezes superior em comparação à serragem de marupá (Figura 25).

A maior quantidade de N (Tabela 1) e compostos aromáticos nas sementes de açaí também podem ter favorecido a maior excreção enzimática no meio (ELISASHVILI; KACHLISHVILI; PENNINGCKX, 2008; HAKULINEN; ROUVINEN, 2015; UMAR; AHMED, 2022). É relatado que a composição do meio e as condições de fermentação afetam diretamente a produção de peroxidases, como as manganês peroxidases (MnP) (JANUSZ et al., 2013; SALAME et al., 2013; PECH-CANUL et al., 2020).

Espécies do gênero *Ganoderma* são relatadas por possuírem a capacidade de produzir peroxidases degradantes de lignina, assim como os demais fungos da podridão branca (CHEN et al., 2021; FERNANDA et al., 2021; LIU et al., 2021; XU et al., 2017). Kachlishvili, Metreveli e Elisashvili (2014) ao estudarem outro fungo da podridão branca, *Cerrena unicolor*, obtiveram atividade máxima de MnP de 7 U/mL no 10º de fermentação submersa, utilizando pericarpo de nozes, tempo semelhante ao detectado no presente trabalho. Já para o fungo *Trametes trogii*, Zhang et al. (2021) detectaram atividade máxima de 15 U/mL para MnP em fermentação líquida estática em meio GYP (2% glicose, extrato de levedura de 0,5%, 0,5% triptona e 0,1% MgSO₄·7H₂O) e utilizando o indutor 2,6-Dimetilfenol.

Balaji, Arulazhagan e Ebenezer (2014) isolaram 21 potenciais micro-organismos degradantes de hidrocarbonetos de petróleo em amostras de solo e encontrou atividade máxima de peroxidases totais para o fungo *Aspergillus fumigatus*. Song et al. (2022) ao realizarem um screening enzimático de 71 fungos endofíticos do processo parasitário de *Taxillus chinensis* detectaram atividade máxima de 11,61 U/mL para MnP e 6,64 U/mL de LiP excretada por *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* no 7º dia de fermentação. Esses dados indicam que *G. lucidum* e *G. tropicum* quando cultivados em meio contendo resíduo de açaí e serragem de marupá apresentam resultados de produção de peroxidases promissores em comparação com os resultados obtidos para alguns fungos filamentosos.

A menor atividade de ligninases em serragem de marupá (Figura 25) pode ter sido um dos fatores que contribuíram para o menor rendimento de endoglucanase nesse resíduo (Figura 22), pois estudos anteriores relatam que menores teores de lignina nos substratos vegetais induz a maior atividade de celulasas (CHANDRA; ARANTES; SADDLER, 2015; WU et al., 2017).

Schmatz et al. (2021) ao avaliarem a hidrólise ácida na deslignificação parcial de resíduo de cana-de-açúcar (folha, fração externa, interno e nó) concluíram que as menores frações de lignina presentes na biomassa vegetal melhoraram a hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose, liberando maiores quantidades de açúcares redutores em relação ao resíduo não tratado. Alarcón et al. (2022) relataram que o pré-tratamento alcalino de bagaço de cana-de-açúcar, com consequente diminuição do teor de lignina, otimizou a produção de endoglucanases e β -glucosidases por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. Sendo assim, pode-se pressupor que a atividade em conjunto de ligninases e celulases de *G. lucidum* e *G. tropicum*, em resíduos vegetais induz a melhor degradação do substrato.

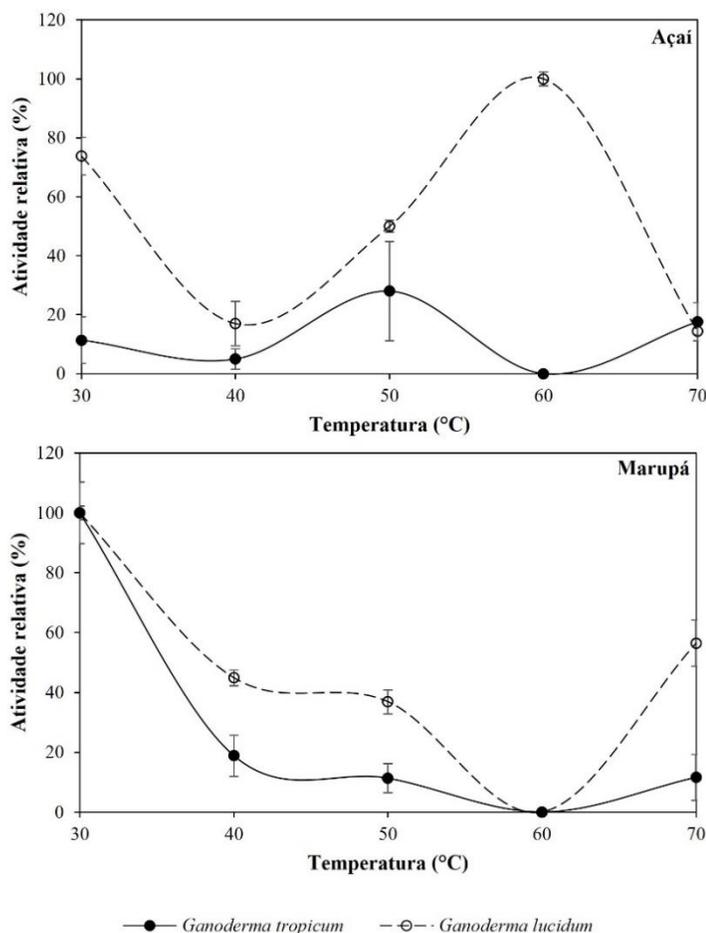
6.5. Caracterização enzimática

6.5.1. Caracterização térmica

A temperatura ótima de atividade de CMCase produzida por *G. lucidum* cultivado em sementes de açaí foi de 60 °C, com 100% de atividade relativa, contudo, a 30 °C a enzima também demonstrou estabilidade, sendo registrado 74% de atividade relativa. Já em relação ao extrato proveniente de *G. tropicum*, a faixa mais adequada de temperatura foi em 50 °C, com valor máximo de atividade relativa de 28%. Em contrapartida, as endoglucanases produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum*, quando cultivados em marupá apresentaram faixa ótima de atividade a 30 °C, com 100% de atividade relativa (Figura 26).

Santos et al. (2016) associaram o aumento da atividade enzimática de celulases de fungos filamentosos em altas temperaturas à ativação térmica dos átomos, que tendem a adquirir mais energia e, portanto, possuem maior tendência ao deslocamento. Ao passo que, a diminuição da atividade em temperaturas superiores a 30 °C, como ocorrido em marupá, pode ter promovido desnaturação ou desativação térmica, ocasionadas pela ruptura de ligações fracas que unem a estrutura globular das proteínas (SANTOS et al., 2016).

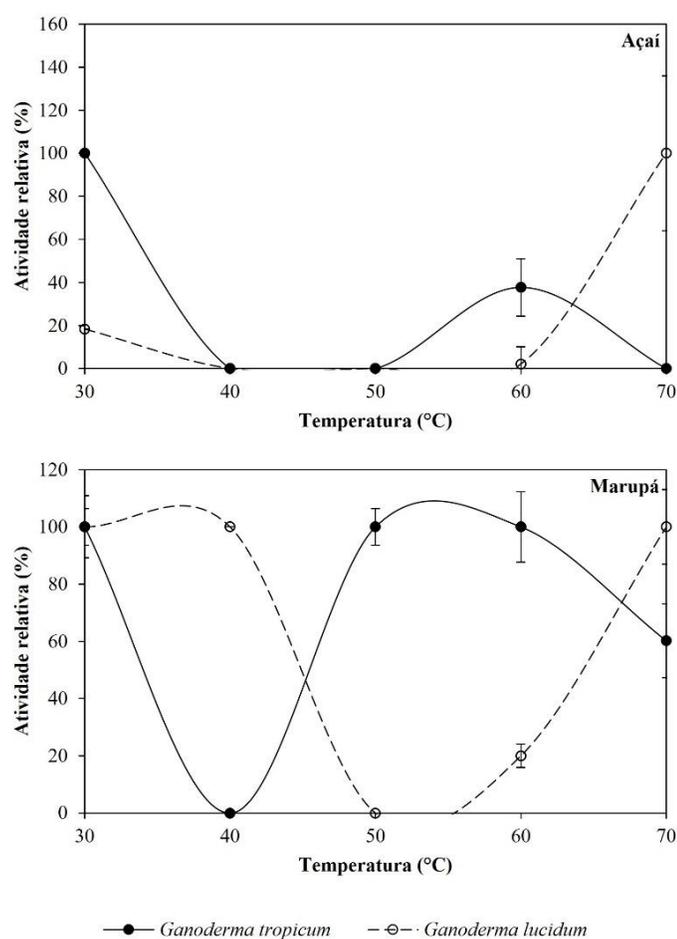
Figura 26. Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de CMCases produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum* em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes temperaturas.



Manavalan et al. (2015) ao avaliarem uma endoglucanase purificada de *G. lucidum* constataram atividade ótima em tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0) a 35 °C e, um aumento da temperatura acima de 50 °C reduziu a atividade dessa enzima significativamente. Sendo assim, a endoglucanase avaliada no presente estudo apresentou estabilidade enzimática em temperaturas mais elevadas. Liu et al. (2016) purificaram uma endoglucanase de *G. lucidum* e verificaram que essa enzima possui atividade ótima na faixa de temperatura entre 55 e 65 °C com significativo decréscimo da atividade em temperaturas superiores a essa faixa. Saptarini e Hadisoebroto (2017) identificaram que o extrato bruto de endoglucanases de *G. applanatum* e *G. tropicum* exibiam atividade ótima em 45 °C, com redução da atividade em temperaturas superiores a 55 °C.

As atividades ótimas das FPases excretadas por *G. lucidum* e *G. tropicum*, cultivados em sementes de açaí, foram obtidas nas temperaturas 30 °C e 70 °C, respectivamente, ambas com 100% de atividade relativa. As FPases excretadas no substrato à base de serragem de marupá apresentaram maiores variações de estabilidade térmica, onde as enzimas produzidas por *G. lucidum* apresentaram atividade ótima em 30, 40 e 70 °C, enquanto as FPases de *G. tropicum*, apresentaram 100% de atividade relativa em 30, 50 e 60 °C (Figura 27).

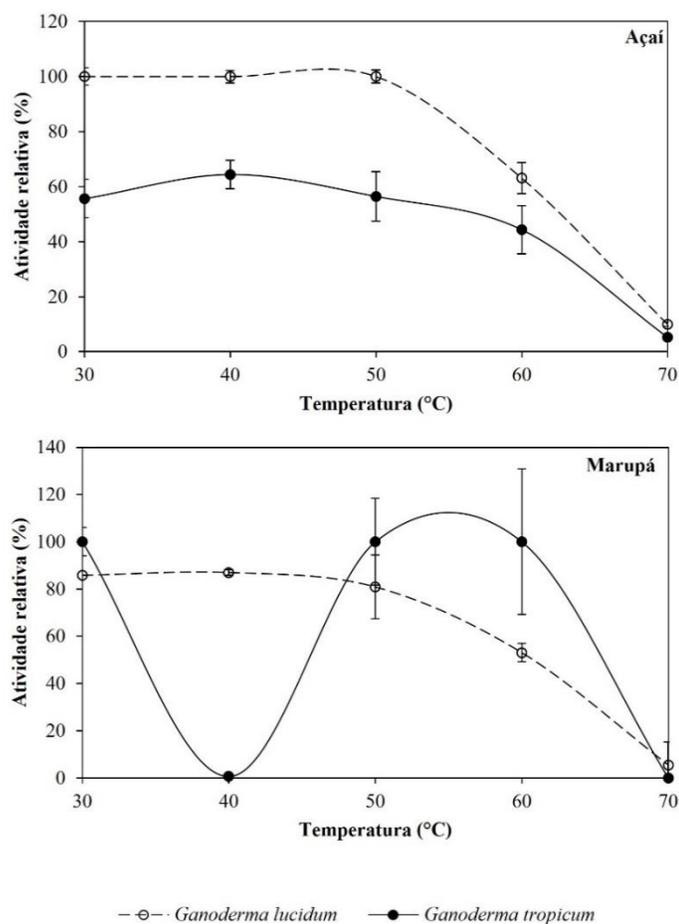
Figura 27. Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de FPases produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum* em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes temperaturas.



Dutta et al. (2018) identificaram atividade ótima do extrato bruto de FPases de *Fusarium* spp. na faixa de temperatura de 50 °C. FPases menos estáveis foram encontradas por Abdulhadi e Ashish (2021) que constataram atividade ótima dessa enzima produzida por *Mucor circinelloides* em 30 °C.

Em relação às lacases excretadas em meio composto de sementes de açaí, o único extrato bruto que alcançou 100% de atividade relativa foi o proveniente de *G. lucidum* nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C, com decréscimo das atividades nas temperaturas mais altas, enquanto *G. tropicum* apresentou atividade relativa máxima de 64% a 40 °C. Controversamente, na serragem de marupá, as lacases produzidas por *G. lucidum* não atingiram atividade relativa de 100% nas temperaturas testadas, sendo as maiores atividades observadas a 30, 40 e 50 °C, com valores na ordem de 80%, ao passo que, *G. tropicum* exibiu 100% de atividade relativa em 30, 50 e 60 °C (Figura 28).

Figura 28. Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de lacases produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum* em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes temperaturas.



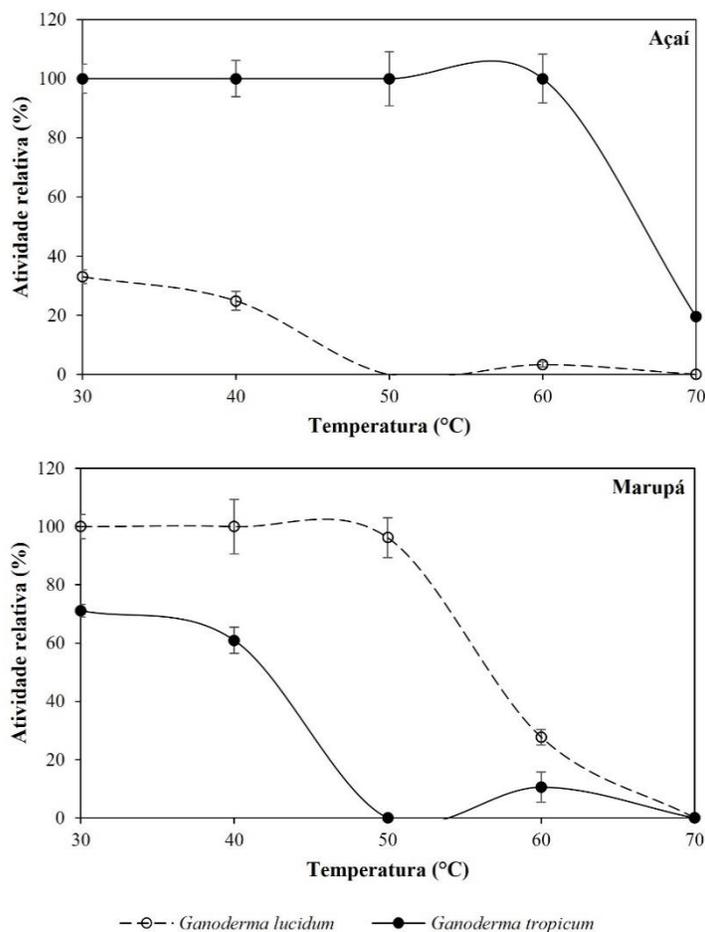
O declínio da atividade enzimática em temperaturas elevadas pode ser em decorrência da desativação térmica e do desdobramento irreversível (desnaturação) da estrutura proteica, devido

à quebra e aumento da vibração das ligações químicas (SI et al., 2021). Kumar et al. (2015) encontraram perfil de estabilidade térmica semelhante para duas isoformas de lacases purificadas de *G. lucidum*, com temperatura ótima a 50 °C e estáveis na faixa de 30-40 °C, com perda da atividade residual em temperaturas superiores.

Si et al. (2021) ao avaliarem uma lacase purificada de *G. lucidum* inferiram atividade ótima em 55 °C, com redução de 37,52% para 5,73% da atividade original em temperaturas que variavam de 65 a 90 °C. Umar e Ahmed (2022) observaram que a atividade ótima de uma lacase purificada de *G. leucocontextum* foi em 70 °C, com diminuição abrupta da atividade acima dessa temperatura. Brugnari et al. (2020) identificaram que tanto a lacase proveniente de *G. lucidum* obtiveram atividade máxima entre 50 e 60 °C, com diminuição contínua da atividade em temperaturas mais elevadas.

G. tropicum foi o fungo mais eficiente na excreção de peroxidases totais em sementes de açaí, sendo constatada 100% de atividade relativa na faixa de temperatura entre 30 e 60 °C e, abrupto decréscimo em 70 °C, apresentando 19% de atividade. *G. lucidum*, por sua vez, apresentou atividades relativas máximas de 33 e 25%, nas temperaturas de 30 e 40 °C, respectivamente. Contrariamente, quando cultivados em marupá, *G. lucidum* produziu peroxidases mais estáveis nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C, com 100% de atividade relativa e, *G. tropicum* produziu peroxidases com maiores atividades relativas de 71 e 61%, a 30 e 40 °C, respectivamente (Figura 29).

Figura 29. Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de peroxidases totais, produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum* em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes temperaturas.



Bilal, Asgher e Ramzan (2015) encontraram menor estabilidade térmica ao avaliarem a atividade de manganês peroxidase purificada de *G. lucidum* onde a temperatura ideal para essa enzima foi a 40 °C, com diminuição constante da atividade em temperaturas superiores a 50 °C. Adebayo-Tayo et al. (2016) identificaram que uma lignina peroxidase isolada de *Ganoderma* sp. Apresentava natureza termoestável, não havendo perda da estabilidade durante a incubação durante 60 minutos nas temperaturas entre 25 e 90 °C. Esses autores também registraram que o tempo de incubação inferior a 60 minutos em temperaturas mais elevadas (90 °C) induziram maior atividade enzimática de manganês peroxidase proveniente deste gênero de fungos.

6.5.2. Caracterização das enzimas na presença de íons

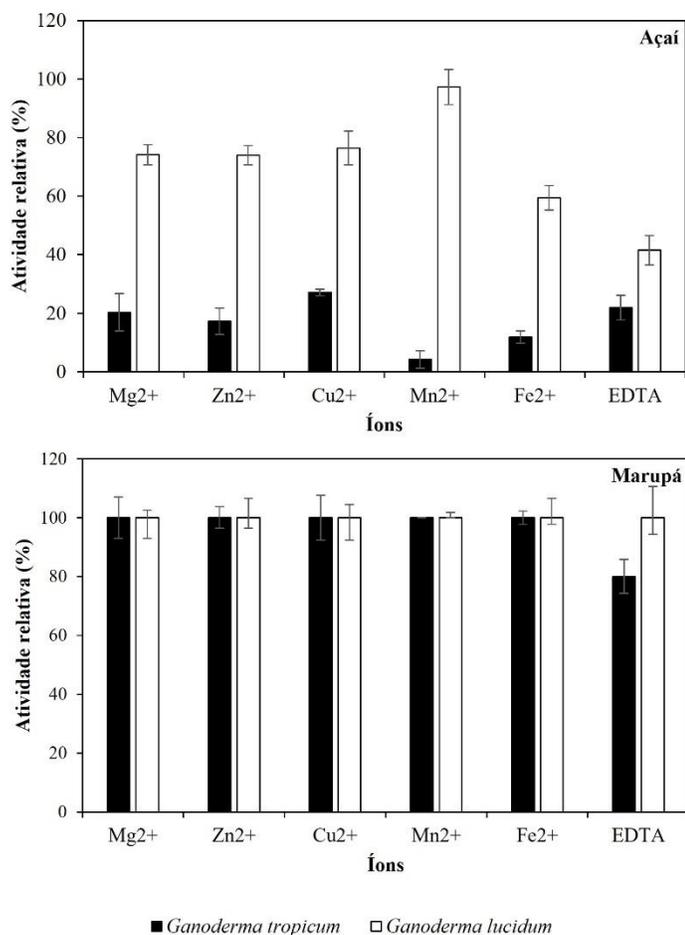
Dentre as espécies fúngicas estudadas, *G. lucidum* produziu endoglucanases mais estáveis quanto à presença de íons, quando cultivado em resíduos de açaí e marupá. Em resíduos de açaí, *G. lucidum* exibiu atividade relativa de CMCases de 97%, na presença do íon Mn^{2+} , com redução dessa atividade para cerca de 74% quando em contato com os íons Mg^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} . *G. tropicum*, por sua vez, apresentou atividade máxima de 27% na presença de Cu^{2+} (Figura 30).

Quando cultivados em resíduos de marupá, *G. lucidum* e *G. tropicum* apresentaram atividade relativa de 100% para todos os íons avaliados, exceto *G. tropicum* na presença de EDTA, em que houve uma redução de 20% dessa atividade, indicando a natureza altamente estável dessas enzimas (Figura 30). Enzimas com elevada estabilidade à íons é uma característica vantajosa em diversos setores industriais onde a degradação da fibra celulósica está envolvida, como na produção de bioetanol, biodegradação de resíduos sólidos, como aditivo alimentar e na indústria têxtil (HAN et al., 2020).

Apesar dos vários registros na literatura sobre os efeitos estimulantes e inibitórios de íons, há uma grande variação de seus efeitos sobre endoglucanases de diferentes fontes (MANAVALAN et al., 2015). Assim, não há um padrão uniforme sobre os efeitos de íons na atividade de celulasas (HAN et al., 2020; LI et al., 2018; PENG et al., 2016).

A literatura relata que a presença de íons pode melhorar a estabilidade conformacional dos sítios catalíticos de proteínas, permitindo que elas sejam mais acessíveis às ligações com os substratos (BERNARDI et al., 2018; HAKI; RAKSHIT, 2003; RAMEZANI; ASOODEH, 2016). Zhou et al. (2021) observaram aumento na atividade enzimática de uma endo- β -1,4-glucanase proveniente de *Colletotrichum orchidophilum* na presença de alguns íons, como Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Fe^{2+} . É defendido por Li et al. (2019) que Mn^{2+} pode se ligar longe do sítio ativo de endo- β -1,4-glucanases, gerando uma alteração conformacional na enzima e melhorando a sua atividade. Outros estudos indicam que a presença dos íons Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} podem aumentar a atividade de endoglucanases (LI; WANG; YAN, 2013; LI; YU, 2013; MANAVALAN et al., 2015).

Figura 30. Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de CMCases, produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum* em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes íons

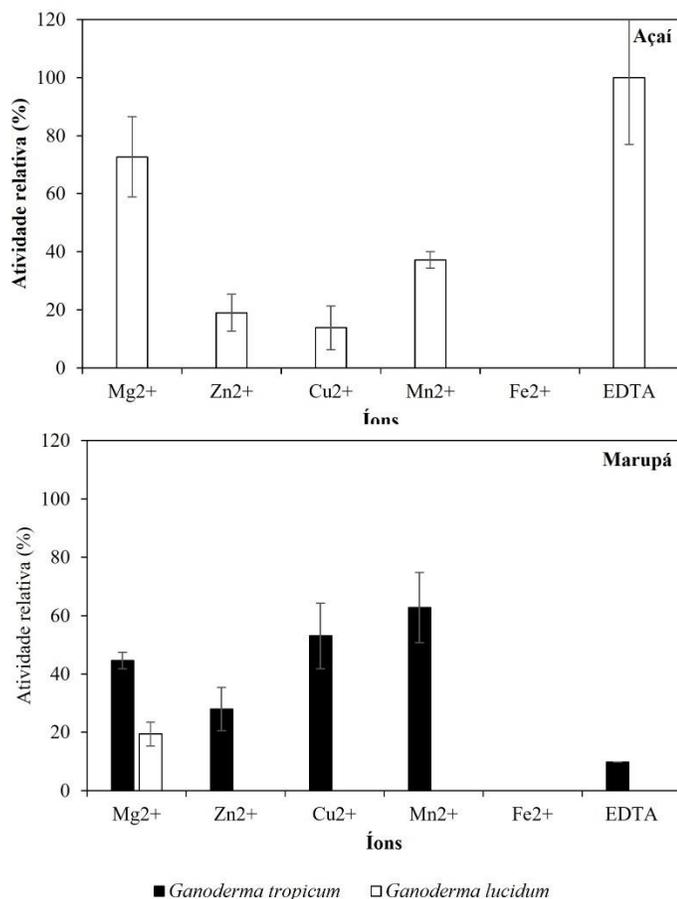


A presença de alguns íons também pode inibir a atividade enzimática, como ocorreu com as endoglucanases produzidas por *G. tropicum* em resíduo de açaí (Figura 30). Li et al. (2019) observaram que uma endoglucanase produzida por *Lentinula edodes* cultivado em palha de colza foi altamente inibida na presença de Cu²⁺. O cobre pode ocasionar danos oxidativos em proteínas devido à produção de espécies reativas de oxigênio, como os radicais hidroxilas ou superóxidos (BALDRIAN et al., 2005; LI et al., 2019).

As FPases produzidas por *G. tropicum*, em fermentação sólida em sementes de açaí, foram totalmente inibidas na presença dos íons testados, demonstrando baixa estabilidade dessas enzimas. Em contrapartida, FPases provenientes de *G. lucidum* apresentaram estabilidade máxima de 100% apenas na presença de EDTA, com redução de 27% da estabilidade em contato

com Mg^{2+} e drástica diminuição para os demais íons. Controversamente, em resíduos de marupá, as FPases produzidas por *G. lucidum* foram inibidas com os íons avaliados, exceto em Mg^{2+} , com máximo de atividade relativa de 19%. Ao passo que, *G. tropicum* apresentou 73% de atividade em contato com Mg^{2+} (Figura 31). Manavalan et al. (2015) também relataram inibição de celulases produzidas por *G. lucidum* na presença de Fe^{2+} e associaram essa inibição a uma possível formação de forte ligação covalente com os aminoácidos presentes no sítio ativo, causando uma inibição competitiva com o substrato, além de terem observado uma inibição enzimática ocasionada por EDTA.

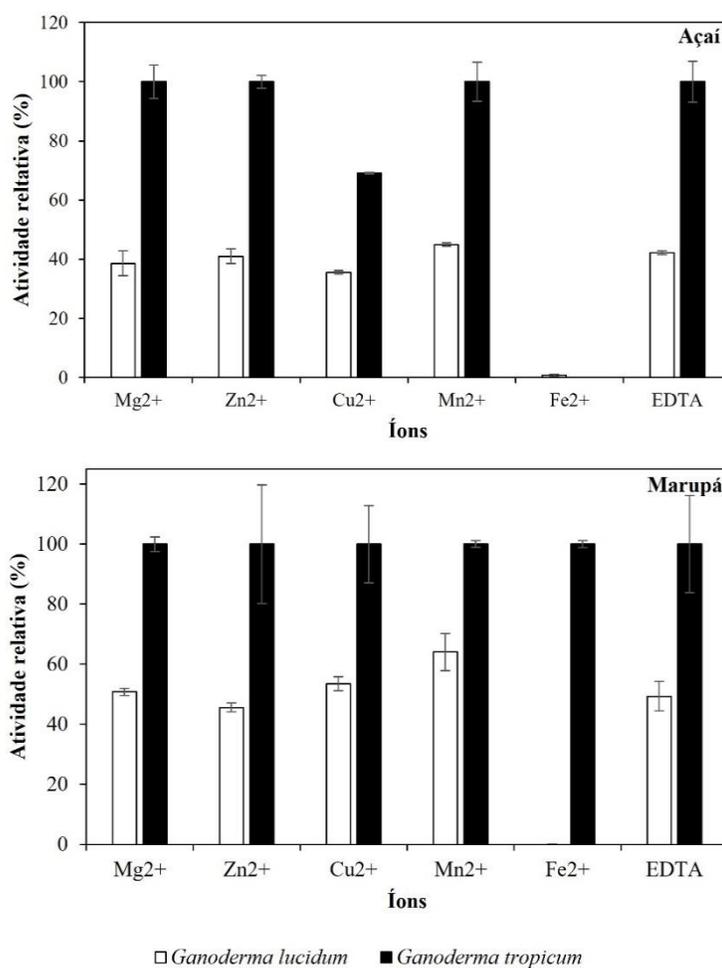
Figura 31. Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de FPases produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum* em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes íons.



G. tropicum produziu lacases mais estáveis à íons, com atividade de 100%, quando cultivado tanto no substrato à base de sementes de açaí, quanto em serragem de marupá, sendo

inibidas apenas na presença de Fe^{2+} quando proveniente do crescimento no resíduo de açaí. Por outro lado, as lacases oriundas de *G. lucidum* apresentaram baixa estabilidade enzimática em contato com os íons estudados, apresentado maiores atividades relativas para o extrato enzimático proveniente do crescimento deste fungo em resíduo de marupá, com atividades variando de 46 a 64%. Adicionalmente, o Fe^{2+} também inibiu completamente a atividade enzimática do extrato de *G. lucidum* em marupá (Figura 32).

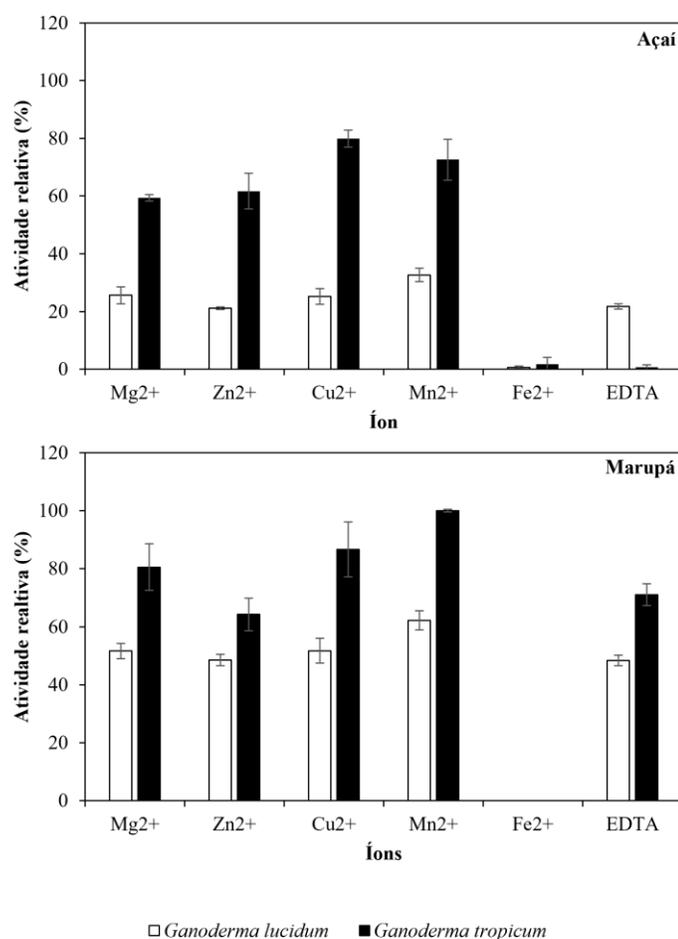
Figura 32. Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de lacases, produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum* em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes íons.



Fang et al. (2015) ao avaliarem uma lacase purificada de *G. lucidum* também encontraram inibição da atividade na presença de Cu^{2+} e, a partir desse resultado, propuseram duas teorias para

explicar o efeito inibitório de íons metálicos: (1) a ligação de íons metálicos induz a mudanças conformacionais na enzima e promove a decomposição do complexo contendo o sítio ativo, substrato e íon, através da inibição não competitiva; (2) que o íon metálico se liga próximo ao sítio ativo da enzima, induzindo uma inibição competitiva através do bloqueio de doadores de elétrons necessários para a atividade enzimática. Kumar et al. (2015) observaram alta estabilidade enzimática na presença de vários íons (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Al^{2+} , Mo^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+}) de uma lacase purificada de *G. lucidum*, no entanto, foi encontrada inibição quando esta enzima foi incubada com Fe^{2+} . Umar e Ahmed (2022) observaram que a presença dos íons Cu^{2+} e Ca^{2+} aumentaram a atividade de uma lacase produzida por *G. leucocontextum*, ao passo que Zn^{2+} induziu a inibição.

Figura 33. Caracterização da atividade enzimática dos picos de atividade máxima de peroxidases totais produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum* em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes íons.



Assim como observado para as lacases, *G. tropicum* também produziu peroxidases totais

mais estáveis frente à diferentes íons, nos dois substratos de crescimento fúngico estudados, com ênfase no resíduo de marupá, que rendeu maiores atividades relativas para quase todos os íons. Adicionalmente, as peroxidases excretadas por *G. tropicum* em fermentação sólida em resíduos de açaí foram estáveis quando em contato com os íons Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Mg^{2+} , sendo registrada estabilidade relativa máxima de 80% quando incubadas com Cu^{2+} (Figura 33).

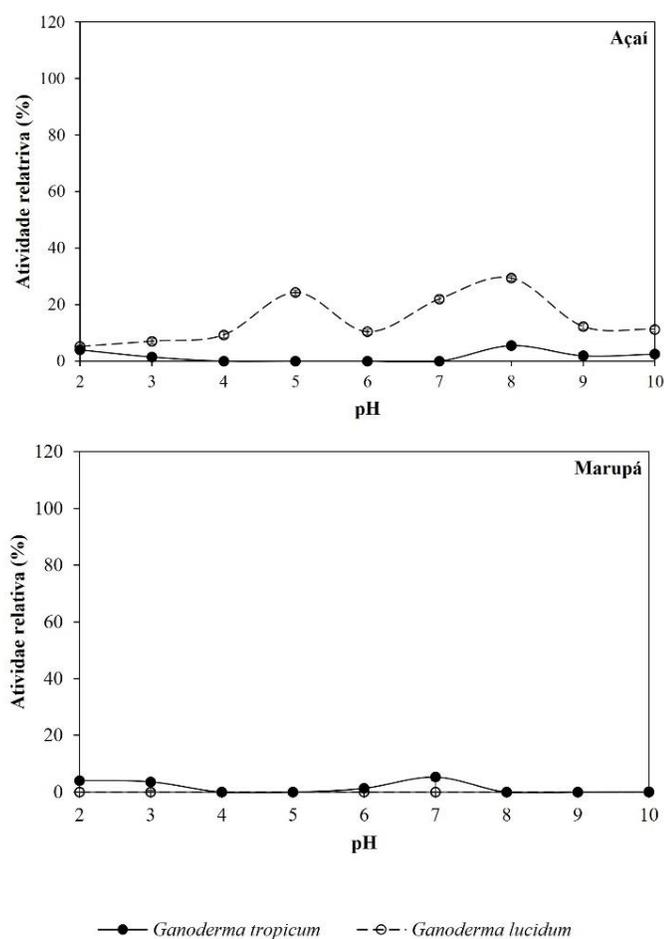
G. lucidum apresentou peroxidases com baixas atividades relativas na presença de diferentes íons, tanto quando proveniente da fermentação em resíduos de açaí, como de marupá, com maior atividade relativa registrada de 62%, quando incubadas com o íon Mn^{2+} . O íon Fe^{2+} inibiu totalmente a atividade de peroxidases totais de *G. lucidum* e *G. tropicum*, quando cultivados em substratos à base de açaí e marupá (Figura 33).

A resposta de ligninases à diferentes íons metálicos depende da espécie fúngica utilizada (HASSAN et al., 2012). Bilal, Asgher e Ramzan (2015) encontraram efeito positivo dos íons Mn^{2+} e Cu^{2+} sobre a atividade de manganês peroxidase purificada de *G. lucidum*, no entanto, Zn^{2+} e Fe^{2+} a inibiram parcialmente, enquanto a atividade dessa enzima foi fortemente inibida por EDTA. Adebayo-Tayo et al. (2016) identificaram que concentrações de íons metálicos superiores a 5 mM estimularam a atividade de lignina e manganês peroxidase isolada de *Ganoderma* sp.

6.5.3. Caracterização das enzimas frente variações de pH

As endoglucanases produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum*, em ambas as fermentações conduzidas nos substratos à base de sementes de açaí e serragem de marupá, não apresentaram boa estabilidade à diferentes faixas de pH. A atividade relativa máxima registrada foi do extrato bruto de endoglucanases obtido de *G. lucidum* na fermentação sólida em açaí, com 29% de atividade relativa após incubação em pH 8. Outro pico de atividade enzimática para essas enzimas produzidas por essa espécie foi registrado quando incubadas em pH 5, sendo registrado 24% de atividade relativa (Figura 34). As demais endoglucanases analisadas foram fortemente inibidas em uma ampla faixa de pH.

Figura 34. Efeito de pH sobre a atividade enzimática dos picos de atividade máxima de CMCases, produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum* em resíduo de açai e marupá, frente à diferentes faixas de pH.



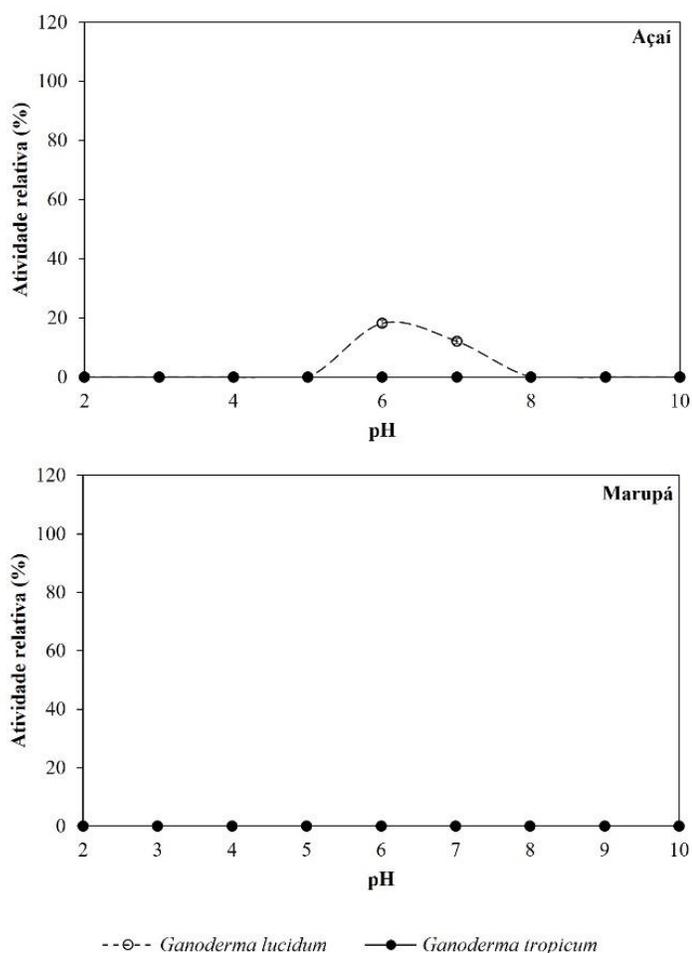
Li et al. (2019), ao avaliarem o pH ótimo de atividade de uma endoglucanase recombinante de *Lentinula edodes* expressa em *Pichia pastoris*, encontraram 100% de atividade relativa nos pHs 3 e 4, com decréscimo constante em pH mais básicos. Manavalan et al. (2015) inferiram 100% de atividade relativa no pH 5 para uma endoglucanase isolada de *G. lucidum*, além disso, os autores observaram baixa afinidade dessa enzima em pH inferiores a 4 e superiores a 7.

Zhou et al. (2021) ao caracterizarem uma endo- β -1,4-glucanase termoestável purificada de *Colletotrichum orchidophilum* constataram pH ótimo entre 3 e 6, com significativa redução da atividade em pH mais ácidos. Padrão de estabilidade diferente foi observado por Phadtare, Joshi e Satyanarayana (2017) ao avaliarem uma endoglucanase purificada do ascomiceto *Myceliophthora*

termofilo, onde identificaram que esta enzima possui pH ótimo na faixa básica, com atividade relativa máxima registrada após inculcação em pH 10.

As FPases produzidas em todas as condições de fermentações avaliadas apresentaram baixa estabilidade frente à diferentes faixas de pH. É importante ressaltar que, nos extratos provenientes da fermentação em marupá foi observada inibição das atividades enzimáticas em todas as faixas de pH avaliadas. As FPases produzidas por *G. lucidum* em substrato formulado à base de sementes de açaí apresentaram atividade relativa máxima de 18%, detectada no pH 6 (Figura 35).

Figura 35. Efeito de pH sobre a atividade enzimática dos picos de atividade máxima de FPases, produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum* em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes faixas de pH.

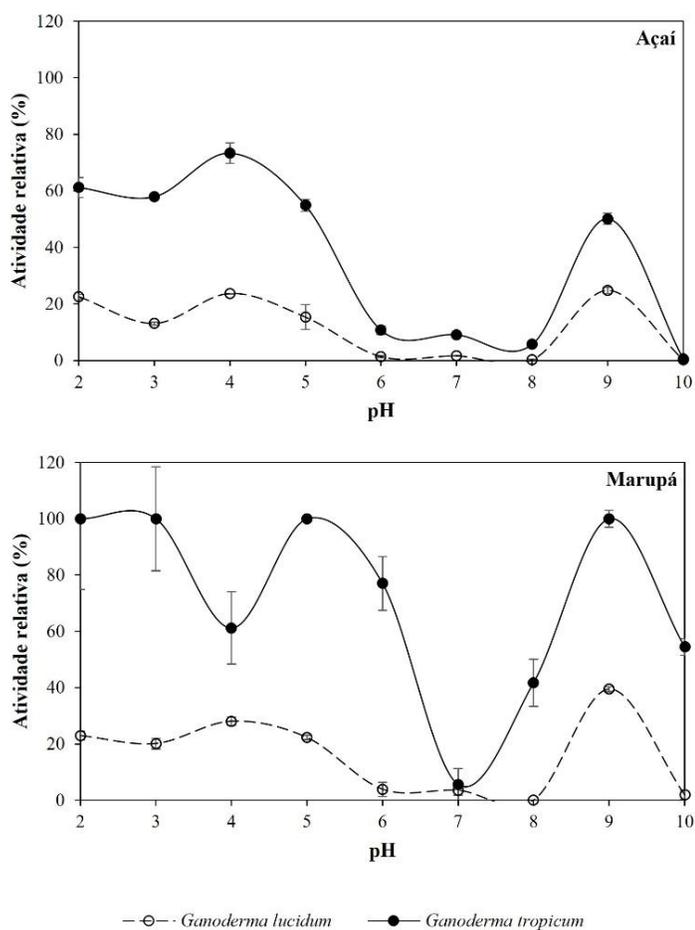


Han et al. (2020) observaram que uma celobiohidrolases (exoglucanases) proveniente de *Chaetomium thermophilum* apresentou atividade ótima no pH 4 e boa estabilidade entre pH 3 e 6.

FPases mais estáveis foram identificadas por Dutta et al. (2018) ao realizarem uma prospecção de enzimas excretadas por *Fusarium* spp., isolados de amostras de solo, onde o pH ótimo para a atividade das FPases variou entre 5 e 6 para a maioria das espécies, exceto *F. oxysporum* que apresentou maior atividade enzimática em pH alcalino.

G. tropicum produziu lacases mais estáveis frente à diferentes faixas de pH, quando cultivado em substrato à base de sementes de açaí e serragem de marupá. A faixa ótima de atividade dessas enzimas foi observada no pH 4, com perfil estável entre os pH 2 e 5, bem como no pH 9 do extrato proveniente de *G. tropicum* cultivado em resíduo de açaí, ao passo que, em resíduo de marupá, o extrato apresentou 100% de atividade relativa nas faixas de pH 2, 3, 5 e 9 (Figura 36).

Figura 36. Efeito de pH sobre a atividade enzimática dos picos de atividade máxima de lacases, produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum* em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes faixas de pH.



Quanto às lacases excretadas por *G. lucidum*, quando cultivado no substrato à base de sementes de açaí apresentaram atividade relativa máxima no pH 9, com 25% de atividade relativa, sendo a fermentação conduzida em serragem de marupá a mais eficiente na indução de produção de lacases mais estáveis, apresentando atividade de 39% (Figura 36).

As lacases fúngicas geralmente apresentam pH ótimo em torno de 5, com pouca atividade em pH neutro (FANG et al., 2015). No entanto, a literatura relata inibição enzimática em pH básicos, divergindo dos resultados obtidos neste estudo. Umar e Ahmed (2022) também constatarem perfil ácido de uma lacase purificada de *G. leucocontextum*, com atividade máxima em pH 3. Shrestha et al. (2016) isolaram e caracterizaram uma lacase proveniente de *G. lucidum* e identificaram o pH 5 como ideal para a atividade desta enzima, porém, a faixa de pH entre 3 e 7 também permitiu atividade relativamente estável, com significativa inibição em pH 8.

Si et al. (2021) observaram que uma lacase purificada de *G. lucidum* foi altamente ativa ao longo de uma ampla faixa de pH, variando entre 5 e 8, onde a enzima manteve pelo menos 72% de atividade relativa, considerando-se pH 6 como ótimo para a indução enzimática. Adebayo-Tayo et al. (2016) ao avaliarem uma lacase purificada de *Ganoderma* sp. observaram que a maior atividade de lacase foi registrada em pH 6, com relativa estabilidade entre os pH 3 e 7, e redução em pH 8 e 9. Essa mudança na atividade enzimática ocasionada pelo pH pode ser em decorrência das modificações da carga superficial da proteína, induzindo uma alteração da estrutura e ativando ou inibindo a catálise do substrato (SI et al., 2021).

As peroxidases, de modo geral, apresentaram baixa estabilidade à variação de pH, onde nenhuma das duas espécies, nos dois resíduos da fermentação sólida resultaram em 100% de atividade relativa. Deste modo, dentre as espécies avaliadas, o extrato enzimático proveniente de *G. tropicum* cultivado em resíduos de açaí apresentou maiores atividades em pH 6 e 9, com 67 e 61% de atividade relativa, respectivamente. No substrato composto de marupá, esse fungo apresentou maior atividade em pH 5 (89% de atividade relativa) (Figura 37).

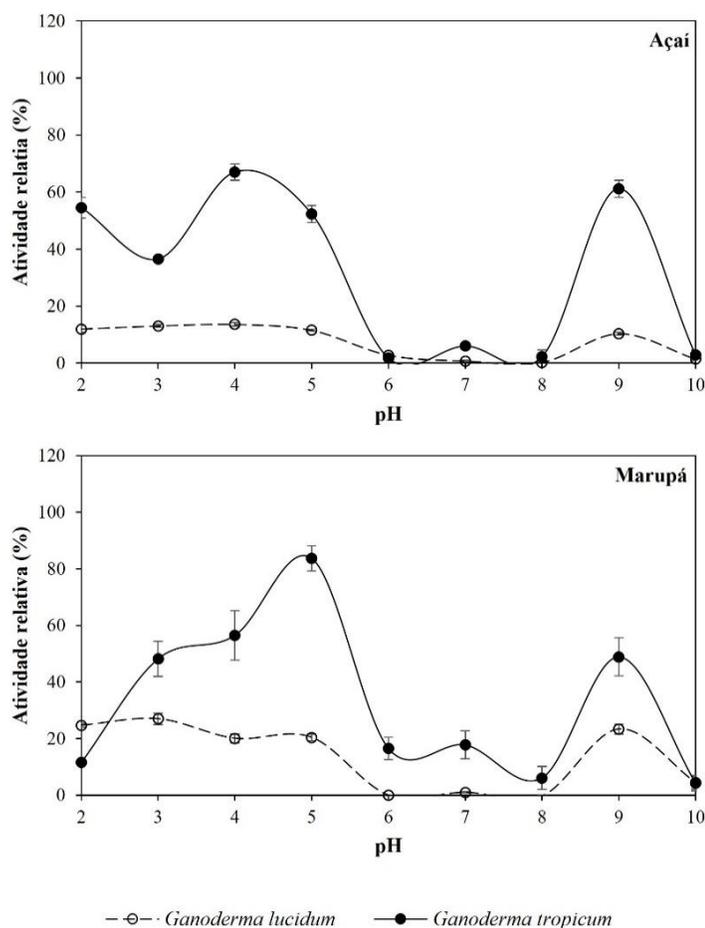
As peroxidases totais excretadas por *G. lucidum* cultivado em substrato à base de açaí não foram estáveis nas faixas de pH testadas, sendo registrada atividade relativa média de 13% entre os pH 2 e 5, e pH 9. Adicionalmente, quando cultivado em marupá observou-se atividade relativa média de 20% também entre os pH 2 e 5, e pH 9 (Figura 37).

Resultados semelhantes são encontrados na literatura acerca da característica ácida das peroxidases degradantes da lignina, no entanto, é relatada inibição da atividade na faixa de pH

básico, divergindo do que foi observado no presente estudo. Bilal, Asgher e Ramzan (2015) caracterizaram uma enzima manganês peroxidase purificada de *G. lucidum* e identificaram que o pH ótimo era faixa ácida, com 100% de atividade relativa obtida no pH 5, mas também identificaram boa estabilidade entre os pH 2 e 6, com significativo decréscimo da atividade em pH superiores a 7.

Adebayo-Tayo et al. (2016) ao avaliarem enzimas ligninolíticas produzidas por *Ganoderma* sp. identificaram que a atividade de lignina peroxidase foi estimulada em pH 6, porém manteve-se estável entre os pH 3 e 9. Ao passo que, a enzima manganês peroxidase produzida por esse fungo exibiu maior atividade em pH 3, e estabilidade entre pH 3 e 7, com inibição em pH 8 e 9.

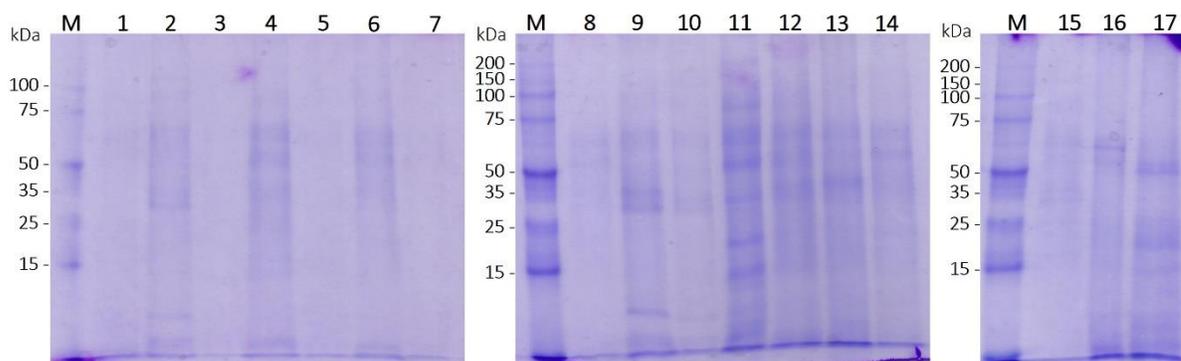
Figura 37. Efeito de pH sobre a atividade enzimática dos picos de atividade máxima de peroxidases totais, produzidas por *G. lucidum* e *G. tropicum* em resíduo de açaí e marupá, frente à diferentes faixas de pH.



6.6. Caracterização dos extratos enzimáticos quanto à massa molecular das proteínas

O perfil eletroforético foi determinado para os extratos provenientes de *G. lucidum* e *G. tropicum*, cultivados em resíduos de sementes de açaí e serragem de marupá, que apresentaram as maiores atividades lignocelulolíticas (CMCases, FPases, lacases e peroxidases), ao longo de 30 dias de fermentação. Nos extratos relativos à maiores atividades de FPases não foram observadas bandas proteicas (Figura 38, colunas 1, 3, 5 e 7), indicando baixa quantidade de proteínas. Os extratos de CMCase de *G. tropicum* e *G. lucidum*, resultaram em perfil proteico semelhantes, sendo observadas bandas proteicas entre 75 e 25 kDa, com bandas mais intensas entre 75 e 50 kDa (Figura 38, colunas 2, 4, 6 e 8). Ao passo que, o extrato de CMCase proveniente de *G. lucidum* cultivado em serragem de marupá, aos 12 dias de fermentação, apresentou bandas proteicas menos visíveis (Figura 38, coluna 8).

Figura 38. Análise de SDS-PAGE do extrato bruto dos picos de produções das enzimas lignocelulolíticas



(M) Marcador, (1) FPase (Tempo 2) de *G. tropicum* em açai, (2) CMCase (Tempo 14) de *G. tropicum* em açai, (3) FPase (Tempo 2) de *G. lucidum* em açai, (4) CMCase (Tempo 18) de *G. lucidum* em açai, (5) FPase (Tempo 4) de *G. tropicum* em marupá, (6) CMCase (Tempo 12) de *G. tropicum* em marupá, (7) FPase (Tempo 2) de *G. lucidum* em marupá, (8) CMCase (Tempo 12) de *G. lucidum* em marupá, (9) Lacase (Tempo 8) de *G. tropicum* em açai, (10) Peroxidases totais (Tempo 12) de *G. tropicum* em açai, (11) Lacase (Tempo 8) de *G. lucidum* em açai, (12) Peroxidases totais (Tempo 12) de *G. lucidum* em açai, (13) Lacase (Tempo 16) de *G. tropicum* em marupá, (14) Peroxidases totais (T16) de *G. tropicum* em marupá, (15) Lacase e peroxidases totais (Tempo 8) totais de *G. lucidum* em açai, (16) Controle de açai e (17) Controle de marupá

Liu et al. (2016) ao analisarem uma 1,4- β -endoglucanase purificada de *G. lucidum* identificaram massa proteica em torno de 43 kDa. Manavalan et al. (2015) estimaram massa molecular de 64 kDa de uma endoglucanase purificada de *G. lucidum*. Li et al. (2019) encontraram massa molecular em torno de 35 kDa para uma endoglucanase recombinante de *L. edodes* expressa em *P. pastoris*. Sendo assim, os pesos moleculares registrados no presente

estudo corroboram com a faixa de massa molecular relatada na literatura para endoglucanases provenientes de fungos da podridão branca.

O número, a posição e a intensidade das bandas de proteínas do extrato bruto de lacases variou em decorrência do substrato e espécie fúngica utilizados na fermentação (Figura 38, colunas 9, 11, 13, 15). O padrão de expressão de enzimas lignocelulolíticas por fungos da podridão branca pode variar em decorrência de alguns fatores, como condição de fermentação (estado sólido ou submerso), tempo de incubação e tipo de substratos utilizados como meio para fermentação (MANAVALAN et al., 2015).

O extrato bruto de lacases provenientes de *G. tropicum* em resíduo de açaí apresentou bandas em torno de 60, 35 e 12,5 kDa (Figura 38, coluna 9). Ao passo que o extrato de lacases obtido de *G. lucidum* no mesmo resíduo, demonstrou massas moleculares mais variadas, sendo observadas bandas de proteínas mais intensas, com massas moleculares de, aproximadamente, 90, 70, 50, 35, 20 e 15 kDa (Figura 38, coluna 11). O extrato de lacase proveniente da fermentação de *G. tropicum* em resíduo de marupá apresentou menores variações de massas moleculares, com bandas em, aproximadamente, 70 e 35 kDa (Figura 38, coluna 13). Baixa intensidade de bandas de proteínas foram encontradas para o extrato bruto obtido da fermentação de *G. lucidum* em resíduo de açaí, sendo registrado leve sinal de bandas nas regiões de 70 e 35 kDa (Figura 38, coluna 15).

As lacases podem apresentar peso molecular entre 24 e 85 kDa (POZDNYAKOVA et al., 2006), 50-80 kDa (NITHERANONT; WATANABE; ASADA, 2011), 55-90 kDa (ULLRICH et al., 2005), 50-100 kDa (CLAUS, 2004), dentre outros valores. Umar e Ahmed (2022) encontraram peso molecular de 65 kDa para lacase purificada de *G. leucocontextum*. Čilerdžić, Stajić e Vukojević (2016) ao avaliarem o extrato bruto de ligninases produzidas por *G. applanatum* em palha de trigo identificaram diferentes bandas proteicas, que variaram entre 40, 46, 55, 80 e 90 kDa. Os autores também observaram a influência do tipo de substrato utilizado e tempo de incubação. Kumar et al. (2015) caracterizaram uma lacase parcialmente purificada de *G. lucidum* e identificaram massa molecular de 24 a 66 kDa. O extrato bruto de peroxidases apresentou menor quantidade de bandas proteicas, exibindo proteínas com massa molecular em torno de 70, 60, 50 e 35 kDa (Figura 38, colunas 10, 12, 14 e 15). Čilerdžić, Stajić e Vukojević (2016) encontram perfil proteico para o extrato bruto de ligninases provenientes de *G. applanatum* semelhante, com pesos moleculares variando entre 40, 46, 55, 80 e 90 kDa.

Os controles (substratos sem inóculo fúngico) apresentaram bandas proteicas de intensidade e massas diferentes da maioria dos extratos brutos avaliados (Figura 38, colunas 16 e 17), indicando menor teor de proteínas nessas amostras e, conseqüentemente, menor interferência de detecção das bandas nos extratos proteicos. Para o substrato à base de sementes de açaí foi observada banda de massa molecular aproximada de 60 kDa (Figura 38, coluna 16), ao passo que o controle de serragem de marupá, verificou-se bandas com massas moleculares em torno de 65, 20 e 15 kDa (Figura 38, coluna 17).

7. CONCLUSÃO

As análises físico-químicas dos resíduos utilizados na fermentação sólida de *G. lucidum* e *G. tropicum* constataram redução dos teores de lipídios, fibras, celulose e minerais, além do aumento na quantidade de proteínas e carboidratos disponíveis. Sinais de degradação da fibra lignocelulósica, como porosidade, afrouxamento e desorganização da fibra, e surgimento de rachaduras foram observados. Assim, o bioprocessamento desses resíduos, obtido após fermentação de *G. lucidum* e *G. tropicum*, pode ser um recurso valioso na indústria de biorrefinaria, através da transformação da biomassa vegetal em matéria-prima para novos processos e produtos.

No geral, ambos os resíduos foram indutores da atividade lignocelulolítica, com variações entre si, destacando-se aquele à base de sementes de açaí. Adicionalmente, a produção das enzimas foi divergente conforme a espécie fúngica, sobressaindo *G. tropicum* na produção de endoglucanases e *G. lucidum* na produção de celulases totais e ligninases, recomendando-se um período de fermentação entre 12 e 14 dias para a obtenção de endoglucanases, 2 e 4 dias para celulases totais e cerca de 8 dias para ligninases.

As celulases de *G. lucidum* e *G. tropicum* apresentaram maior atividade em temperaturas mais elevadas, ao passo que as ligninases demonstraram estabilidade térmica em uma ampla faixa de temperatura. A presença de íons afetou negativamente a atividade de celulases totais e ligninases, enquanto as endoglucanases oriundas da fermentação em serragem de marupá foram estáveis à presença de íons. Já com relação ao pH, apenas as ligninases produzidas por *G. tropicum* foram estáveis em uma ampla faixa de pH. A estabilidade de enzimas lignocelulolíticas em diferentes condições é um requisito necessário para possíveis aplicações em diversos setores industriais, sendo assim, as ligninases obtidas neste estudo apresentaram características estáveis mais vantajosas, comparadas às celulases.

Diante do exposto, a realização de mais estudos que visem avaliar a influência de outros fatores na produção de enzimas lignocelulolíticas por *G. lucidum* e *G. tropicum* são essenciais, de modo a confirmar o potencial e a aplicação industrial dessas espécies.

8. REFERENCIAL TEÓRICO

A.O.A.C. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17. ed. Gaithersburg, Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 1975.

ABDEL-HAMID, A. M.; SOLBIATI, J. O.; CANN, I. K. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 82, p. 1–28, 2013.

ABDULHADI, Y.; ASHISH, V. Production, optimization and deinking capacity of alkaline cellulase produced from *Mucor circinelloides* WSSDBS2F1. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 55, n. 5–6, p. 605–618, 2021.

ADEBAYO-TAYO, B. et al. Catalytic activity and purification of thermostable lignases from *Ganoderma* sp. ade468 and its potential application in the decolourization of dyes. **Suranaree Journal of Science & Technology**, v. 23, n. 3, p. 309–323, 2016.

ADEYI, A. O. et al. *Ganoderma lucidum* ethanol extract abrogates metabolic syndrome in rats: In vivo evaluation of hypoglycemic, hypolipidemic, hypotensive and antioxidant properties. **Obesity Medicine**, v. 22, n. 7, p. 100320, 2021.

AGUIAR, L. V. B. et al. Production of commercial and Amazonian strains of *Pleurotus ostreatus* in plant waste. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 6, p. 47299–47321, 2022.

AGUIAR, L. V. B. et al. Substrate disinfection methods on the production and nutritional composition of a wild oyster mushroom from the amazon. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 45, p. e010321, 2021.

AHARONI, A.; JONGSMA, M. A.; BOUWMEESTER, H. J. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 12, p. 594–602., 2005.

AHMAD, M. F. *Ganoderma lucidum*: Persuasive biologically active constituents and their health endorsement. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, n. 4, p. 507–519, 2018.

AITA, B. C. et al. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, p. 103193, 2019.

AKBAR, R.; YAM, W. K. Interaction of ganoderic acid on HIV related target: molecular docking studies. **Bioinformation**, v. 7, n. 8, p. 413, 2011.

AKINFEMI, A.; OGUNWOLE, O. A. Chemical Composition and in vitro digestibility of rice straw treated with *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus Pulmonarius* and *Pleurotus tuber-regium*. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 1, p. 14–20, 2012.

AKINTUNDE, A. O. et al. Response of Growing Pigs to Diet Physical Form and Allzyme[®] SSF Supplementation in a Palm Kernel Meal-Based Diet. **Animal Production**, v. 13, n. 2, 2011.

AKINYELE, B. J.; OLANIYI, O. O.; AROTUPIN, D. J. Bioconversion of selected agricultural wastes and associated enzymes by *Volvariella volvacea*: An edible mushroom. **Research**

Journal of Microbiology, v. 6, n. 1, p. 63, 2011b.

ALARCÓN, E. et al. Changes in chemical and structural composition of sugarcane bagasse caused by alkaline pretreatments [Ca (OH) 2 and NaOH] modify the amount of endoglucanase and β -glucosidase produced by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. **Chemical Engineering Communications**, v. 209, n. 5, p. 594–606, 2022.

ALAYOUBI, R. et al. Low temperature ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass to enhance bioethanol yield. **Renewable Energy**, v. 145, p. 1808–1816, 2020.

ALCANTARA, E. R.; PEREIRA, S. C. C. Dinâmica organizacional de empreendimentos que comercializam produtos amazônicos na capital do Estado do Pará. **Revista Gestão Industrial**, v. 14, n. 2, 2018.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. Athens, GA, USA: John Wiley and Sons, 1996.

ALFIANTI, F. et al. Sutarman. Pasteurization of coconut water and rice washing water as a supplement for extending the life of oyster mushroom cultivation media. **Agritech: Jurnal Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Purwokerto**, v. 23, n. 1, 2021.

ALHOMODI, A. F. et al. Application of cocultures of fungal mycelium during solid-state fermentation of canola meal for potential feed application. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 98, n. 5, p. 509–517, 2021.

ALMEIDA, A. D. S. V. et al. Caffeine removal using activated biochar from acai seed (*Euterpe oleracea* Mart): Experimental study and description of adsorbate properties using Density Functional Theory (DFT). **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, 2021.

ALVES, J. L. F. et al. Exploring Açaí Seed (*Euterpe oleracea*) pyrolysis using multi-component kinetics and thermodynamics assessment towards its bioenergy potential. **Bioenergy Research**, v. 14, n. 1, p. 209–225, 2021.

ALVES, L. A. et al. Pre-treatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70, n. 72, p. 89–98, 1998.

AMANULLAH, S. M. et al. Effects of microbial additives on chemical composition and fermentation characteristics of barley silage. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n. 4, p. 511, 2014.

AMIN, F. et al. Production, thermodynamic characterization, and fruit juice quality improvement characteristics of an Exo-polygalacturonase from *Penicillium janczewskii*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 5, p. 140379, 2020.

AN, Q. et al. Evaluation of laccase production by two white-rot fungi using solid-state fermentation with different agricultural and forestry residues. **BioResources**, v. 16, n. 3, p. 5287–5300, 2021.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to

unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 163–173, 2016.

ARAÚJO, P. S. et al. Changes in biochemical composition of cassava and beet residues during solid state bioprocess with *Pleurotus ostreatus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, n. 101641, 2020.

ARAUJO, R. O. et al. Magnetic acid catalyst produced from acai seeds and red mud for biofuel production. **Energy Conversion and Management**, v. 228, p. 113636, 2021.

ARIFFIN, D.; IDRIS, A. S.; SINGH, G. Status of *Ganoderma* in oil palm. In: **Ganoderma diseases of perennial crops**. Wallingford: CAB International, 2000. p. 49–68.

ARÓSTEGUI, A. V.; PORTOCARRERO, M. D. **Propagación de especies forestales nativas promisorias en Jenaro Herrera**. Iquitos, Perú: Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana Centro de Investigaciones de Jenaro Herrera, 1992.

ASGHER, M.; SHARIF, Y.; BHATTI, H. N. Enhanced production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum* IBL-06 using lignocellulosic agricultural wastes. **International Journal of Chemical reactor engineering**, v. 8, n. 1, 2010.

ATILA, F. Comparative study on the mycelial growth and yield of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst. On different lignocellulosic wastes. **Acta Ecologica Sinica**, v. 40, n. 2, p. 153–157, 2020.

ATILANO-CAMINO, M. M. et al. Improving laccase production from *Trametes versicolor* using lignocellulosic residues as cosubstrates and evaluation of enzymes for blue wastewater biodegradation. **Journal of Environmental Management**, v. 275, n. 7, 2020.

ATOJI-HENRIQUE, K. et al. Influence of Substrate Composition on Beta-Glucans Production and Growth of *Ganoderma lucidum*. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 5, p. 190, 2017.

BABY, S.; JOHNSON, A. J.; GOVINDAN, B. Secondary metabolites from *Ganoderma*. **Phytochemistry**, v. 114, p. 66–101, 2015.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Factors governing dissolution process of lignocellulosic biomass in ionic liquid: Current status, overview and challenges. **Bioresource technology**, v. 178, p. 2–18, 2015.

BALAJI, V.; ARULAZHAGAN, P.; EBENEZER, P. Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. **Journal of Environmental Biology**, v. 35, n. 3, p. 521, 2014.

BALDRIAN, P. et al. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5–6, p. 670–676, 2005.

BALDRIAN, P. Fungal laccases—occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.

BARBIERI, A. et al. Anticancer and anti-inflammatory properties of *Ganoderma lucidum* extract

effects on melanoma and triple-negative breast cancer treatment. **Nutrients**, v. 9, n. 3, p. 210, 2017.

BARBOSA, A. D. M. et al. Caracterização de partículas de açaí visando seu potencial uso na construção civil. **Matéria**, v. 24, n. 3, p. 1–11, 2019.

BARROS, L. et al. The powerful in vitro bioactivity of *Euterpe oleracea* Mart. seeds and related phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 318–322, 2015.

BARROS, S. D. S. et al. Sementes de açaí (*Euterpe precatoria* Mart.) como uma nova fonte alternativa de celulose: Extração e caracterização. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e31110716661, 2021.

BARSEGHYAN, G. C.; BARAZANI, A.; WASSER, S. P. Medicinal Mushrooms with Anti-Phytopathogenic and Insecticidal Properties. In: **Mushroom Biotechnology: Developments and Applications is a comprehensive**. Romania: Academic Press, 2016. p. 137–156.

BAYER, E. A. et al. Conversion of agricultural residues to bioethanol: the roles of cellulases and cellulosomes. In: **Biofuels from Agricultural Wastes and Byproducts**. Blackwell Publishing, 2010. p. 67–96.

BENTIL, J. A. et al. Cellulase production by white-rot basidiomycetous fungi: solid-state versus submerged cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 14, p. 5827–5839, 2018.

BERCH, S. M. et al. Development and potential of the cultivated and wild-harvested mushroom industries in the Republic of Korea and British Columbia. **Journal of Ecosystems and Management**, v. 8, n. 3, p. 53–75, 2007

BERLIN, A. et al. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates—evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 175–184, 2005.

BERNARDI, A. V. et al. Functional characterization of GH7 endo-1, 4- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus* and its potential industrial application. **Protein Expression and Purification**, v. 150, p. 1–11, 2018.

BHARADWAJ, S. et al. Discovery of *Ganoderma lucidum* triterpenoids as potential inhibitors against Dengue virus NS2B-NS3 protease. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

BHARDWAJ, N.; KATYAL, P.; SHARMA, A. Suppression of inflammatory and allergic responses by pharmacologically potent fungus *Ganoderma lucidum*. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 104–117, 2014.

BHARGAV, S. et al. Solid-state fermentation: an overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, n. 1, p. 49–70, 2008.

BHARTI, A. S. et al. Assessment of the elemental profile of leafy vegetables by synchrotron-radiation-induced energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 88, n. 3, p. 653–661, 2021.

BICHARA, C. M. G.; ROGEZ, H. Açaí (*Euterpe oleracea* Martius). In: **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**. 2. ed. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 2011. p. 1–26.

BILAL, M. et al. Immobilized ligninolytic enzymes: an innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants—a review. **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 646–659, 2017.

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**, v. 10, n. 14, p. 456–464, 2015.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. Ligninolytic enzymes mediated ligninolysis: an untapped biocatalytic potential to deconstruct lignocellulosic molecules in a sustainable manner. **Catalysis Letters**, v. 150, n. 2, p. 524–543, 2020.

BLIGH, E. G.; DYER, W. No A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

BOECHAT, A. **Produção de celulasas pelo microrganismo termofílico *Bacillus* sp SMIA-E**. Campos dos Goytacazes-RJ, 2010, 721. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Centro de Ciências e tecnologias agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

BOEIRA, L. S. et al. Chemical and sensorial characterization of a novel alcoholic beverage produced with native acai (*Euterpe precatoria*) from different regions of the Amazonas state. **Lwt**, v. 117, p. 108632, 2020.

BOYCE, A.; WALSH, G. Characterisation of a novel thermostable endoglucanase from *Alicyclobacillus vulcanalis* of potential application in bioethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 18, p. 7515–7525, 2015.

BRANDT, A. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550–583, 2013.

BROEKER, J. et al. The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium *Clostridium stercorarium*: comparative characterisation and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2018.

BRUGNARI, T. et al. Characterisation of free and immobilised laccases from ***Ganoderma lucidum***: application on bisphenol a degradation. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2020.

BUFALINO, L. et al. Local variability of yield and physical properties of açaí waste and improvement of its energetic attributes by separation of lignocellulosic fibers and seeds. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 10, n. 5, p. 053102, 2018.

BUGG, T. D. et al. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 12, p. 1883–1896, 2011.

- BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v. 28, n. 3, p. 237–259, 2008.
- BURATTO, R. T.; COCERO, M. J.; MARTÍN, Á. Characterization of industrial açai pulp residues and valorization by microwave-assisted extraction. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 160, n. 10, 2021.
- BURSTROM, H. G. Calcium and plant growth. Biological Reviews. **Biological Reviews**, v. 43, n. 3, p. 287–316, 1968.
- BUSWELL, J. A.; CHANG, S. T. Edible mushrooms: attributes and applications. In: **Genetics and breeding of edible mushrooms**. Philadelphia: Routledge, 1993. p. 297–324.
- CAI, M. et al. Characteristics and antifatigue activity of graded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* separated by cascade membrane technology. **Carbohydrate Polymers**, p. 118160, 2021.
- CAI, Q.; LI, Y.; PEI, G. Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* attenuate microglia-mediated neuroinflammation and modulate microglial phagocytosis and behavioural response. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2017.
- CAIRNS, J. R. K.; ESEN, A. β -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 20, p. 3389–3405, 2010.
- CAMARERO, S. et al. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 15, p. 10324–10330, 1999.
- CANTARELLA, H.; MONTEZANO, Z. F. Nitrogênio e enxofre. In: **Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes: nutrientes**. Piracicaba: IPNI-Brasil, 2010. p. 5–46.
- CAO, Y. et al. *Ganoderma*: A cancer immunotherapy review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1217, 2018.
- CAO, Y.; WU, S. H.; DAI, Y. C. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom “Lingzhi”. **Fungal Diversity**, v. 56, n. 1, p. 49–62, 2012.
- CAO, Y.; YUAN, H. S. *Ganoderma mutabile* sp. nov. from southwestern China based on morphological and molecular data. **Mycological Progress**, v. 12, n. 1, p. 121–126, 2013.
- CARAPITO, R. et al. Molecular basis of arabinobio-hydrolase activity in phytopathogenic fungi: crystal structure and catalytic mechanism of *Fusarium graminearum* gh93 exo- α -L-arabinanase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12285–12296, 2009.
- CARLI, S. et al. A novel thermostable and halotolerant xylanase from *Colletotrichum graminicola*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, n. 1, p. S508–S517, 2016.
- CARRASCO, J. et al. Supplementation in mushroom crops and its impact on yield and quality. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- CARVALHO, D. M. et al. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane

bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118–126, 2015.

CARVALHO, T. et al. Determinação da Atividade de CMCase e FPase da Estipe Fúngica *Rhizopus* sp. através da Bioconversão do Resíduo de Seriguela (*Spondias purpurea* L.) Evaluation of CMCase Activity and FPase of *Rhizopus* sp. Stipe Through the Bioconversion of Red Mombin Re. **Ciencias Biológicas da Saúde**, v. 13, n. 3, p. 145–150, 2011.

CATALÁN, E.; SÁNCHEZ, A. Solid-State Fermentation (SSF) Versus Submerged Fermentation (SmF) for the Recovery of Cellulases from Coffee Husks: A Life Cycle Assessment (LCA) Based Comparison. **Energies**, v. 13, n. 11, p. 2685, 2020.

CEDRIM, P. C. A. S.; BARROS, E. M. A.; NASCIMENTO, T. G. D. Antioxidant properties of acai (*Euterpe oleracea*) in the metabolic syndrome. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. e2017092, 2018.

CHAKRABORTY, K. et al. Interplay between sodium and chloride decides the plant's fate under salt and drought stress conditions. In: **Plant Nutrition and Food Security in the Era of Climate Change**. Academic Press, 2022. p. 271–314.

CHAN, C. P. Forced degradation studies: current trends and future perspectives for protein-based therapeutics. **Expert Review of Proteomics**, v. 13, n. 7, p. 651–658, 2016.

CHANDRA, R. P.; ARANTES, V.; SADDLER, J. Steam pretreatment of agricultural residues facilitates hemicellulose recovery while enhancing enzyme accessibility to cellulose. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 302–307, 2015.

CHANDRA, R.; CHOWDHARY, P. Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 17, n. 2, p. 326–342, 2015.

CHANG, S. T.; BUSWEL, J. A. *Ganoderma lucidum* (Curt. Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae) – A mushrooming medicinal mushroom. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 139–146, 1999.

CHANG, S. T. The origin and early development of straw mushroom cultivation. **Economic Botany**, v. 31, n. 3, p. 374–376, 1997.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Edible mushrooms and their cultivation**. Florida: CRC Press, 1989.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. New York: CRC press, 2004.

CHANG, S.; WASSER, S. **The cultivation and environmental impact of mushrooms**. New York: Oxford University Press, 2017.

CHEN, C. L.; CHANG, H. M.; KIRK, T. K. Carboxylic Acids Produced Through Oxidative Cleavage of Aromatic Rings During Degradation of Lignin in Spruce Wood by *Phanerochaete Chrysosporium*. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 3, n. 1, p. 35–57, 1983.

- CHEN, F. et al. Integrated production of edible mushroom (*Auricularia auricular-judae*), fermentable sugar and solid biofuel. **Renewable Energy**, v. 170, p. 172–180, 2021.
- CHEN, H. Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. In: **Biotechnology of Lignocellulose**. Dordrecht: Springer, 2014. p. 25–71.
- CHEN, H.; WANG, L. Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Biomass. In: **Technologies for Biochemical Conversion of Biomass**. Beijing, China: Academic Press, 2017. p. 65–99.
- CHEN, S. et al. Anti-tumor and anti-angiogenic ergosterols from *Ganoderma lucidum*. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, p. 85, 2017.
- CHEN, X. et al. Gano oil: A novel antinociceptive agent extracted from *Ganoderma lucidum* inhibits paw oedema and relieves pain by hypnotic and analgesic actions of fatty acid amides. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 263, p. 113144., 2020.
- CHEN, Z. et al. Effect of continuous cropping soil on the biosynthesis of bioactive compounds and the antioxidant activity of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 23, n. 8, p. 25–37, 2021.
- CHMELOVÁ, D. et al. The production of laccases by white-rot fungi under solid-state fermentation conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 1–20, 2022.
- CHRISTOPHER, L. P.; YAO, B.; JI, Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, p. 12, 2014.
- ĆILERDŽIĆ, J.; STAJIĆ, M.; VUKOJEVIĆ, J. Degradation of wheat straw and oak sawdust by *Ganoderma applanatum*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 114, p. 39–44, 2016.
- CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, v. 35, n. 1, p. 93–96, 2004.
- COLPAN, C. O.; NALBANT, Y.; ERCELIK, M. Fundamentals of Fuel Cell Technologies. In: **Comprehensive Energy Systems**. Buca, Turkey: Elsevier Inc, 2018. p. 1107–1130.
- CÖR, D.; KNEZ, Ž.; HRNČIČ, M. K. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma Lucidum* terpenoids and polysaccharides: A review. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 1–21, 2018.
- CORRÊA, R. C. G. et al. Spent mushroom substrate of *Pleurotus pulmonarius*: a source of easily hydrolyzable lignocellulose. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 5, p. 439–448, 2016.
- COSTA, R. G. et al. Effect of operating conditions on the yield and quality of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced in spouted bed. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. LWT-Food Sci. Technol., 2015.
- COSTA, T. M. et al. Kinetic identification of phenolic compounds and potential production of caffeic acid by *Ganoderma lipsiense* in solid-state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 8, p. 1325–1332, 2019.

COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 500–513, 2006.

CUIN, T. A.; DREYER, I.; MICHARD, E. The role of potassium channels in *Arabidopsis thaliana* long distance electrical signalling: AKT2 modulates tissue excitability while GORK shapes action potentials. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 926, 2018.

D'ARACE, L. M. B. et al. O Marupá - Simarouba amara Aubl. 1. ed. São José dos Pinhais: **Brazilian Journals Editora**, 2021.

D'ARACE, L. M. B. O Marupá - Simarouba amara Aubl. 1. ed. São José dos Pinhais: Brazilian Journals Editora, 2021.

DA SILVA, P. O. et al. Application of an endo-xylanase from *Aspergillus japonicus* in the fruit juice clarification and fruit peel waste hydrolysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101312, 2019.

DASHTBAN, M. et al. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 36–50, 2010.

DE GONZALO, G. et al. Bacterial enzymes involved in lignin degradation. **Journal of Biotechnology**, v. 236, p. 110–119, 2016.

DE LIMA, A. C. P. et al. Physicochemical characterization of residual biomass (seed and fiber) from açai (*Euterpe oleracea*) processing and assessment of the potential for energy production and bioproducts. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, n. 3, p. 925–935, 2021.

DE MENEZES, T. A. et al. Production of basidiomata and ligninolytic enzymes by the lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (agaricomycetes), in licuri (*Syagrus coronata*) wastes in Brazil. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 18, n. 12, 2016.

OLIVEIRA, E. D. S. et al. Cellulase and Xylanase production by *Ganoderma lucidum* in solid-state fermentation using amazonian lignocellulosic wastes. **Studies in Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 3, p. 455–471, 2022.

OLIVEIRA, E. D. S. et al. Enzymatic extract of *Aspergillus fumigatus* CCT 7873 for hydrolysis of sugarcane bagasse and generation of cellulose nanocrystals (CNC). **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-12, 2020.

DEMIRBAS, A. Combustion characteristics of different biomass fuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 30, n. 2, p. 219–230, 2004.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6065–6072, 2011.

DEVECCHI, M. F.; PIRANI, J. R.; THOMAS, W.W. **Simaroubaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB1381>>. Acesso em: 20/07/2022

DIAS, J. C. C. A. et al. Avaliação da estabilidade in vitro de uma protease comercial. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 54, p. 618–622, 2002.

DIAMANTOPOULOU, P.; GARDELI, C.; PAPANIKOLAOU, S. Impact of olive mill wastewaters on the physiological behavior of a wild-type new *Ganoderma resinaceum* isolate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 16, p. 20570–20585, 2021.

DIRO, B. B.; DABA, T.; TEMAM, G. G. Production and characterization of cellulase from mushroom (*Pleurotus ostreatus*) for effective degradation of cellulose., v. 2, n. 1, p. 135–150, 2021.

DODD, D.; CANN, I. K. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Gcb Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2–17, 2009.

DONER, L. W.; HICKS, K. B. Isolation of hemicellulose from corn fiber by alkaline hydrogen peroxide extraction. **Cereal Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 176–181, 1997.

DONINI, L. P. et al. Diferentes Substratos E Dextrose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 331–338, 2005.

DRAGO, G. A.; GIBSON, T. D. Enzyme stability and stabilisation: applications and case studies. In: **Engineering and Manufacturing for Biotechnology**. Dordrecht: Springer, 2001. p. 361–376.

DRAKE, M. et al. Substrate characteristics that influence the filter paper assay's ability to predict the hydrolytic potential of cellulase mixtures. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 8, n. 28, p. 10521–10528, 2020.

DREYER, I.; GOMEZ-PORRAS, J. L.; RIEDELSBERGER, J. The potassium battery: a mobile energy source for transport processes in plant vascular tissues. **New Phytologist**, v. 216, n. 4, p. 1049–1053, 2017.

DUGGER, B. N.; DICKSON, D. W. Pathology of neurodegenerative diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 7, 2017.

DULF, F. V. et al. Liberation and recovery of phenolic antioxidants and lipids in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) pomace by solid-state bioprocessing using *Aspergillus niger* and *Rhizopus oligosporus* strains. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 87, p. 241–249, 2018.

DUTTA, S. D. et al. Characterization of cellulolytic enzymes of *Fusarium* soil Isolates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 279–285, 2018.

ECONOMOU, C. N.; DIAMANTOPOULOU, P. A.; PHILIPPOUSSIS, A. N. Valorization of spent oyster mushroom substrate and laccase recovery through successive solid state cultivation of *Pleurotus*, *Ganoderma*, and *Lentinula* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 12, p. 5213–5222, 2017.

EKER, M. Assessment of procurement systems for unutilized logging residues for Brutian pine forest of Turkey. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2455–2468, 2011.

ELIOPOULOS, C. et al. Conversion of brewers' spent grain into proteinaceous animal feed using solid state fermentation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 20, p. 29562–29569, 2022.

ELISASHVILI, V. et al. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 457–462, 2008.

ELISASHVILI, V. et al. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 331–339, 2009.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; PENNINGCKX, M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1531–1538, 2008.

EL-KHASHAB, I. H. Antiangiogenic and Proapoptotic Activities of *Atorvastatin* and *Ganoderma lucidum* in Tumor Mouse Model via VEGF and Caspase-3 Pathways. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 22, n. 4, p. 1095–1104, 2021.

FAISON, B. D.; KIRK, T. K. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 299–304, 1985.

FALADE, A. O. et al. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 1, p. e00394, 2017.

FANG, W. et al. White rot fungi pretreatment to advance volatile fatty acid production from solid-state fermentation of solid digestate: Efficiency and mechanisms. **Efficiency and mechanisms**, v. 162, p. 534–541, 2018.

FANG, Z. et al. Identification of a laccase Glac15 from *Ganoderma lucidum* 77002 and its application in bioethanol production David Wilson. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 2–13, 2015.

FARIA, S. P. et al. Production of cellulases and xylanases by *Humicola grisea* var. *thermoidea* and application in sugarcane bagasse arabinoxylan hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 158, p. 112968, 2020.

FEENEY, M. J. et al. Mushrooms and health summit proceedings. **Journal of Nutrition**, v. 144, n. 7, 2014.

FERNANDA, R. et al. Suppression of *Ganoderma boninense* using benzoic acid: Impact on cellular ultrastructure and anatomical changes in oil palm wood. **Forests**, v. 12, n. 9, p. 1231, 2021.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509,

1957.

FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Potential of jackfruit peel as precursor for activated carbon prepared by microwave induced NaOH activation. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 143–150, 2012.

FOUGERE, D. et al. Effect of acidic pretreatment on the chemistry and distribution of lignin in aspen wood and wheat straw substrates. **Biomass and Bioenergy**, v. 91, p. 56–68, 2016.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 149–154, 2005.

GAETE, A. V.; TEODORO, C. E. DE S.; MARTINAZZO, A. P. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de celulase: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. 1–33, 2020.

GANASH, M. et al. Lignocellulolytic activity of *Pleurotus ostreatus* under solid state fermentation using silage, stover, and cobs of maize. **BioResources**, v. 16, n. 2, p. 3797–3807, 2021.

GAUNA, A. et al. Secretome characterization of the lignocellulose-degrading fungi *Pycnoporus sanguineus* and *Ganoderma resinaceum* growing on *Panicum prionitis* biomass. **Mycologia**, v. 113, n. 5, p. 877–890, 2021.

GHAJARI, G.; NABIUNI, M.; AMINI, E. The association between testicular toxicity induced by Li₂Co₃ and protective effect of *Ganoderma lucidum*: Alteration of Bax & c-Kit genes expression. **Tissue and Cell**, v. 72, n. February, p. 101552, 2021.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GIBSON, L. J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 9, n. 76, p. 2749–2766, 2012.

GILBERT, H. J.; STÅLBRAND, H.; BRUMER, H. How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 338–348, 2008.

GILL, B. S.; KUMAR, S. Evaluating antioxidant potential of ganoderic acid A in STAT 3 pathway in prostate cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 43, n. 12, p. 1411–1422, 2016.

GINNI, G. et al. Valorization of agricultural residues: Different biorefinery routes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105435, 2021.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GOETZE, A. M.; SCHENAUER, M. R.; FLYNN, G. C. Assessing monoclonal antibody product quality attribute criticality through clinical studies. **mAbs**, v. 2, n. 5, p. 500–507, 2010.

- GOMEZ, J. A.; HÖFFNER, K.; BARTON, P. I. Production of biofuels from sunlight and lignocellulosic sugars using microbial consortia. **Chemical Engineering Science**, v. 239, p. 116615, 2021.
- GRAMINHA, E. B. N. et al. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, n. 1–2, p. 1–22, 2008.
- GRIMALDI, M. P. et al. Evaluation of lime and hydrothermal pretreatments for efficient enzymatic hydrolysis of raw sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2015.
- HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3479–3500, 2010.
- HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17–34, 2003.
- HAKULINEN, N.; ROUVINEN, J. Three-dimensional structures of laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 857–868, 2015.
- HAMMEL, K. E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 349–355, 2008.
- HAN, C. et al. Identification and Characterization of a Novel Hyperthermostable Bifunctional Cellobiohydrolase- Xylanase Enzyme for Synergistic Effect With Commercial Cellulase on Pretreated Wheat Straw Degradation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. April, p. 1–13, 2020.
- HAN, J. R.; AN, C. H.; YUAN, J. M. Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Ganoderma lucidum* for degrading starch and upgrading nutritional value. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 4, p. 910–915, 2005.
- HARIHARAN, S.; NAMBISAN, P. Optimization of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase, and Lac Production from *Ganoderma lucidum* Under Solid State Fermentation of Pineapple Leaf. **BioResources**, v. 8, n. 1, p. 250–271, 2013.
- HASSAN, M. M. et al. Biochemical characterization of an extracellular laccase from *Pleurotus ostreatus* ARC280. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8, n. 8, p. 4525–4536, 2012.
- HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2–3, p. 125–135, 1994.
- HAWKSWORTH, D. L. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 9, p. 2425–2433, 2012.
- HEAH, K. G. et al. In Vitro and in vivo Studies of *Ganoderma lucidum* in Cancer. **Journal of International Dental and Medical Research**, v. 13, n. 1, p. 379–383, 2020.
- HEINZKILL, M., et al. Characterization of laccases and peroxidases from wood rotting fungi.

Applied and Environmental Microbiology, v. 64, p. 1601–1606, 1988.

HERMOSILLA, E. et al. Combined effect of enzyme inducers and nitrate on selective lignin degradation in wheat straw by *Ganoderma lobatum*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 27, p. 21984–21996, 2017.

HIDAYAT, T. et al. Evaluation of nutritive values and digestibility's cacao (*Theobroma cacao* L.) pod husk fermented with lingzhi mushroom (*Ganoderma lucidum*) at different concentration and incubation time. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 951, n. 1, p. 012024, 2022.

HIRANO, T. et al. Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 64, n. 9, p. 1958–1962, 2000.

HOEGGER, P. J. et al. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. **The FEBS journal**, v. 273, n. 10, p. 2308–2326, 2006.

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**, v. 434, n. 3, p. 362–366, 1998.

HOFRICHTER, M. Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 454–466, 2002.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175–186, 2004.

HONG, C. Y. et al. Phanerochaete chrysosporium multienzyme catabolic system for in vivo modification of synthetic lignin to succinic acid. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 7, p. 1749–1759, 2017.

HONG, M. R.; PARK, C. S.; OH, D. K. Characterization of a thermostable endo-1, 5- α -L-arabinanase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 9, p. 1439–1443, 2009.

HOOGE, D. M. et al. Meta-analysis of broiler chicken trials using diets with or without Allzyme® SSF enzyme complex. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 9, p. 819–823, 2010.

HOWARD, R. L. et al. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602–619, 2003.

HSIEH, C.; YANG, F. C. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p. 105–109, 2004.

HU, L. L. et al. A new nortriterpenoid from the fruiting bodies of *Ganoderma tropicum*. **Phytochemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 11–13, 2014.

- HU, L. L. et al. Three new lanostanoid triterpenes from the fruiting bodies of *Ganoderma tropicum*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 15, n. 4, p. 357–362, 2013.
- HUANG, C. H. et al. Evaluation of the hypoglycaemic and antioxidant effects of submerged *Ganoderma lucidum* cultures in type 2 diabetic rats. **Mycology**, v. 12, n. 2, p. 82–93, 2021.
- HUBBE, M. A. Prospects for maintaining strength of paper and paperboard products while using less forest resources: A Review. **Bioresource Technology**, v. 9, n. 1, p. 1–131, 2014.
- HUFFMAN, D. M. et al. **Mushrooms and other fungi of the midcontinental United States**. Iowa City: University of Iowa Press, 2008.
- HWANG, J. Y. et al. **Characterization of Minerals, Metals and Materials**. Orlando, USA: John Wiley & Sons, 2012.
- IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. São Paulo: 4ª Edição. 1ª Edição Digital, 1020 p., 2008.
- IMPERIAL COLLEGE LONDON. **Chemical building blocks from renewable resources**. Disponível em: <https://www.imperial.ac.uk/news/143947/chemical-building-blocks-from-renewable-resources/>. Acesso em: 25 de jul. 2022.
- ISHIMOTO, Y. et al. Enhanced release of immunostimulating β -1, 3-glucan by autodigestion of the lingzhi medicinal mushroom, *Ganoderma lingzhi* (Agaricomycetes). **International journal of medicinal mushrooms**, v. 19, n. 1, 2017.
- ITAI, Y. et al. Numerical and experimental assessment of a downdraft gasifier for electric power in Amazon using açai seed (*Euterpe oleracea* Mart.) as a fuel. **Renewable Energy**, v. 66, p. 662–669, 2014.
- IVERSON, S. J.; LANG, S. L. C.; COOPER, M. H. Comparison of the bligh and dyer and folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, v. 36, n. 11, p. 1283–1287, 2001.
- JAIN, K. K. et al. De novo transcriptome assembly and protein profiling of copper-induced lignocellulolytic fungus *Ganoderma lucidum* MDU-7 reveals genes involved in lignocellulose degradation and terpenoid biosynthetic pathways. **Genomics**, v. 112, n. 1, p. 184–198, 2020.
- JAMES, A. K. et al. Ash management review—applications of biomass bottom ash. **Energies**, v. 5, n. 10, p. 3856–3873, 2012.
- JANUSZ, G. et al. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 1, p. 1–12, 2013.
- JAYASINGHE, C. et al. Favorable Culture Conditions for Mycelial Growth of Korean Wild Strains in *Ganoderma lucidum*. **Mycobiology**, v. 36, n. 1, p. 28–33, 2008.
- JENSEN, K. A. et al. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3679–3686, 1996.

JESUS, M. et al. Current options in the valorisation of vine pruning residue for the production of biofuels, biopolymers, antioxidants, and bio-composites following the concept of biorefinery: a review. **Polymers**, v. 14, n. 9, p. 1640, 2022.

JONG, S. C.; BIRMINGHAM, J. M. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. **Advances in applied microbiology**, v. 37, p. 101–134, 1992.

JULIAN, A. V.; REYES, R. G.; EGUCHI, F. Agro-industrial waste conversion into medicinal mushroom cultivation. In: **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**. Elsevier, 2019. p. 1–8.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1219–1227, 2012.

KACHLISHVILI, E. et al. Screening of novel basidiomycetes for the production of lignocellulolytic enzymes during fermentation of food wastes. **Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 9–15, 2012.

KACHLISHVILI, E.; METREVELI, E.; ELISASHVILI, V. Modulation of *Cerrena unicolor* laccase and manganese peroxidase production. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2014.

KAINTHOLA, J. et al. Fungal pretreatment and associated kinetics of rice straw hydrolysis to accelerate methane yield from anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 286, n. 3, p. 121368, 2019.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Current trends in research and application of microbial cellulases. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 41–53, 2011.

KARSTEN, P. A. Enumeratio boletinearum et polyporearum fennicarum, systemate novo dispositarum. **Rev. Mycol. (Toulouse)**, v. 3, p. 16–19, 1881.

KAUR, A.; KUHAD, R. C. Valorization of rice straw for ethanol production and lignin recovery using combined acid-alkali pre-treatment. **BioEnergy Research**, v. 12, n. 3, p. 570–582, 2019.

KAWAI, S. et al. New polymeric model substrates for the study of microbial ligninolysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 9, p. 3407–3414, 1995.

KAZA, S. et al. **What a waste 2.0: a global snapshot of solid waste management to 2050**. Washington, D.C.: World Bank Publications, 2018.

KEISHAM, M.; MUKHERJEE, S.; BHATLA, S. C. Mechanisms of sodium transport in plants—progresses and challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 647, 2018.

KHAN, N. A. et al. Role of various supplementary materials with cotton waste substrate for production of *Pleurotus ostreatus* an oyster mushroom. **Pakistan Journal of Botany**, v. 49, n. 5, p. 1911–1915, 2017.

KHANAHMADI, M. et al. Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid- state fermentation in flask and tray bioreactor. **Biocatalysis and**

- Agricultural Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 272–282, 2018.
- KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, n. 4, p. 361–375, 2004.
- KIM, L. et al. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 22, 2019.
- KJELDAHL, J. A. A new method for the estimation of nitrogen in organic compounds. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 366, 1883.
- KNOP, D.; YARDEN, O.; HADAR, Y. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1025–1038, 2015.
- KORMELINK, F. J. M.; VORAGEN, A. G. J. Degradation of different [(glucurono) arabino] xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 688–695, 1993.
- KOUTROTSIOS, G. et al. Bioconversion of lignocellulosic residues by *Agrocybe cylindracea* and *Pleurotus ostreatus* mushroom fungi-Assessment of their effect on the final product and spent substrate properties. **Food Chemistry**, v. 161, p. 127–135, 2014.
- KRITTANAWONG, C. et al. Mushroom consumption and cardiovascular health: a systematic review. **American Journal of Medicine**, v. 134, n. 5, p. 637- 642.e2, 2021.
- KUBICEK, C. P. **Fungi and lignocellulosic biomass**. John Wiley & Sons, 2012.
- KUHAD, R. C. et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249–272, 2016.
- KUHAR, F.; CASTIGLIA, V.; LEVIN, L. Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 104, p. 238–243, 2015.
- KUMAR, A. et al. Laccase isozymes from *Ganoderma lucidum* MDU-7: Isolation, characterization, catalytic properties and differential role during oxidative stress. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 113, p. 68–75, 2015.
- KUMLA, J. et al. Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production through the utilization of agro-industrial waste. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 1–41, 2020.
- KURT, S.; BUYUKALACA, S. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3164–3169, 2010.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

- LASA, B. et al. Effects of low and high levels of magnesium on the response of sunflower plants grown with ammonium and nitrate. **Plant and Soil**, v. 225, n. 1, p. 167–174, 2000.
- LATIF, Z. et al. Development of efficient strain of *Ganoderma lucidum* for biological stripping of cotton fabric dyed Reactive Blue 21. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 12, p. 7550–7560, 2021.
- LEE, M. E. et al. Enzymatic production of sugar from fungi and fungi-infected lignocellulosic biomass by a new cellulosomal enzyme harboring N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity. **Bioresource Technology**, v. 319, n. 7, p. 124242, 2021.
- LEITE, P. et al. Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 27, p. 100407, 2020.
- LI, C. H.; WANG, H. R.; YAN, T. R. Cloning, purification, and characterization of a heat-and alkaline-stable endoglucanase B from *Aspergillus niger* BCRC31494. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9774–9789, 2013.
- LI, H. et al. Reviewing the world's edible mushroom species: A new evidence-based classification system. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 1982–2014, 2021.
- LI, H. J. et al. Enhancement of ganoderic acid production by constitutively expressing *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Ganoderma lucidum*. **Journal of Biotechnology**, v. 227, n. 3, p. 35–40, 2016.
- LI, L. et al. Characteristics of a recombinant *Lentinula edodes* endoglucanase and its potential for application in silage of rape straw. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 49–56, 2019.
- LI, M.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. J. Current understanding of the correlation of lignin structure with biomass recalcitrance. **Frontiers in Chemistry**, v. 4, p. 45, 2016.
- LI, W. et al. Characteristics of self-alkalization in high-rate denitrifying automatic circulation (DAC) reactor fed with methanol and sodium acetate. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 44–50, 2014.
- LI, W. et al. Insights into the synergistic biodegradation of waste papers using a combination of thermostable endoglucanase and cellobiohydrolase from *Chaetomium thermophilum*. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 1, p. 49–54, 2018.
- LI, X.; CHANG, S. H.; LIU, R. Industrial applications of cellulases and hemicellulases. In: **Fungal Cellulolytic Enzymes**. Singapore: Springer, p. 267–282, 2018.
- LI, X.; YU, H. Y. Characterization of a halostable endoglucanase with organic solvent-tolerant property from *Haloarcula* sp. G10. *, v. 62, p. 101–106, 2013.
- LIAN, L. D. et al. GlSwi6 Positively Regulates Cellulase and Xylanase Activities through Intracellular Ca²⁺ Signaling in *Ganoderma lucidum*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, p. 187, 2022.

- LIU, G. et al. Functional and structural analyses of a 1,4- β -endoglucanase from *Ganoderma lucidum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 86, p. 67–74, 2016.
- LIU, H. et al. In vitro and in vivo modifications of recombinant and human IgG antibodies. **mAbs**, v. 6, n. 5, p. 1145–1154, 2014.
- LIU, J. et al. Anti-Androgen Effects of Extracts and Compounds from *Ganoderma lucidum*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 2, p. 231–243, 2009.
- LIU, J. et al. Lignin waste as co-substrate on decolorization of azo dyes by *Ganoderma lucidum*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 122, p. 85–92, 2021.
- LIU, Y. et al. Hypoglycemic effect of inulin combined with *Ganoderma lucidum* polysaccharides in T2DM rats. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 381–390, 2019.
- LIU, Y. et al. Protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in precision-cut carp liver slices. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1209–1221, 2017.
- LIU, Z. H. et al. Transforming biorefinery designs with ‘Plug-In Processes of Lignin’ to enable economic waste valorization. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2021.
- LOPES, E. et al. Mapping the socio-ecology of Non Timber Forest Products (NTFP) extraction in the Brazilian Amazon: The case of açai (*Euterpe precatoria* Mart) in Acre. **Landscape and Urban Planning**, v. 188, p. 110–117, 2019.
- LÓPEZ, A. M. Q.; SILVA, A. L. D. S.; SANTOS, E. C. L. D. The fungal ability for biobleaching/biopulping/bioremediation of lignin-like compounds of agro-industrial raw material. **Química Nova**, v. 40, n. 8, p. 916–931, 2017.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 2 368 p.
- LOYD, A. L. et al. Identifying the “Mushroom of immortality”: Assessing the *Ganoderma* species composition in commercial reishi products. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 1–14, 2018.
- LU, S. Y. et al. Isolation of benzolactones, Ganodumones A–F from *Ganoderma lucidum* and their antibacterial activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 98, p. 103723, 2020.
- LU, X. et al. Biomass, lignocellulolytic enzyme production and lignocellulose degradation patterns by *Auricularia auricula* during solid state fermentation of corn stalk residues under different pretreatments. **Food Chemistry**, v. 384, p. 132622, 2022.
- LUANGHARN, T. et al. A new record of *Ganoderma tropicum* (Basidiomycota, Polyporales) for Thailand and first assessment of optimum conditions for mycelia production. **MycoKeys**, v. 51, p. 65–83, 2019.
- LUO, L. et al. Purification and characterization of an alkaliphilic endo-xylanase from *Streptomyces althioticus* LMZM and utilization in the pulp paper industry. **Journal of Chemical**

- Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 1093–1098, 2016.
- LUO, X.; ZHU, J. Y. Effects of Drying-Induced Fiber Hornification on Enzymatic Saccharification of Lignocelluloses. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 92–99, 2010.
- LUPOI, J. S. et al. Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 871–906, 2015.
- LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.
- MA, K. et al. Antiplasmodial 3, 4-seco-27-Norlanostane Triterpenes from *Ganoderma boninense* Pat. **Journal of natural products**, v. 77, n. 8, p. 1847–1852, 2014.
- MA, Q. et al. Oxidative delignification: The roles of lignin reactivity and accessibility. **Journal of Cleaner Production**, v. 363, n. 3, p. 132351, 2022.
- MA, Q. Y. et al. Two new tirucallane triterpenoids from the fruiting bodies of *Ganoderma tropicum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 52, n. 4, p. 656–659, 2016.
- MACIEL-SILVA, F. W.; MUSSATTO, S. I.; FORSTER-CARNEIRO, T. Integration of subcritical water pretreatment and anaerobic digestion technologies for valorization of açai processing industries residues. **Journal of Cleaner Production**, v. 228, p. 1131–1142, 2019.
- MAHARI, W. A. et al. A review on valorization of oyster mushroom and waste generated in the mushroom cultivation industry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 400, n. 6, p. 123156, 2020.
- MAKARENKOVA, G. et al. Effect of pretreated colza straw on the growth and extracellular ligninolytic enzymes production by *Lentinula edodes* and *Ganoderma lucidum*. **Fermentation**, v. 7, n. 3, p. 157, 2021.
- MANAN, M. A.; WEBB, C. Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 4, n. 1, p. 91, 2017.
- MANAVALAN, T. et al. Characterization of a novel endoglucanase from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 761–771, 2015.
- MANAVALAN, T. et al. Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, p. 106–114, 2013.
- MANAVALAN, T. et al. Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. **Journal of Proteomics**, v. 77, p. 298–309, 2012.
- MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; HEESE, K. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. **Current Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 485–498, 2015.
- MANDAL, A. Review on microbial xylanases and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 45–42, 2015.
- MARTÍNEZ, A. T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme

- peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 425–444, 2002.
- MARTINEZ, R. M. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma cells. **Foods**, v. 7, n. 11, p. 1–9, 2018.
- MARTINS, G. R. et al. A validated Folin-Ciocalteu method for total phenolics quantification of condensed tannin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds extract. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 12, p. 4693–4702, 2021.
- MARTINS, G. R. et al. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activities of açai seed (*Euterpe oleracea* Mart.) extracts containing A- and B-type procyanidins. **Lwt**, v. 132, n. July, p. 1–11, 2020.
- MARTINS, L. S. et al. Insight on açai seed biomass economy and waste cooking oil: Eco-sorbent castor oil-based. **Journal of Environmental Management**, v. 293, n. 7, p. 112803, 2021.
- MARTONO, Y.; DANRIANI, L. D.; HARTINI, S. The effect of fermentation on protein content and amino acids of fortified dried-cassava flour-soybean (*Glycine Max* (L)) flour. **AGRITECH: Jurnal teknologi pertanian**, v. 36, n. 1, p. 56–63, 2016.
- MATA, G.; SAVOIE, J. M. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 513–519, 1998.
- MATHANKER, A. et al. Hydrothermal liquefaction of lignocellulosic biomass feedstock to produce biofuels: Parametric study and products characterization. **Fuel**, v. 271, n. 1, p. 117534, 2020.
- MCCARTER, J. D.; WITHERS, S. G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Opin Struct Biol**, v. 4, p. 885–892, 1994.
- MELANOURI, E. M.; DEDOUSI, M.; DIAMANTOPOULOU, P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: Screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase. **Carbon Resources Conversion**, v. 5, n. 1, p. 61–70, 2022.
- MELO, P. S. et al. Açai seeds: An unexplored agro-industrial residue as a potential source of lipids, fibers, and antioxidant phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 161, p. 113204, 2021.
- MESQUITA, A. M. et al. Eco-particleboard manufactured from chemically treated fibrous vascular tissue of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) Fruit: A new alternative for the particleboard industry with its potential application in civil construction and furniture. **Industrial Crops and Products**, v. 112, n. January, p. 644–651, 2018.
- MHALASKAR, S. R.; THORAT, S. S.; LANDE, S. B. An Investigation on fermentative changes during the production of food bio-colours through solid state fermentation of corn meal by *Monascus purpureus*. **Trends in Biosciences**, v. 10, n. 3, p. 962–967, 2017.
- MHLONGO, G.; MNISI, C. M.; MLAMBO, V. Cultivating oyster mushrooms on red grape

pomace waste enhances potential nutritional value of the spent substrate for ruminants. **PLoS ONE**, v. 16, n. 2, p. 1–12, 2021.

MILES, P. G.; CHANG, S. T. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. New York: CRC press, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MIN, C. H. E. N. et al. Purification and characterization of a versatile peroxidase from edible mushroom *Pleurotus eryngii*. **Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 5, p. 824–829, 2010.

MONGKOLSAMRIT, S. et al. Life cycle, host range and temporal variation of *Ophiocordyceps unilateralis/Hirsutella formicarum* on formicine ants. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 111, n. 3, p. 217–224, 2012.

MONTEIRO, A. F. et al. High concentration and yield production of mannose from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

MOON, R. J. et al. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 3941–3994, 2011.

MORALES, E. M. et al. Effects of solid-state fermentation and the potential use of cassava by-products as fermented food. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 4, p. 1289–1299, 2020.

NAIDU, D. S.; HLANGOTHI, S. P.; JOHN, M. J. Bio-based products from xylan: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 28–41, 2018.

NANDA, S. et al. Pathways of lignocellulosic biomass conversion to renewable fuels. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 4, n. 2, p. 157–191, 2014.

NANDA, S. et al. Physico-chemical evolution in lignocellulosic feedstocks during hydrothermal pretreatment and delignification. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 9, n. 3, p. 295–308, 2015.

NASCIMENTO, B. F. et al. Detoxification of sisal bagasse hydrolysate using activated carbon produced from the gasification of açai waste. **Journal of Hazardous Materials**, v. 409, p. 124494, 2021.

NASCIMENTO, D. C. O. et al. Studies on the characterization of piassava fibers and their epoxy composites. **Applied Science and Manufacturing**, v. 43, n. 3, p. 353–362, 2012.

NASEHI, M. et al. Effect of solid-state fermentation by oyster mushroom (*Pleurotus florida*) on nutritive value of some agro by-products. **Journal of Applied Animal Research**, v. 45, n. 1, p. 221–226, 2017.

NASSER, M. D. et al. Effects of organic compost, gypsum, and topdress sulfur rates on bioactive compounds and physicochemical characteristics of collard greens. **Scientia Plena**, v. 16, n. 9, p. 090201, 2020.

NAVEENKUMAR, C. et al. Screening of Antifungal Activity of Ganoderma Lucidum Extract Against Medically Important Fungi. **Indian Journal of Public Health Research & Development**, v. 9, n. 1, 2018.

NEPA. NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **TACO: tabela brasileira de composição de alimentos**. 3. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP: [s.n.].

NGUYEN, H. H.; MANEEPONG, S.; SURANILPONG, P. No Title. Nutrient uptake and fruit quality of Pummelo as influenced by ammonium, potassium, magnesium, zinc application. **Journal of Agricultural Science**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2016.

NGUYEN, N. T. et al. Lanostane triterpenoids from *Ganoderma tropicum* collected in Vietnam and their nitroblue tetrazolium reductive activity In Vitro. **Natural Product Sciences**, v. 26, n. 4, p. 334–339, 2020.

NIEGO, A. C. et al. Macrofungi as a Nutraceutical Source: Promising Bioactive Compounds and Market Value. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 5, p. 397, 2021.

NITAYAPAT, N. et al. Bioconversion of tangerine residues by solid-state fermentation with *Lentinus polychrous* and drying the final products. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 63, n. 1, p. 773–779, 2015.

NITHERANONT, T.; WATANABE, A.; ASADA, Y. Extracellular laccase produced by an edible basidiomycetous mushroom, *Grifola frondosa*: purification and characterization. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 74, n. 3, p. 538–543, 2011.

NOVAES, E. et al. Lignin and biomass: a negative correlation for wood formation and lignin content in trees. **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 555–561, 2010.

O’SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, n. 3, p. 173–207, 1997.

OKOLIE, J. A. et al. Chemistry and specialty industrial applications of lignocellulosic biomass. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 5, p. 2145–2169, 2021.

OKOLIE, J. A. et al. Supercritical water gasification of biomass: a state-of-the-art review of process parameters, reaction mechanisms and catalysis. **Sustainable Energy & Fuels**, v. 3, n. 3, p. 578–598, 2019.

OLIVEIRA, D. N. P. S. et al. Enhancement of the amazonian açai waste fibers through variations of alkali pretreatment parameters. **Chemistry and Biodiversity**, v. 16, n. 9, 2019.

OLIVEIRA, J. et al. Evaluation of alkaline delignification (NaOH) of açai seeds (*Eutherpe oleracea*) treated with H₂SO₄ dilute and effect on enzymatic hydrolysis. **Chemical Engineering Transactions**, v. 43, p. 499–504, 2015.

OLIVEIRA, J. et al. Evaluation of alkaline delignification (NaOH) of açai seeds (*Eutherpe oleracea*) treated with H₂SO₄ dilute and effect on enzymatic hydrolysis. **Chemical Engineering Transactions**, v. 43, p. 499–504, 2015.

- OLIVEIRA, M. S. et al. Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8335–8338, 2011.
- OLIVEIRA, S. D. et al. Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 937–944, 2018.
- OPATTOVA, A. et al. Ganoderma Lucidum induces oxidative DNA damage and enhances the effect of 5-Fluorouracil in colorectal cancer in vitro and in vivo. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 845, n. May, p. 403065, 2019.
- ORZUA, M. C. et al. Exploitation of agroindustrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 1, p. 24–27, 2009.
- ÖZTÜRK, C.; ATILA, F. Changes in lignocellulosic fractions of growing substrates during the cultivation of *Hypsizygus ulmarius* mushroom and its effects on mushroom productivity. **Scientia Horticulturae**, v. 288, n. July, p. 110403, 2021.
- PALANGI, V. et al. Ecofriendly Usability of Mushroom Cultivation Substrate as a Ruminant Feed : Anaerobic Digestion Using Gas. **Animals**, v. 12, n. 2, p. 1583, 2022.
- PAN, X. et al. Systematic review of the methodological quality of controlled trials evaluating Chinese herbal medicine in patients with rheumatoid arthritis. **BMJ open**, v. 7, n. 3, p. e013242, 2017.
- PANDEY, M. P.; KIM, C. S. Lignin depolymerization and conversion: a review of thermochemical methods. **Chemical Engineering & Technology**, v. 34, n. 1, p. 29–41, 2011.
- PAPADAKI, A. et al. Upgrading grape pomace through *Pleurotus* spp. cultivation for the production of enzymes and fruiting bodies. **Microorganisms**, v. 7, n. 7, p. 207, 2019.
- PATEL, S. H. Review article on mushroom cultivation. **International Journal of Pharmacy Research & Technology**, v. 4, n. 1, p. 47–59, 2014.
- PATERSON, R. R. M. *Ganoderma*—a therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p. 1985–2001, 2006.
- PAULA, T. DA C.; BRIOSO, P. S. T. Resistance of tropical arboreous species to the action of ganoderma philippii. **Ciencia Florestal**, v. 31, n. 1, p. 393–416, 2021.
- PECH-CANUL, A. D. L. C. et al. Functional expression and one-step protein purification of manganese peroxidase 1 (rMnP1) from *Phanerochaete chrysosporium* using the *E. coli*-expression system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 416, 2020.
- PENG, X. et al. A multifunctional thermophilic glycoside hydrolase from *Caldicellulosiruptor owensensis* with potential applications in production of biofuels and biochemicals. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2016.
- PESSOA, J. D. C. et al. Characterization of açai (*E. oleracea*) fruits and its processing residues.

Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 53, p. 1451–1460, 2010.

PETTERSSON, A. et al. Application of chemical fractionation methods for characterisation of biofuels, waste derived fuels and CFB co-combustion fly ashes. **Fuel**, v. 87, n. 15–16, p. 3183–3193, 2008.

PHADTARE, P.; JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Recombinant thermo-alkali-stable endoglucanase of *Myceliophthora thermophila* BJA (rMt-egl): Biochemical characteristics and applicability in enzymatic saccharification of agro-residues. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 107–116, 2017.

PHILIPPOUSSIS, A. N. Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates. In: **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues**. Dordrecht: Springer, 2009. p. 163–196.

PLASSARD, C.; FRANSSON, P. Regulation of low-molecular weight organic acid production in fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 1–2, p. 30–39, 2009.

POGNI, R. et al. Tryptophan-based radical in the catalytic mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. **Biochemistry**, v. 44, n. 11, p. 4267–4274, 2005.

POSTEMSKY, P. D. et al. Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*. **Bioresource Technology**, v. 231, p. 85–93, 2017.

POZDNYAKOVA, N. N. et al. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* D1: purification and characterization. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 56–61, 2006.

QUEIROZ, L. S. et al. Activated carbon obtained from amazonian biomass tailings (acai seed): Modification, characterization, and use for removal of metal ions from water. **Journal of Environmental Management**, v. 270, p. 110868, 2020.

RAHMAN, S. H. A. et al. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 554–559, 2007.

RAI, S. N. et al. Therapeutic applications of mushrooms and their biomolecules along with a glimpse of in silico approach in neurodegenerative diseases. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111377, 2021.

RAJARATHNAM, S.; WANKHEDE, D. B. PATWARDHAN, M. V. Some chemical and biochemical changes in straw constituents during growth of *Pleurotus flabellatus* (Berk & Br) Sacc. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 125–134, 1979.

RAJARATHNAM, S.; WANKHEDE, D. B.; BANO, Z. Degradation of rice straw by *Pleurotus flabellatus*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 203–214, 1987.

RAMAN, J. et al. Current prospects of mushroom production and industrial growth in India. **Journal of Mushrooms**, v. 4, n. 16, p. 239–249, 2018.

RAMBO, M. K. D.; SCHMIDT, F. L.; FERREIRA, M. M. C. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. **Talanta**, v. 144, n. 10, p. 696–703, 2015.

RAMEZANI, S.; ASOODEH, A. Biochemical characterization and gene cloning of a novel alkaline endo-1-4-glucanase from *Bacillus subtilis* DR8806. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 132, p. 75–83, 2016.

RASHAD, F. M. et al. Recycling of agro-wastes for *Ganoderma lucidum* mushroom production and *Ganoderma* post mushroom substrate as soil amendment. **Waste Management**, v. 88, p. 147–159, 2019.

REINOSO, F. A. et al. Fate of p-hydroxycinnamates and structural characteristics of residual hemicelluloses and lignin during alkaline-sulfite chemithermomechanical pretreatment of sugarcane bagasse. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2018.

REN, L.; ZHANG, J.; ZHANG, T. Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Ganoderma* on immune effector cells. **Food Chemistry**, v. 340, n. July 2020, p. 127933, 2021.

RESENDIZ-VAZQUEZ, J. A. et al. Chemical and biological delignification treatments from blue agave and sorghum by-products to obtain cellulose nanocrystals. **Waste and Biomass Valorization**, v. 13, n. 2, p. 1157–1168, 2022.

REVANKAR, M. S.; DESAI, K. M.; LELE, S. S. Solid-state fermentation for enhanced production of laccase using indigenously isolated *Ganoderma* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 143, n. 1, p. 16–26, 2007.

REZAEI, S.; SHAHVERDI, A. R.; FARAMARZI, M. A. Isolation, one-step affinity purification, and characterization of a polyextremotolerant laccase from the halophilic bacterium *Aquisalibacillus elongatus* and its application in the delignification of sugar beet pulp. **Bioresource Technology**, v. 230, p. 67–75, 2017.

REZENDE, C. A. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 1–19, 2011.

RINGMAN, M. **Wood fuel assortments. Definitions and properties**. Institutionen för Virkeslära, Sveriges Lantbruksuniversitet (Department of Forest Products, Swedish University of Agricultural Science), v. 250, p. 125, 1996.

RIOS, J. L. et al. Lanostanoids from fungi: a group of potential anticancer compounds. **Journal of natural products**, v. 75, n. 11, p. 2016–2044, 2012.

ROBERTS, J. N. et al. Characterization of dye-decolorizing peroxidases from *Rhodococcus jostii* RHA1. **Biochemistry**, v. 50, n. 23, p. 5108–5119, 2011.

RODRIGUES FILHO, J. A.; CAMARÃO, A. P.; LOURENÇO JUNIOR, J. D. B. **Avaliação de subprodutos agroindustriais para alimentação de ruminantes**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1993.

RODRIGUES, P. O. et al. Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2683–2693, 2020.

ROMÃO, M. H. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed extract protects against hepatic steatosis and fibrosis in high-fat diet-fed mice: Role of local renin-angiotensin system, oxidative stress and inflammation. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 103726, 2020.

ROSSETTO, R. et al. Acai pulp and seeds as emerging sources of phenolic compounds for enrichment of residual yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) through biosorption process. **Lwt**, v. 128, p. 109447, 2020.

ROYSE, D. J.; BAARS, J.; TAN, Q. Current overview of mushroom production in the world. In: **Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Ltd, 2017. p. 5–13.

RYU, D. H. et al. Optimization of antioxidant, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities and ganoderic acid content of differentially dried *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 335, n. June 2020, p. 127645, 2020.

RYVARDEN, L. **Neotropical polypores: Part 1: Introduction, Ganodermataceae & Hymenochaetaceae**. Oslo, Norueg: Fungiflora, 227 pp.

SADEGHIAN-ABADI, S. et al. Enhanced production, one-step affinity purification, and characterization of laccase from solid-state culture of *Lentinus tigrinus* and delignification of pistachio shell by free and immobilized enzyme. **Journal of Environmental Management**, v. 244, p. 235–246, 2019.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2018.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SAINI, S.; SHARMA, K. K. Fungal lignocellulolytic enzymes and lignocellulose: A critical review on their contribution to multiproduct biorefinery and global biofuel research. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 2304–2319, 2021.

SALAME, T. M. et al. No Title. Redundancy among manganese peroxidases in *Pleurotus ostreatus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2405–2415, 2013.

SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ, S. et al. Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1099–1116, 2020.

SALES-CAMPOS, C. et al. Análise físico-Química e composição nutricional da matéria prima e de substratos pré e pós cultivo de. **Interciencia**, v. 35, n. 1, 2010.

SALES-CAMPOS, C. et al. Cinética micelial dos fungos comestíveis *Pleurotus ostreatus* e

Lentinula edodes em resíduos lignocelulósicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 141–145, 2020.

SALES-CAMPOS, C. et al. Mineral composition of raw material, substrate and fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in culture. **Interciencia**, v. 34, n. 6, p. 432–436, 2009.

SALES-CAMPOS, C. et al. Nutritional and bioactive properties of an amazon wild oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus ostreatus* (agaricomycetes): contributions to functional food and human health. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 23, n. 7, 2021.

SALES-CAMPOS, C. et al. Physicochemical analysis and centesimal composition of *Pleurotus ostreatus* mushroom grown in residues from the Amazon. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 456–461, 2011.

SALES-CAMPOS, C.; DE ANDRADE, M. C. N. Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2011.

SALOMÃO, G. S. B. et al. Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 1–6, 2019.

SAMSUDIN, N. I. P.; ABDULLAH, N. Edible mushrooms from Malaysia; a literature review on their nutritional and medicinal properties. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 1, p. 11–31, 2019.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.

SÁNCHEZ, C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. **Synthetic and systems biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 13–22, 2017.

SÁNCHEZ, Ó. J.; MONTOYA, S. Assessment of polysaccharide and biomass production from three white-rot fungi by solid-state fermentation using wood and agro-industrial residues: A kinetic approach. **Forests**, v. 11, n. 10, p. 1–23, 2020.

SANODIYA, B. S. et al. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 10, n. 8, p. 717–742, 2009.

SANTOS, A. et al. New dye-decolorizing peroxidases from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* MET94: towards biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 2053–2065, 2014.

SANTOS, T. C. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 1, p. 222–233, 2016.

SAPTARINI, N. M.; HADISOEBROTO, G. The activity of cellulase enzymes of *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma tropicum*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 4, p. 134–137, 2017.

- SAQIB, A. A. et al. A thermostable crude endoglucanase produced by *Aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water. **Enzyme Research**, v. 2012, 2012.
- SCHIESSER, A. fine structure and mechanical properties of straw filaments invaded by *Pleurotus ostreatus*. **Biological Wastes**, v. 27, n. 2, p. 87–100, 1989.
- SCHMATZ, A. A. et al. Pseudo-lignin content decreased with hemicellulose and lignin removal, improving cellulose accessibility, and enzymatic digestibility. **Bioenergy Research**, v. 14, n. 1, p. 106–121, 2021.
- SCHMITT, U.; WEINER, G.; LIESE, W. The fine structure of the stigmata in *Calamus axillaris* during maturation. **IAWA Journal**, v. 16, n. 1, p. 61–68, 1995.
- SCHOEMAKER, H. E.; LEISOLA, M. S. A. Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 2–3, p. 101–109, 1990.
- SEGAL, L. et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile research journal**, v. 29, n. 10, p. 786–794, 1959.
- SELIG, M. J. et al. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4997–5005, 2008.
- SEVERIN, K. P. **Energy dispersive spectrometry of common rock forming minerals**. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers, 2004.
- SHAHEEN, R. et al. Immobilized lignin peroxidase from *Ganoderma lucidum* IBL-05 with improved dye decolorization and cytotoxicity reduction properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 57–64, 2017.
- SHAHER, F. et al. Associated targets of the antioxidant cardioprotection of *Ganoderma lucidum* in diabetic cardiomyopathy by using open targets platform: a systematic review. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–228, 2003.
- SHAMIM, H. M. et al. Bioconversion of water-hyacinth to nutritionally enriched animal feed by solid state fermentation using *Pleurotus sajor-caju*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 6, n. 7, 2017.
- SHARMA, A. et al. Potential of in situ SSF laccase produced from *Ganoderma lucidum* RCK 2011 in biobleaching of paper pulp. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 3, p. 367–377, 2019b.
- SHARMA, C. et al. Bioactive metabolites of *Ganoderma lucidum*: Factors, mechanism and broad-spectrum therapeutic potential. **Journal of Herbal Medicine**, v. 17–18, n. 12, p. 100268, 2019a.

- SHEN, C. et al. Nutrient changes in solid-state fermented okara with *Ganoderma lucidum*. **Food and Fermentation Industries**, v. 45, n. 12, p. 114–119, 2019.
- SHI, Y. JIAO et al. Antitumor effects of different *Ganoderma lucidum* spore powder in cell- and zebrafish-based bioassays. **Journal of Integrative Medicine**, v. 19, n. 2, p. 177–184, 2021.
- SHIN, G. C. et al. Morphological characters of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karsten grown naturally in Korea. **Korean Journal of Agricultural Science**, v. 13, n. 1, p. 44–51, 1986.
- SHRESTHA, P. et al. Isolation and physicochemical characterization of laccase from *Ganoderma lucidum*-CDBT1 isolated from its native habitat in Nepal. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 10, 2016.
- SI, J. et al. Selection of a pH- and temperature-stable laccase from *Ganoderma australe* and its application for bioremediation of textile dyes. **Journal of Environmental Management**, v. 299, n. 35, p. 113619, 2021.
- SILVA, C. A. A.; LACERDA, M. P. F.; FONSECA, G. G. Biotransformation of pequi and guavira fruit wastes via solid state bioprocess using *Pleurotus Sajor-Caju*. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, n. 2, p. 88–92, 2013.
- SILVA, J. D. S. et al. Hidrólise enzimática, fermentação e produção de biocombustíveis através da coroa de *Ananas comosus*. **Química Nova**, v. 41, n. 10, p. 1127–1131, 2018.
- SILVA, R. J. F.; POTIGUARA, R. C. D. V. Substâncias ergásticas foliares de espécies amazônicas de *Oenocarpus* Mart. (Arecaceae): caracterização histoquímica e ultra-estrutural. **Acta Amazonica**, v. 39, p. 793–798, 2009.
- SILVEIRA, M. L. L.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L. Development of an alternative technology for the oyster mushroom production using liquid inoculum Desenvolvimento de tecnologia alternativa para a produção de cogumelos ostra usando inóculo líquido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 858, 2008.
- SIMMONS, B. A.; LOQUÉ, D.; RALPH, J. Advances in modifying lignin for enhanced biofuel production. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 3, p. 312–319, 2010.
- SINGH, A.; NANDA, S., & BERRUTI, F. A review of thermochemical and biochemical conversion of *Miscanthus* to biofuels. In: **Biorefinery of Alternative Resources: Targeting Green Fuels and Platform Chemicals**. Singapura: Springer Nature, 2020. p. 195–220.
- SINGH, M. P. **Biodegradation of lignocellulosic wastes through cultivation of *Pleurotus sajor-caju***. Maastricht, Netherlands: Science and Cultivation of Edible Fungi, 2000.
- SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–15, 2016.
- SINGH, R.; ELTIS, L. D. The multihued palette of dye-decolorizing peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 574, p. 56–65, 2015.
- SINGH, T. A. et al. Valorization of agro-industrial residues for production of commercial

- biorefinery products. **Fuel**, v. 322, p. 124284, 2022.
- SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.
- SINGHVI, M. S.; GOKHALE, D. V. Lignocellulosic biomass: hurdles and challenges in its valorization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 23, p. 9305–9320, 2019.
- SIWULSKI, M. et al. *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst.–health-promoting properties. A review. **Herba Polonica**, v. 61, n. 3, p. 105–118, 2015.
- SNIFFEN, C. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. **Journal of animal science**, v. 71, n. 5, p. 1298–1311, 1993.
- SNIFFEN, C. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 5, p. 1298–1311, 1993.
- SOCOL, C. R. et al. Cogumelos: uma fonte promissora de compostos ativos para o desenvolvimento de bioprodutos farmacêuticos e nutracêuticos. In: **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2016. p. 315–360.
- SOCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52–71, 2017.
- SOLANILLA-DUQUE, J. F.; SALAZAR-SÁNCHEZ, M. DEL R.; RODRÍGUEZ HERRERA, R. Potential of lignocellulosic residues from coconut, figue, and sugar cane as substrates for *Pleurotus* and *Ganoderma* in the development of biomaterials. **Environmental Quality Management**, n. 7, p. 1–11, 2021.
- SONG, L. et al. Effects of endophytic fungi on parasitic process of *Taxillus chinensis*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2022.
- SRIVASTAVA, N.; MISHRA, P. K.; UPADHYAY, S. N. Endoglucanase: revealing participation in open cellulosic chains. **Industrial Enzymes for Biofuels Production**, p. 37–62, 2020.
- STELMOCK, R. L. et al. Application of van soest acid detergent fiber method for analysis of shellfish chitin. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 6, p. 1502–1506, 1985.
- STOJKOVIC, D. et al. An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase linked to type-2 diabetes. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 100–103, 2019.
- SU, H. G. et al. Lanostane triterpenoids with anti-inflammatory activities from *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**, v. 173, p. 112256, 2020.
- SUNG, H. J.; KHAN, M. F.; KIM, Y. H. Recombinant lignin peroxidase-catalyzed decolorization of melanin using in-situ generated H₂O₂ for application in whitening cosmetics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 20–26, 2019.

- SUSTR, M.; SOUKUP, A.; TYLOVA, E. Potassium in root growth and development. **Plants**, v. 8, n. 10, p. 435, 2019.
- TAN, B. L. et al. Antioxidant and oxidative stress: A mutual interplay in age-related diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 10, p. 1–28, 2018.
- TANG, W. et al. A randomized, double-blind and placebo-controlled study of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide extract in neurasthenia. **Journal of medicinal food**, v. 8, n. 1, p. 53–58, 2005.
- TAVARES, A. P. M. et al. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134, n. 3, p. 233–248, 2006.
- TEIXEIRA, L. B. et al. Processos de compostagem usando resíduos das agroindústrias de açaí e de palmito do açazeiro. **Circular Técnica**, v. 41, p. 6, 2005.
- TEUNISSEN, M. J. et al. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes during growth of anaerobic fungi from ruminant and nonruminant herbivores on different substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 177–189, 1993.
- THAKUR, S. et al. Sustainability of bioplastics: Opportunities and challenges. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 13, p. 68–75, 2018.
- THATOI, H.; SINGDEVSACHAN, S. K. Diversity, nutritional composition and medicinal potential of Indian mushrooms: A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 523–545, 2014.
- TORRES-FARRADÁ, G. et al. Diversity of ligninolytic enzymes and their genes in strains of the genus *Ganoderma*: applicable for biodegradation of xenobiotic compounds? **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 898, 2017.
- TOUSHIK, S. H. et al. Functional applications of lignocellulolytic enzymes in the fruit and vegetable processing industries. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 3, p. 585–593, 2017.
- TRÄNKNER, M.; TAVAKOL, E.; JÁKLI, B. Functioning of potassium and magnesium in photosynthesis, photosynthate translocation and photoprotection. **Physiologia Plantarum**, v. 163, n. 3, p. 414–431, 2018.
- TSAI, M. H. et al. Evaluation of different pretreatments of Napier grass for enzymatic saccharification and ethanol production. **Energy Science & Engineering**, v. 6, n. 6, p. 683–692, 2018.
- ULLRICH, R. et al. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 357–363, 2005.
- UMAR, A.; AHMED, S. Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocontextum* along with its phylogenetic relationship. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2022.

URZÚA, U.; KERSTEN, P. J.; VICUÑA, R. Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispora* produces extracellular hydrogen peroxide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 68–73, 1998.

USMANI, Z. et al. Lignocellulosic biorefineries: The current state of challenges and strategies for efficient commercialization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 148, n. 1, p. 111258, 2021.

VALÁŠKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 119–124, 2006.

VALLI, K.; WARIISHI, H.; GOLD, M. H. Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. **Biochemistry**, v. 29, n. 37, p. 8535–8539, 1990.

VALVERDE, M. E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Inside Front Cover (Editorial Board). **Phytochemistry Letters**, v. 20, n. 1, 2017.

VAN SOEST, J. L. New Species of taraxacum from Asia (including: rechingeri, iter iranicum II Nr. 40). **Acta botanica neerlandica**, v. 9, n. 3, p. 302–326, 1960.

VASIL'CHENKO, L. G.; BOLOBOVA, A. V.; VASIL'CHENKO, L. G. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 1–17, 2004.

VASSILEV, S. V. et al. An overview of the chemical composition of biomass. **Fuel**, v. 89, n. 5, p. 913–933, 2010.

VASSILEV, S. V. et al. An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. **Fuel**, v. 94, p. 1–33, 2012.

VEENA, R. K.; AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 20, n. 8, 2018.

VIEIRA, M. E. M. et al. Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV): fundamentos e aplicações em produtos lácteos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e262101018622, 2021.

VIGANÓ, J. et al. Techno-economic evaluation for recovering phenolic compounds from acai (*Euterpe oleracea*) by-product by pressurized liquid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 179, p. 105413, 2022.

VILLAS-BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E.; MITCHELL, D. A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 98, n. 1–2, p. 1–12, 2002.

WANG, C. et al. Polysaccharide peptide isolated from grass-cultured *Ganoderma lucidum* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects in the human U251 glioma cell line.

Oncology Letters, v. 15, n. 4, p. 4330–4336, 2018.

WANG, D.; SAKODA, A.; SUZUKI, M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. **Bioresource Technology**, v. 78, n. 3, p. 293–300, 2001.

WANG, F. et al. Fungal Laccase Production from Lignocellulosic Agricultural Wastes by Solid-State Fermentation: A Review. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 665, 2019.

WANG, H. et al. A laccase Gl-LAC-4 purified from white-rot fungus *Ganoderma lucidum* had a strong ability to degrade and detoxify the alkylphenol pollutants 4-n-octylphenol and 2-phenylphenol. **Journal of Hazardous Materials**, v. 408, n. 3, p. 124775, 2021.

WANG, J. et al. Emerging roles of *Ganoderma lucidum* in anti-aging. **Aging and Disease**, v. 8, n. 6, p. 691–707, 2017a.

WANG, Q. et al. The effect of delignification on the properties of cellulosic fiber material. **Holzforschung**, v. 72, n. 6, p. 443–449, 2018.

WANG, S. et al. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: a state-of-the-art review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 62, p. 33–86, 2017b.

WANG, T. N.; ZHAO, M. No TitleA simple strategy for extracellular production of CotA laccase in *Escherichia coli* and decolorization of simulated textile effluent by recombinant laccase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 685–696, 2017.

WANG, X. C. et al. The species identity of the widely cultivated *Ganoderma*, ‘*G. lucidum*’ (Ling-zhi), in China. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e40857, 2012.

WANG, X. et al. *Ganoderma lucidum* put forth anti-tumor activity against PC-3 prostate cancer cells via inhibition of Jak-1/STAT-3 activity. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 10, p. 2632–2637, 2020.

WARIISHI, H.; AKILESWARAN, L.; GOLD, M. H. Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. **Biochemistry**, v. 27, n. 14, p. 5365–5370, 1988.

WATSON, B. J. et al. Processive endoglucanases mediate degradation of cellulose by *Saccharophagus degradans*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 18, p. 5697–5705, 2009.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in plants. **Annals of botany**, v. 92, n. 4, p. 487–511, 2003.

WOICIECHOWSKI, A. L. et al. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. **Bioresource Technology**, v. 304, n. 1, p. 122848, 2020.

WOLFENDEN, B. S.; WILLSON, R. L. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2’-Azinobis_ethyl benzthiazoline-6-sulphonate). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 2, n. 7, p. 805–812, 1982.

- WONG, D. W. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 174–209, 2009.
- WONG, D. W.; CHAN, V. J.; BATT, S. B. Cloning and characterization of a novel exo- α -1, 5-L-arabinanase gene and the enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 6, p. 941–949, 2008.
- WU, D. T. et al. Characterization of polysaccharides from *Ganoderma* spp. Using saccharide mapping. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 398–405, 2013.
- WU, H. et al. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment for enhancing the enzymatic hydrolysis of rice straw by using the heat energy dissipated from ultrasonication. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 70–74, 2017.
- WU, Y. L. et al. Triterpenoids from *Ganoderma lucidum* and their potential anti-inflammatory effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 18, p. 5147–5158, 2019.
- XIROS, C.; SHAHAB, R. L.; STUDER, M. H. P. A cellulolytic fungal biofilm enhances the consolidated bioconversion of cellulose to short chain fatty acids by the rumen microbiome. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 8, p. 3355–3365, 2019.
- XU, H. et al. Expression and characteristics of manganese peroxidase from *Ganoderma lucidum* in *Pichia pastoris* and its application in the degradation of four dyes and phenol. **BMC Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017.
- XU, X. et al. Solid state bioconversion of lignocellulosic residues by *Inonotus obliquus* for production of cellulolytic enzymes and saccharification. **Bioresource Technology**, v. 247, n. 7, p. 88–95, 2018.
- YANG, L. C.; FU, T. J.; YANG, F. C. Biovalorization of soybean residue (okara) via fermentation with *Ganoderma lucidum* and *Lentinus edodes* to attain products with high anti-osteoporotic effects. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 4, p. 514–518, 2020.
- YANG, S. H. **Lignocellulosic Fiber Chemistry**. Beijing, China: China Light Industry Press, 2008.
- YANG, Z. et al. Hypoglycemic mechanism of a novel proteoglycan, extracted from *Ganoderma lucidum*, in hepatocytes. **European journal of pharmacology**, v. 820, p. 77–85, 2018.
- YAO, G. et al. Production of a high-efficiency cellulase complex via β -glucosidase engineering in *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016.
- YAROLOV, A. I. et al. Laccase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 257–280, 1994.
- YOON, L. W. et al. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319–338, 2014.
- YUN, T. K. Update from Asia: Asian studies on cancer chemoprevention. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 889, n. 1, p. 157–192, 1999.

ZABED, H. et al. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751–774, 2016.

ZAKZESKI, J. et al. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3552–3599, 2010.

ZAMBLAZI, R. C. Análise Físico Química de Alimentos. **Pelotas: Editora Universitária/UFPEL**, v. 1, p. 202, 2010.

ZENG, P. et al. Chemical, biochemical, preclinical and clinical studies of *Ganoderma lucidum* polysaccharide as an approved drug for treating myopathy and other diseases in China. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 7, p. 3278–3297, 2018.

ZERVAKIS, G. I. et al. Rapid strain classification and taxa delimitation within the edible mushroom genus *Pleurotus* through the use of diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopy. **Fungal Biology Reviews**, v. 116, n. 6, p. 715–728, 2012.

ZHANG, H.; LIU, Y., & WANG, G. Integrated use of maize bran residue for one-step phosphate bio-fertilizer production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 4, p. 1475–1487, 2019.

ZHANG, J. et al. Transforming lignocellulosic biomass into biofuels enabled by ionic liquid pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 322, n. December 2020, p. 124522, 2021.

ZHANG, S. S. et al. Three new lanostanoids from the mushroom *Ganoderma tropicum*. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 3281–3289, 2015.

ZHANG, Y. et al. Low-cost cellulase-hemicellulase mixture secreted by *Trichoderma harzianum* EM0925 with complete saccharification efficacy of lignocellulose. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 371, 2020.

ZHANG, Y. et al. The manganese peroxidase gene family of *Trametes trogii*: Gene identification and expression patterns using various metal ions under different culture conditions. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, p. 2595, 2021.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452–481, 2006.

ZHONG, S. M. et al. Reduction of facial pigmentation of melasma by topical lignin peroxidase: A novel fast-acting skin-lightening agent. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 9, n. 2, p. 341–344, 2015.

ZHOU, H. Y. et al. Heterologous expression and biochemical characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from *Colletotrichum orchidophilum*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 1, p. 67–79, 2021.

ZHOU, J. et al. Biochemical and kinetic characterization of GH43 β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase and GH30 α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase from rumen metagenome. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 143–152,

2012.

ZHOU, Q. et al. Optimization of medium pH, growth media compositions and analysis of nutritional components of *ganoderma lucidum* in submerged culture fermentation. *European Journal of Medicinal Plants*, v. 6, n. 1, p. 17–25, 2015.

ZHOU, S. et al. Investigation of lignocellulolytic enzymes during different growth phases of *Ganoderma lucidum* strain G0119 using genomic, transcriptomic and secretomic analyses. **PloS one**, v. 13, n. 5, 2018.

ZHUO, R.; FAN, F. A comprehensive insight into the application of white rot fungi and their lignocellulolytic enzymes in the removal of organic pollutants. **Science of the Total Environment**, v. 778, p. 146132, 2021.

ZILLY, A. et al. Solid-state bioconversion of passion fruit waste by white-rot fungi for production of oxidative and hydrolytic enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 5, p. 1573–1580, 2012.

ZION MARKET RESEARCH. **Mushroom market to witness fabulous growth in the with a cagr of 9.2%. zion market research**, 2018. Disponível em: <https://www.zionmarketresearch.com/news/global-mushroom-market/>. Acesso em: 15 jul. 2022.