

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Livia Ribeiro Scarlassara

**INVESTIGAÇÃO BIOLÓGICA DA BIOCONVERSÃO DE LIGNINA EM PROCESSO
DE PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE**

Porto Alegre
2022

Livia Ribeiro Scarlassara

**INVESTIGAÇÃO BIOLÓGICA DA BIOCONVERSÃO DE LIGNINA EM PROCESSO
DE PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Coorientadora: Dra. Carla Roberta Matte

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Scarlassara, Livia Ribeiro
INVESTIGAÇÃO BIOLÓGICA DA BIOCONVERSÃO DE LIGNINA
EM PROCESSO DE PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE / Livia
Ribeiro Scarlassara. -- 2022.

54 f.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub.

Coorientadora: Carla Roberta Matte.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Bioconversão. 2. Lignina. 3. Enzimas. 4.
Cupriavidus necator. I. Ayub, Marco Antônio Záchia,
orient. II. Matte, Carla Roberta, coorient. III.
Título.

AGRADECIMENTOS

Quero deixar um agradecimento especial para meus pais, não tenho palavras para expressar o quanto sou grata pelo esforço e confiança que eles depositaram em mim. Amo muito vocês, obrigada por sempre me incentivarem mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço também meu orientador por ter acreditado em meu potencial e aceito me acolher para seu grupo de alunos, me instruindo para ser um profissional cada vez melhor. A todos os alunos e amigos que fiz durante minha estada, cada um foi essencial para que este projeto pudesse ser realizado.

E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

**INVESTIGAÇÃO BIOLÓGICA DA BIOCONVERSÃO DE LIGNINA EM PROCESSO
DE PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE**

Autor: Livia Ribeiro Scarlassara
Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub
Co-orientadora: Dr^(a). Carla Roberta Matte

RESUMO

A possibilidade de utilizar materiais que seriam classificados como poluentes para geração de outros produtos através de bioconversão vem crescendo. Nessa categoria, podemos destacar a lignina, um biopolímero complexo, composto por diversos anéis aromáticos, presente principalmente nas paredes celulares vegetais, sendo classificado como o segundo biopolímero mais abundante no planeta, após a celulose. Apesar de a lignina apresentar uma dificuldade de degradação por micro-organismos, ela apresenta capacidade para ser matéria-prima para obtenção de materiais por via biotecnológica. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a exploração da bioconversão da lignina kraft através de bioprocessos com *Cupriavidus necator* através da produção de enzimas, dentro de um contexto de biorrefinarias. Foi realizado um plaquet burn para observar o impacto que a temperatura de incubação, quantidade de fonte de nitrogênio, de lignina e frutose possuíam sobre o crescimento do micro-organismo e a atividade enzimática. Também foi avaliado a produção da enzima lacase em frascos agitados em comparação com o crescimento bacteriano. Em resumo, foi possível verificar a produção de lacase, onde a fonte de nitrogênio foi o parâmetro que mais influenciou em sua atividade; em relação ao crescimento da bactéria, o que mais influenciou foi a quantidade de lignina presente no meio, e foi possível observar que, em alguns experimentos, a atividade enzimática teve uma pequena influencia no crescimento microbiano.

Palavras-chaves: Lignina, bioconversão, meio ambiente, enzimas, economia, *Cupriavidus necator*

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (xx p.) Agosto, 2022.

BIOLOGICAL INVESTIGATION OF LIGNIN BIOCONVERSION FOR THE
PROCESS OF LACCASE PRODUCTION ¹

Author: Livia Ribeiro Scarlassara
Advisor: Prof. Dr. Marco Antônio ZÁchia Ayub
Co-Advisor: Dra. Carla Roberta Matte

ABSTRACT

The possibility of using materials that would be classified as pollutants for the generation of other products through bioconversion has been in great demand, this including the lignin, which is a complex biopolymer, composed of several aromatic rings, present mainly in plant cell walls. Lignin is classified as the second most abundant biopolymer on the planet, after cellulose. Although lignin presents a remarkable characteristic of being difficult to degrade by microorganisms, it has the capacity to be raw material for obtaining materials through biotechnology. In this context, the objective of this work was to explore the bioconversion of kraft lignin through bioprocesses using *Cupriavidus necator* through the production of enzymes, within a context of biorefineries. A plaquet burn was carried out to observe the impact that the incubation temperature, amount of nitrogen source, lignin and fructose have on the growth of the microorganism and the enzymatic activity. The production of the laccase enzyme was also evaluated in shaken flasks compared to bacterial growth. As a result, it was possible to verify the production of laccase, where the nitrogen source was the parameter that most influenced its activity; in relation to the growth of the bacteria, the most important variable was the amount of lignin present in the medium, and it was possible to observe that in some experiments the enzymatic activity had a small influence on microbial growth.

Keywords: Lignin, bioconversion, environment, enzymes, economy, *Cupriavidus necator*

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (xx p.) August, 2022.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	8
2.	OBJETIVOS	9

2.1	OBJETIVOS GERAIS	9
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3.	REVISÃO DA LITERATURA	10
3.1	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	10
3.2	LIGNINA: COMPOSIÇÃO E DEFINIÇÃO.....	11
3.3	BIORREFINARIA.....	14
3.4	ENZIMAS E SEUS INTERESSES INDUSTRIAIS	15
3.4.1	Lacase	15
3.5	POTENCIAIS MICRO-ORGANISMOS PARA BIOCONVERSÃO DE LIGNINA.....	17
3.5.1	<i>Cupriavidus necator</i>.....	18
4.	MATERIAIS E METODOS	20
4.1	MICRO-ORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	20
4.2	PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA	20
4.3	OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTÉRIANO - plaquet burn .	20
4.4	BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE	22
4.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	22
4.6	SOLUBILIDADE DA LIGNINA	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO - plaquet burn	24
5.2	COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO COM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	27
5.3	INFLUÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CRESCIMENTO	29
6.	CONCLUSÃO	33
7.	PERSPECTIVAS E FUTUROS TRABALHOS.....	34
8.	REFERÊNCIAS	35
9.	APÊNDICES.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Plaquet burn para a otimização do crescimento de <i>C. necator</i>	21
Tabela 2- Valores reais para interpretação do plaquet burn.....	21

Tabela 3- Sistema para determinar a atividade enzimática da lacase por ABTS	22
Tabela 4- Resultados obtidos nos respectivos dias para a densidade ótica de acordo com o plaquet burn.....	24
Tabela 5- Resultados obtidos nos respectivos dias para a atividade enzimática utilizando os experimentos do plaquet burn de crescimento	29
Tabela 6 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação a atividade enzimática para as 24 horas testadas.....	45
Tabela 7 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação a atividade enzimática para as 72 horas testadas.....	46
Tabela 8 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação a atividade enzimática para as 120 horas testadas.....	47
Tabela 9 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação a atividade enzimática para as 168 horas testadas.....	47
Tabela 10 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação ao crescimento bacteriano para as 24 horas testadas.....	48
Tabela 11 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação ao crescimento bacteriano para as 72 horas testadas.....	49
Tabela 12 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação ao crescimento bacteriano para as 120 horas testadas.....	50
Tabela 13 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação ao crescimento bacteriano para as 24 horas testadas.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema estrutural da lignina. Fonte: SALIBA et al. (2001).....	12
Figura 2- Comparação de crescimento bacteriano (OD ₆₀₀) e atividade enzimática (U/mL) do experimento 20.....	25

Figura 3- Comparação de crescimento bacteriano (OD ₆₀₀) e atividade enzimática (U/mL) do experimento 21.....	26
Figura 4- Comparação de crescimento bacteriano (OD ₆₀₀) e atividade enzimática (U/mL) dos experimentos 1, 3 e 7 realizados.....	29
Figura 5– Superfície de resposta da produção de lacase utilizando-se o substrato ABTS.....	32
Figura 6 - Comparação de crescimento bacteriano (OD ₆₀₀) e atividade enzimática (U/mL) dos experimentos realizados.....	45

1. INTRODUÇÃO

A economia baseada em produtos de origem biológica compreende diversos setores e o uso de biomassa como material para a produção de combustíveis, químicos e materiais tem sido visto como uma oportunidade econômica para o futuro, por apresentar potencial ambiental, econômico e de benefício social. Está demonstrado que através de vias biológicas ou químicas, uma grande variedade de produtos químicos podem ser obtidos a partir de biomassas. Economicamente, este processo é favorável por possibilitar o investimento no setor industrial, podendo trazer uma redução da dependência de combustíveis fósseis e um melhoramento da industrialização. Além disso apresenta um potencial ambiental, onde através da utilização de biomassa para produção de outros materiais temos a diminuição de resíduos, que poderiam causar efeitos negativos na natureza, assim contribuindo com a mudança climática e com a poluição.

Várias fontes de biomassa baseada em lignocelulose são produzidas no mundo, sendo esta constituída por três principais componentes: a celulose, a hemicelulose e lignina, presentes em todas as plantas. Devido a grande atividade agrícola no Brasil existe uma disponibilidade de biomassa lignocelulósica a partir de resíduos agrícolas ou agroindustriais que podem ser extraídos e fracionados para serem utilizados em diversos bioprocessos para obtenção de etanol, aditivos alimentares e enzimas.

Portanto, devido a essa grande quantidade de biomassa lignocelulolítica disponível no meio ambiente e que pelo seu excesso se torna um contaminante na natureza, este trabalho teve como objetivo principal estudar a sua possível utilização para produção da enzima lacase através da bioconversão da lignina presente na biomassa através da metabolização pelo micro-organismo *Cupriavidus necator*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Tendo em vista a possibilidade de se dispor de grandes quantidades de biomassa lignocelulósica, o objetivo geral deste trabalho foi a exploração da lignina Kraft de resíduos agroindustriais através de bioprocessos com a bactéria *Cupriavidus necator* para produção da enzima lacase, que está associada à degradação do substrato lignina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Avaliar a melhor condição de crescimento para *Cupriavidus necator*;
- 2.2.2 Relacionar como os parâmetros de temperatura, fonte de nitrogênio, quantidade de lignina e frutose utilizados no plaquet burn para crescimento, influenciaram na atividade enzimática da lacase;
- 2.2.3 Comparar o nível de crescimento do micro-organismo com a atividade da enzima.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Durante os últimos anos teve-se um aumento na produção de alimentos e bens de consumo. Isso se dá devido ao aumento populacional, gerando um aumento na produção de resíduos agroindustriais, tornando os materiais lignocelulósicos como um dos resíduos mais abundantes no mundo. Estes materiais são importantes fontes de açúcares solúveis, podendo ser utilizados para produção de biocombustíveis e produtos químicos (BENTO; CASARIL, 2012; GARCIA, 2019).

O Brasil é um grande produtor agrícola, produzindo milhões de toneladas de culturas vegetais por ano, o que gera grandes quantidades de resíduos. Estes devem ser devidamente descartados, pois podem causar problemas ambientais, devido a sua composição química, sendo necessário um investimento para o tratamento dos mesmos. Além disso, quando não manejados e descartados em locais adequados, estes demonstram uma perda de matéria rica que poderiam ser utilizados para outros fins comerciais (BENTO; CASARIL, 2012).

Apesar do Brasil ser um dos grandes produtores agrícolas, não utilizamos bem os resíduos gerados, estimando-se que somente 85 % das matérias-primas são aproveitadas e no máximo 40 % dos resíduos, tendo assim uma perda de uma fonte de matéria orgânica, além de proteínas, enzimas, óleos essenciais e potenciais produtos que poderiam ser criados (RORIZ, 2012; RICARDINO; SOUZA; NETO, 2020).

Além disso, reutilizando esses resíduos agroindustriais temos a possibilidade de desenvolvimento de novas tecnologias para utilização em bioprocessos e geração de empregos, gerando o fortalecimento da economia e causando uma redução de custos de produção. Outra possibilidade de mercado são a utilização destes resíduos para produção de enzimas, estas podem ser produzidas por micro-organismos utilizando os resíduos como biomassa mais viável em relação aos produtos químicos (GAETE; TEODORO; MARTINAZO, 2020).

Existem diversos resíduos agroindustriais lignocelulíticos, como o bagaço de cana, palha do milho, palha de trigo, palha de arroz, casca de arroz, casca de nozes, palha de cevada, bagaço de sorgo doce, caroço de azeitona, dentre outros

(MAITY, 2015). A utilização de lignocelulose como biomassa para produção de mais produtos resultaria em uma possível diminuição de poluição em 90 % de monóxido e dióxido de carbono, hidrocarbonetos reativos, óxido de nitrogênio, formaldeído, emissão de material particulado e queda na queima de materiais pelos agricultores (MACHINENI, 2020).

3.2 LIGNINA: COMPOSIÇÃO E DEFINIÇÃO

Lignocelulose é o componente da estrutura de todas as plantas, o principal componente da biomassa, sendo uma fonte renovável de energia à base de carbono. Porém, a degradação ou conversão da lignocelulose é restrita devido ao fato de sua estrutura possuir componentes recalcitrantes, de forma polimérica: a celulose, a hemicelulose e a lignina, que possuem ligações extremamente fortes e estáveis entre eles (SÁNCHEZ, 2009; SCHUTYSER, 2018; YANG; GU; LIN, 2020)

A cristalinidade da celulose influencia na digestão enzimática da biomassa lignocelulósica por ser uma região ordenada se tornando muito compacta, resistente à ação de enzimas, ácidos e água. A hemicelulose atua como uma barreira física limitando o acesso de enzimas. A lignina, por sua vez, apresenta propriedades recalcitrantes à hidrólise enzimática, além de dificultar o acesso de enzimas aos polímeros de carboidratos, o que também previne mais ações através da desativação de enzimas hidrolíticas (KUMAR et al., 2019).

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante na Terra, após a celulose (KOSA; RAGAUSKAS, 2013; ZHAO et al., 2016). Ainda assim, seu uso é negligenciado, mesmo com estudos provando a existência de micro-organismos capazes de degradar seus diversos anéis aromáticos. Na natureza, esta é encontrada na forma de um biopolímero tridimensional composto por diversos anéis aromáticos com várias ligações éter e carbono-carbono (Figura 1) (KOSA; RAGAUSKAS, 2013; GALL et al., 2017; SI et al., 2018). Esta estrutura proporciona rigidez para as plantas, sendo crucial para diversos papéis como no transporte de água e nutrientes, impermeabilização dos tecidos para circulação da seiva, sendo útil como barreira de proteção para a celulose contra agentes infecciosos e promovendo resistência ao estresse mecânico. Além disso, proporciona extrema resistência a degradação química e biológica (KOSA; RAGAUSKAS, 2013; ZHAO et al., 2016; GALL et al., 2017; LOPEZ; SILVA; SANTOS, 2017) .

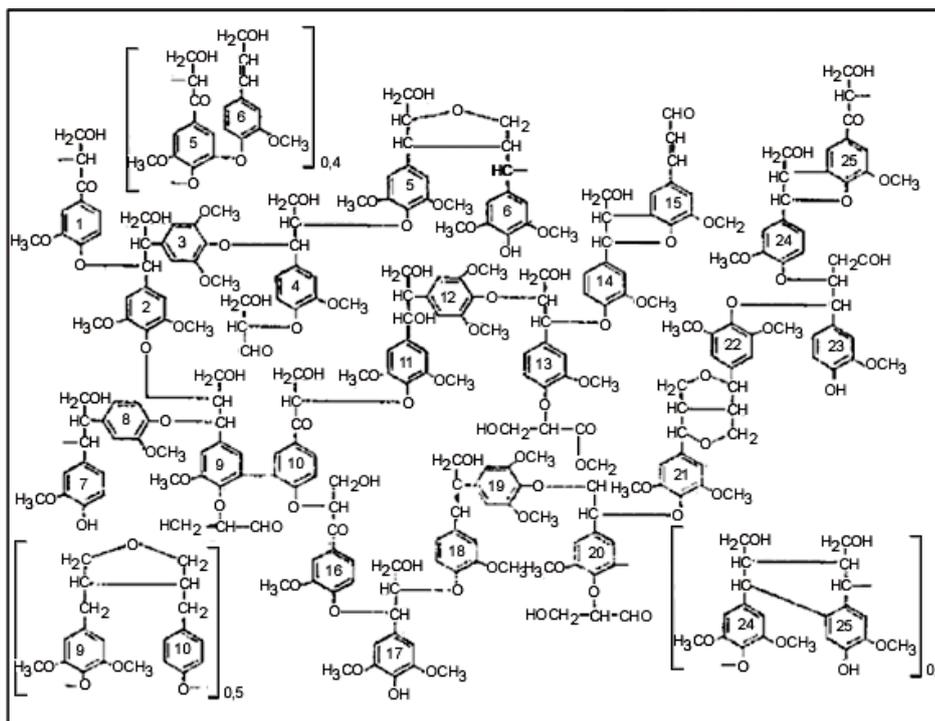


Figura 1- Esquema estrutural da lignina. Fonte: SALIBA et al. (2001).

Devido à sua complexa estrutura, a lignina é normalmente utilizada para fornecimento de energia e aquecimento através da queima em indústrias de celulose e papel (KOSA; RAGAUSKAS, 2013; XIE; RAGAUSKAS; YUAN, 2016). Estas indústrias têm a capacidade de produzir milhares de toneladas de lignina anualmente. Além disso, houve uma projeção de que as indústrias de bioetanol dos Estados Unidos iriam produzir 60 mil toneladas de lignina em 2020, enquanto que, no Brasil, teve-se e a expectativa de se produzir até 82 mil toneladas em 2020, dos quais, somente 2 % seriam utilizadas comercialmente (GARCIA, 2019).

Quando utilizada em bioprocessos, a lignina apresenta viabilidade econômica e sustentabilidade ambiental, podendo representar um aumento de 10 vezes comparado com sua utilização somente para a produção de energia através da queima, representando um recurso para produção de biocombustíveis, como etanol, e produtos químicos, como a vanilina, ácido vanilínico e pirogallol. Outros estudos demonstraram que a conversão da lignina pode ter diversas outras aplicações como para produção de lipídios, ácido adípico, poli-hidroxialcanoato, fibras de carbono, hidrocarbonetos multifuncionais e gás, entretanto para que esta possa ser utilizada para tais aplicações são necessários processos para sua conversão (XIE;

RAGAUSKAS; YUAN, 2016; WU et al., 2017; SCHUTYSER, 2018; SI et al., 2018; BAJWA et al., 2019).

De acordo com Moraes (2017), a lignina quando obtida através de materiais lignocelulósicos pode ser uma alternativa para produção de compostos fenólicos, como o siringaldeído, phidroxilbenzaldeído e polímeros, e estes fenólicos obtidos podem ser convertidos em éteres de arila para serem utilizados como aditivos de gasolina ou na produção de solventes e ácidos orgânicos através de processos de craqueamento e dealquilação. Além disso, em medicina, estudos demonstram que estes possuem atividade antioxidante, ou seja, podem diminuir o desenvolvimento de desordens crônico-degenerativas, entre outras diversas aplicações.

Inúmeras maneiras são conhecidas para realização da quebra da lignina em produtos comercialmente utilizáveis, dentre eles temos as vias termoquímicas que vêm sendo bastante estudadas para a valorização desta. Esta tecnologia, porém, requer uma grande quantidade de energia e diversos catalisadores caros, além de substâncias tóxicas, o que acaba tornando essa via não-sustentável do ponto de vista ambiental (WU et al., 2017). Por outro lado, vários estudos demonstram a capacidade dos micro-organismos de realizar a quebra da lignina, onde os mais comumente pesquisados são os fungos de podridão branca e marrom da madeira, que através da baixa especificidade de substrato de suas enzimas ligninolíticas e forte atividade oxidativa conseguem realizar a degradação (SÁNCHEZ, 2009).

Além destes fungos, alguns grupos de bactérias também são descritos como degradadoras da lignina, as principais classes com esta habilidade sendo os actinomicetos, α -proteobacteria e γ -proteobacteria (BUGG et al., 2011a; XIE; RAGAUSKAS; YUAN, 2016). Como exemplo, temos *Rhodococcus opacus* que utiliza a lignina do solo e converte-a em lipídio, *Pseudomonas putina* KT2440, que a converte em poli-hidroxialcanoato, além de estudos demonstrarem que esta pode acumular uma quantidade de cis, cis-muconato e aromáticos derivados de lignina (XIE; RAGAUSKAS; YUAN, 2016; WU et al., 2017). A habilidade de metabolização da lignina é possível graças à produção de enzimas oxidativas, as mais conhecidas sendo a lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP), onde estas apresentam a possibilidade de uso industrial (SÁNCHEZ, 2009; XIE; RAGAUSKAS; YUAN, 2016; MENEZES et al., 2017).

A lacase pode ser utilizada nos processos de biorremediação do solo, além de ser usada no processo de branqueamento de polpa, já a manganês peroxidase é

aplicada na degradação de corantes e na clarificação de polpa de papel (MENEZES et al., 2017). Além disto, quando a lignina é despolimerizada por enzimas oxidativas, é formada uma mistura heterogênea de monômeros aromáticos que podem ser utilizados pelas bactérias como fonte de carbono e energia (JOHNSON; BECKHAM, 2015).

3.3 BIORREFINARIA

A população mundial vem crescendo gradualmente, o que preocupa muitos países, pois com o aumento populacional também há um aumento de poluição, mudanças climáticas e lixo e a diminuição dos recursos naturais devido ao uso desenfreado nas atividades humanas, como a exploração do petróleo e combustíveis fósseis para produção de energia, químicos e materiais (LEONG et al., 2021). Observando os resultados desse uso indevido dos recursos naturais e suas consequências no meio ambiente, a sociedade iniciou um movimento de “reuso e restauração” para obter um meio ambiente mais saudável para os humanos e uma progressão a uma socioeconomia. Assim a biomassa vem crescendo e chamando mais atenção como uma possível alternativa sustentável para a produção de energia no lugar do petróleo, por exemplo (KUMAR et al., 2020).

A partir destas concepções de reuso, surgiu o conceito de biorrefinaria, proposta como sistemas complexos de tecnologias sustentáveis, menos agressivas ao meio ambiente e de recursos para a utilização da conversão da biomassa para produção de diversos produtos, como combustíveis, energia e químicos (MAITY, 2015). A biorrefinaria é dividida em três fases, a mais recente e mais avançada é a terceira, onde há uma mistura de biomassas para produzir múltiplos produtos usando a combinação de tecnologias (MAITY, 2015).

O bioprocesso da biorrefinaria de utilizar o que seria descartado como lixo para produção de materiais, como biopolímeros e bioenergia, traz um melhor gerenciamento do lixo. Dentre os diversos tipos de biomassa que podem ser utilizados temos a lignocelulose, que tem uma produção em torno de 2×10^{11} toneladas por ano, tendo assim uma grande disponibilidade para a produção de materiais (KUMAR et al., 2020; LEONG et al., 2021).

Entretanto, para um uso mais adequado deste material é necessário um pré-tratamento que auxilia a melhorar o acesso enzimático aos seus componentes, celulose, hemicelulose e lignina, e assim gerar os materiais de interesse. Contudo, a

escolha de processos enzimáticos tem uma influência no custo e a configuração da biorrefinaria que será utilizada. Dentre os tipos de tratamento temos o biológico, que pode utilizar micro-organismos ou produtos de base biológica para degradar a lignina e hemicelulose, resultando na sacarificação e depois produção de bioetanol (KUMAR *et al.*, 2020).

3.4 ENZIMAS E SEUS INTERESSES INDUSTRIAIS

Enzimas são proteínas, normalmente com estrutura molecular complexa, que desempenham uma capacidade de aceleração de reações, ou seja, catalisadores, apresentando uma velocidade de reação mais rápida do que catalisadores químicos e, diferente destes, possuindo uma maior disponibilidade para serem degradados no meio ambiente. As enzimas são fundamentais para o metabolismo de seres vivos e degradação de matéria orgânica (ALVES *et al.*, 2002; BATISTA, 2009; ORLANDELLI *et al.*, 2012).

As enzimas podem ter diversas origens, podendo ser obtidas de células animais, vegetais e de micro-organismo, sendo esta última fonte a mais importante industrialmente devido a possibilidade de serem produzidas a baixo custo e por serem versáteis, sendo as enzimas obtidas por micro-organismos amplamente conhecidas por suas aplicações industriais, como em industriais têxteis, de detergente, alimentícia e de papel, entre outras (ALVES *et al.*, 2002; ORLANDELLI *et al.*, 2012). As enzimas também apresentam a capacidade de minimizar reações indesejáveis como decomposição, isomerização, racemização ou rearranjos inoportunos que podem atrapalhar as metodologias que utilizam produtos químicos e também efetuar reações que podem ser inviáveis através de reações químicas (BATISTA, 2009). Com desenvolvimento de novas tecnologias, houve um melhoramento na produção de enzimas, reduzindo custos produtivos, dando mais oportunidade para o uso desta (LIN *et al.*, 2018).

3.4.1 Lacase

A lacase (EC 1.10.3.2) é uma enzima conhecida pela sua grande capacidade de oxidação, tendo a habilidade de oxidar moléculas aromáticas, não aromáticas e compostos orgânicos, inorgânicos, como polifenóis e difenóis. Lacase tem a habilidade de modificar contaminantes e transformá-los em compostos menos

tóxicos tornando-os mais acessíveis para micro-organismos degradá-los (FERNANDES, 2014; SHIRAIISHI, 2019; YANG; GU; LIN, 2020). Segundo Fernandes (2014) a lacase possui três mecanismos de ação. Primeiramente, irá catalisar a retirada de elétrons do substrato de cobre, conferindo uma cor azulada à enzima, e os outros mecanismos são responsáveis pela ativação do oxigênio molecular, o que causa uma liberação de moléculas de água como seu subproduto.

De acordo com Yang, Gu e Lin (2019), o papel fisiológico da enzima está relacionado com sua origem, desempenhando o papel de induzir a biossíntese de lignina através da construção de blocos monolignólicos gerando polimerização de radicais em plantas. Em fungos, a lacase é responsável por catalisar a degradação da lignina. Possuindo um sistema autossuficiente para a degradação da lignina, a enzima consegue gerar seus próprios radicais, através da lignificação que realiza a oxidação dos grupos fenólicos (OH), o que resulta nos radicais fenóis. O potencial de modificação e despolarização da lignina é o que diferencia esta enzima da reação de Fenton e das demais peroxidases (ZHAO et al., 2016; XIE et al., 2017; SCHUTYSER, 2018).

Pelo seu subproduto reacional ser a água, a lacase ficou conhecida como um produto de “biotecnologia verde”, sendo muito utilizada em diversos segmentos industriais, como no branqueamento de papel, descoloração de corantes sintéticos e na degradação de lignina. Além disso, sua capacidade oxidativa aumenta o interesse para outras aplicações como na eliminação de compostos fenólicos em sucos, cervejas e vinhos, formação de compostos orgânicos funcionais, tais como corantes e fármacos, produção de polímeros e combustíveis (FERNANDES, 2014; YANG; GU; LIN, 2019). No pré-tratamento do resíduo com lacase, há uma diminuição nos cromóforos da polpa e uma base favorável para o branqueamento de papel, aumentando seu branqueamento, pela degradação da lignina, diminuindo seu custo e afetando a força do papel (Lin *et al.*, 2018).

Conforme Bugg e colaboradores (2011) esta enzima permite uma modificação na lignocelulose, apresentando assim uma possibilidade para desenvolvimento de novos produtos mais ecológicos. Por exemplo, através da utilização das ligações de compostos fenólicos mediados pela lacase em materiais celulósicos, é possível realizar uma produção de embalagens e papéis com propriedades antimicrobianas. Além de todas estas aplicações, esta enzima ainda tem um potencial ecológico, onde pode ser aplicada para a remoção dos compostos

fenólicos de águas industriais, descontaminação de solos, degradação de pesticidas, polietileno e poliestireno (FERNANDES, 2014). Entretanto sua expressão se dá devido a uma codificação de genes, podendo ser expressa de forma constitutiva, ou seja, normal ao metabolismo, ou induzida, sendo que normalmente tem sua origem no citoplasma e sua ação só é realizada quando secretada (SHIRAISHI, 2019).

3.5 POTENCIAIS MICRO-ORGANISMOS PARA BIOCONVERSÃO DE LIGNINA

Inúmeros trabalhos demonstram que vários grupos de fungos e bactérias possuem os recursos necessários para que estes consigam realizar a degradação da lignina, principalmente através da utilização de enzimas que apresentam habilidade de clivar a lignina (GARCIA, 2019). Os micro-organismos mais estudados com esta função são os fungos, principalmente os ascomicetos e os basidiomicetos, onde é possível encontrar os fungos de podridão branca, como o *Phanerochaete chrysosporium*, e marrom, que conseguem produzir uma diversidade de enzima, como as peroxidases, lignina e manganês, e lacases, e enzimas extracelulares como ligninases (BENTO; CASARIL, 2012; GARCIA, 2019; SHIRAISHI, 2019).

Outros fungos com a capacidade de produção de lacase e outras peroxidases, são *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Ganoderma*, *Lentinula*, *Pycnoporus* e *Polyporus*, e uma linhagem de *Streptomyces viridosporus* T7A, que produz diversas peroxidases extracelulares que oxidam componentes da lignina. Em relação aos ascomicetos é possível encontrar a linhagem de *Botryosphaeria rhodina*, uma produtora de lacase (BUGG et al., 2011b; BENTO; CASARIL, 2012; BROWN; CHANG, 2014; SHIRAISHI, 2019).

Além destes, temos o *Myrothecium verrucaria* que, através da produção de três tipos de enzimas lignolíticas, lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, conseguiu reduzir em 42,3 % a quantidade de lignina de palha de milho, possibilitando um aumento de 123,8 % na taxa de transformação durante a sacarificação e a fermentação, quando comparado com uma palha de milho não tratada (MACHINENI, 2020).

Contudo, fungos são muito sensíveis por necessitarem de condições ótimas de cultivo, onde as condições do substrato, como baixas concentrações de oxigênio dissolvido, pH elevado e altas concentrações de lignina, podem afetar seu

crescimento e por isso sua utilização no tratamento da lignina é relativamente difícil (SHIRAISHI, 2019).

As bactérias são menos estudadas do que os fungos, entretanto a descoberta de bactérias com capacidade de degradar lignina demonstra vantagens para a valorização da lignina e suas aplicações biotecnológicas, pois estas apresentam um crescimento em larga escala mais eficiente, possuem uma genética e expressão de proteínas mais simples, e há possibilidade de isolamento de termofílicos (TAYLOR et al., 2012; XU et al., 2019).

Segundo Xu e colaboradores (2019), pesquisas caracterizaram enzimas e vias metabólicas inerentes à degradação da lignina pelas bactérias, incluindo enzimas e vias catalisadoras de reações oxidativas e de hidroxilação, despolimerização de polímeros de lignina fenólicos e não fenólicos, reações de desmetilação e abertura dos anéis aromáticos de lignina.

A maioria das bactérias degradadoras de lignina estão presentes nos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, onde algumas dessas bactérias já são utilizadas para tratamentos de esgotos de indústrias de celulose e papel e pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, dentre outras. Entretanto algumas linhagens são conhecidas por bioconverterem a lignina em produtos de valor agregado como *Rhodococcus opacus* e *R. jostii* RHA1, que demonstraram capacidade de converter lignina em triacilglicerol, *Cupriavidus basilensis* B-8, que transformou lignina em PHA, *Azotobacter*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus megatarium*, *Enterobacter lignolyticus* SCF1, dentre outras (BUGG et al., 2011; TAYLOR et al., 2012; KOSA E RAGAUSKAS, 2013; SHI et al., 2017; GARCIA, 2019; XU et al., 2019).

Em seu estudo, Bandounas e colaboradores (2011) identificaram três bactérias potenciais para despolimerização da lignina, estas são *Pandoraea norimbergensis* LD001, *Pseudomonas* sp. LD002 e *Bacillus* sp. LD003, onde as três apresentaram crescimento na presença de alto e baixo peso molecular das frações de lignina, mas com um crescimento lento e com uma habilidade de utilizar monômeros de lignina limitada.

3.5.1 *Cupriavidus necator*

A bactéria de escolha para este estudo foi a *Cupriavidus necator*, esta é um bacilo Gram negativo e durante os últimos anos vem sendo muito estudada,

principalmente por seu potencial de produção de poli(3-ácido hidroxibutírico) (PHB) (WANG et al., 2010). Dentre suas características principais temos a capacidade de utilizar uma ampla gama de substratos para produção de energia e crescimento, além da capacidade de sobreviver utilizando metabolismos heterotrófico e autotrófico, componentes orgânicos e H₂ como fontes de carbono e energia. Esta bactéria também consegue degradar fragmentos de plásticos em compostos aromáticos, sintetizar metabólitos que podem ser utilizados industrialmente, bem como bioacumular polímeros biodegradáveis (SOHN et al., 2021).

C. necator faz parte da subclasse das β -Proteobacterias que possuem a habilidade de quebrar as fortes ligações triplas entre dois átomos de nitrogênio e converter em componentes solúveis para que as plantas consigam assimilá-las mais facilmente, denominada fixação de nitrogênio (AGNOL et al., 2017). Ainda estudos demonstraram que seus genes codificam enzimas que podem facilitar o metabolismo de poluentes, como metais pesados (AZUBUIKE et al., 2020).

Além da capacidade de produção de PHB, este micro-organismo apresenta capacidade de biossintetizar diversos produtos como ácidos graxos, alcanos e enzimas em meios heterotróficos e autotróficos, com o potencial de conversão de CO₂ em álcool através de eletrossíntese. Com o desenvolvimento de engenharia, ainda é possível a síntese de biopolímeros, biocombustíveis e bioquímicos, como o etanol e isobutanol (AZUBUIKE et al., 2020; SOHN et al., 2021).

Estudos demonstraram que *C. necator* foi capaz de crescer e biossintetizar outros produtos em meios derivados de lignina, como vinhaça, o que indica a presença de enzimas lignolíticas (DALSASSO et al., 2019; KUMAR et al., 2020).

Shin e colaboradores (2019) observaram que micro-organismos que metabolizam lignina kraft no início da sua fase de crescimento para obter carbono e energia devem utilizá-la durante todo o seu ciclo de vida, assim a quantidade de lignina que é degradada seria maior do que daqueles que optam por utilizar a lignina como co-metabólito.

4. MATERIAIS E METODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Cupriavidus necator (ABIP 261), foi a bactéria de escolha, pois como citado anteriormente, esta é uma das bactérias que apresenta capacidade de produção de lacase, esta foi cedida pela EMBRAPA, sendo isolada da Mata Atlântica brasileira. Foi realizado um estoque em glicerol e antes de qualquer inoculação sua pureza era checada com plaqueamento e coloração de Gram. Uma cultura foi inoculada em 25 mL de meio de cultivo (extrato de carne 3 g/L, peptona de carne 5 g/L e glucose 30 g/L) em shaker, à 33 °C com 180 rpm, e esperou-se o crescimento por 24 h para a obtenção da fase exponencial com uma DO de 0,800 a 1,000 em espectrofotômetro e 600 nm (LI; WILKINS, 2020).

4.2 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

A solução de lignina Kraft obtida comercialmente da Sigma-Aldrich foi ajustada a pH para 7,0 e esterilizada por meio de filtração com membranas de poros de 0,20 µm. Esta foi suplementada com meio 9 (M9) contendo: Na₂HPO₄ (141,99 g/L), KH₂PO₄ (136,09 g/L) e NaCl (58,44 g/L), suplementado com 2 mL de solução 1 M de MgSO₄, 100 µL de CaCl₂ 1 M, 1 mL de solução traços 1mM (contendo CuSO₄, MnSO₄, FeSO₄ e ZnSO₄), 1 mL de (NH₄)₂SO₄ 15 mM e 9 mL de frutose para cada 100 mL de meio, pois foi realizado estudos que a frutose possibilita um melhor crescimento celular, todos foram autoclaves à 121°C e 2 bar (SALVACHÚA et al., 2015; AZUBUIKE et al., 2020).

4.3 OTIMIZAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTÉRIANO - PLAQUET BURN

Os fatores e níveis descritos foram avaliados no delineamento Box-Behnker (MONTGOMERY; RUNGER, 2016) para quatro variáveis em quatro níveis, em 27 ensaios experimentais, dos quais três são repetições do ponto central. Foram realizados os experimentos durante 7 dias, onde nas primeiras 24, 72, 120 e 168 horas foram retidas amostras para a realização dos testes de crescimento e atividade

enzimática. A Tabela 1 apresenta os valores codificados e a Tabela 2 demonstra os valores reais de cada experimento executado.

Tabela 1- Plaquet burn para a otimização do crescimento de *C. necator*

Experimento	Lignina	Frutose	Temperatura	Fonte de nitrogênio
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	-1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	-2	0	0	0
21	2	0	0	0
22	0	-2	0	0
23	0	2	0	0
24	0	0	-2	0
25	0	0	2	0
26	0	0	0	-2
27	0	0	0	2

Tabela 2- Valores reais para interpretação do plaquet burn

	Valores Reais				
	-2	-1	0	1	2
Lignina (g/L)	2	3,5	3	3,5	4
Frutose (g/L)	10	12,5	15	17,5	20
Temperatura (°C)	30	30,75	31,5	32,25	33
Fonte de nitrogênio (mM)	10	12,5	15	17,5	20

As análises estatísticas, superfície de resposta e análise de variância (ANOVA), foram obtidas a partir do programa computacional Statistica 10.0.

4.4 BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DA ENZIMA LACASE

Os cultivos foram incubados em diversas temperaturas, para o plaquet burn de avaliação de crescimento bacteriano e produção de enzimas, sob agitação constante de 180 rpm, ou seja, os experimentos utilizados para realizar os testes de crescimento também foram utilizados para avaliação da atividade enzimática. Os isolados bacterianos foram cultivados no meio com lignina em frascos de Erlenmeyer de 125 mL. O tempo de cultivo avaliado foi de 7 dias. Para controle foram utilizadas amostras de meio não inoculadas, sendo incubado e tratado da mesma forma que as amostras com inóculo. Os cultivos foram realizados em triplicatas.

O crescimento bacteriano foi acompanhado através da medição de Densidade Óptica no comprimento de onda (λ) 600 nm (OD_{600}) por espectrofotometria.

Decorrido o tempo de cada experimento, os cultivos foram centrifugados a 3500 rpm por 15 min e os sobrenadantes utilizados para determinação da atividade enzimática da lacase.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática da lacase produzida pela *C. necator* foi determinada conforme metodologia de Silva (2015) e Shiraishi (2019). Em tubos de ensaio foram adicionados 200 μ L de água destilada, 200 μ L do substrato ABTS (1 mM) (2,2 azinobis (3-etilbenzotiazoline) 6 sulfato), 600 μ L da solução tampão acetato de sódio pH 4,5 (0,1 M) e 1000 μ L da amostra centrifugada, totalizando 2 mL. A solução foi aquecida em banho Maria a 36 °C por 10 min e, posteriormente, fez-se a leitura da absorbância em um espectrofotômetro no comprimento de onda de onda (λ) 420 nm. Paralelamente, foram realizados os controles positivos (C1) e negativo (C2) conforme dados da Tabela 3.

Tabela 3- Sistema para determinar a atividade enzimática da lacase por ABTS

Reação	C1	C2
--------	----	----

Substrato	200 µL	-----	200 µL
Tampão	600 µL	600 µL	600 µL
H ₂ O	200 µL	400 µL	1200 µL
Amostra	1000 µL	1000 µL	-----

Uma unidade de enzima é definida como o necessário para oxidar 1 µM de substrato por minuto, de acordo com a equação (1) para determinação da atividade enzimática.

$$Atividade \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{VF \times Abs \times Fd}{Caminho \text{ optico} \times T \times VA \times \epsilon} \quad (1)$$

Onde: VF: volume final (mL) dentro do tubo de ensaio;

Abs: absorvância da reação;

Fd: fator de diluição da solução enzimática quando necessário;

ϵ : coeficiente de extinção molar do substrato (para o ABTS, $\epsilon = 36.000 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$);

VA: volume de enzima empregado nos ensaios (mL);

T: tempo de incubação (em minutos);

Caminho óptico da cubeta (cm).

4.6 SOLUBILIDADE DA LIGNINA

Devido ao alto grau de insolubilidade da lignina em meio não alcalino, ela acaba gerando sedimentos e gera a perda desta. Para que fosse possível uma avaliação de produção enzimática mais eficaz, foi avaliado o grau de solubilidade da lignina, através de filtração. A lignina kraft foi pesada (2, 3, 3,5 e 4 g) e ajustado o pH para cada uma das amostras, depois estas foram filtradas em membranas de 0,22 µM em filtro a vácuo, pesado em balança analítica e então calculado a perda de lignina.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO - PLAQUET BURN

Aplicando os parâmetros do plaquet burn (frutose, temperatura, fonte N₂ e lignina) avaliou-se a influência destes sobre o crescimento bacteriano e a produção enzimática. Abaixo encontra-se a Tabela 4 com os resultados obtidos para o crescimento bacteriano para cada dia coletado e cada experimento realizado:

Tabela 4- Resultados obtidos nos respectivos dias para a densidade ótica de acordo com o plaquet burn

	24 horas	72 h	120 h	168 h
Experimento 1	0,274	0,446	0,475	0,474
Experimento 2	0,322	0,525	0,600	0,648
Experimento 3	0,361	0,541	0,516	0,578
Experimento 4	0,336	0,470	0,472	0,542
Experimento 5	0,309	0,635	0,565	0,557
Experimento 6	0,285	0,718	0,678	0,617
Experimento 7	0,162	0,551	0,565	0,529
Experimento 8	0,228	0,617	0,648	0,604
Experimento 9	0,247	0,486	0,475	0,462
Experimento 10	0,286	0,534	0,494	0,536
Experimento 11	0,255	0,515	0,556	0,560
Experimento 12	0,291	0,558	0,476	0,510
Experimento 13	0,191	0,365	0,456	0,479
Experimento 14	0,235	0,583	0,615	0,634
Experimento 15	0,148	0,497	0,513	0,616
Experimento 16	0,118	0,498	0,535	0,566
Experimento 17	0,395	0,816	0,584	0,596
Experimento 18	0,206	0,844	0,777	0,560
Experimento 19	0,297	0,869	0,727	0,559

Experimento 20	0,374	0,883	0,835	0,848
Experimento 21	-0,056	0,260	0,249	0,122
Experimento 22	0,523	0,822	0,623	0,572
Experimento 23	0,454	0,836	0,678	0,681
Experimento 24	0,471	0,711	0,670	0,674
Experimento 25	0,461	0,847	0,708	0,644
Experimento 26	0,330	0,708	0,696	0,686
Experimento 27	0,369	0,715	0,532	0,592

Pode-se observar que o experimento 20 (condições de cultivo: lignina 2 g/L, temperatura 31,5 °C, fonte de nitrogênio 15 mM e frutose 15 g/L), representado na Figura 2, obteve-se a maior leitura de crescimento entre todos os experimentos, também pode-se constatar que a quantidade de lignina presente em seu meio é a menor quantidade testada. SHI et al. (2013) obteve um resultado semelhante com *Cupriavidus basiliensis* B-8, demonstrando um rápido crescimento durante os dois primeiros dias, alcançando sua máxima no quarto dia, quando inoculado em um meio com 2 g/L de lignina kraft.

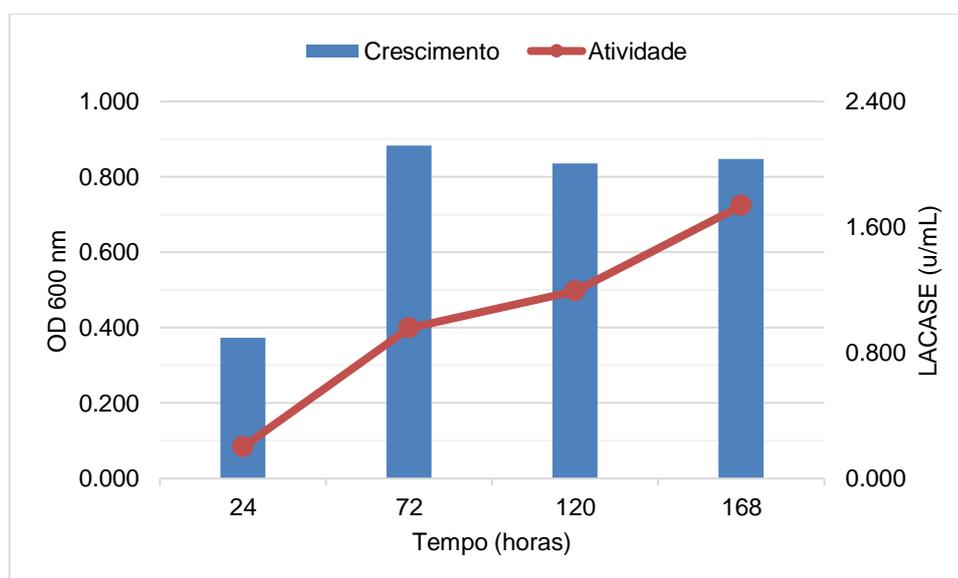


Figura 2- Comparação de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) e atividade enzimática (U/mL) do experimento 20.

Pode-se observar que experimento 21 (condições de cultivo: lignina 4 g/L, temperatura 31,5 °C, fonte de nitrogênio 15 mM e frutose 15 g/L), o experimento com a maior quantidade de lignina, o crescimento foi menor quando comparado com os demais (figura 3). Isto pode ter ocorrido devido à repressão causada que essa alta quantidade de lignina tenha afetado o crescimento bacteriano, mas também é possível observar que a bactéria pode ter se adaptado ao meio e assim desenvolvendo uma maneira de crescer nos dias que se sucederam, porém logo entrou em senescência celular.

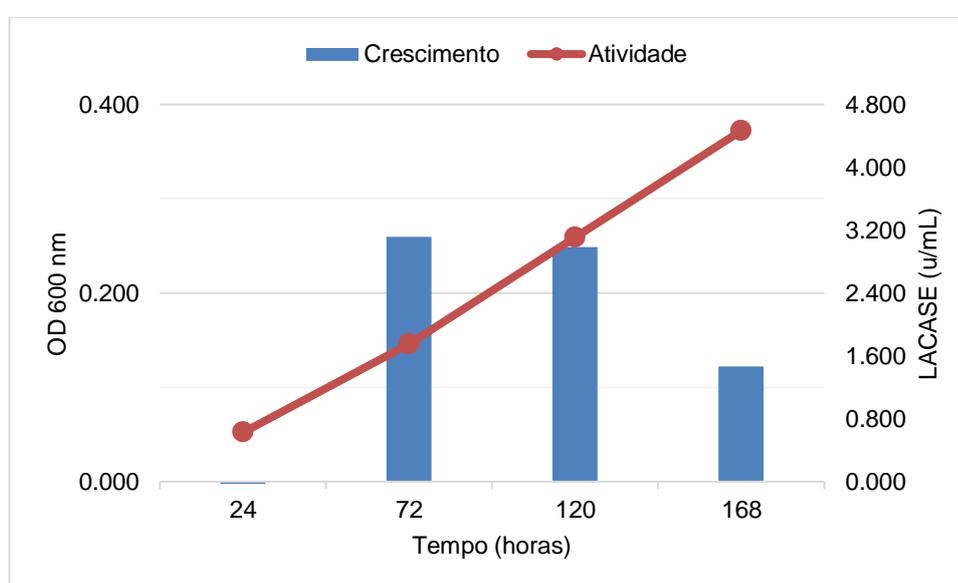


Figura 3- Comparação de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) e atividade enzimática (U/mL) do experimento 21.

Em estudos em que o *C. necator* foi inoculado em um meio com hidrólise química ácida contendo pectina, o crescimento foi imediato e continuou depois de 10 h, porém quando inoculado em meio com hidrólise enzimática foi necessário um período de adaptação e depois de 12 h obteve-se um crescimento exponencial maior do que o meio tratado com hidrólise química (LOCATELLI et al., 2018).

Em relação aos pontos centrais utilizados, experimentos 17, 18 e 19 (condições de cultivo: lignina 3 g/L, temperatura 31,5 °C, fonte de nitrogênio 15 mM e frutose 15 g/L), foi possível observar que o experimento 17 foi o que mais divergiu dentre os pontos, apresentando semelhança na densidade ótica nas 72 e 168 horas, já os experimentos 18 e 19 apresentaram semelhança contínua em todas as horas realizadas os testes.

5.2 COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO COM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Paralelamente aos testes do plaquet burn para o crescimento microbiano, também foram realizados os testes de atividades enzimáticas destes experimentos.

Verificou-se que em alguns experimentos a atividade enzimática prevaleceu mesmo após o início da fase de decrescimento celular, isso pode ter se dado devido ao fato de que o meio em que foram inoculados ser composto por 3 ou 3,5 g de lignina, assim, as bactérias continuaram com a produção enzimática através de uma tentativa de disponibilizar mais nutrientes para elas, pois assim a enzima conseguiria quebrar a lignina e assim proporcionar o aparecimento de mais compostos, e ter-se um crescimento contínuo. Entretanto outros experimentos demonstraram uma perda de atividade enzimática após o período de 120 horas, possivelmente porque a lacase começa a perder sua atividade enzimática depois de uma certa quantidade de reações (Arregui et al., 2019).

SI et al. (2018) realizaram um estudo semelhante utilizando *Cupriavidus basiliensis* B-8 em meio com lignina, neste o micro-organismo foi capaz de produzir manganês peroxidase (MnP) com boa atividade enzimática durante os três primeiros dias com uma pequena diminuição no quarto dia, entretanto a lacase produzida demonstrou atividade enzimática a partir do segundo dia e já no quarto estava com uma máxima de 815,6 U/L, o que se encontra de acordo com este estudo.

Ao observarmos os gráficos da figura 4, pode se analisar que o crescimento celular e a atividade enzimática dos experimentos 1 (condições de cultivo: lignina 3,5 g/L, temperatura 30,75 °C, fonte de nitrogênio 12,5 mM e frutose 12,5 g/L) e 7 (condições de cultivo: lignina 3,5 g/L, temperatura 32,25 °C, fonte de nitrogênio 12,5 mM e frutose 17,5 g/L), por exemplo, apresentam uma constância até o quinto dia, ao contrário do experimento 3 (condições de cultivo: lignina 3,5 g/L, temperatura 30,75 °C, fonte de nitrogênio 12,5 mM e frutose 12,5 g/L), apresentou o mesmo resultado nos terceiros e sétimo dia. Sendo assim pode-se prever que quando o micro-organismo estava em fase de crescimento também estava produzindo mais enzimas e assim obtendo um aumento em sua atividade enzimática.

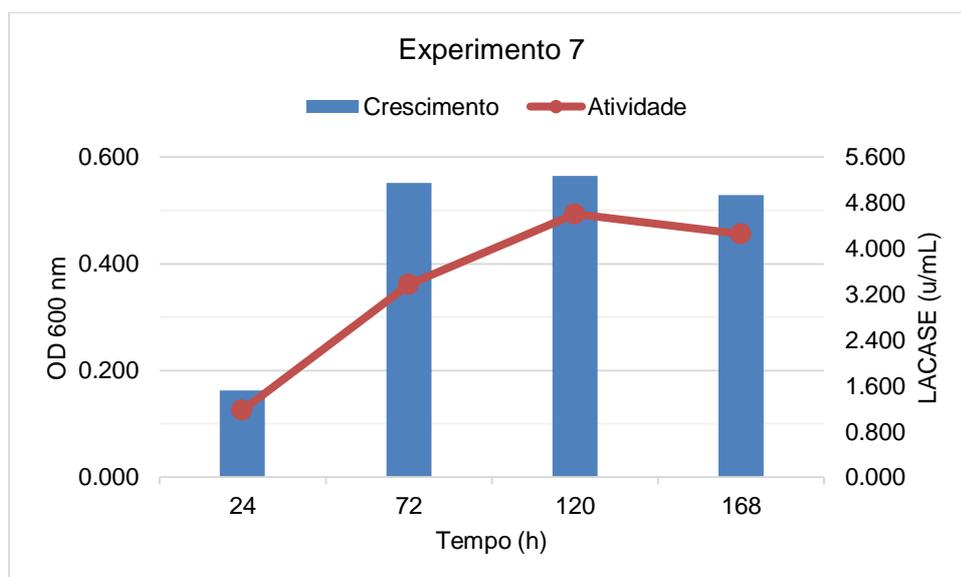
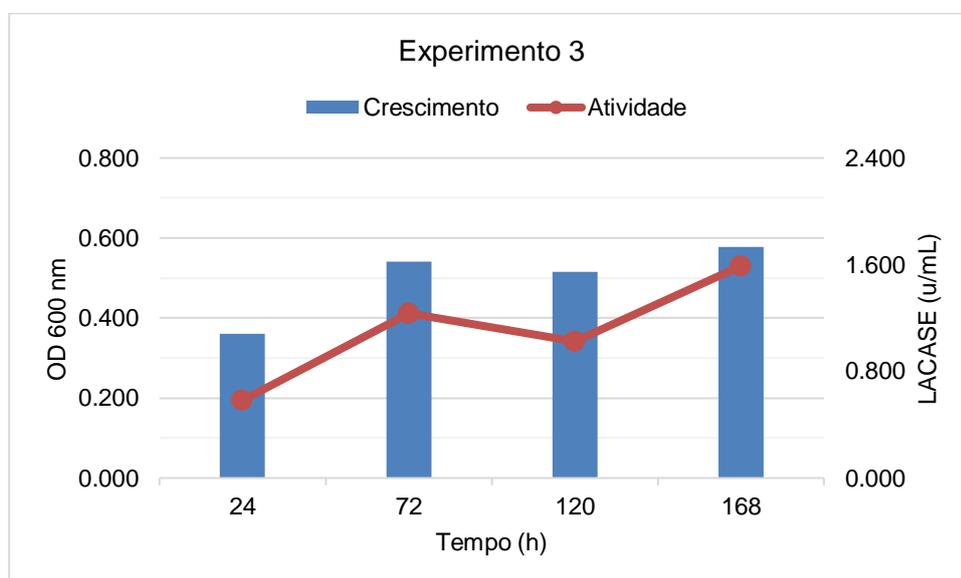
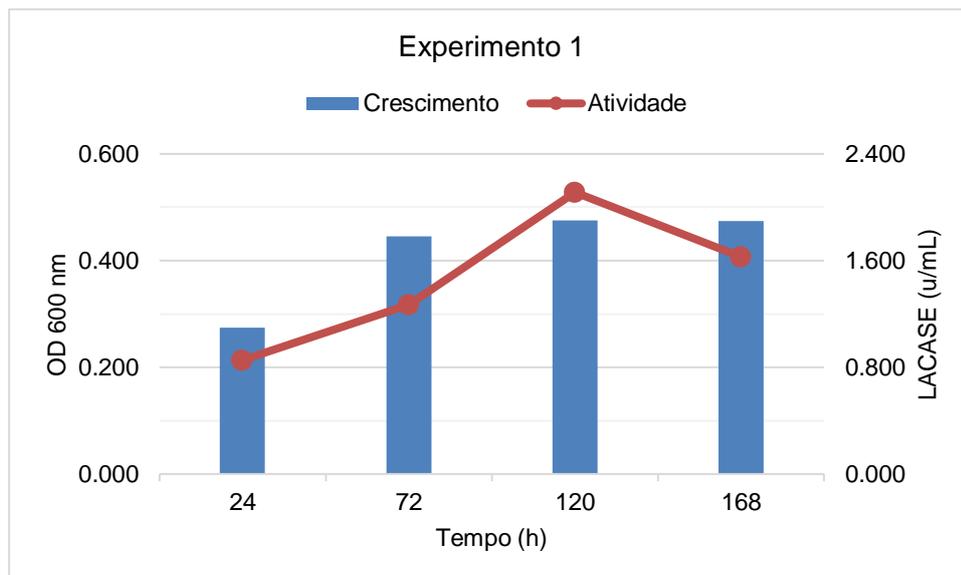


Figura 4- Comparação de crescimento bacteriano (OD_{600}) e atividade enzimática (U/mL) dos experimentos 1, 3 e 7 realizados

Também observamos que alguns experimentos apresentaram uma alta atividade enzimática, em relação aos demais experimentos, nas 120 horas, estes experimentos foram o 7, 13, 16, 17 e 27, estes também obtiveram uma densidade óptica semelhante no mesmo período, quando comparamos as condições de cultivo os experimentos 7, 13 e 16 possuem concentrações semelhantes, já o 17 e 27 são mais semelhantes.

5.3 INFLUÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CRESCIMENTO

Quanto ao experimento 21, foi o que apresentou maior atividade enzimática no último dia de testes dentre os experimentos, como pode ser observado na tabela 5, este é também o experimento com maior quantidade de lignina presente em seu meio, portanto é possível supor que para obter um meio mais favorável ao seu desenvolvimento celular iniciou-se a produção enzimática para obter nutrientes, já que o meio em que o micro-organismo foi inoculado possuía uma alta quantidade de cadeias aromáticas, entretanto observa-se que no sétimo dia tivemos o início de declínio em sua curva de OD_{600} , demonstrando que a quantidade enzimática presente não foi o suficiente, ou as substâncias inibidoras presentes junto com a lignina estavam em maior concentração, assim afetando o crescimento celular.

Tabela 5- Resultados obtidos nos respectivos dias para a atividade enzimática utilizando os experimentos do plaquet burn de crescimento

	24 horas	72 h	120 h	168 h
Experimento 1	0,854	1,269	2,112	1,629
Experimento 2	0,859	1,431	1,629	1,499
Experimento 3	0,583	1,233	1,026	1,590
Experimento 4	0,695	1,830	1,208	1,063
Experimento 5	0,961	1,300	1,671	1,502
Experimento 6	1,502	1,767	1,867	1,674
Experimento 7	1,171	3,373	4,603	4,257

Experimento 8	1,281	1,330	1,728	1,213
Experimento 9	1,062	1,692	2,292	3,776
Experimento 10	0,809	1,918	2,541	4,387
Experimento 11	1,575	2,469	2,162	2,914
Experimento 12	1,066	1,644	2,315	2,609
Experimento 13	0,506	4,056	3,819	3,481
Experimento 14	0,520	3,117	3,056	2,924
Experimento 15	0,619	2,117	1,567	2,013
Experimento 16	0,670	3,393	4,611	3,939
Experimento 17	0,360	1,859	3,143	4,374
Experimento 18	0,422	1,294	1,937	2,733
Experimento 19	0,317	1,180	2,209	3,587
Experimento 20	0,201	0,958	1,191	1,736
Experimento 21	0,625	1,750	3,107	4,467
Experimento 22	0,614	1,295	2,437	3,376
Experimento 23	0,656	1,142	2,154	2,441
Experimento 24	0,511	1,115	1,433	1,974
Experimento 25	1,001	2,301	2,235	2,098
Experimento 26	1,235	2,507	0,224	0,823
Experimento 27	1,276	2,957	3,374	2,833

Estudos demonstraram a influência que a presença da lacase possui sobre o crescimento dos micro-organismo e a produção de materiais secundários. Li e colaboradores (2019) constataram que um meio com lignina kraft suplementada com a lacase propiciou o crescimento exponencial *R. opacus* e estimulou a produção de lipídios.

Nota-se também que a quantidade de lignina kraft presente no meio trouxe consequências para o crescimento bacteriano, sendo que a análise pelo programa Statistica também mostrou esse mesmo resultado, obtendo um p de 0,04 em relação a quantidade de lignina com o crescimento bacteriano, através da realização de análise variância (ANOVA).

Ravi et al. (2019) utilizaram inicialmente uma concentração de 5 g/L de lignina kraft despolimerizada em placa de petri para o inóculo, entretanto, depois de três semanas não obtiveram crescimento visível, porém outro teste com uma redução na concentração de lignina para 2 g/L obteve um crescimento visível depois de duas semanas. Em outro estudo, SHI et al. (2013), usando *Cupriavidus basilensis* B-8, testaram seu crescimento sobre sete diferentes concentrações de lignina kraft, tendo um ótimo crescimento (OD inicial de 1455.4 mg/L⁻¹ e 3276.4 mg/L⁻¹ no sétimo dia) nas concentrações de 1 g/L até 6 g/L, à 30 °C e um pH entre 7 e 8, sendo assim obtivemos resultados conflitantes, pois quando em concentração de até 3,5 g/L nosso micro-organismo demonstrou um bom desenvolvimento (OD inicial com um intervalo entre 0,118 à 0,528 e máxima de 0,848 no último dia), entretanto quando aumentamos a concentração para 4 g/L, este apresentou dificuldade para ter um crescimento (OD final de 0,122).

Observa-se também que a fonte de nitrogênio tem uma influência na atividade enzimática, como pode ser observado nos resultados obtidos pelo experimento 26, este obteve um resultado abaixo do que os outros, possivelmente por possuir a menor quantidade de fonte de nitrogênio.

Além disso, os 8 primeiros experimentos possuíam a segunda menor quantidade de fonte de nitrogênio e foram estes, com exceção do experimento 7, que possuíam uma atividade enzimática abaixo de 2. O que é compatível com a estudo de Salvachúa e colaboradores (2015) que testaram diversos micro-organismos, dentre eles o *C. necator*, entretanto realizaram os testes de atividade enzimática com DMP (2,6-dimetoxifenol), e revelaram que obtiveram em seus resultados uma melhor atividade enzimática no meio em que possuía sulfato de amônia (15 mM) e glicose em comparação com o meio mais pobre, sem glicose e com 1mM de sulfato de amônia. O mesmo foi visto em outros estudos onde a restrição de nitrogênio causou uma dificuldade no crescimento dos micro-organismo, mas favoreceu a formação de compostos, como o PHB (polihidroxibutirato) (DALSASSO et al., 2019).

Realizando uma apuração dos resultados obtidos dos pontos centrais, conseguimos visualizar que todos os três tiveram resultados lineares, ou seja, a atividade enzimática dos pontos foi crescendo conforme o tempo de teste, porém só tiveram resultados semelhantes os experimentos 17 e 19 nas primeiras 24 horas, com 72 horas os três tiveram leitura semelhante, nas horas que se sucederam as leituras se diferem.

Quando analisado quais os parâmetros que mais tiveram efeito sobre a atividade enzimática no programa Statistica, utilizando análise de variância, obtivemos um p de 0,001 em relação a concentração de fonte de N₂ e atividade enzimática, assim fica evidenciado que a quantidade de fonte de nitrogênio realmente se mostra significativa para o aumento da atividade, o que pode ser visto na Figura 5, esta é referente aos resultados obtidos depois de 168 horas para atividade enzimática, onde está sendo apresentado a variável significativa para se obter a melhor atividade.

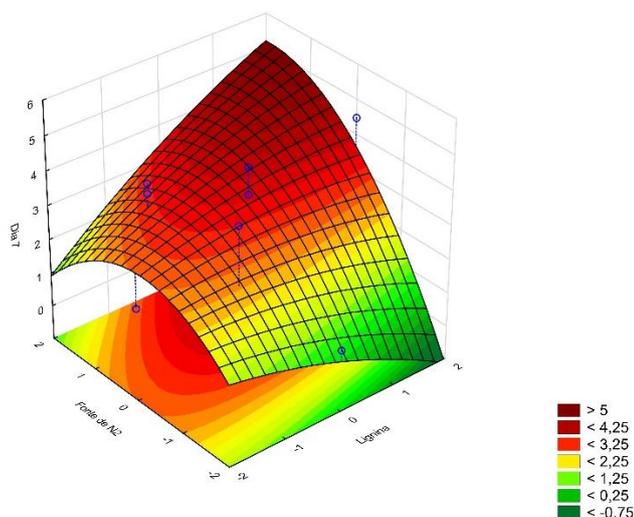


Figura 5– Superfície de resposta da produção de lacase utilizando-se o substrato ABTS.

O valor de R² para as condições otimizadas é de 0,73, demonstrando que os valores obtidos foram adequados por se tratar de um experimento biotecnológico.

Entretanto a alta concentração de frutose pode ter resultado em uma influência no crescimento celular e, conseqüentemente na atividade enzimática, porém não foi possível a realização da medição da quantidade de frutose e sua influência sobre estas.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que foi possível a produção de lacase em erlenmeyer por bioconversão utilizando o meio com lignina kraft. A adequada concentração de fonte de nitrogênio é importante para a determinação de uma atividade enzimática suficientemente alta.

Entretanto, com relação ao estabelecimento da influência que os parâmetros de temperatura, fonte de nitrogênio, quantidade de lignina e frutose sobre o crescimento, foi possível verificar que a quantidade de lignina tem uma importância para com este.

Quando comparado o crescimento com a atividade enzimática, alguns experimentos demonstraram que um não possui efeito sobre o outro, porém outros diferem, como nos experimentos citados anteriormente (1, 20 e 21), que foi possível verificar que conforme o micro-organismo cresceu foi-se tendo uma maior atividade.

7. PERSPECTIVAS E FUTUROS TRABALHOS

Visando o futuro e melhor ambiente para a sobrevivência humana diversas empresas e outros vem investindo na descoberta e utilização de tecnologias conhecidas como “tecnologias verdes”, portanto trazer um aproveitamento econômico aos resíduos que seriam descartados, como os resíduos agroindustriais.

Assim para o futuro seriam realizados testes de deslignificação e assim comprovar a eficácia da enzima lacase, um estudo sobre uma produção em maior escala da produção enzimática, por exemplo em biorreatores e também pesquisar a capacidade de deslignificação e produção enzimática, não somente da lacase, mas de outras enzimas que poderiam ser utilizadas comercialmente e que tem a capacidade de quebra da lignina, em outros micro-organismos. Além disso também poderia ser feita uma pesquisa dos compostos que são formados após a quebra da lignina e suas importâncias no mercado.

8. REFERÊNCIAS

- AGNOL, R. F. D. et al. Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 4, 2017.
- ALVES, M. H. et al. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 325–330, 2002.
- AZUBUIKE, C. C. et al. Applying statistical design of experiments to understanding the effect of growth medium components on *Cupriavidus necator* H16 Growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 17, 2020.
- BAJWA, D. S. et al. A concise review of current lignin production, applications, products and their environment impact. **Industrial Crops and Products**, v. 139, n. February, p. 111526, 2019.
- BANDOUNAS, L. et al. Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. **BMC Biotechnology**, v. 11, 2011.
- BATISTA, F. L. **PRODUÇÃO DE LACASE E BIOCONVERSÃO DE FLAVONÓIDES POR *Pycnoporus sanguineus***. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS FACULDADE DE FARMÁCIA, 2009.
- BENTO, C.; CASARIL, K. Agroindustriais Ligninocelulósicos Por Fungos Causadores Da Podridão Branca: Uma Alternativa À Produção. **E-revista UNIOESTE**, v. 14, p. 151–180, 2012.
- BROWN, M. E.; CHANG, M. C. Y. Exploring bacterial lignin degradation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, n. 1, p. 1–7, 2014.
- BUGG, T. D. H. et al. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 12, p. 1883–1896, 2011a.
- BUGG, T. D. H. et al. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 394–400, 2011b.
- DA SILVA, S. R. S. **Melhoramento da produção de enzimas ligninocelulolíticas a partir de resíduos agrícolas da Amazônia Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais. Universidade do Estado do Amazonas**, 2015.
- DALSASSO, R. R. et al. Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate. **Process Biochemistry**, v. 85, n. April, p. 12–18, 2019.
- FERNANDES, T. A. R. **LACASES DE ACTINOBACTÉRIAS: CARACTERIZAÇÃO, OBTENÇÃO DE NOVOS PRIMERS E EXPRESSÃO HETERÓLOGA NA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* UFV-3**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA TATIANA, 2014.
- GAETE, A. V.; TEODORO, C. E. S.; MARTINAZO, A. P. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de celulase: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. 1–33, 2020.
- GALL, D. L. et al. Biochemical transformation of lignin for deriving valued commodities from lignocellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 45, p. 120–126, 2017.
- GARCIA, M. B. **CULTURAS ENRIQUECIDAS PARA DEGRADAÇÃO DE LIGNINA: DIVERSIDADE MICROBIANA E TRIAGEM DE BIBLIOTECA METAGENÔMICA**. [s.l.] Universidade Católica de Brasília, 2019.
- JOHNSON, C. W.; BECKHAM, G. T. Aromatic catabolic pathway selection for optimal production of pyruvate and lactate from lignin. **Metabolic Engineering**, v.

28, p. 240–247, 2015.

KOSA, M.; RAGAUSKAS, A. J. Lignin to lipid bioconversion by oleaginous Rhodococci. **Green Chemistry**, v. 15, n. 8, p. 2070–2074, 2013.

KUMAR, B. et al. Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. **Fuel Processing Technology**, v. 199, n. October 2019, 2020.

KUMAR, P. et al. Bioconversion of lignin and its derivatives into polyhydroxyalkanoates: Challenges and opportunities. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 153–162, 2019.

LEONG, H. Y. et al. Waste biorefinery towards a sustainable circular bioeconomy: a solution to global issues. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2021.

LI, M. et al. Enhancement of polyhydroxybutyrate (PHB) production by 10-fold from alkaline pretreatment liquor with an oxidative enzyme-mediator-surfactant system under Plackett-Burman and central composite designs. **Bioresource Technology**, v. 281, n. February, p. 99–106, 2019.

LI, M.; WILKINS, M. Fed-batch cultivation and adding supplements to increase yields of polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* from corn stover alkaline pretreatment liquor. **Bioresource Technology**, v. 299, n. October 2019, p. 122676, 2020.

LIN, X. et al. Enzymatic pulping of lignocellulosic biomass. **Industrial Crops and Products**, v. 120, n. April, p. 16–24, 2018.

LOPEZ, A. M. Q.; SILVA, A. L. DOS S. S.; SANTOS, E. C. L. THE FUNGAL ABILITY FOR BIOBLEACHING/BIOPULPING/BIOREMEDIATION OF LIGNIN-LIKE COMPOUNDS OF AGRO-INDUSTRIAL RAW MATERIAL. **Quim. Nova**, v. 40, n. 8, p. 916–931, 2017.

MACHINENI, L. Lignocellulosic biofuel production: review of alternatives. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 10, n. 3, p. 779–791, 2020.

MAITY, S. K. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part i. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 1427–1445, 2015.

MENEZES, D. B. et al. Prospecting fungal ligninases using corncob lignocellulosic fractions. **Cellulose**, v. 24, n. 10, p. 4355–4365, 2017.

MONTGOMERY, D.C.; RUNGER, G. . **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros**. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro:Anthares, 2016.

MORAES, E. C. **Prospecção de enzimas e vias metabólicas para a biossíntese de vanilina e valorização da lignina do bagaço de cana-de-açúcar**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA, 2017.

ORLANDELLI, C. R. et al. ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PRODUÇÃO POR FUNGOS E APLICAÇÕES. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.

RAVI, K. et al. Bacterial conversion of depolymerized Kraft lignin. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2019.

RICARDINO, I. E. F.; SOUZA, M. N. C.; NETO, I. F. S. Vantagens E Possibilidades Do Reaproveitamento De Resíduos Agroindustriais. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 1, p. 55–79, 2020.

RORIZ, R. F. C. **Aproveitamento dos resíduos alimentícios obtidos das centrais de abastecimento do Estado de Goiás S/A para alimentação humana**. [s.l: s.n.].

SALIBA, E. DE O. S. et al. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização

química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917–928, 2001.

SALVACHÚA, D. et al. Towards lignin consolidated bioprocessing: simultaneous lignin depolymerization and product generation by bacteria. **Green Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 4951–4967, 2015.

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

SCHUTYSER, W. ET AL. No Title. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 2, p. 852–908, 2018.

SHI, Y. et al. Characterization and genomic analysis of kraft lignin biodegradation by the beta-proteobacterium *Cupriavidus basilensis* B-8. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2013.

SHIN, S. K. et al. Effective melanin degradation by a synergistic laccase-peroxidase enzyme complex for skin whitening and other practical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 181–186, 2019.

SHIRAIISHI, I. S. **BIODEGRADAÇÃO DA LIGNINA KRAFT: OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE PELO ISOLADO JUMAD053 E ANÁLISE DOS PRODUTOS POR CLAE**. [s.l.] UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, 2019.

SI, M. et al. In Situ Lignin Bioconversion Promotes Complete Carbohydrate Conversion of Rice Straw by *Cupriavidus basilensis* B-8. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 6, p. 7969–7978, 2018.

SOHN, Y. J. et al. Chemoautotroph *Cupriavidus necator* as a potential game-changer for global warming and plastic waste problem: A review. **Bioresource Technology**, v. 340, n. July, p. 125693, 2021.

TAYLOR, C. R. et al. Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin from screening of environmental samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 521–530, 2012.

WANG, J. et al. Kinetic analysis on the production of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Cupriavidus necator* with a consideration of substrate inhibition, cell growth, maintenance, and product formation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 3, p. 422–428, 2010.

WU, W. et al. Lignin Valorization: Two Hybrid Biochemical Routes for the Conversion of Polymeric Lignin into Value-added Chemicals. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

XIE, S. et al. Advanced Chemical Design for Efficient Lignin Bioconversion. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 3, p. 2215–2223, 2017.

XIE, S.; RAGAUSKAS, A. J.; YUAN, J. S. Lignin Conversion: Opportunities and Challenges for the Integrated Biorefinery. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 161–167, 2016.

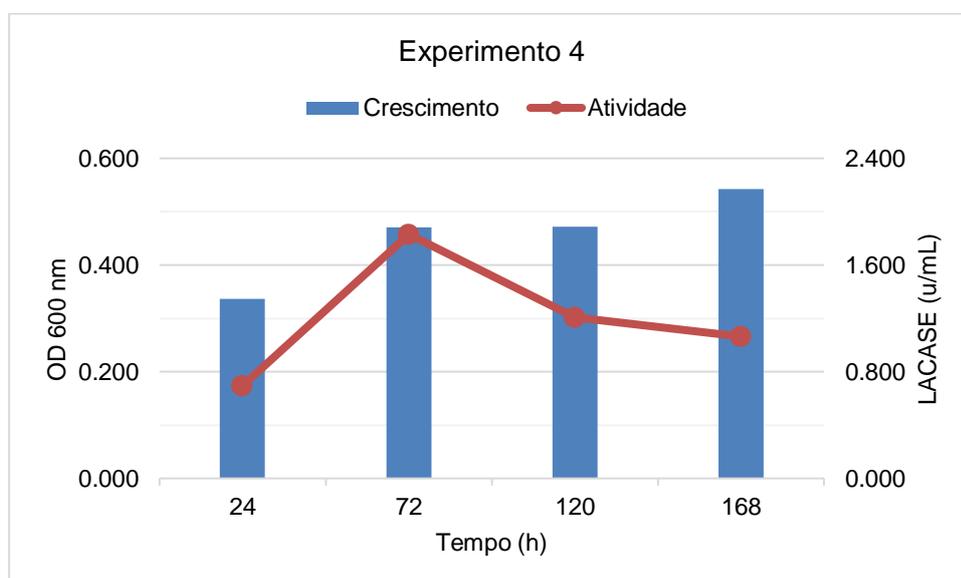
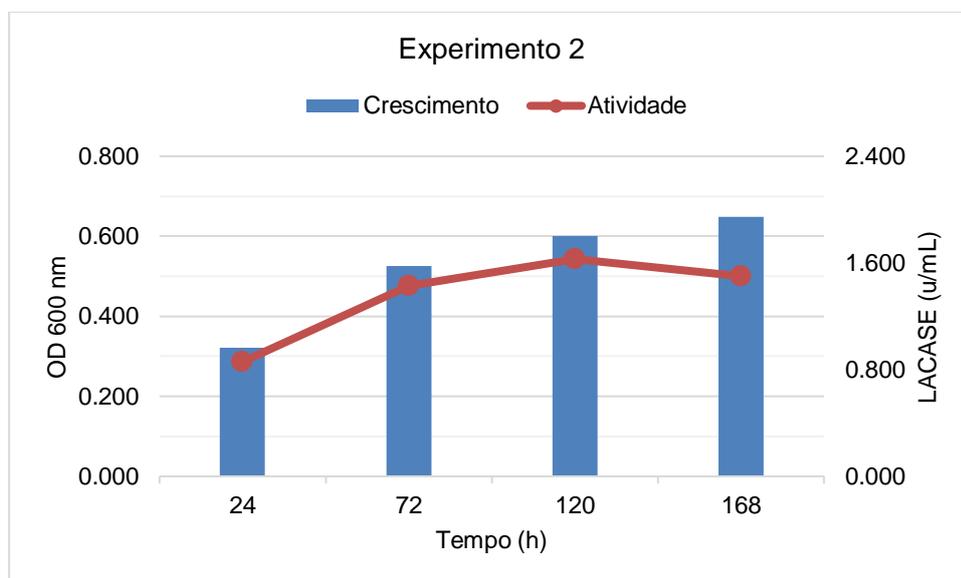
XU, Z. et al. Recent advances in lignin valorization with bacterial cultures: Microorganisms, metabolic pathways, and bio-products. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2019.

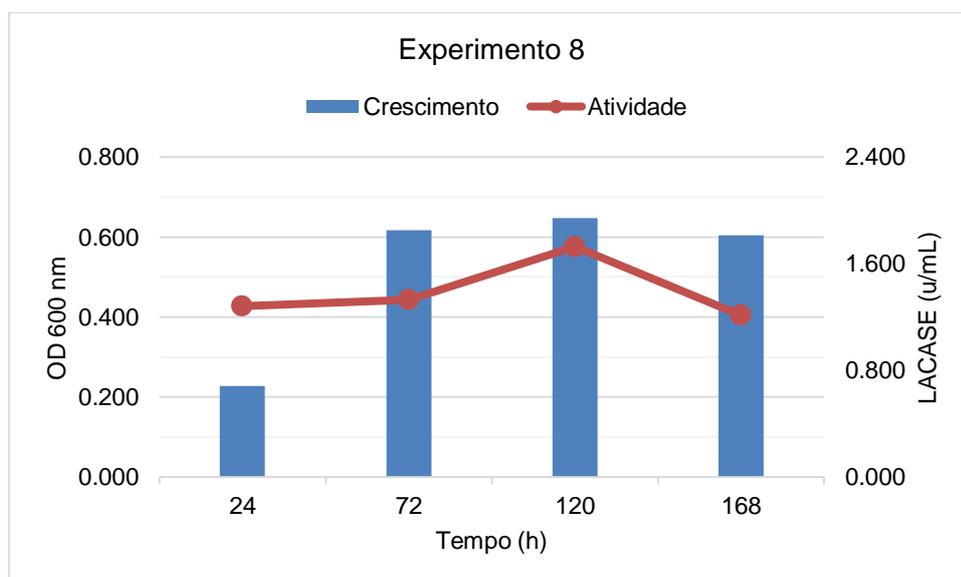
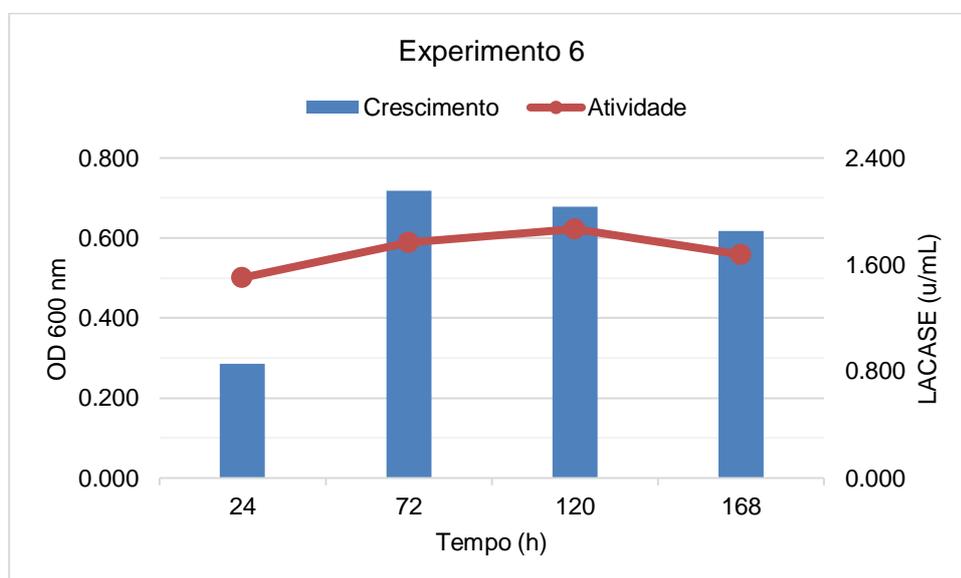
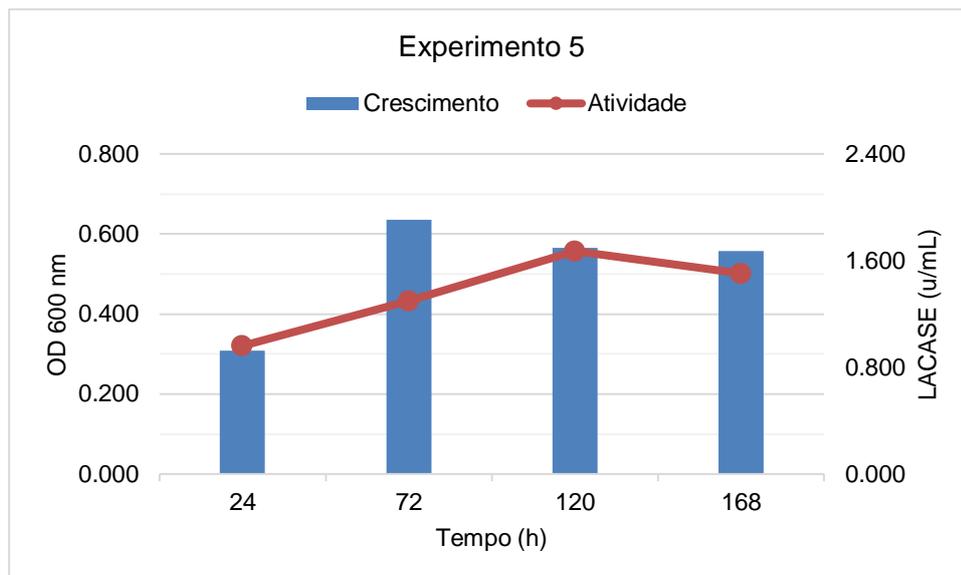
YANG, X.; GU, C.; LIN, Y. A novel fungal laccase from *Sordaria macrospora* k-hell: expression, characterization, and application for lignin degradation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 7, p. 1133–1139, 2020.

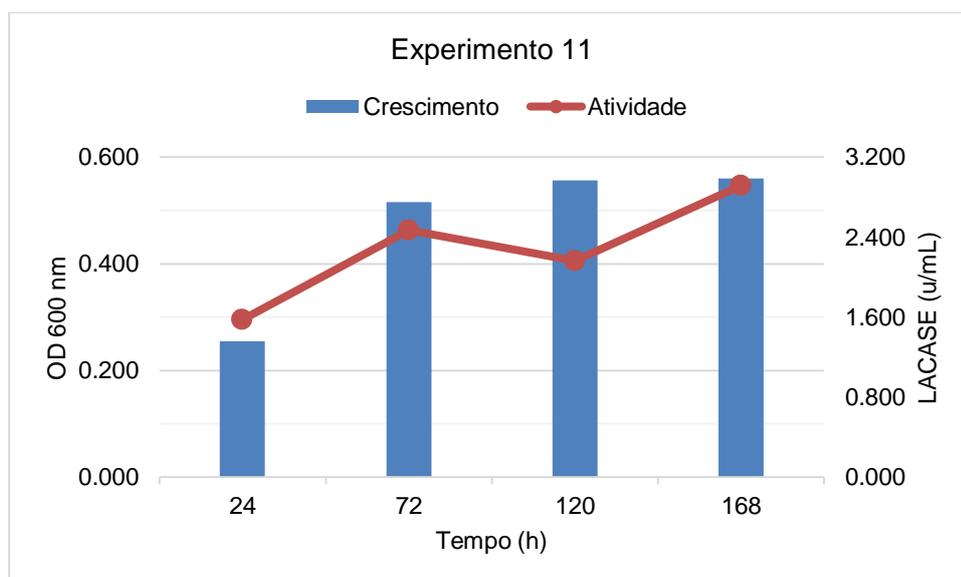
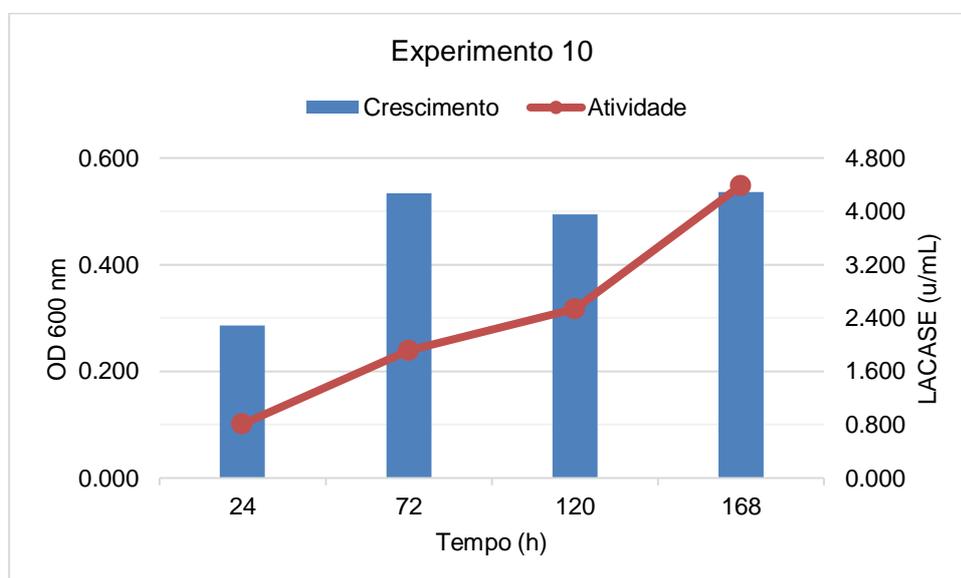
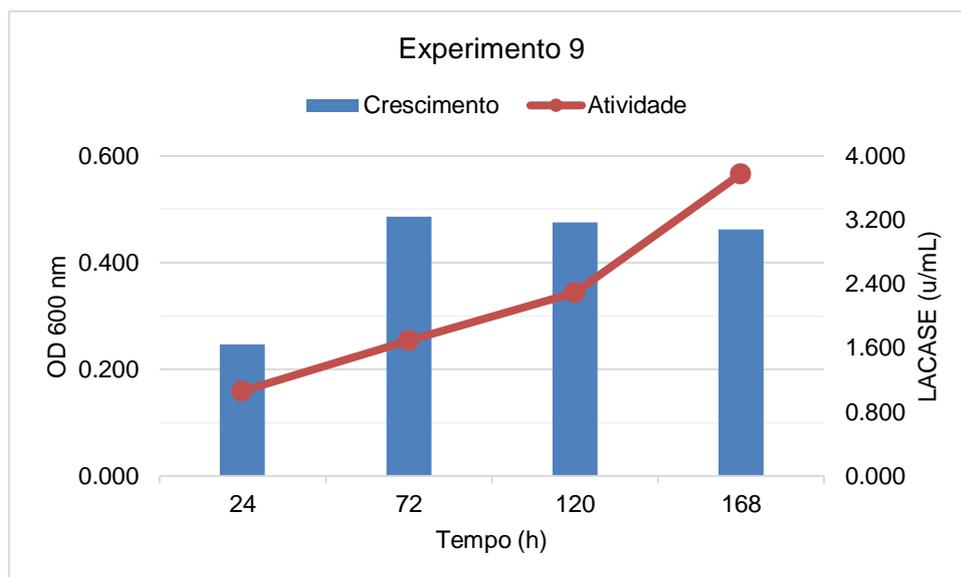
ZHAO, C. et al. Synergistic enzymatic and microbial lignin conversion. **Green Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1306–1312, 2016.

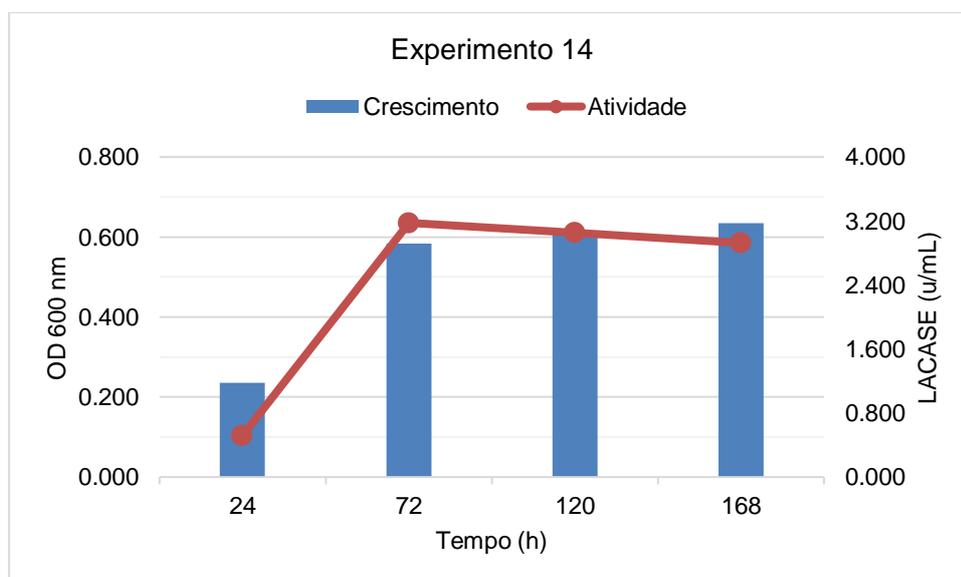
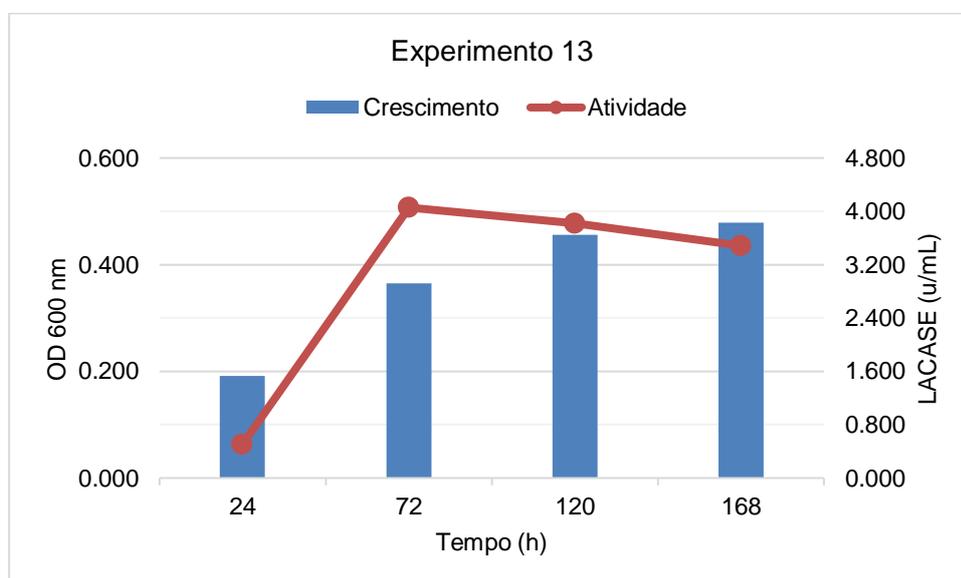
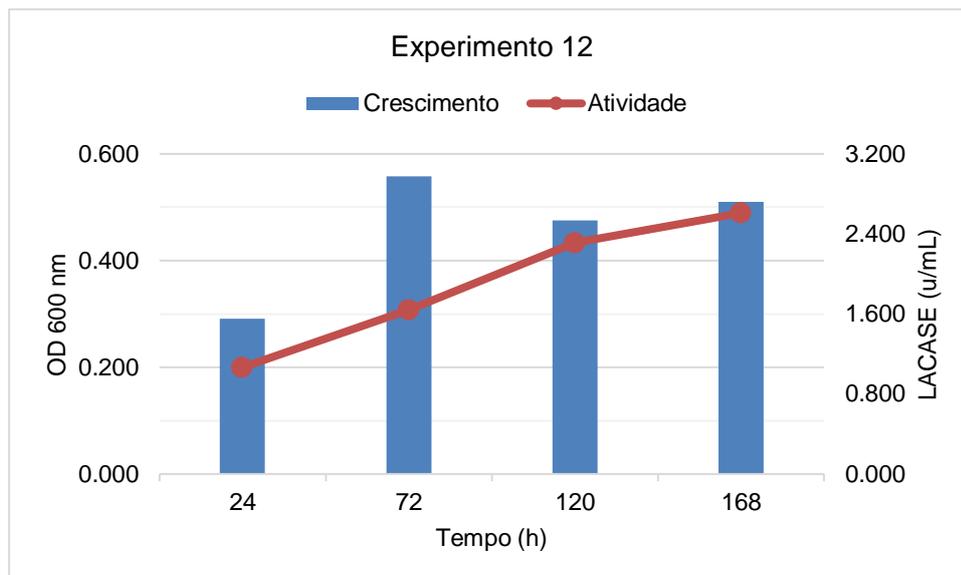
9. APÊNDICES

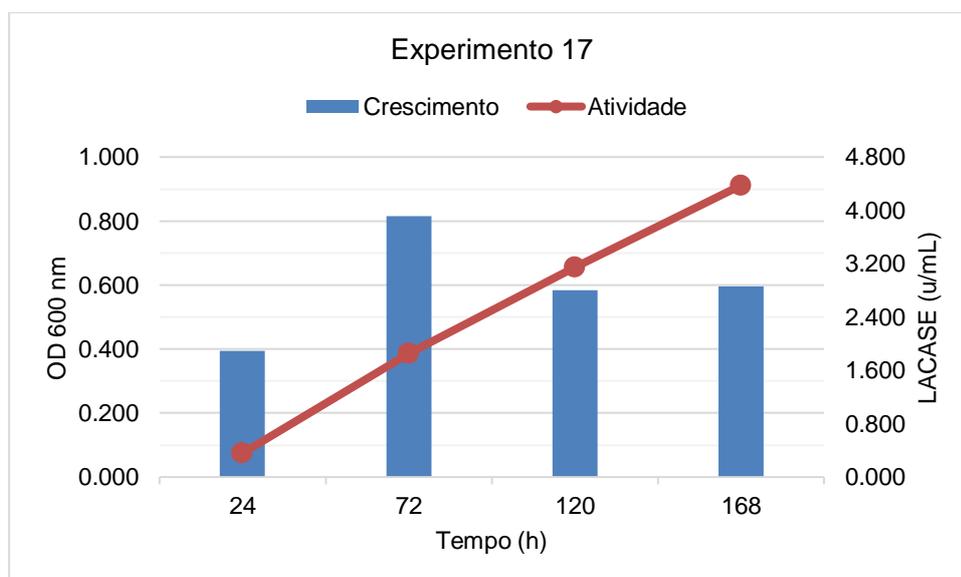
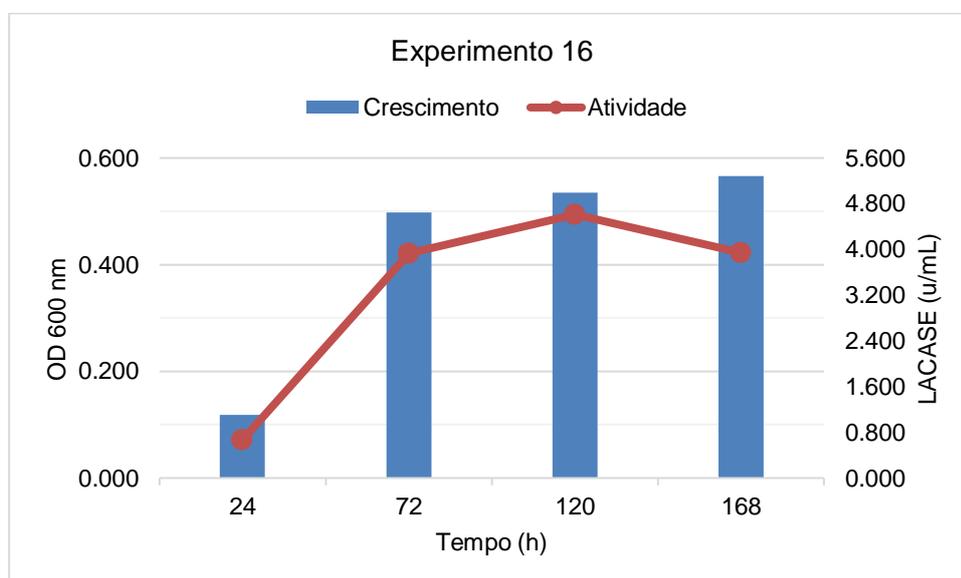
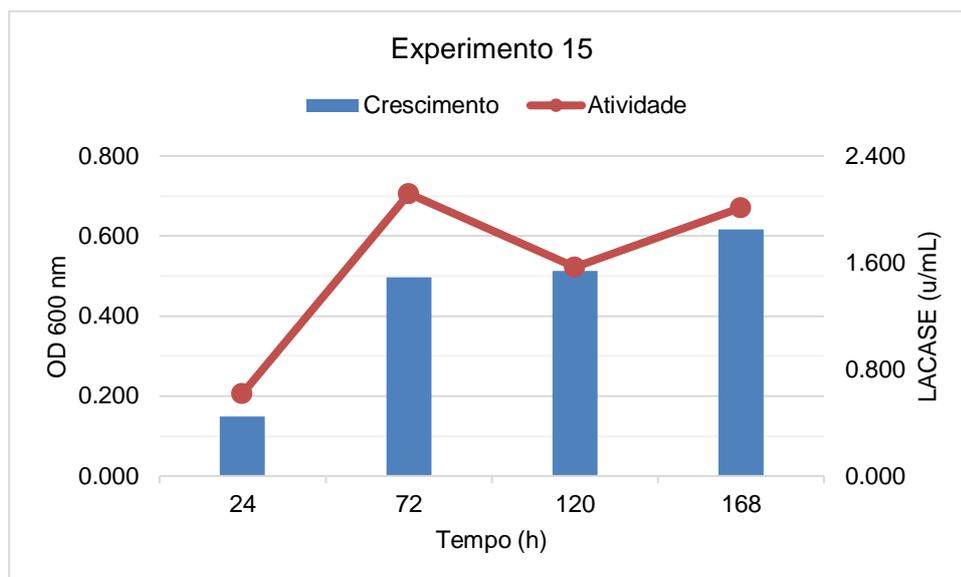
Para melhor visualização realizamos um comparativo em gráficos (figura 6) entre a atividade enzimática e o crescimento celular dos demais experimentos realizados.

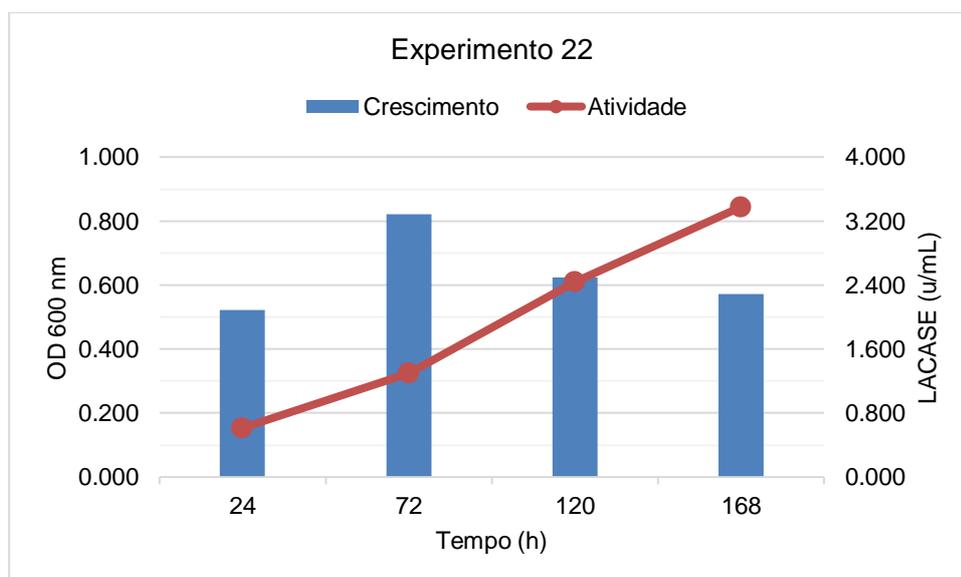
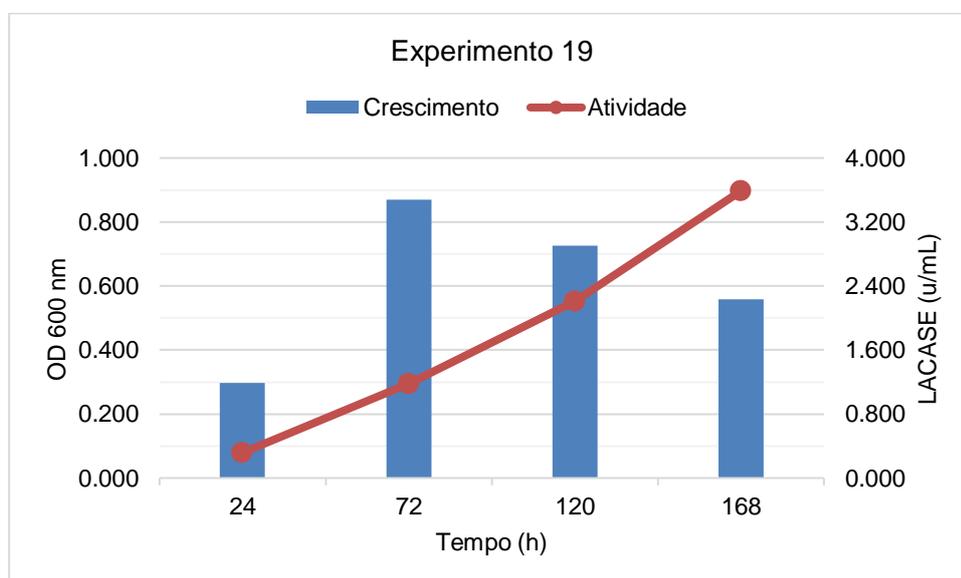
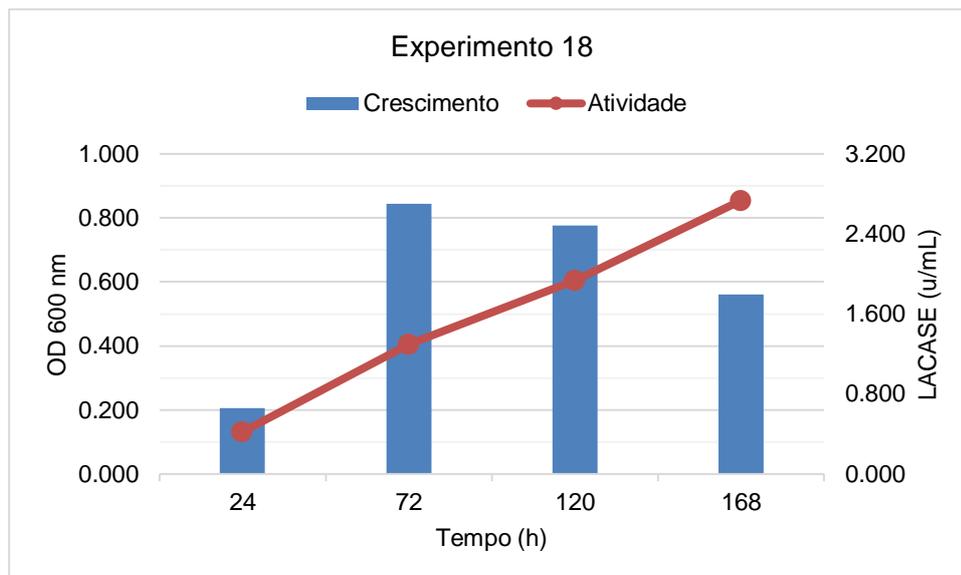


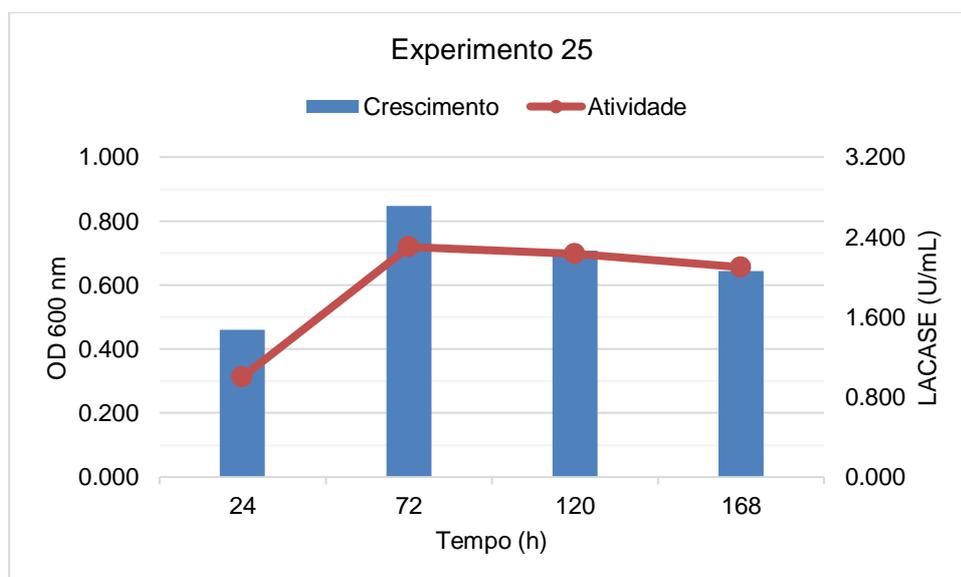
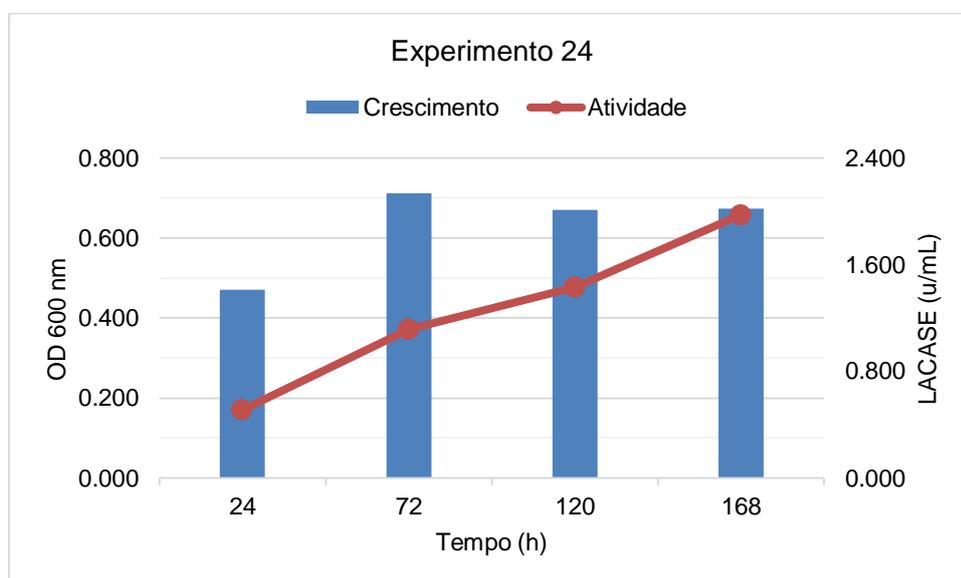
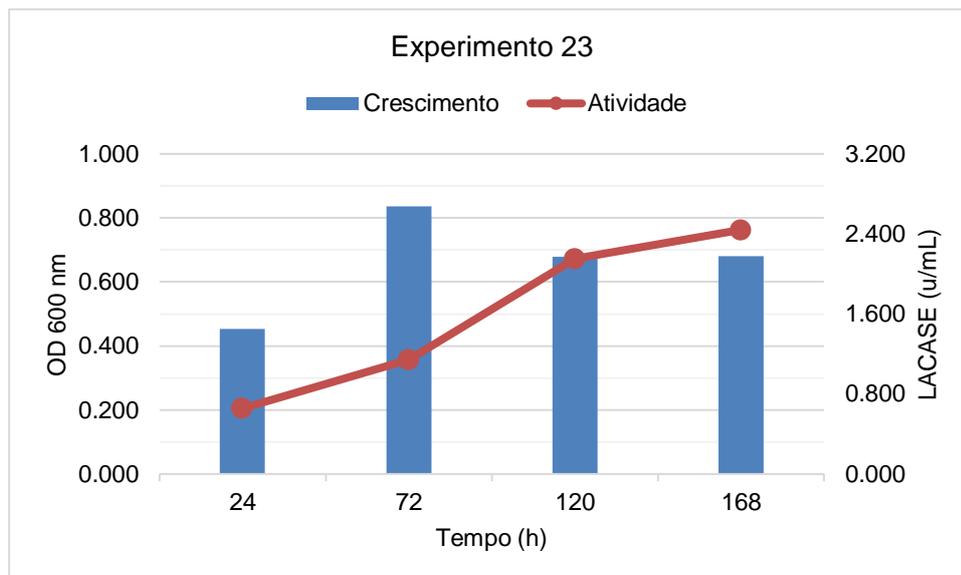












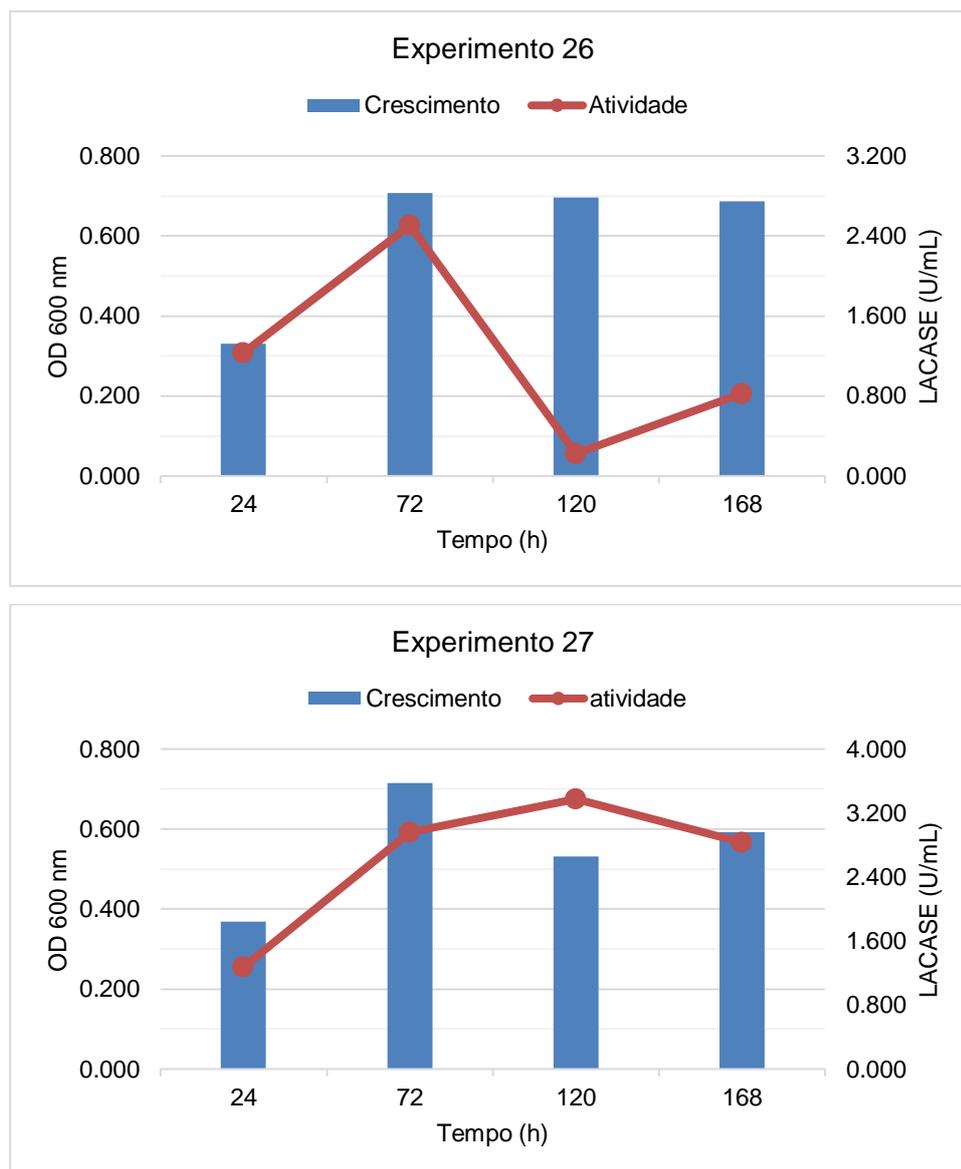


Figura 6 - Comparação de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) e atividade enzimática (U/mL) dos experimentos realizados.

Tabela 6 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação a atividade enzimática para as 24 horas testadas.

ANOVA; Var. Dia 1; R-sqr=,87261; Adj.,72398 (Atividade bacteriana) 4 factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=,0366949 DV: Dia 1				
Factor	SS	df	MS	F
(1) Lignina (L)	0,034597	1	0,034597	0,94282
Lignina (Q)	0,032637	1	0,032637	0,88940
(2) Frutose (L)	0,010880	1	0,010880	0,29649
Frutose (Q)	0,190618	1	0,190618	5,19466

(3) Temperatura (L)	0,028678	1	0,028678	0,78153
Temperatura (Q)	0,331889	1	0,331889	9,04454
(4) Fonte de N2(L)	0,028576	1	0,028576	0,77874
Fonte de N2 (Q)	1,327027	1	1,327027	36,16379
1L by 2L	0,018218	1	0,018218	0,49648
1L by 3L	0,107099	1	0,107099	2,91862
1L by 4L	0,113593	1	0,113593	3,09560
2L by 3L	0,003015	1	0,003015	0,08216
2L by 4L	0,102408	1	0,102408	2,79079
3L by 4L	0,910424	1	0,910424	24,81063
Error	0,440339	12	0,036695	
Total SS	3,456532	26		

Tabela 7 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação a atividade enzimática para as 72 horas testadas.

ANOVA; Var.: Dia 3; R-sqr=,61962; Adj:,17584 (Atividade bacteriana) 4 factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=,625303 DV: Dia 3				
Factor	SS	df	MS	F
(1) Lignina (L)	0,05981	1	0,059814	0,095656
Lignina (Q)	0,04831	1	0,048307	0,077254
(2) Frutose (L)	0,02234	1	0,022337	0,035723
Frutose (Q)	0,00404	1	0,004041	0,006463
(3) Temperatura (L)	4,09764	1	4,097643	6,553052
Temperatura (Q)	0,39427	1	0,394274	0,630532
(4) Fonte de N2(L)	2,93532	1	2,935322	4,694239
Fonte de N2 (Q)	3,27057	1	3,270572	5,230379
1L by 2L	0,01868	1	0,018678	0,029870
1L by 3L	0,02368	1	0,023677	0,037865
1L by 4L	0,09330	1	0,093296	0,149202
2L by 3L	0,02612	1	0,026125	0,041780
2L by 4L	0,49777	1	0,497774	0,796053

3L by 4L	0,83517	1	0,835166	1,335618
Error	7,50364	12	0,625303	
Total SS	19,72656	26		

Tabela 8 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação a atividade enzimática para as 120 horas testadas.

ANOVA; Var.: Dia 5; R-sqr=,55589; Adj:,03776 (Atividade bacteriana) 4 factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=1,011585 DV: Dia 5				
Factor	SS	df	MS	F
(1) Lignina (L)	0,75640	1	0,756401	0,747739
Lignina (Q)	0,00029	1	0,000289	0,000286
(2) Frutose (L)	0,09185	1	0,091850	0,090798
Frutose (Q)	0,03456	1	0,034562	0,034167
(3) Temperatura (L)	4,29347	1	4,293475	4,244305
Temperatura (Q)	0,11982	1	0,119819	0,118447
(4) Fonte de N2(L)	7,74292	1	7,742920	7,654247
Fonte de N2 (Q)	0,14938	1	0,149383	0,147672
1L by 2L	0,00871	1	0,008708	0,008609
1L by 3L	0,00924	1	0,009244	0,009138
1L by 4L	2,38584	1	2,385838	2,358515
2L by 3L	0,44074	1	0,440739	0,435691
2L by 4L	0,71877	1	0,718770	0,710539
3L by 4L	0,06257	1	0,062569	0,061853
Error	12,13902	12	1,011585	
Total SS	27,33318	26		

Tabela 9 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação a atividade enzimática para as 168 horas testadas.

ANOVA; Var.:Dia 7; R-sqr=,73173; Adj:,41874 (Atividade bacteriana) 4 factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=,7332628 DV: Dia 7				
Factor	SS	df	MS	F
(1) Lignina (L)	1,05497	1	1,05497	1,43874

Lignina (Q)	0,16004	1	0,16004	0,21825
(2) Frutose (L)	0,96949	1	0,96949	1,32215
Frutose (Q)	0,38757	1	0,38757	0,52856
(3) Temperatura (L)	0,51058	1	0,51058	0,69631
Temperatura (Q)	2,65185	1	2,65185	3,61650
(4) Fonte de N2(L)	12,00872	1	12,00872	16,37710
Fonte de N2 (Q)	3,49036	1	3,49036	4,76004
1L by 2L	0,75038	1	0,75038	1,02335
1L by 3L	0,01311	1	0,01311	0,01788
1L by 4L	2,58754	1	2,58754	3,52880
2L by 3L	0,56869	1	0,56869	0,77557
2L by 4L	2,60648	1	2,60648	3,55464
3L by 4L	0,32629	1	0,32629	0,44498
Error	8,79915	12	0,73326	
Total SS	32,79936	26		

Tabela 10 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação ao crescimento bacteriano para as 24 horas testadas.

ANOVA; Var.:Dia 1; R-sqr=,52377; Adj:0, (crescimento bacteriano) 4 factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=,0155006 DV: Dia 1

Factor	SS	df	MS	F
(1) Lignina (L)	0,014197	1	0,014197	0,915912
Lignina (Q)	0,061941	1	0,061941	3,996033
(2) Frutose (L)	0,005665	1	0,005665	0,365472
Frutose (Q)	0,017160	1	0,017160	1,107078
(3) Temperatura (L)	0,020728	1	0,020728	1,337234
Temperatura (Q)	0,011037	1	0,011037	0,712044
(4) Fonte de N2(L)	0,007531	1	0,007531	0,485830
Fonte de N2 (Q)	0,000856	1	0,000856	0,055210
1L by 2L	0,001367	1	0,001367	0,088204
1L by 3L	0,000169	1	0,000169	0,010902

1L by 4L	0,000813	1	0,000813	0,052451
2L by 3L	0,012673	1	0,012673	0,817592
2L by 4L	0,000071	1	0,000071	0,004556
3L by 4L	0,000436	1	0,000436	0,028124
Error	0,186008	12	0,015501	
Total SS	0,390581	26		

Tabela 11 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação ao crescimento bacteriano para as 72 horas testadas.

ANOVA; Var.:Dia 03; R-sqr=,46428; Adj:0, (crescimento bacteriano) 4 factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=,0326885 DV: Dia 03				
Factor	SS	df	MS	F
(1) Lignina (L)	0,024678	1	0,024678	0,754942
Lignina (Q)	0,208930	1	0,208930	6,391539
(2) Frutose (L)	0,000072	1	0,000072	0,002197
Frutose (Q)	0,025670	1	0,025670	0,785297
(3) Temperatura (L)	0,018595	1	0,018595	0,568864
Temperatura (Q)	0,047465	1	0,047465	1,452027
(4) Fonte de N2(L)	0,007201	1	0,007201	0,220298
Fonte de N2 (Q)	0,087429	1	0,087429	2,674607
1L by 2L	0,007381	1	0,007381	0,225793
1L by 3L	0,003330	1	0,003330	0,101863
1L by 4L	0,000926	1	0,000926	0,028339
2L by 3L	0,003796	1	0,003796	0,116118
2L by 4L	0,002771	1	0,002771	0,084778
3L by 4L	0,025349	1	0,025349	0,775478
Error	0,392262	12	0,032689	
Total SS	0,732222	26		

Tabela 12 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação ao crescimento bacteriano para as 120 horas testadas.

ANOVA; Var.:Dia 05; R-sqr=,42362; Adj:0, (crescimento bacteriano) 4 factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=,0183186 DV: Dia 05				
Factor	SS	df	MS	F
(1) Lignina (L)	0,037925	1	0,037925	2,070276
Lignina (Q)	0,060609	1	0,060609	3,308608
(2) Frutose (L)	0,000558	1	0,000558	0,030474
Frutose (Q)	0,014665	1	0,014665	0,800570
(3) Temperatura (L)	0,009899	1	0,009899	0,540405
Temperatura (Q)	0,005885	1	0,005885	0,321262
(4) Fonte de N2(L)	0,026065	1	0,026065	1,422855
Fonte de N2 (Q)	0,026628	1	0,026628	1,453606
1L by 2L	0,002558	1	0,002558	0,139615
1L by 3L	0,001039	1	0,001039	0,056731
1L by 4L	0,007848	1	0,007848	0,428392
2L by 3L	0,000187	1	0,000187	0,010210
2L by 4L	0,003401	1	0,003401	0,185676
3L by 4L	0,007507	1	0,007507	0,409811
Error	0,219823	12	0,018319	
Total SS	0,381383	26		

Tabela 13 - Resultados obtidos através da ANOVA em relação ao crescimento bacteriano para as 24 horas testadas.

ANOVA; Var.:Dia 07; R-sqr=,54449; Adj:,01305 (crescimento bacteriano) 4 factors, 1 Blocks, 27 Runs; MS Residual=,0244466 DV: Dia 07				
Factor	SS	df	MS	F
(1) Lignina (L)	0,117715	1	0,117715	4,815195
Lignina (Q)	0,027312	1	0,027312	1,117216
(2) Frutose (L)	0,001245	1	0,001245	0,050917
Frutose (Q)	0,000005	1	0,000005	0,000186
(3) Temperatura (L)	0,006384	1	0,006384	0,261133

Temperatura (Q)	0,001249	1	0,001249	0,051085
(4) Fonte de N2(L)	0,000565	1	0,000565	0,023098
Fonte de N2 (Q)	0,000151	1	0,000151	0,006170
1L by 2L	0,049791	1	0,049791	2,036703
1L by 3L	0,021566	1	0,021566	0,882179
1L by 4L	0,004371	1	0,004371	0,178802
2L by 3L	0,016531	1	0,016531	0,676203
2L by 4L	0,038582	1	0,038582	1,578210
3L by 4L	0,024767	1	0,024767	1,013109
Error	0,293360	12	0,024447	
Total SS	0,644020	26		