

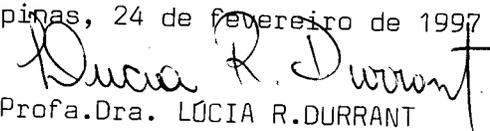
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DO SISTEMA LIGNINOLÍTICO PRODUZIDO POR FUNGOS
SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE OXIGENAÇÃO**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por LARA DURÃES SETTE e aprovada pela Comissão Julgadora em 24.02.97.

Campinas, 24 de fevereiro de 1997


Prof.a.Dra. LÚCIA R.DURRANT

Presidente da Banca

Lara Durães Sette

Bióloga

Prof.^a. Dr.^a. Lúcia Regina Durrant

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas/1997



UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP		
	20120		
V.	EX.		
TRABO BU/	30055		
PROC.	281197		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	10/05/197		
N.º CPD			
CM.000973204			

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Se78e

Sette, Lara Durães

Estudo do sistema ligninolítico produzido por fungos sob diferentes condições de oxigenação / Lara Durães Sette. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Lignina. 2.Microrganismos. 3.Biodegradação.
4.Enzimas. I.Durrant, Lúcia Regina. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Lúcia R. Durrant

Prof.^a Dr.^a Lúcia Regina Durrant
(ORIENTADORA)

Hélia Harumi Sato

Prof.^a Dr.^a Hélia Harumi Sato
(MEMBRO)

Ranulfo Monte Alegre

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(MEMBRO)

Prof. Dr. Fumio Yokoya
(MEMBRO)

“Não quero só chegar à fraternidade com os seres ditos humanos. Quero me identificar com tudo o que vive, mesmo com os animais que se arrastam no solo”.

(Mahatma Ghandi)

*Ao meu pai,
grande Mestre,
grande Luz,
grande Ser.*

*A minha mãe e aos
meus irmãos,*

dedico.

AGRADECIMENTOS

A professora Lúcia pela orientação, amizade e confiança.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica - CNPq pelo suporte financeiro.

Aos membros da banca examinadora pelas proveitosas sugestões.

A Dane e a Tânia pela grande colaboração técnica e amizade.

A todos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, pelo apoio e agradável convívio.

Ao Hamilton Roberto, sempre disponível para ouvir e ajudar.

A Erika pela parceria e amizade.

A Regina Furlani, do Laboratório de Análise de Alimentos, pela grande ajuda final.

Aos funcionários da biblioteca e ao Jonas do xerox, pela colaboração.

A Margaret, da secretaria de pós-graduação, pelos esclarecimentos e simpatia.

Aos amigos Rato, Bigato, Wandinho, Mara, Eder, Carmem, Miguel, Flávio e Marina, pelos momentos de descontração.

Ao Caco pelo incentivo, compreensão e grande ajuda nos momentos mais difíceis.

agradeço.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS -----	iv
ÍNDICE DE FIGURAS -----	vi
RESUMO -----	viii
SUMMARY -----	x
1. - INTRODUÇÃO -----	1
2. - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	3
2.1. - Lignina -----	3
2.1.1. - Estrutura da Lignina -----	4
2.2. - Biodegradação da Lignina por Fungos -----	6
2.2.1. - Fungos Degradadores de Madeira -----	6
2.2.2. - Fisiologia da Biodegradação da Lignina -----	7
2.2.3. - Enzimas Ligninolíticas Produzidas por Fungos -----	8
2.3. - Sistema Enzimático Produzido sob Condição de Baixa Oxigenação -----	14
2.4. - Degradação da Lignina por Fungos Anaeróbicos -----	16
2.5. - Algumas Aplicações das Enzimas Ligninolíticas -----	18
2.5.1. - Produção de Etanol a Partir de Material Lignocelulósico -----	19
3. - OBJETIVOS DESTE ESTUDO -----	22
4. - MATERIAL E MÉTODOS -----	23
4.1. - Reagentes e Equipamentos -----	23
4.2. - Microrganismos -----	24
4.3. - Meios de Cultura -----	24
4.3.1. - Meio de Manutenção -----	24
4.3.2. - Meio de Crescimento -----	24

4.4 - Inóculo -----	25
4.5. - Condições de Cultivo -----	25
4.6. - Obtenção das Enzimas -----	26
4.7. - Determinações Enzimáticas -----	26
4.7.1. - Lignina Peroxidase (LiP) -----	26
4.7.2. - Álcool Veratrílico Oxidase (AVO) -----	27
4.7.3. - Manganês Peroxidase (MnP) -----	27
4.7.4. - Lacase -----	27
4.7.5. - Peroxidases -----	28
4.8. - Microrganismos Seleccionados -----	28
4.8.1. - Meios de Cultura -----	28
4.8.2. - Condições de Cultivo -----	29
4.8.3. - Inóculo -----	29
4.8.4. - Obtenção das Enzimas -----	30
4.8.5. - Determinações Enzimáticas -----	30
4.8.6. - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) -----	30
5. - RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	32
5.1. - Seleção dos Microrganismos -----	32
5.1.2. - Produção de Enzimas Ligninolíticas -----	32
5.1.2.1. - Produção de Manganês Peroxidase (MnP) -----	33
5.1.2.2. - Produção de Lacase -----	34
5.1.2.3. - Produção de Lignina Peroxidase (LiP) -----	34
5.1.2.4. - Produção de Peroxidases -----	35
5.1.2.5. - Produção de Álcool Veratrílico Oxidase (AVO) -----	35
5.2. - Produção de Enzimas Ligninolíticas em Diferentes Substratos -----	41
5.2.1. - Álcool Veratrílico -----	41
5.2.2. - Ácido Lignosulfônico -----	42

5.2.3. - Ácido Lignosulfônico (dialisado) -----	44
5.2.4. - Xilana -----	46
5.2.5. - Serragem -----	47
5.2.6. - Bagaço de Cana -----	48
5.3. - Produção de Enzimas Ligninolíticas Sob Condições Variadas de Oxigenação -----	49
5.4. - Degradação do Ácido Lignosulfônico -----	53
5.5. - Produção de Etanol -----	58
5.6. - Considerações Finais -----	61
6. - CONCLUSÕES -----	62
7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	64
8. - APÊNDICE -----	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tempo de retenção (t.R.) e porcentagem em área do padrão e das linhagens crescidas em meio contendo ácido lignosulfônico ---	54
Tabela 2. Tempo de retenção (t.R.) e porcentagem em área do padrão e das linhagens crescidas em meio contendo ácido lignosulfônico dialisado -----	55
Tabela 3. Produção de etanol pelas linhagens selecionadas crescidas em meio contendo serragem -----	59
Tabela 4. Produção de etanol pelas linhagens selecionadas crescidas em meio contendo bagaço de cana -----	60
Tabela 5. Atividade de MnP e de LiP das dez linhagens de fungos iniciais crescidas em meio contendo papel de filtro sob condição aeróbica sem agitação -----	75
Tabela 6. Atividade de lacase e peroxidases das dez linhagens de fungos iniciais crescidas em meio contendo papel de filtro sob condição aeróbica sem agitação -----	76
Tabela 7. Atividade de AVO das dez linhagens de fungos iniciais crescidas em meio contendo papel de filtro sob condição aeróbica sem agitação -----	77
Tabela 8. Atividade de MnP e de LiP das dez linhagens de fungos iniciais crescidas em meio contendo papel de filtro sob condição aeróbica com agitação -----	78
Tabela 9. Atividade de lacase e peroxidases das dez linhagens de fungos iniciais crescidas por 4, 6 e 10 dias a 30°C, em meio contendo papel de filtro sob condição aeróbica com agitação -----	78

Tabela 10. Atividade de AVO das dez linhagens de fungos iniciais crescidas em meio contendo papel de filtro sob condição aeróbica com agitação -----	79
Tabela 11. Atividade de MnP e de LiP das dez linhagens de fungos iniciais crescidas em meio contendo papel de filtro sob condição microaerofílica -----	79
Tabela 12. Atividade de lacase e peroxidases das dez linhagens de fungos iniciais crescidas em meio contendo papel de filtro sob condição microaerofílica -----	80
Tabela 13. Atividade de AVO das dez linhagens de fungos iniciais crescidas em meio contendo papel de filtro sob condição microaerofílica -----	80
Tabela 14. Atividade de LiP, MnP, lacase, peroxidases e AVO das cinco linhagens selecionadas crescidas em diferentes meios sob condição microaerofílica -----	81
Tabela 15. Atividade de LiP, MnP, lacase, peroxidases e AVO das cinco linhagens selecionadas crescidas em diferentes meios sob condição variada de oxigenação -----	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de uma lignina de madeira mole e de seus álcoois precursores -----	5
Figura 2. Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP) -----	10
Figura 3. Ciclo catalítico da manganês peroxidase (MnP) -----	12
Figura 4. Atividades enzimáticas de MnP para as dez linhagens de fungos crescidas em meio contendo papel de filtro -----	36
Figura 5. Atividades enzimáticas de lacase para as dez linhagens de fungos crescidas em meio contendo papel de filtro -----	37
Figura 6. Atividades enzimáticas de LiP para as dez linhagens de fungos crescidas em meio contendo papel de filtro -----	38
Figura 7. Atividades enzimáticas de peroxidases para as dez linhagens de fungos em meio contendo papel de filtro -----	39
Figura 8. A tividades enzimáticas de AVO para as dez linhagens de fungos crescidas em meio contendo papel de filtro -----	40
Figura 9. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas crescidas em meio contendo como fonte de carbono álcool veratrílico -----	42
Figura 10. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas crescidas em meio contendo como fonte de carbono ácido lignosulfônico -----	43
Figura 11. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas crescidas em meio contendo como fonte de carbono ácido lignosulfônico dialisado -----	45
Figura 12. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas crescidas em meio contendo como fonte de carbono xilana -----	46

Figura 13. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas crescidas em meio contendo serragem como fonte de carbono-----	48
Figura 14. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas crescidas em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono -----	49
Figura 15. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas crescidas em meio contendo como fonte de carbono papel de fito, serragem e bagaço de cana sob condição variada de oxigenação -----	51
Figura 16. Cromatograma do padrão e do caldo de cultivo da linhagem Q10 crescida em meio contendo ácido lignosulfônico sob condição de baixa oxigenação -----	56
Figura 17. Cromatograma do padrão e dos caldos de cultivo das linhagens H2, LH5 e Q10 crescidas em meio contendo ácido lignosulfônico dialisado -----	57

RESUMO

O sistema ligninolítico produzido por fungos apresenta grande interesse nos dias de hoje, por possuir diferentes aplicações, com mínima agressividade ambiental. As enzimas ligninolíticas podem ser utilizadas para o tratamento de resíduos lignocelulósicos, biopolpação, tratamento de efluentes, etc., além de poderem degradar uma variedade de poluentes orgânicos. No presente trabalho foi realizado o estudo do sistema ligninolítico de cinco linhagens de fungos, capazes de produzir enzimas que participam da degradação da lignina, em diferentes condições de oxigenação. A seleção dos microrganismos foi efetivada a partir dos resultados de produção enzimática de dez linhagens iniciais, crescidas em meio contendo papel de filtro como fonte de carbono, sob condições aeróbica com agitação, aeróbica sem agitação e sob condição microaerofílica. Os resultados de produção de enzimas celulolíticas pelas linhagens iniciais também foram levados em consideração na seleção. Quatro linhagens de fungos filamentosos LH5 (deuteromiceto), 20 (deuteromiceto), Q10 (*Trichocladium canadense*), H2 (basidiomiceto), e uma linhagem de levedura LD (*Geotrichum* sp) foram selecionadas. Após a seleção os cinco microrganismos foram cultivados sob condição de baixa oxigenação em seis diferentes meios de cultura contendo como fontes de carbono: álcool veratrílico (0,4 mM); ácido lignosulfônico (0,5%); ácido lignosulfônico dialisado (0,5%); xilana (0,5%); serragem (0,5%) e bagaço de cana (0,5%). Os resultados de produção das enzimas lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), lacase, peroxidases e álcool veratrílico oxidase (AVO) revelaram que em meios contendo álcool veratrílico, xilana, serragem e bagaço de cana, houve melhor produção da enzima MnP, enquanto que para os meios onde o ácido lignosulfônico e o ácido lignosulfônico dialisado foram utilizados como fontes de carbono, a melhor

produção foi para as enzimas LiP e AVO. Os microrganismos cultivados sob condição aeróbica com agitação em meios contendo papel de filtro, serragem e bagaço de cana apresentaram, de maneira geral, melhor produção de MnP. Os microrganismos também foram crescidos nesses três meios, primeiramente sob condição de agitação sendo posteriormente colocados sob condição microaerofílica, onde foi observado um aumento de produção das enzimas LiP e AVO. A verificação da degradação do ácido lignossulfônico utilizado como substrato, e da presença de etanol nos caldos enzimáticos obtidos dos microrganismos crescidos em serragem e em bagaço de cana, foram monitorados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os cromatogramas dos caldos de cultivo apresentaram melhores resultados de degradação para o ácido lignossulfônico dialisado do que para o ácido lignossulfônico não dialisado. A detecção do etanol nos sobrenadantes das culturas variou com a fonte de carbono, serragem ou bagaço de cana, e com as condições de crescimento utilizadas.

SUMMARY

The ligninolytic system produced by fungi is currently of great interest because it has many environmental applications. Ligninolytic enzymes can be used for the treatment lignocellulosic wastes, biopulping, effluent treatment, etc., and one able to degrade a variety of organic pollutants. In the present work a study was made of the ligninolytic system of five fungal strains, capable of producing enzymes that participate in lignin degradation, under different conditions of oxygenation. The screening of microorganisms was made considering the results of enzymatic production in ten strains, grown in a medium containing ground Whatman n° 1 paper as the carbon source, under aerobic conditions with or without shaking and also under microaerophilic conditions. The production of cellulolytic enzymes by the initial strains were also considered in the screening. Four strains of filamentous fungi LH5 (deuteromycete), 20 (deuteromycete), Q10 (*Trichocladium canadense*), H2 (basidiomycete) and one yeast strain LD (*Geotrichum* sp) were selected. These five microorganisms were grown under low oxygenation conditions in six different culture media containing as carbon sources: veratryl alcohol (0,4mM); lignosulfonic acid (0,5%); dialysed lignosulfonic acid (0,5%); xylan (0,5%); sawdust (0,5%) and sugar-cane bagasse (0,5%). The production of the enzymes lignin peroxidase (LiP); manganese peroxidase (MnP); laccase; peroxidases and veratryl alcohol oxidase (VAO) revealed that in media containing veratryl alcohol, xylan, sawdust and sugar-cane bagasse, there was a better production of MnP, while in media where the lignosulfonic acid and dialysed lignosulfonic acid were used as carbon sources, the greatest production was of LiP and VAO. The microorganisms that were grown on ground Whatman n°1 paper, sawdust and sugar-cane bagasse under shaking showed better production, in general, of MnP. The strains were also

grown in these media primarily under shaking conditions, subsequently being under microaerophylic conditions, where an increase in the production of the enzymes LiP and VAO was observed. The demonstration of lignosulfonic acid degradation and the presence of ethanol in the enzymatic supernatant of the microorganisms grown in sawdust and in sugar-cane bagasse, were monitored by HPLC. Dialysis of the lignosulfonic acid resulted in higher degradation levels after growth of the fungi, when compared to the non-dialysed one. The ethanol appearance in the cultures broth varied with the carbon sources sawdust or sugar-cane bagasse and also with the growth conditions used.

1. INTRODUÇÃO

A grande quantidade de material lignocelulósico que é produzida anualmente tem intensificado consideravelmente o interesse pelo estudo de sua utilização como fonte renovável de energia e de sua degradação ambiental. Cerca de 95% da biomassa básica da Terra é composta por materiais lignocelulósicos, sendo aproximadamente 50% constituído por celulose, 30% por hemicelulose e 25% por lignina.

A maior fração que compõe a biomassa lignocelulósica é a celulose, constituída por aproximadamente 14.000 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4, formando um polímero linear com estrutura estabilizada por pontes de hidrogênio. As pontes de hidrogênio intramoleculares formam as regiões cristalinas que representam cerca de 85% das fibrilas, os 15% restantes são formados por regiões amorfas, onde as pontes de hidrogênio estão ausentes.

A hemicelulose é um polissacarídeo composto por pentoses, principalmente do tipo xilose e arabinose; hexoses do tipo glicose, manose e galactose; ácidos urônicos; e outros açúcares menores. O polímero de hemicelulose encontra-se na parede celular vegetal associado com a celulose em tecidos lignificados.

A lignina é um polímero tridimensional, de estrutura complexa, presente na parede celular de células vegetais, fornecendo rigidez e protegendo a célula contra ataques microbiológicos. Apresenta-se ligada quimicamente à hemicelulose formando uma matriz encrustada nas microfibrilas de celulose.

A degradação biológica da lignina é uma das etapas mais importantes do ciclo do carbono. Muitos microrganismos possuem habilidade de degradar a lignina em diferentes graus e metabolizar compostos intermediários de baixo peso molecular, entretanto são poucos os capazes de degradá-la extensivamente, sendo os mais conhecidos e estudados os fungos de decomposição branca, dentre eles o basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*.

O processo de degradação da lignina por fungos é oxidativo, envolvendo provavelmente enzimas como as lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), lacase e enzimas produtoras de H_2O_2 . As concentrações de nitrogênio, carbono e oxigênio podem afetar a fisiologia da degradação, bem como as condições de cultivo como temperatura, pH e umidade.

As enzimas ligninolíticas produzidas por microrganismos apresentam um grande potencial aplicativo, podendo ser utilizadas para o tratamento de efluentes, tratamento biológico de material lignocelulósico, biopolpação, etc., podendo também degradar um grande número de poluentes orgânicos.

Atualmente, muitos progressos relacionados com o mecanismo de degradação da lignina foram alcançados, mas existem ainda muitas dúvidas relativas ao sistema ligninolítico produzido por microrganismos. O presente trabalho tem como objetivo a seleção de fungos capazes de degradar a lignina sob diferentes condições de oxigenação e o estudo de seus sistemas enzimáticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LIGNINA

A lignina é um característico constituinte cimentante localizado entre as paredes celulares de tecidos vegetais. Ela não representa um composto definido e uniforme, mas é uma forma coletiva de substâncias que possuem propriedades químicas muito semelhantes, mas com pesos moleculares diferentes. O peso molecular da lignina pode variar em torno de 100.000 Da ou mais. Uma considerável parte da atividade fotossintética nas plantas é empregada na conversão do dióxido de carbono atmosférico em lignina. A lignina constitui cerca de 40% da energia solar estocada nas plantas, desempenhando um importante papel no ciclo do carbono. (Janshekar e Fiechter, 1983).

O polímero de lignina desempenha inúmeras funções essenciais para a vida das plantas (Janshekar e Fiechter, 1983), fornecendo um suporte mecânico, servindo como uma barreira contra o ataque microbiológico e agindo como um selo impermeável a água nos vasos xilema de plantas vasculares (Eriksson, 1991).

A lignificação é uma resposta comum das plantas para infecções ou ferimentos (Grisebach, 1981). O processo de restabelecimento de ferimentos envolve a lignificação e a suberização da superfície celular, que está associado ao aumento de resistência a infecções.

Os materiais lignocelulósicos formados por celulose, hemicelulose e lignina, compreendem cerca de 95% da biomassa básica da Terra. A composição

desses três biopolímeros varia de acordo com a fonte. Em madeiras coníferas a celulose representa cerca de 40-50%, a hemicelulose 20-30% e a lignina 25-35%; o bagaço de cana compreende aproximadamente 40% de celulose, 30% de hemicelulose e 20% de lignina; o papel jornal contém 50% de celulose, 20% de hemicelulose e 30% de lignina (Janshekar e Fiechter, 1983).

2.1.1. Estrutura da Lignina

A lignina é composta por moléculas poliméricas altamente ramificadas consistindo de unidades monoméricas básicas de fenilpropano unidas por diferentes tipos de ligações (Janshekar e Fiechter, 1983). Biossinteticamente ela é formada a partir de três tipos de álcoois precursores: álcool *p*-hidroxinamil (cumarílico), o qual origina unidades *p*-hidroxifenólicas no polímero; álcool 4-hidroxi-3-metóxicinamil (coniferílico), responsável pela formação de unidades guaiacóis; e álcool 3,5-dimetóxi-4-hidroxicinamil (sinapílico), formador de unidades siringóis (Kirk e Farrell, 1987). Os núcleos aromáticos ou subunidades fenilpropano que constituem a lignina, estão associados por ligações estáveis principalmente do tipo β -O-4 aril-éter, α -O-4 aril-éter e β -5 aril carbono (Higuchi, 1990). A proporção relativa dos três álcoois precursores varia de acordo com a espécie de planta, com os tecidos das plantas e com a localização da lignina dentro da parede celular (Janshekar e Fiechter, 1983). Na Figura 1 está representada a fórmula esquemática da lignina e de seus álcoois precursores.

O maior problema no estudo da química da lignina está relacionado com a impossibilidade do isolamento da lignina no seu estado nativo (ou inalterado). As representações estruturais da lignina têm sido feitas através de análises de preparações de derivados solúveis de lignina, tais como lignina de madeira moída

extraída com dioxano, e ligninas Kraft (Adler, 1977; Glasser e Glasser, 1981; Lai e Sarkanen, 1971; Nimz, 1974). Devido as suas similaridades com as ligninas dehidrogenativamente polimerizadas (DHP), as quais são obtidas *via* polimerização ao acaso de monolignóis *in vitro*, tem-se geralmente assumido que as ligninas existem no tecido das plantas como ligações poliméricas desordenadas (Lewis e Yamamoto, 1990).

Em termos de propriedades físicas a lignina é um polímero amorfo que não possui cristalinidade. A maneira com a qual ocorre a sua polimerização torna a molécula de lignina opticamente inativa (Janshekar e Fiechter, 1983).

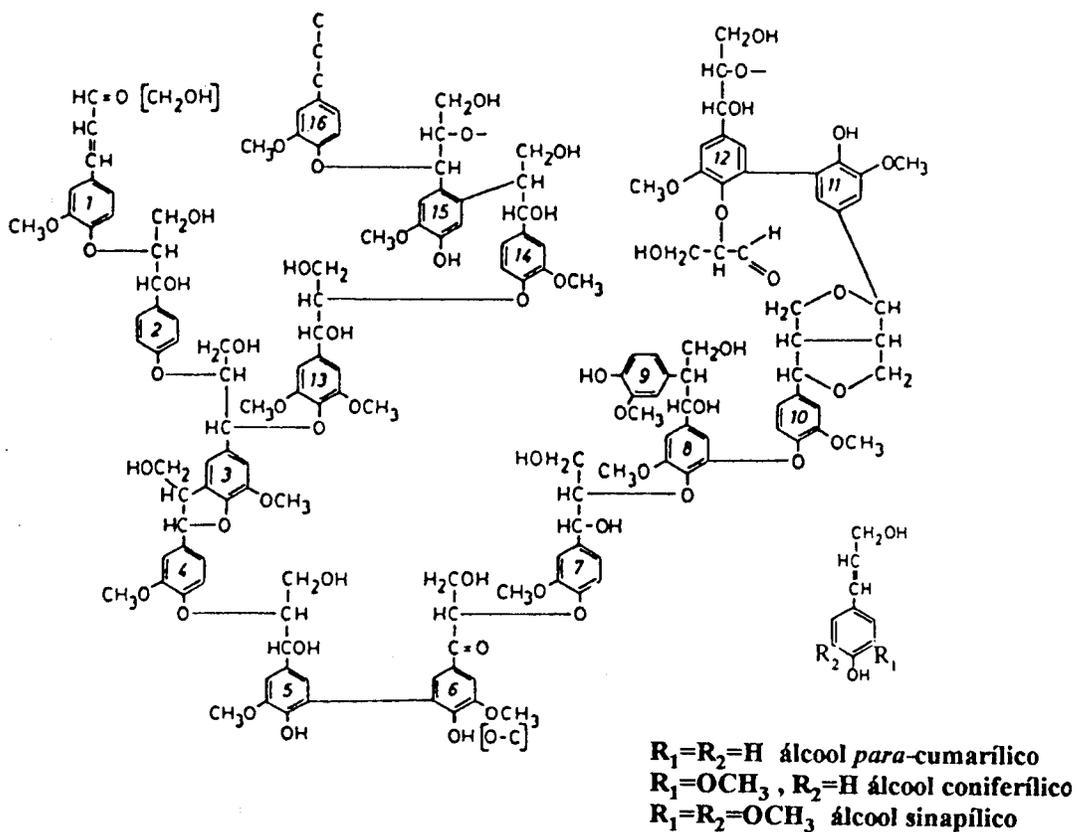


FIGURA 1. Representação esquemática de uma lignina de madeira mole e de seus álcoois precursores (direita), (Adler, 1977).

2.2. BIODEGRADAÇÃO DA LIGNINA POR FUNGOS

2.2.1. Fungos Degradadores de Madeira

Baseado apenas no tipo de decomposição que causam os fungos degradadores de madeira são divididos em três classes: fungos de decomposição branca, fungos de decomposição parda e fungos de decomposição branda.

Os fungos de decomposição branca, pertencentes à classe dos basidiomicetos e alguns ascomicetos, degradam preferencialmente a lignina da madeira de maneira mais rápida e extensiva do que outros grupos de microrganismos. Eles invadem o lúmen das células vegetais, onde secretam enzimas que irão degradar a lignina e outros componentes. O fungo de decomposição branca *Phanerochaete chrysosporium* tem sido utilizado extensivamente como um modelo de organismo para o estudo fisiológico da biodegradação da lignina (Kirk e Farrell, 1987).

Os basidiomicetos que causam decomposição parda podem decompor a lignina parcialmente. A habilidade desses fungos em degradar o polímero de lignina parece ser limitada (Kirk e Farrell, 1987). Alguns fungos de decomposição parda degradam compostos modelo de lignina diméricos, mas formam produtos muito diferentes do que os produzidos pelos fungos de decomposição branca (Enoki e Takahashi, 1983; Enoki et al., 1985).

A decomposição branda da madeira causada por várias espécies de ascomicetos e fungos imperfeitos não envolve a degradação, mas sim algumas

modificações na lignina, tendo como preferência a degradação dos polissacarídeos celulose e hemicelulose (Kirk, 1984; Kirk e Cowling, 1984).

2.2.2. Fisiologia da Biodegradação da Lignina

Estudos realizados na década de 70 demonstraram que parâmetros nutricionais e culturais são importantes para a degradação da lignina por *P. chrysosporium* (Kirk e Farrell, 1987). A lignina é degradada por esse microrganismo durante o seu metabolismo secundário, em resposta à depleção de nitrogênio, carbono ou enxofre (Gold e Alic, 1993).

P. chrysosporium é capaz de metabolizar preparações de lignina apenas quando uma fonte alternativa de carbono está presente (Leatham, 1986; Ulmer et al., 1983), portanto a degradação da lignina depende da presença de um co-substrato rapidamente metabolizável, como por exemplo a glicose (Buswell e Odier, 1987; Kirk e Farrell, 1987; De Jong et al., 1994). Alguns estudos têm confirmado observações anteriores de que a celulose e a hemicelulose, ou carboidratos adicionados, são sempre metabolizados junto com a lignina em materiais lignocelulósicos (Kirk e Farrell, 1987; Valmaseda et al., 1991; Akin et al., 1993).

Dill e Kraepelin (1986) concluíram que a quantidade extremamente baixa de nitrogênio da madeira seria a primeira causa para a delignificação. Baixos níveis de nitrogênio têm demonstrado estimular a degradação da lignina por diferentes fungos de decomposição branca, embora altas concentrações desse nutriente seja estimuladora da degradação polissacarídica, ou seja, celulose e hemicelulose (Fenn e Kirk, 1981; Kirk et al., 1978; Reid, 1983; Erwin et al.,

1993). Entretanto, a degradação da lignina por muitos fungos de decomposição branca não é aparentemente estimulada pela limitação do nutriente nitrogênio (Buswell e Odier, 1987; Kirk e Farrell, 1987; Périé e Gold, 1991; Boyle et al., 1992; Erwin et al., 1993; Buswell et al., 1995).

A lignina parece ser relativamente inerte e recalcitrante à decomposição microbiana em ambientes anaeróbicos (Hackett et al., 1977; Zeikus, 1980). Em geral, estudos têm demonstrado que a melhor atividade ligninolítica em culturas agitadas está associada a altas concentrações de oxigênio (100%) (Kirk et al., 1978; Reid e Seifert, 1982; Yu e Eriksson, 1985), entretanto, as concentrações de oxigênio dentro dos troncos de árvores são extremamente baixas (Jensen, 1969). Recentemente foi reportado na literatura (Durrant et al., 1995) o isolamento sob condição anaeróbica de dois fungos celulolíticos, capazes de degradar compostos derivados de lignina, como o ácido lignosulfônico, em condição de baixa oxigenação.

2.2.3. Enzimas Ligninolíticas Produzidas por Fungos

O fungo *Phanerochaete chrysosporium* tem sido usado como um sistema modelo para o estudo da biodegradação da lignina, existindo numerosos artigos sobre a fisiologia, bioquímica, química e genética desse sistema. Entretanto ele não é o único fungo que tem capacidade de degradar a lignina, não sendo o único, portanto, a possuir um sistema enzimático degradador de lignina (Orth et al., 1993). O processo pelo qual o fungo degrada a lignina é oxidativo, envolvendo enzimas como as lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), lacase e enzimas produtoras de H₂O₂ (Eriksson et al., 1990; Evans, 1985; Faison e Kirk, 1985; Kirk e Farrell, 1987).

A) Peroxidases

Assim como a lacase, as peroxidases são responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos. O ferro contido na enzima é oxidado na presença de peróxido de hidrogênio, formando um composto de alta capacidade oxidativa. Esse composto sofre redução *via* transferência de um elétron, oxidando fenóis ou aminas aromáticas, os quais atuam como doadores de elétron. Os produtos que resultam da oxidação de compostos fenólicos podem sofrer polimerização espontânea e formar complexos.

A1) Lignina Peroxidase (LiP)

Essa enzima foi descoberta em 1983 por dois grupos de pesquisadores que, trabalhando com *Phanerochaete chrysosporium*, conseguiram isolar uma enzima extracelular dependente de H₂O₂, responsável pela catálise de reações capazes de despolimerizar parcialmente a lignina (Gold et al., 1983; Kirk e Tien, 1983; Tien e Kirk, 1983). A LiP é uma glicoproteína que contém 1 mol de Fe protoporfirínico IX, por mol de enzima (Gold et al., 1989; Kirk et al., 1986; Leisola et al., 1987; Renganathan et al., 1985).

As ligninases, uma classe de isoenzimas, apresentam ponto isoelétrico variando de 3,3 a 4,7 e massa molecular de 38.000 a 43.000 Da (Reddy e D'Souza, 1994).

A LiP catalisa a oxidação de compostos modelo de lignina preferencialmente não fenólicos, podendo oxidar também compostos fenólicos, através de uma simples reação inicial de remoção de um elétron do núcleo

aromático, produzindo radicais cátions arila os quais, através de reações não enzimáticas, darão origem a uma série de produtos finais, resultando no rompimento do polímero (Gold e Alic, 1993; Hammel et al., 1985; Kersten et al., 1985).

O Fe contido no grupo heme passa por 5 estados de óxido-redução durante o ciclo catalítico normal da enzima, podendo originar três tipos de compostos (Figura 2).

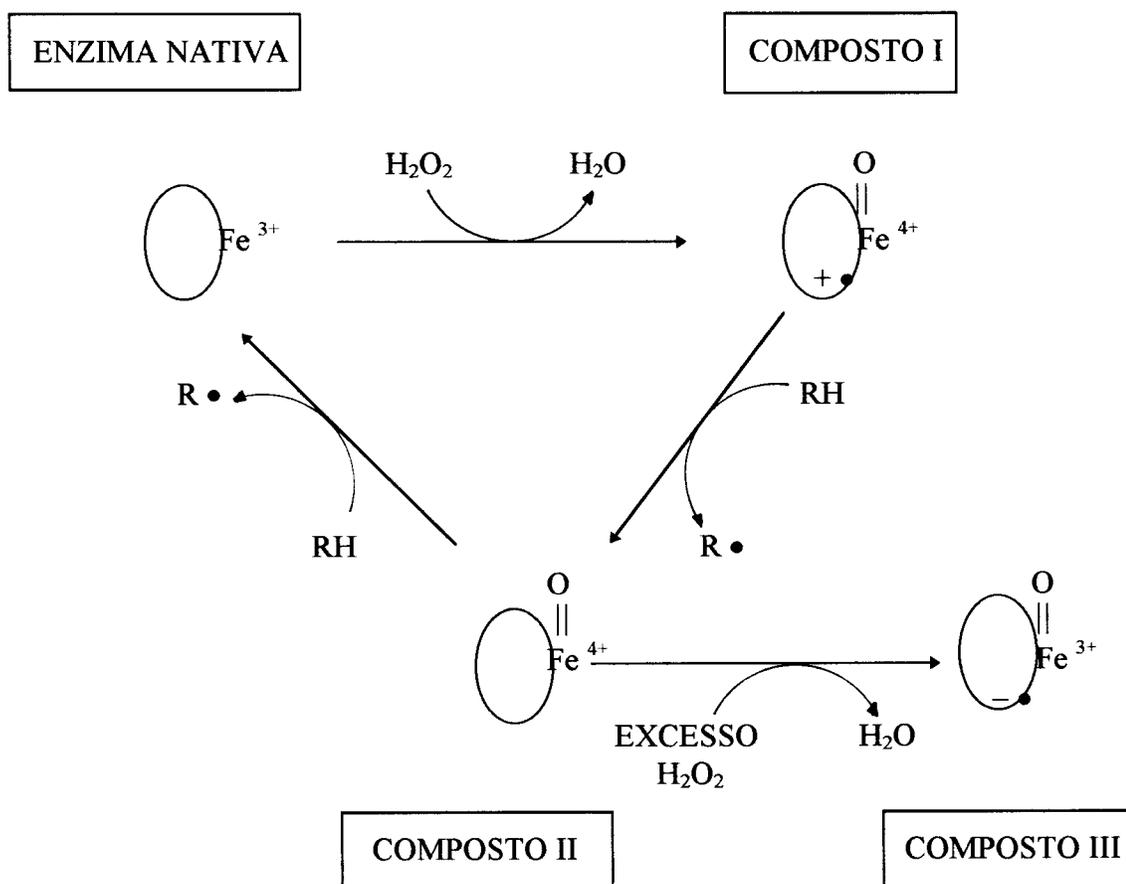


FIGURA 2. Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP)

RH = substrato da enzima na forma reduzida

$\text{R}\bullet$ = forma radicalar oxidada (Gold et al. 1989).

O composto I é produto da reação primária da enzima com H_2O_2 , onde o Fe (III) da enzima nativa é oxidado a Fe (IV). A redução desse composto, *via* transferência de um elétron, resulta na formação do composto II, que pode ser reduzido também pela transferência de um elétron, retornando a enzima ao seu estado nativo, ou poderá formar o composto III, se for oxidado pelo H_2O_2 na ausência de um substrato redutor. O composto III é uma forma enzimática com capacidade catalítica limitada e pode ser rapidamente inativado pelo excesso de H_2O_2 (Gold e Alic, 1993; Schoemaker et al., 1994; Barr e Aust, 1994; De Jong et al., 1994; Cai e Tien, 1993).

Muitos fungos de decomposição branca são produtores de LiP. Recentes estudos têm reportado que esta enzima também está presente nos fungos de decomposição parda (Dey et al., 1994).

A2) Manganês Peroxidase (MnP)

A atividade de MnP foi descoberta por Kuwahara et al. (1984) no meio extracelular de crescimento de culturas ligninolíticas de *P. chrysosporium*. A MnP também é uma glicoproteína contendo como grupo prostético Fe protoporfirínico IX, dependente de H_2O_2 e íons Mn (II), sendo produzida junto com a LiP durante o metabolismo secundário (Buswell e Odier, 1987).

As isoenzimas MnP apresentam ponto isoelétrico variando entre 4,2 a 4,9 e massa molecular de 45.000 a 47.000 Da (Gold e Alic, 1993). A MnP é responsável pela catálise da oxidação de uma variedade de fenóis, aminas e corantes (Glenn e Gold, 1985; Paszcynski, et. al., 1986; Glenn et al., 1986).

O ciclo catalítico da MnP é semelhante ao da LiP, envolvendo a formação de três compostos. Como demonstrado na Figura 3, o composto I é formado através da oxidação do Fe (III) para Fe (IV) na presença de H_2O_2 . A redução desse composto, *via* transferência de um elétron, formará o composto II, que por sua vez poderá transformar-se em enzima nativa tendo como participação íons Mn (II), ou formar o composto III em excesso de H_2O_2 . Os íons Mn (II) atuam como doadores de elétron e os íons Mn (III) são estabilizados por quelação, atuando como mediador redox na formação de radicais fenoxila (Wariishi et. al., 1989, 1992; Aitken e Irvine, 1990; De Jong et al., 1994).

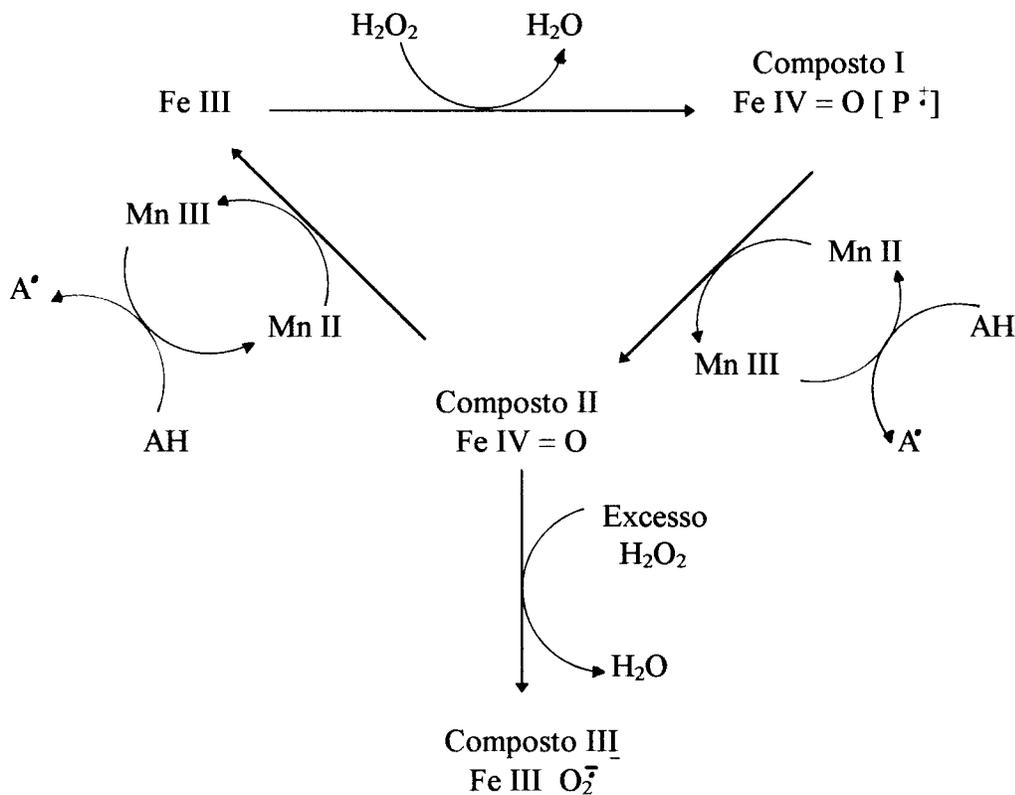


FIGURA 3. Ciclo catalítico da manganês peroxidase (MnP)

AH= substrato da enzima

A^* = forma radicalar oxidada (Gold et al. 1989).

B) Lacase

Esta enzima é uma polifenoloxidase que contém em geral 4 átomos de cobre no seu sítio ativo por molécula, a qual utiliza oxigênio molecular como oxidante (Eriksson et al., 1990), oxidando fenóis e polifenóis através da remoção de um elétron, com a formação de radicais fenóxi. Esses radicais podem ser convertidos em quinonas através de uma segunda catálise ou de reações não enzimáticas espontâneas (Higuchi, 1990; Ishihara, 1980; Reinhammar, 1984; Thurston, 1994).

A lacase fúngica aparentemente pode polimerizar, despolimerizar e desmetilar compostos fenólicos *in vitro* (Mayer, 1987; Bourbonnais e Paice, 1990; Kersten et al., 1990; Lundquist e Kriterssom, 1985). Entretanto, a função fisiológica dessa enzima não foi esclarecida e seu papel na biodegradação da lignina ainda é incerto (Hatakka, 1994).

A lacase extracelular é tipicamente produzida pelos fungos de decomposição branca (Hatakka, 1994). Alguns ascomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos foram reportados como fungos produtores de lacase (Mayer, 1987; Bollag e Leonowicz, 1984). Recentemente duas isoenzimas (L1 e L2) isoladas do fungo de decomposição branca *Ceriporiopsis subvermispora* caracterizadas como lacase foram purificadas. L1 e L2 apresentaram ponto isoelétrico de 3,4 e 4,8 e massa molecular de 71.000 Da e 68.000 Da, respectivamente (Fukushima e Kirk, 1995).

C) Álcool Veratrílico Oxidase (AVO)

Em adição as peroxidases e lacase, os fungos de decomposição branca produzem uma variedade de oxidases capazes de gerar H_2O_2 . A produção dessas enzimas deve estar relacionada provavelmente com a utilização do H_2O_2 por peroxidases extracelulares durante a degradação da lignina. Estas oxidases incluem entre outras a álcool veratrílico oxidase (Gold e Alic, 1993).

A enzima álcool veratrílico oxidase é uma aril álcool oxidase que cataliza a oxidação de álcoois insaturados aos seus aldeídos correspondentes, com a redução de O_2 a H_2O_2 . Esta enzima tem sido identificada em culturas que estão em estágio de crescimento avançado, quando a *via* metabólica secundária é presumivelmente iniciada (Marzullo et al., 1995).

Estudos anteriores demonstraram que esta enzima é capaz de reduzir quinonóides ou radicais gerados durante a degradação da lignina pela atuação principalmente da lacase (Marzullo et al., 1995). Portanto, a enzima AVO além de produzir H_2O_2 utilizado pelas peroxidases, deve estar relacionada com a prevenção da polimerização de derivados de baixos pesos moleculares durante a degradação da lignina.

2.3. SISTEMA ENZIMÁTICO LIGNINOLÍTICO PRODUZIDO SOB CONDIÇÃO DE BAIXA OXIGENAÇÃO

Em geral, muitos estudos têm mostrado que a melhor atividade ligninolítica obtida em culturas de fungos submetidas a agitação, está associada com altas

concentrações de oxigênio (Kirk et al., 1978; Reid e Seifert, 1982; Yu e Eriksson, 1985). Entretanto, as concentrações de oxigênio dentro dos troncos das árvores são extremamente baixas (Jensen, 1969), e a decomposição de troncos caídos em florestas chuvosas é efetivada em ambiente de baixa oxigenação (Blanchette, 1991). Uma vez que os fungos aparentemente não possuem sistemas capazes de tolerar baixas concentrações de oxigênio (Highley, et al., 1983), algum mecanismo desconhecido deve ser operativo na liberação do oxigênio necessário para as reações oxidativas envolvidas na degradação da lignina (Blanchette, 1991).

Fungos individuais podem sofrer adaptações durante o processo de crescimento, responsáveis pela tolerância de algumas condições extremas. Poucas espécies fúngicas, incluindo algumas leveduras, são capazes de realizar um crescimento somático em tensões relativamente baixas de oxigênio (Ainsworth e Sussman, 1968).

Buswell e Hatfield (1938) foram pioneiros no estudo da decomposição de compostos aromáticos simples por processos microbianos anaeróbicos. Eles demonstraram que uma variedade de substratos incluindo benzoato, ácido cinâmico, fenol e ácido siríngico podem ser fermentados a metano por uma mistura de culturas presentes no lodo de tratamento de esgotos.

Embora existam poucas publicações sobre a degradação da lignina por bactérias sob condição anaeróbica, evidências da degradação, principalmente por bactérias sulfidrogênicas e metanogênicas, de alguns compostos derivados de lignina, como por exemplo o ácido ferúlico, podem ser encontradas (Healy et al., 1980).

Recentemente, duas linhagens distintas de microrganismos fermentadores de celulose, o fungo *Trichocladium canadense* (Q10) e o basidiomiceto (H2), foram isoladas de amostras de solo sob condição anaeróbica. As duas linhagens demonstraram capacidade de degradação de compostos derivados de lignina, como o ácido lignosulfônico, sugerindo a habilidade de decomposição da lignina não apenas sob condição aeróbica mas também sob condição microaerofílica, ou seja, em baixas concentrações de oxigênio (Durrant et al., 1995; Durrant, 1996).

2.4. DEGRADAÇÃO DA LIGNINA POR FUNGOS ANAERÓBICOS.

Os fungos anaeróbicos degradadores de fibras vegetais fazem parte da população de microrganismos que habitam o rúmen de animais. Existem três grupos de fungos que podem ser encontrados no rúmen de herbívoros: o primeiro grupo inclui os anaeróbicos facultativos e aeróbicos, considerados como transitórios por não conseguirem crescer sob a condição anaeróbica do ambiente do rúmen; o segundo grupo consiste de duas espécies que parasitam protozoários ciliados; e o terceiro grupo, o dos fungos zoospóricos anaeróbicos obrigatórios, que são saprófitas de material vegetal (Wubah et al., 1993).

Alguns aspectos biológicos e o papel desses organismos na degradação de fibras vegetais têm sido extensivamente examinados (Akin e Rigsby, 1987; Akin, et al., 1988; Orpin, 1975; Orpin, 1977; Orpin, 1988; Trinci et al., 1988; Webb e Theodorou, 1988; Bauchop, 1989), sugerindo a degradação da lignina em ambientes anóxicos.

Estudos realizados anteriormente indicaram que alguns fungos anaeróbicos, isolados de rúmen de mamíferos herbívoros, são capazes de

colonizar e degradar a lignina contida na parede celular de células vegetais com maior eficiência do que as bactérias e os protozoários (Akin, 1987; Akin e Bonerman, 1990; Akin et al., 1988; Akin e Rigsby, 1987; Teunissen e Op den Camp, 1993). Os rizóides do talo vegetativo fúngico podem penetrar no tecido vegetal com melhor eficiência, conferindo um acesso ao material que seria inviável para os outros tipos de microrganismos (Wubah et al., 1993).

Uma importante característica dos fungos pertencentes ao rúmen é a capacidade de degradação da lignina contida na parede celular das células vegetais. Wubah et al., 1993 relatou que os zoósporos de muitas espécies de fungos colonizam preferencialmente tecidos que contêm lignina, estabelecendo colônias que se localizam principalmente no esclerênquima e nas células do xilema.

Os filamentos fúngicos frequentemente atravessam toda a parede das células lignificadas (Akin et al., 1989). Pequenas quantidades de compostos fenólicos derivados da parede celular vegetal podem ser solubilizados por alguns desses microrganismos (Orpin, 1983).

O sistema enzimático produzido pelos fungos habitantes do intestino de animais herbívoros, responsável pela degradação de compostos fenólicos contidos na parede celular de vegetais, foi relacionado a algumas esterases, como as feruloil e *p*-cumaroil esterases (Wubah et al., 1993).

2.5. ALGUMAS APLICAÇÕES DAS ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

A habilidade de degradação da lignina por microorganismos tem sido utilizada em muitas aplicações e projetos industriais. A transformação biológica desse polímero possui grande potencialidade, podendo ser utilizada em muitos processos e produtos proveitosos com mínima agressividade ambiental.

As primeiras áreas de aplicação biotecnológica associada com a utilização de materiais lignocelulósicos estão relacionadas com as indústrias de polpa e papel e com a agricultura.

Durante o processo de polpação e branqueamento, o tratamento da polpa com fungos ligninolíticos de decomposição branca pode ser beneficiado através da diminuição do gasto energético dos processos termomecânicos convencionais; da redução da quantidade de agentes oxidantes clorados, pela incorporação desse sistema no branqueamento; e da remoção da coloração do efluente gerado (Kuhad e Singh, 1993).

Uma importante área de aplicação de enzimas degradadoras de lignina produzida por microorganismos é o uso na biorremediação tendo em vista a descontaminação de solos e águas poluídas. Recentes estudos têm demonstrado a habilidade do fungo *P. chrysosporium* de degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como o naftaleno, fluoranteno e benzo[a]pireno (Bogan e Lamar, 1996). O fungo *P. chrysosporium* possui a capacidade de oxidar vários xenobióticos recalcitrantes, como muitos corantes sintéticos. Compostos clorofenólicos também podem ser detoxificados pela utilização de enzimas ligninolíticas (Bollag et al., 1988).

Através de processos biotecnológicos e químicos uma variedade de produtos fenólicos como fenóis, xilenóis, catecóis, guaiacóis, siringóis e vanilina podem ser produzidos pela fragmentação e conversão da lignina (Janshekar e Fiechter, 1983).

Em alguns processos de utilização de materiais lignocelulósicos, como por exemplo a produção de ração animal e a produção de etanol, a lignina funciona como uma barreira, visto que essa macromolécula apresenta-se envolvendo a porção polissacarídica desses materiais. Portanto, a utilização de enzimas ligninolíticas produzidas por microrganismos pode ser aplicada com a finalidade de remover a lignina, deixando a celulose e a hemicelulose expostas e prontas para serem utilizadas.

2.5.1. Produção de Etanol a Partir de Material Lignocelulósico

A produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos de materiais tais como resíduos agrícolas, resíduos sólidos municipais e resíduos de processamentos industriais, tem sido sugerida como sendo um processo alternativo de renovação de combustível com propriedades ambientais favoráveis (Buttler et al., 1994).

O processo é baseado na hidrólise dos polímeros de celulose e hemicelulose contidos na biomassa lignocelulósica para formar moléculas individuais de açúcares, as quais podem ser fermentadas em etanol (Wyman, 1994).

Alguns fungos filamentosos capazes de fermentar açúcares em etanol foram reportados: *Fusarium* sp; *Mucor* sp, *Rhizopus* sp, *Monolia* sp e *Neurospora crasa* (Ueng e Gong, 1982; Rao et al., 1983; Olsson e Hahn-Hägerdal, 1996);

A lignina apresenta-se envolvendo os polímeros de celulose e hemicelulose, representando cerca de aproximadamente 20% da biomassa lignocelulósica. Devido a sua estrutura, quando hidrolisada, não pode gerar moléculas capazes de serem fermentadas em etanol, funcionando como uma barreira para o processo. Portanto, a remoção da lignina é uma etapa importante para a efetivação da transformação da biomassa lignocelulósica em etanol.

A primeira etapa do processo de produção de etanol é o pré-tratamento, responsável pelo abaixamento da cristalinidade da celulose e pela remoção da lignina. Os tratamentos mais utilizados são os físicos (moagem, tratamento com vapor, desfibrilamento), químicos (hidrólise ácida, inchamento com álcali, uso de solventes) e o tratamento que envolve alta pressão e alta temperatura, denominado de "Steam Explosion". As desvantagens desses processos são principalmente o alto custo, a toxicidade e a corrosão (químicos) e a degradação de alguns açúcares (Steam Explosion).

A aplicação de enzimas ligninolíticas com a finalidade de remover a lignina envolvida na porção polissacarídica do material lignocelulósico pode ser uma alternativa para o pré-tratamento, possuindo baixo custo, não apresentando problema de corrosão e não inibindo o crescimento de microrganismos por não apresentar toxicidade.

Os fungos celulolíticos, *Trichocladium canadense* (cepa Q10) e o basidiomiceto (cepa H2), isolados anaerobicamente, demonstraram capacidade de produzir etanol a partir de resíduos lignocelulósicos. Essas duas linhagens também foram capazes de produzir enzimas envolvidas na degradação da lignina, apresentando um bom crescimento em compostos derivados de lignina sob diferentes condições de oxigenação (Durrant, 1996).

3. OBJETIVOS

O estudo do sistema ligninolítico produzido por fungos ainda apresenta muitas dúvidas sobre o mecanismo de ação enzimática e sobre as condições requeridas por esses organismos para que seja efetivada a degradação da lignina tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Esse estudo teve como objetivos:

- Estudar a produção das enzimas LiP, MnP, lacase, peroxidases e AVO de dez linhagens de fungos cultivadas sob condição de baixa oxigenação e condição de oxigenação com e sem agitação; em meio contendo papel de filtro, para posterior seleção das melhores linhagens.
- Determinar as atividades do sistema enzimático de cinco linhagens de fungos selecionadas (descrito acima), crescidas em diferentes meios contendo como fonte de carbono: ácido lignosulfônico, ácido lignosulfônico dialisado, álcool veratrílico, xilana, serragem e bagaço de cana, cultivadas sob condição de baixa oxigenação.
- Verificar a degradação do ácido lignosulfônico causada pelos fungos selecionados, após crescimento sob condição microaerofílica, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Verificar a capacidade fermentativa das linhagens selecionadas após crescimento em meio contendo serragem e em meio contendo bagaço de cana, cultivadas em condições variadas de oxigenação e relacionar com as atividades ligninolíticas produzidas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes e Equipamentos

- Banho-maria, marca Eyela, modelo SB-650
- Centrífuga, marca Hitachi, modelo himac CR21
- Colunas Cromatográficas ZORBAX C18 e SUPELCOGEL C610H
- Compressor, marca Millipore
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência modelo LC-6A com detector ultravioleta modelo SPD-6A acoplado a integrador modelo CR-4A, marca Shimadzu
- Espectrofotômetro UV 1201, marca Shimadzu
- Filtros para Fase Móvel, marca Millipore
- Frascos de vidro cor âmbar, diâmetro interno 2.0 cm, 5.0 cm de altura com tampa plástica
- Peneira GRAN UTEST, abertura em mm (1.19)
- Reagentes grau para análise
- Reagentes grau cromatográfico
- Ultra purificador de água para uso em CLAE, marca Milli Q Plus
- Vortex, modelo Genil-2
- Micropipetadores com volumes reguláveis, marca Gilson
- Equipamentos de uso comum em laboratório: balança analítica, autoclave, estufas, câmara de fluxo contínuo, etc.

4.2. Microrganismos

Nesse estudo foram utilizadas dez linhagens de fungos isoladas de amostras de solos provenientes de diferentes regiões. As linhagens Q10 (*Trichocladium canadense*) e H2 (basidiomiceto) foram isoladas conforme descrito por Durrant et al. (1995); FOR, linhagem de *Fusarium oxysporum* foi obtida no Departamento de Microbiologia da Universidade de Massachusetts em Amherst; a levedura LD (*Geotrichum sp*) foi isolada e identificada em nosso laboratório (Carvalho e Durrant, 1995) e as demais linhagens, LH5 e 20 (deuteromicetos), 30, 5, D7 e L71 (não identificadas), foram isoladas de amostras de solo coletadas na região de Campinas.

4.3. Meios de Cultura

4.3.1. Meio de Manutenção

As culturas foram mantidas, em tubos de ensaio e em placas de Petri, em meio ágar GYP (2% de glicose, 1% de extrato de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de ágar) em câmara fria a 16°C.

4.3.2. Meio de Crescimento

As linhagens foram crescidas em meio líquido básico contendo por litro: 1,0 g de KH_2PO_4 ; 0,54g de NH_4Cl ; 0,3 g de CaCl_2 ; 1,0 g de NH_2CONH_2 ; 1,0 g de $\text{C}_3\text{H}_8\text{ClNO}_2\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (L-cisteína HCl); 1 mL de solução de resazurina (0,1%); 1mL de solução de minerais e 0,5 mL de solução de vitaminas, previamente preparadas e filtradas em membrana Millipore (0,2 μm). Ao meio básico foi adicionado 0,5% de papel de filtro previamente moído em moinho de bolas. O pH do meio foi ajustado para 5,8-6,0.

Solução de minerais (em 1 litro): 0,22 g de $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$; 0,66 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,15 g de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$; 0,10 g de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,10 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,64 g de $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 0,10 g de $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

Solução de vitaminas (em 1 litro): 2 mg de biotina; 2 mg de ácido fólico; 5 mg de tiamina HCl; 5 mg de riboflavina; 10 mg de piridoxina HCl; 0,10 mg de cianocobalamina; 5 mg de ácido nicotínico; 5 mg de DL-cálcio pantotenato e 5,0 mg de ácido tiótico.

4.4. Inóculo

Para cada 50 mL de meio (Erlenmeyer) foram inoculados três quadrados de ágar-micélio (1,0 x 1,0 cm) e em cada 30 mL de meio (tubos de ensaio grandes) um quadrado de ágar-micélio (1,5 x 1,5 cm).

4.5. Condições de Cultivo

Os fungos foram cultivados a 30°C sob condição aeróbica com agitação de 150 rpm (em Erlenmeyers de 100 mL contendo 50 mL de meio), e sem agitação (em Erlenmeyers de 100 mL contendo 50 mL de meio e em tubos de ensaio grandes (2,5 x 20 cm), contendo 30 mL de meio); e sob condição microaerofílica (em tubos grandes contendo 30 mL de meio). Para a manutenção da microaerofilia os tubos inoculados foram colocados em jarras hermeticamente fechadas contendo placas Microaerobac (PROBAC).

4.6. Obtenção das Enzimas

Após 7, 15, 22 e 30 dias de cultivo sob as condições aeróbica sem agitação e microaerofílica as linhagens foram centrifugadas por 15 min. a 9000 rpm a uma temperatura de 5°C, e os sobrenadantes foram utilizados para as determinações das atividades enzimáticas. Em condição aeróbica com agitação de 150 rpm as coletas foram feitas após 4, 6 e 10 dias de crescimento.

4.7. Determinações Enzimáticas

As determinações das enzimas LiP, MnP, lacase, peroxidases e AVO foram realizadas conforme descrito abaixo. Todas as atividades foram expressas em UI/L (μ moles produto/min.L). Os cálculos foram feitos utilizando-se a fórmula:

$$\frac{A}{\frac{E}{Rxt}} \times 10^6 = \text{UI/L}$$

Onde,

A = absorbância

E = ϵ (do produto formado)

R = quantidade de caldo enzimático (mL)

t = tempo de reação (minutos)

4.7.1. Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade LiP foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico ($\epsilon = 9.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A reação contém uma mistura de 0,6 mL de caldo centrifugado, 0,2 mL de H_2O_2 2,0 mM e 0,2 mL de álcool veratrílico 2,0 mM em tampão

tartarato de sódio 0,4 M (pH 3,0). Após 10 min de reação a formação do aldeído veratrílico foi determinada lendo-se a absorvância a 310 nm (Tien e Kirk, 1984).

4.7.2. Álcool Veratrílico Oxidase (AVO)

A determinação da atividade AVO foi realizada da mesma maneira que para a atividade de LiP exceto que o H_2O_2 foi substituído do meio de reação por H_2O destilada.

4.7.3. Manganês Peroxidase (MnP)

A atividade de MnP foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol ($\epsilon = 4.460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A mistura da reação contém 0,5 mL de caldo centrifugado, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M, 0,05 mL de MnSO_4 2,0 mM e 0,05 mL de uma solução de H_2O_2 2,0 mM em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,5). Após 5 min a 30°C a reação foi interrompida pela adição de 0,40 mL de NaOH 2,0 N. A leitura da absorvância foi efetivada a 610 nm (Kuwahara et al, 1984).

4.7.4. Lacase

A determinação da atividade lacase foi efetivada utilizando-se siringaldazine como substrato. A oxidação da siringaldazine ($\epsilon = 65.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) foi determinada pela reação de uma mistura contendo 0,6 mL de caldo centrifugado, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0) e 0,1 mL de H_2O destilada. A leitura da absorvância a 525 nm foi efetivada após 10 min de reação a temperatura ambiente (Szklark et al., 1989, modificado).

4.7.5. Peroxidases

Para as peroxidases a determinação foi feita da mesma forma que para lacase, exceto que 0,1 mL de H₂O₂ foi introduzido no meio de reação no lugar da H₂O destilada (Szkler et al, 1989).

4.8. Microrganismos Seleccionados

Após a análise dos resultados das atividades enzimáticas das dez linhagens em todas as condições de estudo propostas, cinco fungos foram seleccionados e os seus sistemas enzimáticos ligninolíticos foram estudados utilizando-se meios de crescimento mais complexos, contendo diferentes fontes de carbono.

4.8.1. Meios de Cultura

As cinco linhagens de fungos seleccionadas foram cultivadas sob condição microaerofílica em seis diferentes meios de cultura, contendo por litro meio básico e as seguintes fontes de carbono: ácido lignosulfônico (0,5%); ácido lignosulfônico dialisado (0,5%); álcool veratrílico (0,04 mM); xilana (0,5%);bagaço de cana (0,5%) e serragem (0,5%).

As linhagens seleccionadas também foram cultivadas em meios contendo papel de filtro moído, serragem e bagaço de cana na concentração de 0,5% (p/v) sob condição de agitação e posterior condição microaerofílica.

O meio básico utilizado foi o mesmo descrito no item 4.3.2. com as seguintes modificações: retirada do composto NH_2CONH_2 e substituição do composto NH_4Cl pelo composto $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

O ácido lignosulfônico foi dialisado contra água destilada, em membrana de celofane, por 48 hs. A serragem utilizada continha uma mistura das madeiras cedrinho, peroba e pinheiro. O bagaço de cana foi previamente moído em um moinho de martelo. Tanto a serragem quanto o bagaço de cana foram peneirados para padronização do tamanho das partículas em peneira GRAN UTEST contendo abertura de 1,19 mm.

4.8.2. Condições de Cultivo

As linhagens selecionadas foram cultivadas nos diferentes meios sob condição microaerofílica, em Erlenmeyer de 100 mL contendo 50 mL de meio. Para os meios contendo como fonte de carbono serragem, bagaço de cana e papel de filtro, as linhagens foram cultivadas sob agitação por um período de seis dias, sendo posteriormente colocadas sob condição de baixa oxigenação por mais quatorze dias.

4.8.3. Inóculo

A quantidade de inóculo foi a mesma utilizada para as dez linhagens testadas, ou seja, três quadrados de ágar micélio (1,0 x 1,0 cm) foram inoculados em cada Erlenmeyer contendo 50 mL de meio.

4.8.4. Obtenção das Enzimas

Após o período de crescimento de 20 e 35 dias sob condição microaerofílica e de 6 dias sob agitação seguidos por mais 14 dias sob condição microaerofílica, os caldos enzimáticos foram coletados filtrando-se o meio em lâ de vidro, e mantidos em freezer para posteriores verificações de atividade enzimática, degradação do ácido lignosulfônico dialisado e não dialisado, e produção de etanol.

4.8.5. Determinações Enzimáticas

As determinações enzimáticas de LiP, MnP, lacase, peroxidase e AVO foram realizadas para os seis diferentes meios cultivados, após 20 e 35 dias de crescimento a 30°C, de acordo com o item 4.7. Para os meios contendo serragem, bagaço de cana e papel de filtro as atividades também foram determinadas após crescimento dos microrganismos sob condição de agitação por 6 dias e posterior crescimento por mais 14 dias sob condição microaerofílica.

4.8.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os meios contendo ácido lignosulfônico dialisado e ácido lignosulfônico não dialisado foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para verificação da degradação desses compostos. O equipamento utilizado foi o cromatógrafo e integrador da marca Shimadzu, modelo LC-6A com detector ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm nas seguintes

condições: fase móvel metanol/água (50:50), com fluxo de 0,5 mL/min; coluna ZORBAX C18, utilizada a temperatura ambiente; e volume injetado de 20 μ L.

A presença de etanol nos caldos enzimáticos foi verificada também por CLAE utilizando-se cromatógrafo e integrador Shimadzu, modelo LC-6A com detector ultravioleta no comprimento de onda de 210 nm nas seguintes condições: fase móvel H_3PO_4 0,1%, com fluxo de 0.5 mL/min; fase estacionária poliestirenodivinilbenzeno, coluna supelcogel C610H, utilizada a temperatura ambiente; e o volume injetado de 20 μ L.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção dos Microrganismos

Das dez linhagens utilizadas nesse estudo, cinco foram selecionadas de acordo com a produção enzimática após 7, 15, 22 e 30 dias de crescimento sob condições aeróbica sem agitação e microaerofílica, e após 4, 6 e 10 dias de crescimento sob condição aeróbica com agitação, a uma temperatura de 30° C, em meio contendo papel de filtro como fonte de carbono.

A seleção foi efetivada a partir da análise dos resultados de produção das enzimas ligninolíticas, lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), lacase, peroxidases e álcool veratrílico oxidase (AVO); e também da análise da produção das enzimas celulolíticas carboximetilcelulase, avicelase, xilanase e β -glicosidase, sendo estas últimas realizadas por Pavarina (1996).

Os microrganismos selecionados foram: o fungo deuteromiceto Q10 (*Trichocladium canadense*); o basidiomiceto H₂; os fungos deuteromicetos, linhagens 20 e LH₅; e a levedura LD (*Geotrichum* sp).

5.1.2. Produção de Enzimas Ligninolíticas

Os caldos enzimáticos das dez linhagens de fungos, crescidas em meio contendo papel de filtro, sob condições aeróbica com e sem agitação, e microaerofílica, foram utilizados para a determinação enzimática. Os valores das atividades enzimáticas estão apresentados nas Tabelas 5 a 13, em apêndice.

De uma maneira geral, em meio contendo papel de filtro como fonte de carbono, houve uma maior produção da enzima MnP, seguida pela produção de lacase, peroxidases e LiP. A enzima AVO foi produzida em níveis baixos pelas dez linhagens em todas as condições estudadas.

5.1.2.1. Produção de Manganês Peroxidase (MnP)

A máxima atividade de MnP, 34 UI/L, (Figura 4) foi produzida pela levedura LD (*Geotrichum* sp), quando cultivada após um período de 22 dias de crescimento em Erlenmeyer, em condição aeróbica sem agitação (A (E) 22D). Também sob essa condição, os fungos Q10 (*Trichocladium canadense*) e L71 (não identificado) apresentaram máximas atividades de MnP, aproximadamente 18 UI/L, quando crescidos em tubos de ensaio após um período de 22 dias (A (T) 22 D) e 7 dias, respectivamente (A (T) 7 D).

Em condição aeróbica com agitação a máxima atividade de MnP foi produzida em geral com 10 dias de crescimento (AG (E) 10 D), sendo as melhores atividades de aproximadamente 11 UI/L produzida pela linhagem 20 e 6,5 UI/L produzida pela linhagem LH5.

Também pode-se observar na Figura 4 a produção de MnP em condição microaerofílica, onde os fungos 20 (~10 UI/L) e FOR (~9 UI/L) produziram máximas atividades, seguidos pela levedura LD (~5 UI/L), quando cultivados por 7 dias (M (T) 7 D).

5.1.2.2. Produção de lacase

A enzima lacase foi produzida pelas dez linhagens estudadas nas três condições propostas, como demonstrado na Figura 5. As linhagens Q10 (*Trichocladium canadense*) e LH5 (deuteromiceto) foram as melhores produtoras de lacase, sendo a máxima produção (~1,4 UI/L) obtida pela linhagem Q10 quando cultivada em Erlenmeyer sob agitação a 150 rpm por 6 dias (AG (E) 6 D). Essa mesma linhagem também mostrou a melhor atividade de lacase sob condição microaerofílica (~1,2 UI/L), após 7 dias de crescimento (M (T) 7 D).

Em condição aeróbica sem agitação as linhagens 5 (não identificada) e H2 (basidiomiceto) produziram máxima atividade de lacase (~1,2 UI/L) e (~1,0 UI/L), quando cultivadas respectivamente em tubo (A (T) 30 D) e em Erlenmeyer (A (E) 30 D) por 30 dias.

5.1.2.3. Produção de Lignina Peroxidase (LiP)

Na Figura 6 estão representadas as atividades de LiP, onde pode-se observar que poucas linhagens produziram esta enzima e em apenas algumas das condições estudadas. De uma maneira geral a melhor condição de produção foi a de incubação em Erlenmeyer com agitação a 150 rpm por 10 dias (AG (E) 10 D) onde houve produção de LiP pelas linhagens Q10 (*Trichocladium canadense*), LH5 (deuteromiceto), LD (*Geotrichum* sp), 20 (deuteromiceto), FOR (*Fusarium oxysporum*) e L71 (não identificada).

A máxima atividade (~1,2 UI/L) foi produzida pelo fungo FOR (*Fusarium oxysporum*) quando cultivado em Erlenmeyer por 22 dias sob condição aeróbica

sem agitação (A (E) 22 D). Em condição de baixa oxigenação a produção de LiP foi praticamente ausente, sendo produzida apenas em níveis muito baixos pelos microrganismos LD (*Geotrichum* sp), 20 (deuteromiceto), FOR (*Fusarium oxysporum*), 30 (não identificado) e H2 (basidiomiceto).

5.1.2.4. Produção de Peroxidases

A produção de peroxidases está demonstrada na Figura 7, onde podemos observar que as linhagens fúngicas LH5 (basidiomiceto), FOR (*Fusarium oxysporum*), 30 (não identificada), H2 (bsidiomiceto) e D7 (não identificada) produziram atividade enzimática em quase todas as condições estudadas. Em geral, os melhores resultados foram obtidos em condição microaerofílica, com a máxima atividade produzida pelo basidiomiceto H2 (~1,3 UI/L) quando cultivado por 30 dias (M (T) 30 D).

5.1.2.5. Produção de Álcool Veratrílico Oxidase (AVO)

A produção desta enzima está representada pela Figura 8. As linhagens produziram AVO em poucas condições e em níveis muito baixos. A levedura LD (*Geotrichum* sp) produziu a máxima atividade (~0,5 UI/L) quando cultivada sob condição aeróbica, em Erlenmeyer, por 15 dias (A (E) 15 D).

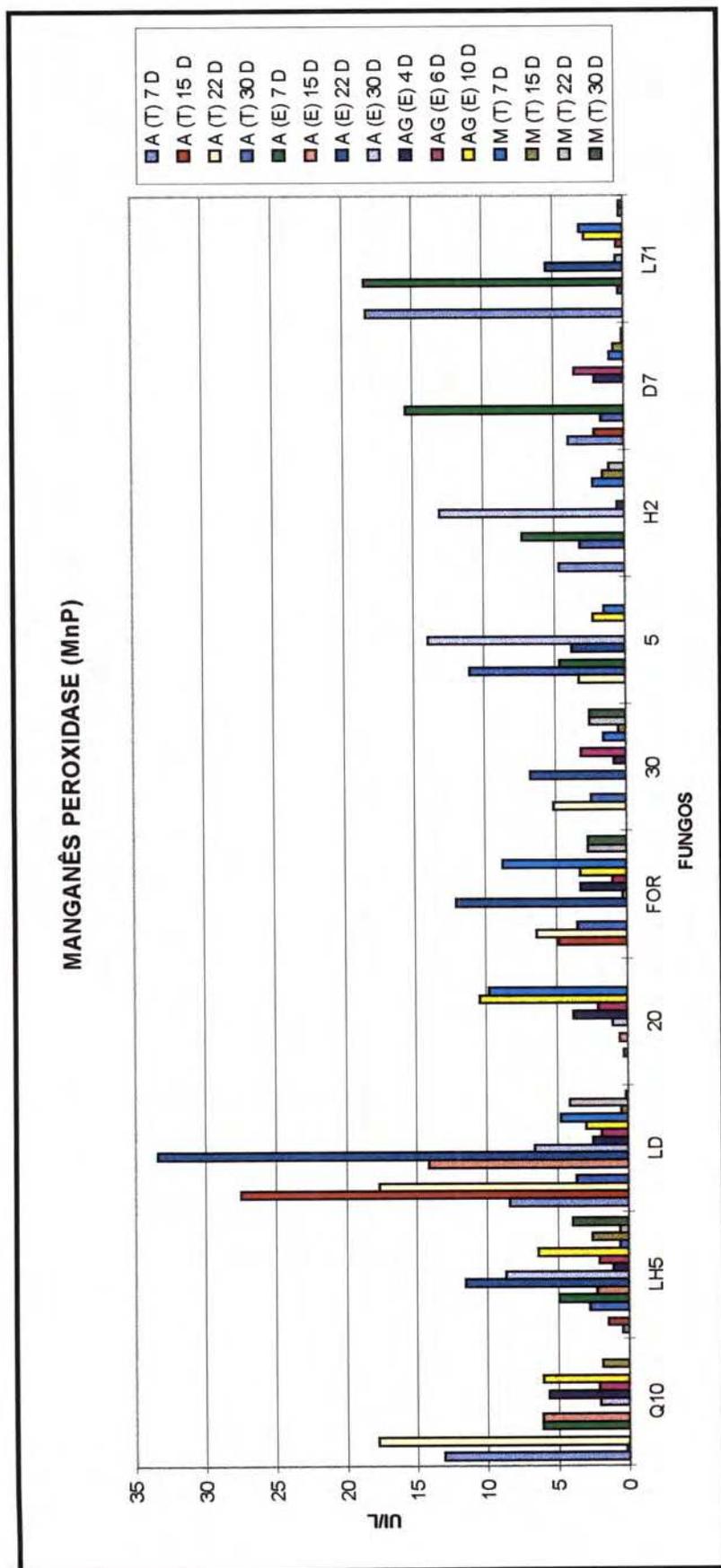


FIGURA 4. Atividades enzimáticas de MnP para as dez linhagens de fungos crescidas em tubo (T) e em Erlenmeyer (E), em meio contendo papel de filtro, a uma temperatura de 30°C, sob condições: aeróbica sem agitação (A), aeróbica com agitação de 150 rpm (AG) e microaerofílica (M). (D) indica o dia da determinação enzimática. Fungos: Q10 (*Trichocladium canadense*); LH5 e 20 (Deuteromicetos); FOR (*Fusarium oxysporum*) LD (*Geotrichum* sp); H2 (Basidiomiceto) e 30, 5, D7 e L71 (não identificados).

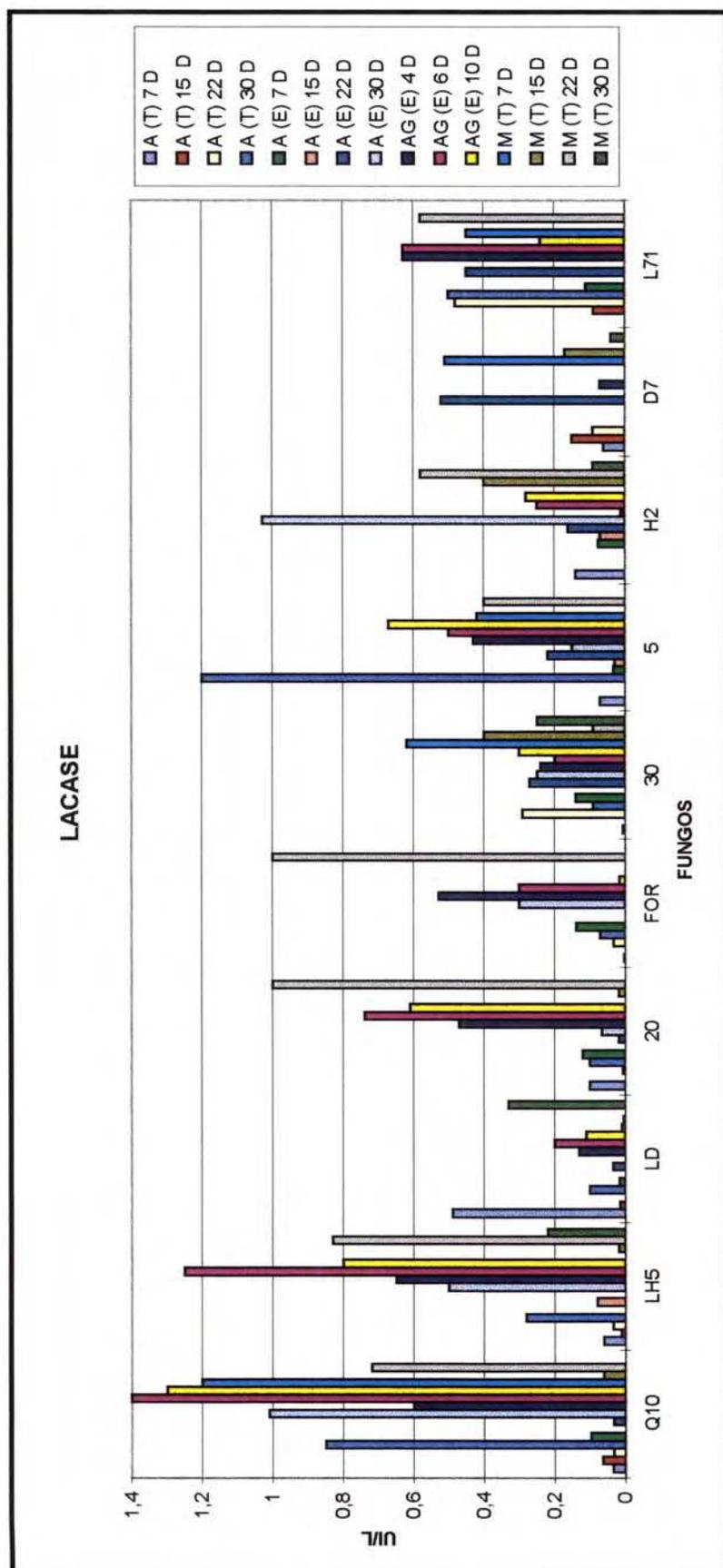


FIGURA 5. Atividades enzimáticas de lacase para as dez linhagens de fungos crescidas em tubo (T) e em Erlenmeyer (E), em meio contendo papel de filtro, a uma temperatura de 30°C, sob condições: aeróbica sem agitação (A), aeróbica com agitação de 150 rpm (AG) e microaerofílica (M). (D) indica o dia da determinação enzimática.

Fungos: Q10 (*Trichocladium canadense*); LH5 e 20 (Deuteromicetos); FOR (*Fusarium oxysporum*); LD (*Geotrichum* sp); H2 (Basidiomiceto) e 30, 5, D7 e L71 (não identificados).

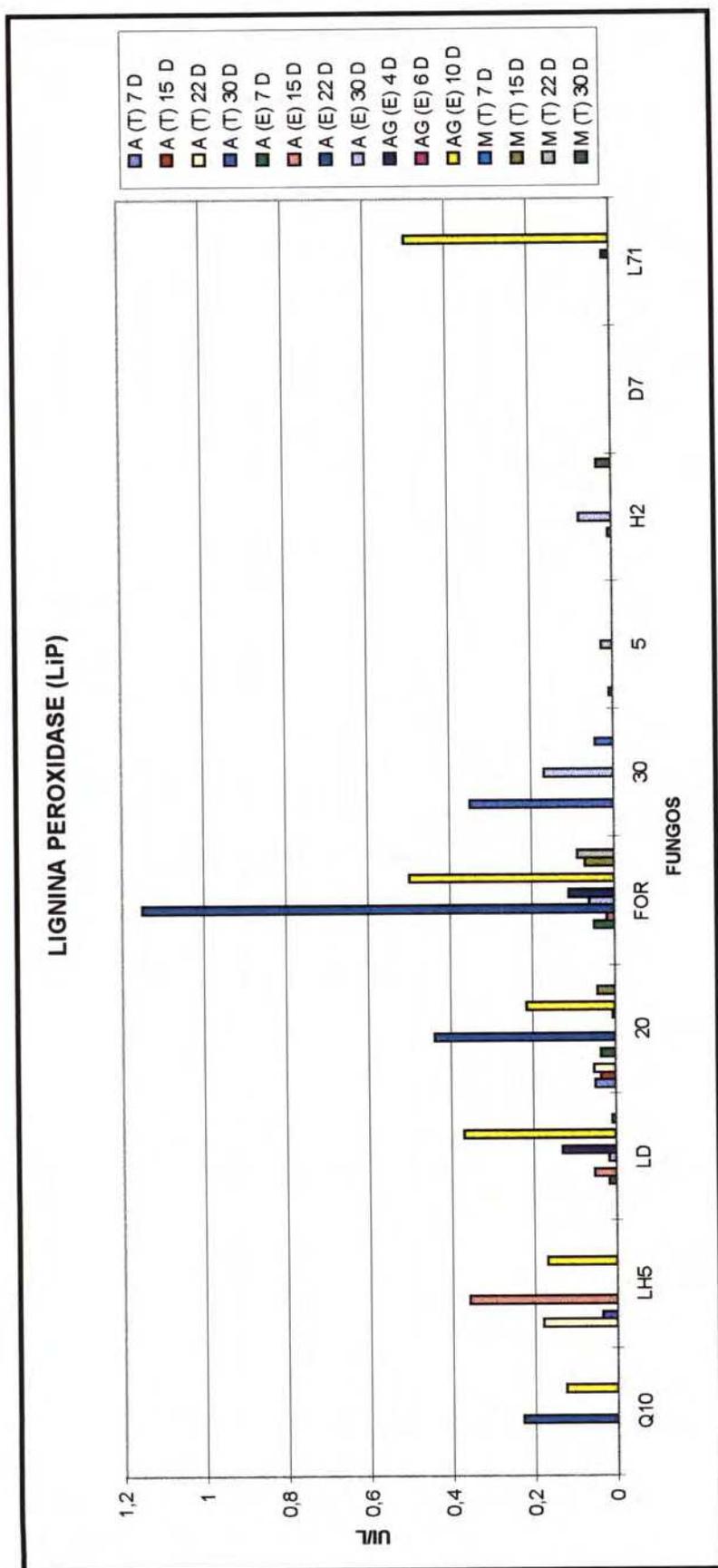


FIGURA 6. Atividades enzimáticas de LiP para as dez linhagens de fungos crescidas em tubo (T) e em Erlenmeyer (E), em meio contendo papel de filtro, a uma temperatura de 30°C, sob condições: aeróbica sem agitação (A), aeróbica com agitação de 150 rpm (AG) e microaerofílica (M).

(D) indica o dia da determinação enzimática.

Fungos: Q10 (*Trichocladium canadense*); LH5 e 20 (Deuteromicetos); FOR (*Fusarium oxysporum*); LD (*Geotrichum* sp.); H2 (Basidiomiceto) e 30, 5, D7 e L71 (não identificados).

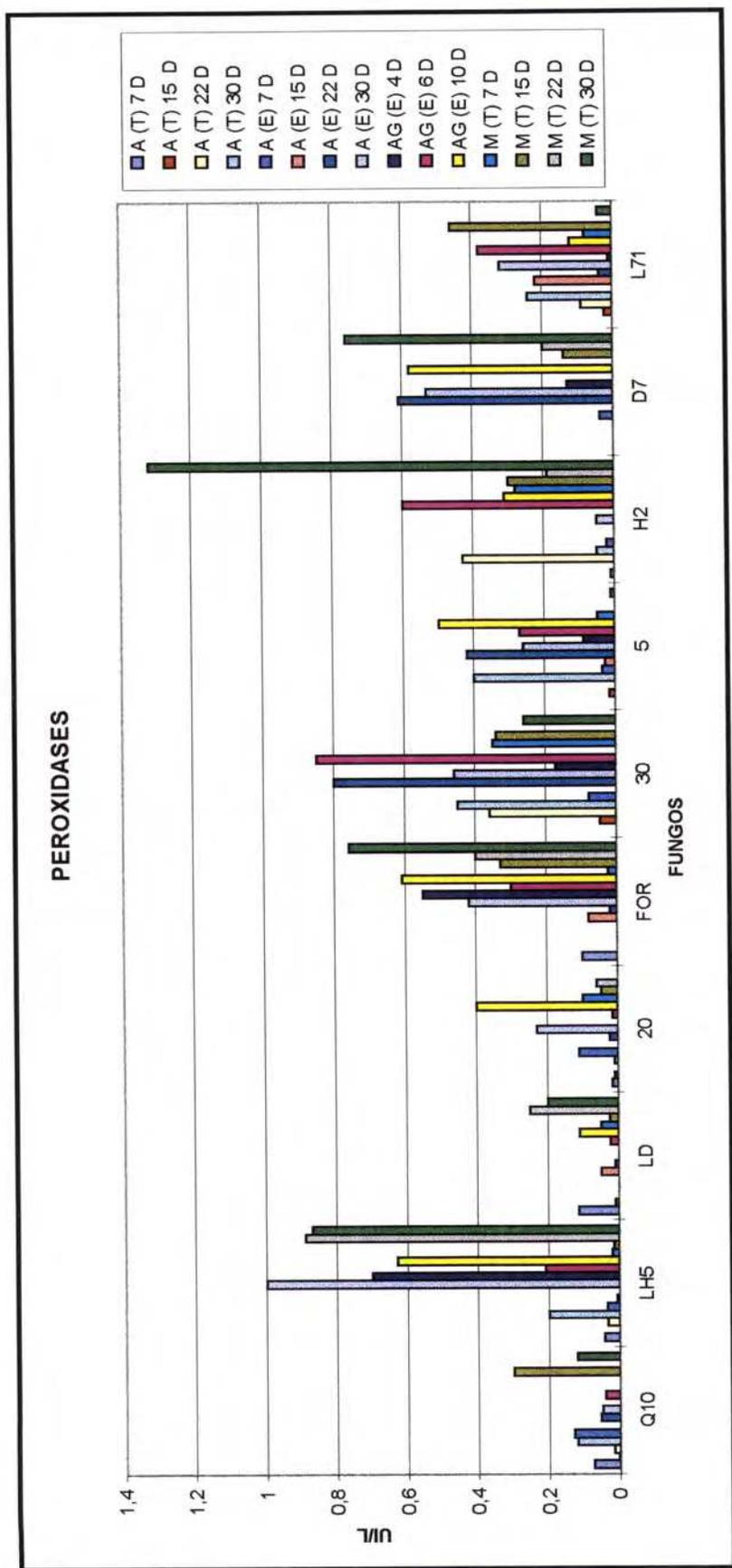


FIGURA 7. Atividades enzimáticas de peroxidases para as dez linhagens de fungos crescidas em tubo (T) e em Erlenmeyer (E), em meio contendo papel de filtro, a uma temperatura de 30°C, sob condições: aeróbica sem agitação (A), aeróbica com agitação de 150 rpm (AG) e microaerofílica (M). (D) indica o dia da determinação enzimática.

Fungos: Q10 (*Trichocladium canadense*); LH5 e 20 (Deuteromiceto); FOR (*Fusarium oxysporum*); LD (*Geotrichum* sp); H2 (Basidiomiceto) e 30, 5, D7 e L71 (não identificados).

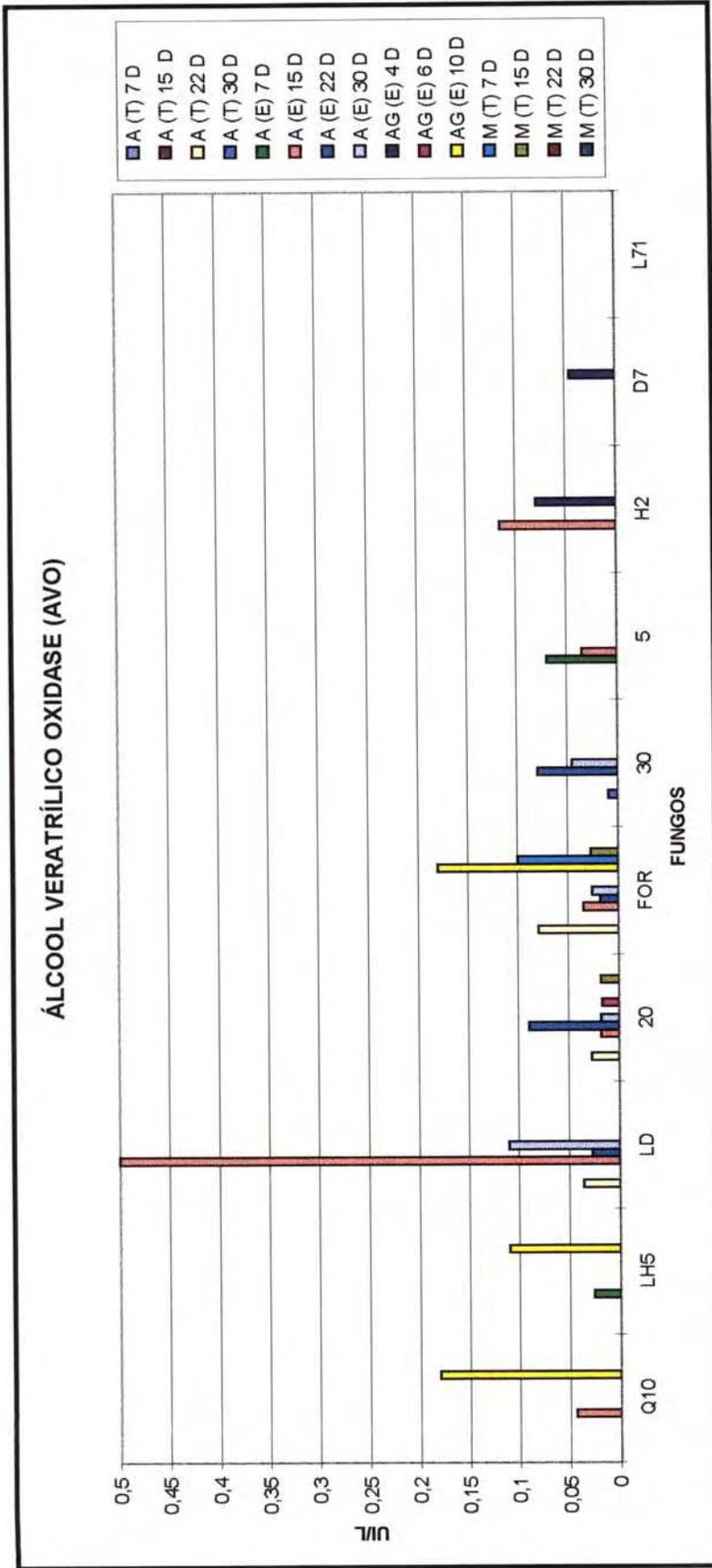


FIGURA 8. Atividades enzimáticas de AVO para as dez linhagens de fungos crescidas em tubo (T) e em Erlenmeyer (E), em meio contendo papel de filtro, a uma temperatura de 30°C, sob condições: aeróbica sem agitação (A), aeróbica com agitação de 150 rpm (AG) e microaerofílica (M).

(D) indica o dia da determinação enzimática.

Fungos: Q10 (*Trichocladium canadense*); LH5 e 20 (Deuteromiceto); FOR (*Fusarium oxysporum*); LD (*Geotrichum* sp); H2 (Basidiomiceto) e 30, 5, D7 e L71 (não identificados).

5.2. Produção de Enzimas Ligninolíticas em Diferentes Substratos

As cinco linhagens selecionadas Q10 (*Trichocladium canadense*), H2 (basidiomiceto), LH5 (deuteromiceto), 20 (deuteromiceto) e LD (*Geotrichum* sp) foram cultivadas em seis diferentes fontes de carbono (álcool veratrílico, ácido lignosulfônico, ácido lignosulfônico dialisado, xilana, serragem e bagaço de cana), sob condição microaerofílica por um período de 20 e 35 dias, a 30°C.

Nas Figuras 9 a 14 estão representados os gráficos relacionados com a produção das enzimas ligninolíticas (LiP, MnP, lacase, AVO e peroxidases) para cada um dos seis diferentes substratos utilizados. Os valores das atividades enzimáticas estão apresentados em apêndice na Tabela 14.

5.2.1. Álcool Veratrílico (AV)

Na Figura 9 estão representadas as atividades das enzimas ligninolíticas LiP, MnP, lacase, AVO e peroxidases, das cinco linhagens de fungos selecionadas, crescidas em meio líquido contendo álcool veratrílico (0,4 mM) como fonte de carbono, durante um período de 20 e 35 dias, sob condição microaerofílica, a uma temperatura de 30°C.

A enzima manganês peroxidase foi a mais produzida em meio contendo álcool veratrílico, sendo o restante das enzimas, quando presentes, obtidas em níveis menores do que 1,0 UI/L. Todas as cinco linhagens testadas produziram MnP, e os melhores resultados foram obtidos com 20 dias de crescimento. A levedura LD (*Geotrichum* sp) produziu a máxima atividade de MnP, que foi de aproximadamente 14 UI/L.

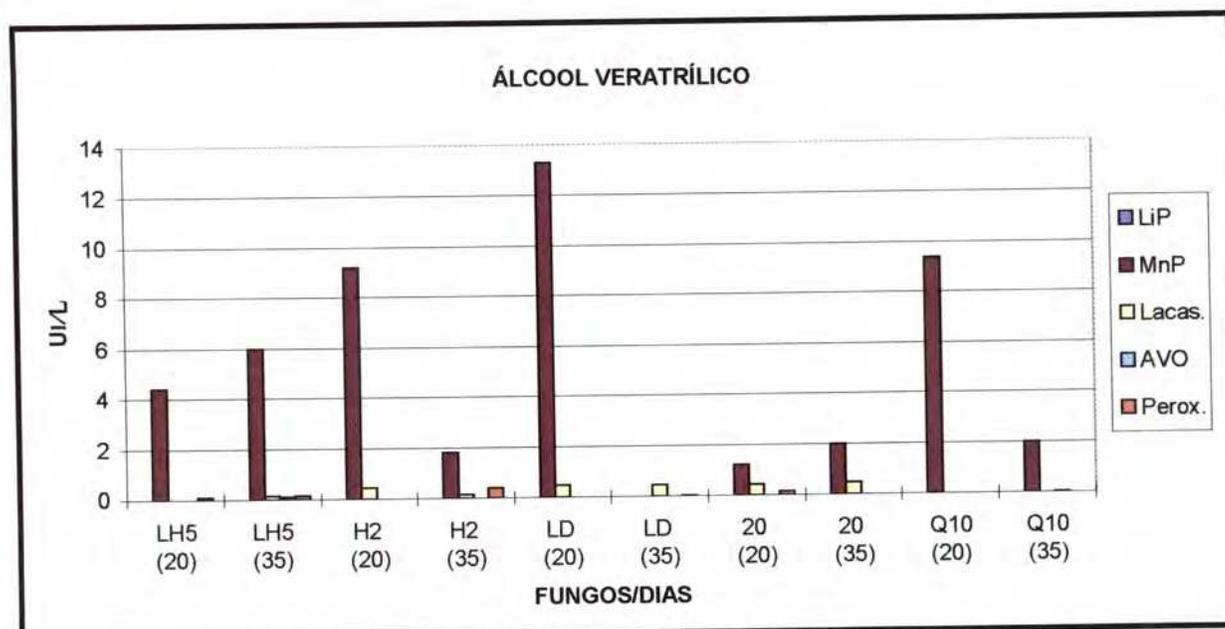


FIGURA 9. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas LH5 (deuteromiceto); H2 (basidiomiceto); LD (*Geotrichum* sp); 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*); crescidas por 20 e 35 dias em meio contendo como fonte de carbono álcool veratrílico, sob condição microaerofílica, a 30°C.

O álcool veratrílico tem sido associado com a proteção da enzima LiP, impedindo a sua desativação e, podendo funcionar também como um possível doador de elétron para este sistema enzimático. Os resultados obtidos com os microrganismos crescidos em meio contendo o substrato álcool veratrílico revelaram que a LiP esteve ausente em todas as culturas para ambos os dias de determinação enzimática, o que sugere a ineficiência desse composto como indutor da produção enzimática, a qual pode estar relacionada com a baixa concentração utilizada (0,4 mM).

5.2.2. Ácido Lignosulfônico

A produção de enzimas ligninolíticas em meio líquido, cultivado sob condição microaerofílica, por 20 e 35 dias a 30°C, contendo como fonte de

carbano ácido lignosulfônico (0,5%) pode ser observada na Figura 10.

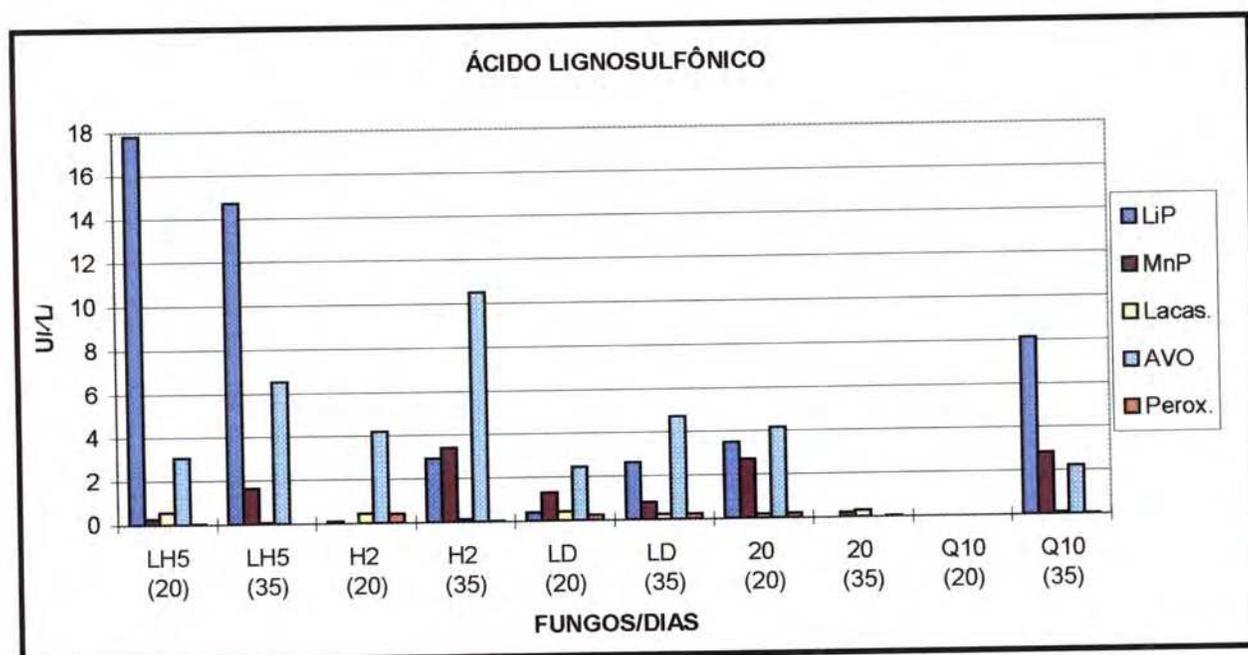


FIGURA 10. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas LH5 (deuteromiceto); H2 (basidiomiceto); LD (*Geotrichum* sp); 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*); crescidas por 20 e 35 dias em meio contendo como fonte de carbono ácido lignosulfônico, sob condição microaerofílica, a 30°C.

Para esse substrato, de uma maneira geral, as enzimas LiP e AVO foram produzidas em maiores quantidades por quase todas as linhagens, sendo as máximas atividades produzidas pelos fungos LH5 (deuteromiceto), onde podemos observar a maior produção de LiP (18 UI/L); e pelo basidiomiceto H2, que foi o melhor produtor de AVO (~11 UI/L). A enzima MnP também foi produzida nessas condições pela maioria das linhagens testadas, mas em menores quantidades. A máxima atividade de MnP foi obtida pelo basidiomiceto H2 (~ 4 UI/L), quando cultivado por um período de 35 dias.

A enzima AVO pode ser observada em todas as linhagens produtoras principalmente de LiP e de MnP. Este resultado é indicativo de que esta enzima

provavelmente esteja atuando em conjunto com as LiP e MnP, ou seja, que ela esteja produzindo o H_2O_2 necessário para o sistema enzimático das peroxidases.

A produção de maiores atividades ligninolíticas pelos fungos selecionados após crescimento nesse substrato quando comparada com a produção das demais fontes de carbono utilizadas (papel de filtro, xilana, serragem e bagaço de cana), pode estar relacionada com a estrutura desse composto, visto que o ácido lignosulfônico é constituído apenas por moléculas derivadas de lignina, sulfonadas, com diferentes pesos moleculares, e pode estar promovendo um efeito de indução do sistema enzimático.

5.2.3. Ácido Lignosulfônico (dialisado)

Para o meio contendo ácido lignosulfônico dialisado, os resultados de produção de enzimas ligninolíticas sob condição microaerofílica, foram maiores quando comparados com os outros tipos de substratos estudados.

Em meio contendo ácido lignosulfônico dialisado como fonte de carbono, a produção de enzimas ligninolíticas foi semelhante à do meio contendo ácido lignosulfônico não dialisado havendo, de uma maneira geral, aumento de produção das enzimas LiP, AVO e MnP, como pode ser observado na Figura 11. O aumento na atividade das enzimas LiP, AVO e MnP, deve estar relacionada com os pesos moleculares das moléculas retidas na membrana de celofane durante a diálise, sugerindo uma melhor produção enzimática na presença de moléculas com maiores pesos moleculares.

As enzimas LiP, AVO e MnP foram produzidas por todas as cinco linhagens estudadas, tanto em 20 dias quanto em 35 dias. O microrganismo LH5 (deuteromiceto) foi o maior produtor de LiP (~13 UI/L) e os microrganismos LH5 e 20 (deuteromiceto) foram os melhores produtores de AVO (12 UI/L). O fungo Q10 (*Trichocladium canadense*) apresentou a máxima atividade de MnP, cerca de 11 UI/L.

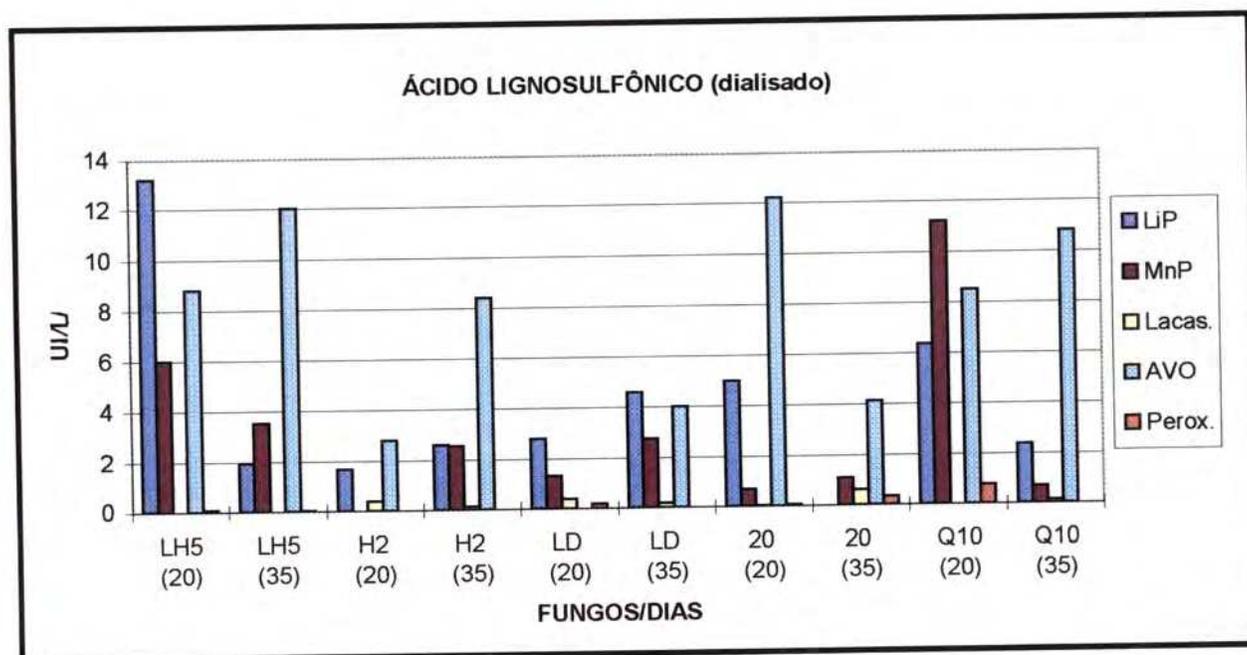


FIGURA 11. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas LH5 (deuteromiceto); H2 (basidiomiceto); LD (*Geotrichum* sp); 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*); crescidas por 20 e 35 dias em meio contendo como fonte de carbono ácido lignosulfônico dialisado, sob condição microaerofílica, a 30°C.

A presença da enzima AVO pode ser observada em quase todas as culturas juntamente com a produção de LiP e MnP, com exceção para o microrganismo LD (*Geotrichum* sp). O mesmo resultado de produção de AVO foi obtido para o meio contendo ácido lignosulfônico não dialisado (Figura 10).

5.2.4. Xilana

Na Figura 12 está representada a produção das enzimas ligninolíticas pelas linhagens fúngicas selecionadas, crescidas em meio contendo xilana como fonte de carbono, por um período de 20 e 35 dias, a 30°C, sob condição microaerofílica.

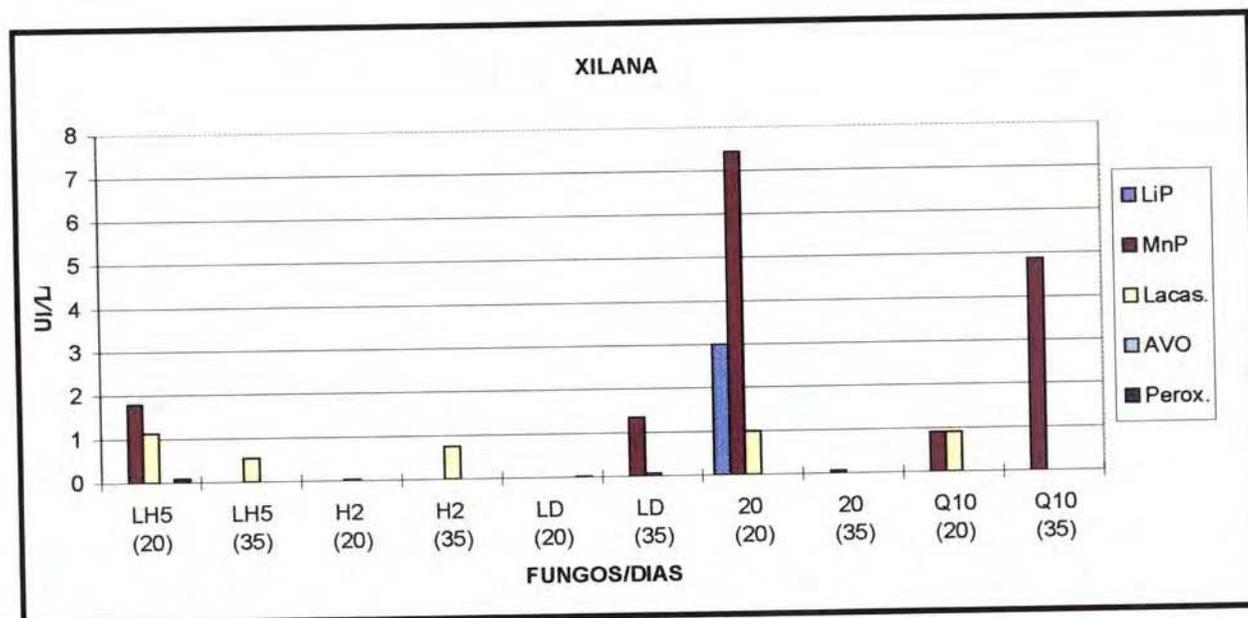


FIGURA 12. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas LH5 (deuteromiceto); H2 (basidiomiceto); LD (*Geotrichum* sp); 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*); crescidas por 20 e 35 dias sob condição microaerofílica, em meio contendo xilana como fonte de carbono, a 30°C.

Os resultados obtidos demonstram que poucas linhagens foram capazes de produzir enzimas ligninolíticas quando crescidas em substrato xilana. A linhagem 20 foi a melhor produtora de MnP (~7,5 UI/L) e a única produtora de LiP (3 UI/L). As linhagens LH5 (deuteromiceto), 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*) produziram lacase em quantidades aproximadas de 1 UI/L, quando cultivadas por 20 dias.

A baixa atividade das enzimas envolvidas na degradação da lignina, produzida pela maioria das linhagens selecionadas, quando crescidas em meio contendo xilana como fonte de carbono, sugere que esse substrato, por ser hemicelulósico, não seja indutor da produção dessas enzimas para as linhagens estudadas, com exceção da linhagem 20, que produziu quantidades razoáveis de MnP (~7,5 UI/L) e LiP (3,0 UI/L), quando crescida por 20 dias.

5.2.5. Serragem

A Figura 13 representa o gráfico de produção das enzimas LiP, MnP, lacase, AVO e peroxidases para as linhagens selecionadas, cultivadas por 20 e 35 dias, em meio contendo serragem, sob condição de baixa oxigenação, a 30°C.

Para o meio contendo serragem, apesar dos valores das produções enzimáticas não terem sido muito altos quando comparados com os outros substratos, houve produção das cinco enzimas ligninolíticas estudadas, em quase todas as linhagens, com exceção do microrganismo Q10 (*Trichocladium canadense*). A enzima MnP foi a melhor produzida nesse meio, sendo a máxima atividade (~4,5 UI/L) produzida pela linhagem do basidiomiceto H2. As enzimas LiP, lacase, AVO e peroxidases foram produzidas em quantidades menores que 1 UI/L.

A menor produção das enzimas ligninolíticas para esse substrato pode estar associada à forma triturada na qual o material lignocelulósico se apresenta, havendo naturalmente uma maior exposição dos polissacarídeos celulose e hemicelulose, os quais são substratos mais facilmente metabolizáveis.

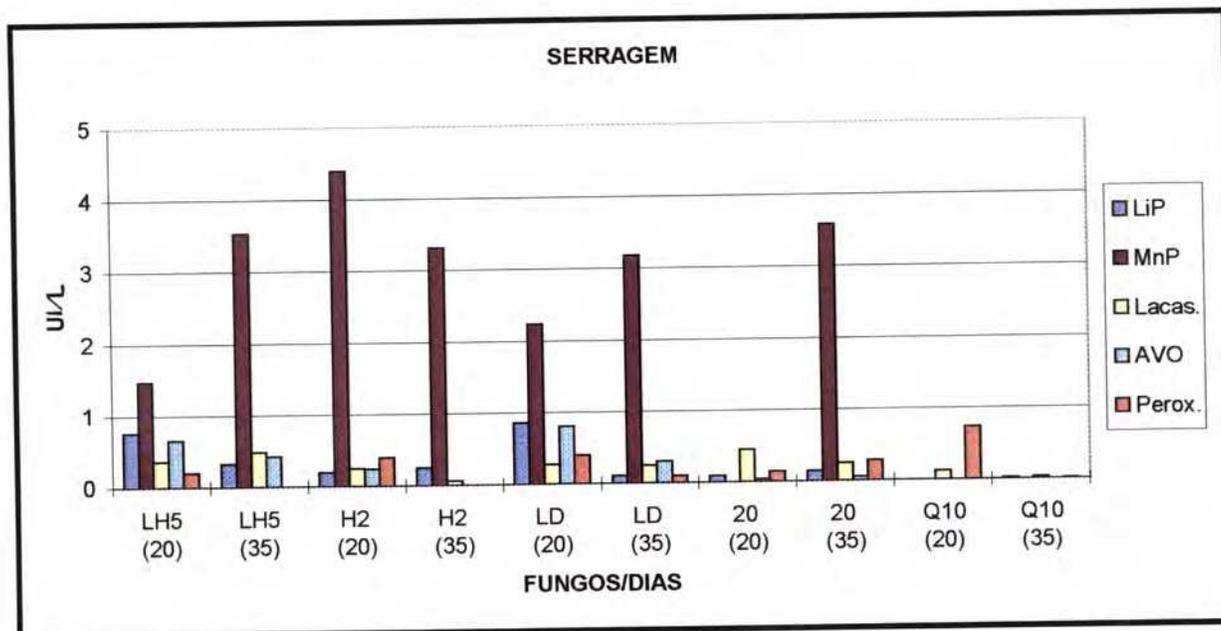


FIGURA 13. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas LH5 (deuteromiceto); H2 (basidiomiceto); LD (*Geotrichum* sp); 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*); crescidas por 20 e 35 dias sob condição microaerofílica, em meio contendo serragem como fonte de carbono, a 30°C.

5.2.6. Bagaço de cana

Para o meio contendo como fonte de carbono bagaço de cana, a produção enzimática ligninolítica foi menor quando comparada com a do meio contendo serragem, como pode ser observado na Figura 14. Os resultados obtidos para a enzima MnP foram, de uma maneira geral, inferiores, exceto para o microrganismo Q10 (*Trichocladium canadense*) que apresentou atividade máxima para essa enzima, produzindo aproximadamente 7 UI/L.

Da mesma maneira que para o substrato serragem, a forma triturada na qual esse substrato foi utilizado pode estar relacionada com a baixa produção enzimática, bem como a presença de alguma contaminação no substrato, como por exemplo a glicose, que poderia estar presente como contaminante do bagaço

de cana sendo, portanto, consumida como fonte de carbono alternativa para o crescimento dos microrganismos, regulando a produção das enzimas ligninolíticas.

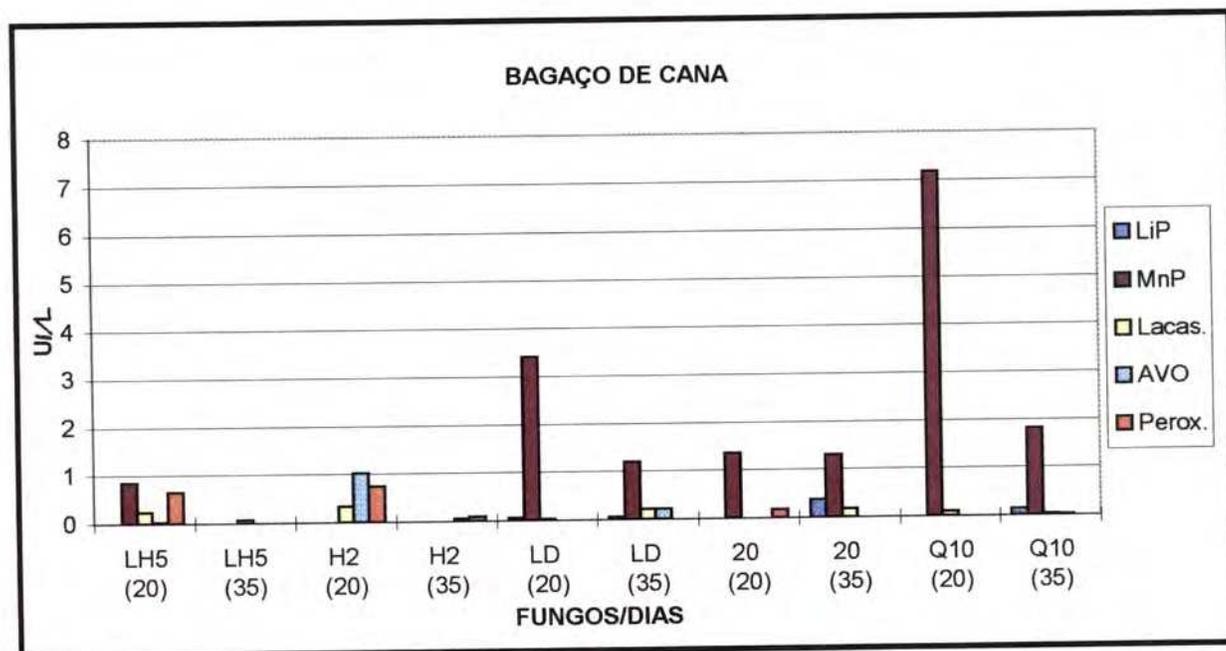


FIGURA 14. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas LH5 (deuteromiceto); H2 (basidiomiceto); LD (*Geotrichum* sp); 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*); crescidas por 20 e 35 dias sob condição microaerofílica, em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono, a 30°C.

5.3. Produção de Enzimas Ligninolíticas Sob Condições Variadas de Oxigenação.

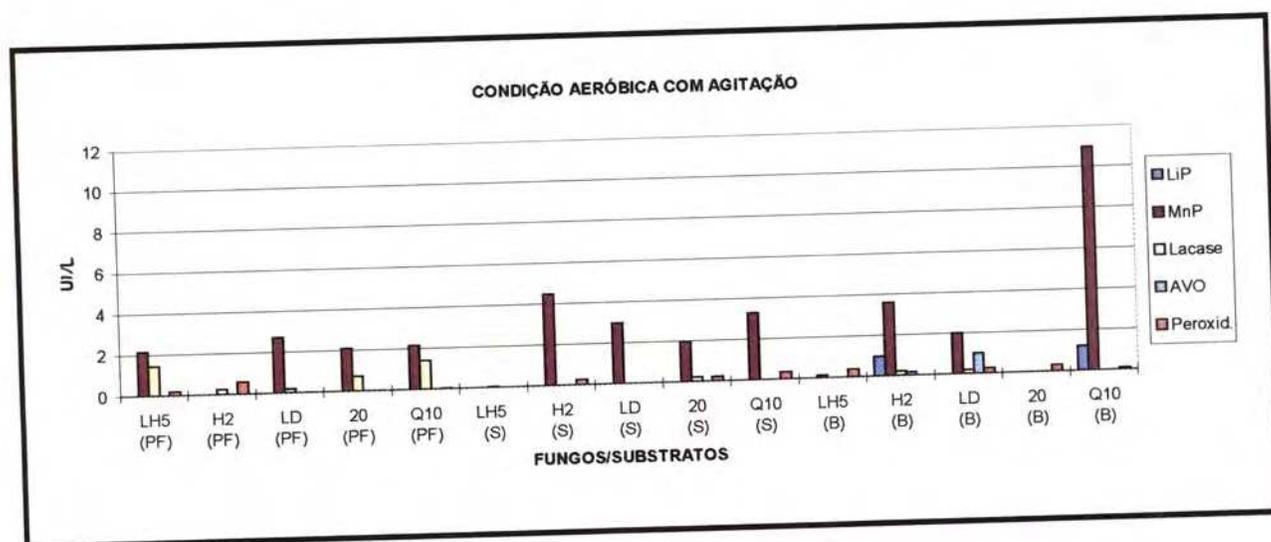
Após a produção das enzimas ligninolíticas em seis diferentes tipos de substratos (item 5.2.), as cinco linhagens selecionadas foram cultivadas em meio contendo papel filtro, serragem e bagaço de cana na concentração de 0,5% (p/v), a 30°C, sob condição aeróbica com agitação e sob posterior condição microaerofílica.

As determinações enzimáticas (LiP, MnP, lacase, peroxidases e AVO) foram feitas após 6 dias de crescimento sob condição aeróbica seguida por 14 dias de crescimento sob condição microaerofílica. Os valores das atividades enzimáticas após 6 e 20 dias de incubação estão representados na Tabela 15, em apêndice, e nas Figuras 15A e B.

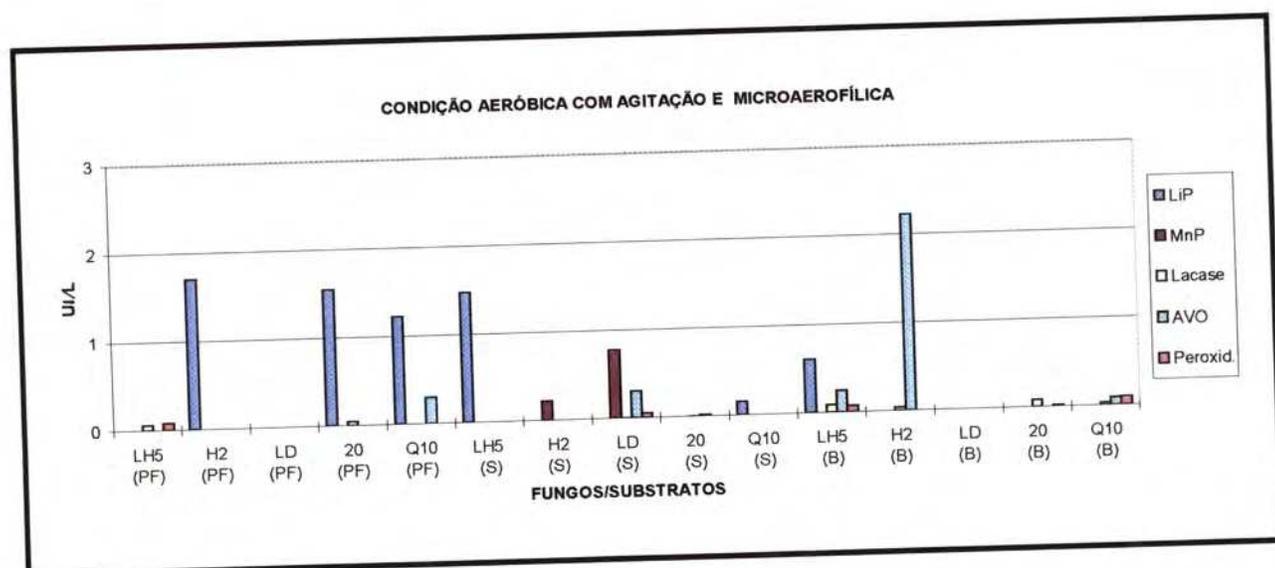
A enzima MnP foi a melhor produzida após 6 dias de crescimento sob agitação (Figura 15A), em todos os três meios estudados. A atividade máxima de MnP, aproximadamente 11 UI/L, foi produzida pelo fungo deuteromiceto Q10 (*Trichocladium canadense*), quando crescido em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono. Essa enzima foi produzida em menores quantidades pelas linhagens, quando cultivadas em meio contendo papel de filtro moído.

Os valores máximos de atividade de MnP após crescimento por 6 dias sob condição de agitação, para alguns microrganismos, como os fungos 20 (deuteromiceto) e FOR (*Fusarium oxysporium*), foram próximos aos resultados obtidos por essas mesmas linhagens após crescimento por 7 dias apenas sob condição microaerofílica, os quais podem ser observados na Figura 3.

A produção da enzima lacase sob agitação (6 dias) foi melhor em meio contendo papel de filtro. A máxima atividade de lacase, aproximadamente 1,5 UI/L, foi produzida pelos microrganismos LH5 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*). A linhagem Q10 também foi a produtora da máxima atividade de LiP, que foi de aproximadamente 1,25 UI/L, em meio contendo bagaço de cana. As enzimas peroxidases e AVO, quando presentes, demonstraram atividades com valores iguais ou inferiores 1 UI/L.



(A)



(B)

FIGURA 15. Atividade enzimática ligninolítica das linhagens selecionadas LH5 (deuteromiceto); H2 (basidiomiceto); LD (*Geotrichum* sp); 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*); crescidas em meio contendo como fonte de carbono papel de filtro (PF), serragem (S) e bagaço de cana (B) a 30°C, sob condições: (A) aeróbica com agitação de 150 rpm, por um período de 6 dias e (B) aeróbica com agitação (6 dias) mais microaerofílica (14 dias), por um período de 20 dias.

Apesar das atividades das enzimas ligninolíticas terem sido baixas em condição de agitação por 6 dias e microaerofílica por mais 14 dias (Figura 15B), de maneira geral, houve um aumento da produção de LiP e AVO, e diminuição da produção de MnP, após a mudança de condição de crescimento dos microrganismos de agitação para microaerofílica. A enzima LiP apresentou melhor atividade, sendo produzida principalmente em meio contendo como fonte de carbono papel de filtro e serragem. O fungo deuteromiceto LH5 foi produtor da maior atividade de LiP, produzindo cerca de 1,7 UI/L em meio contendo papel de filtro. A máxima atividade de AVO foi de aproximadamente 2,25 UI/L, produzida pelo basidiomiceto H2.

Os valores das atividades enzimáticas ligninolíticas obtidos após o crescimento dos microrganismos por 20 dias (6 dias sob condição de agitação mais 14 dias sob condição microaerofílica), em meio contendo serragem ou bagaço de cana foram, de uma maneira geral, inferiores aos valores das atividades enzimáticas produzidas durante o mesmo período de crescimento (20 dias) nesses substratos apenas sob condição microaerofílica (Figuras 13 e 14). Algumas enzimas apresentaram melhores resultados de atividade após o crescimento dos microrganismos sob condição de agitação mais condição microaerofílica, como é o caso da LiP produzida em serragem e em bagaço de cana pela linhagem LH5 (deuteromiceto) e da AVO produzida pela linhagem do fungo H2 (basidiomiceto) em meio contendo bagaço de cana.

Para o meio contendo papel de filtro, a produção enzimática após 22 dias de crescimento sob condição microaerofílica para as cinco linhagens selecionadas (Figuras 4 a 8) também foi, de maneira geral, superior aos resultados de atividade enzimática sob condição combinada de agitação mais microaerofílica, com exceção da enzima LiP produzida pelas linhagens H2 (basidiomiceto), 20

(deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*) apenas após a mudança de condição de oxigenação de aerada para microaeróbica (Figura 15B).

5.5. Degradação do Ácido Lignosulfônico

Os caldos enzimáticos obtidos dos fungos LH5 (deuteromiceto), H2 (basidiomiceto), LD (*Geotrichum* sp), 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*) após o crescimento durante um período de 20 e 35 dias a 30°C, sob condição microaerofílica, em meio contendo ácido lignosulfônico e ácido lignosulfônico dialisado, foram utilizados para verificação da degradação desses substratos através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito no item 4.8.5. Os padrões e as amostras analisadas foram diluídas em proporção de 1:1.

A degradação desses compostos foi determinada através da comparação da porcentagem em área do padrão com a porcentagem em área das amostras, demonstradas na Tabela 1 e na Tabela 2.

O tempo de retenção do padrão do ácido lignosulfônico foi de 3,047 minutos e a porcentagem em área foi de 503985 enquanto que o padrão do ácido lignosulfônico dialisado apresentou tempo de retenção do padrão de 2,887 minutos e porcentagem em área de 695394.

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que apenas o cromatograma referente a amostra da linhagem Q10 (*Trichocladium canadense*), cultivada por 35 dias, obteve porcentagem em área (451505) menor do que a obtida com o controle (503985). A diminuição da área também pode ser observada no cromatograma relativo à linhagem Q10, representado na Figura 16.

Tabela 1. Tempo de retenção (t.R.) e porcentagem em área do padrão e das amostras de meio contendo ácido lignosulfônico cultivado com as linhagens selecionadas durante o período de 20 e 35 dias.

FUNGOS	DIAS	t. R.	ÁREA (%)
LH5	20	3,01	536235
H2	20	3,078	601721
LD	20	3,072	533988
20	20	3,017	542980
Q10	20	N.D.	N.D.
LH5	35	3,004	565400
H2	35	3,03	586250
LD	35	3,038	561619
20	35	3,024	599901
Q10	35	3,086	451507
PADRÃO		3,047	503985

Fungos: LH5 (deuteromiceto), H2 (basidiomiceto), LD (*Geotrichum* sp), 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*).
N.D.: não determinado

A análise dos resultados dos cromatogramas obtidos dos caldos de cultivo das amostras dos fungos selecionados, crescidos por 20 e 35 dias, em meio contendo como fonte de carbono ácido lignosulfônico dialisado (Tabela 2), demonstra que apenas a linhagem da levedura LD (*Geotrichum* sp) quando cultivada por 35 dias, apresentou porcentagem em área (928032) superior a do controle (695394).

A diminuição da porcentagem em área para quase todas as amostras crescidas em meio contendo ácido lignosulfônico dialisado, sugerindo uma melhor degradação desse composto, pode estar relacionada com a melhor produção das enzimas ligninolíticas nesse substrato, que pode ser verificada na Figura 11.

Tabela 2. Tempo de retenção (t.R.) e porcentagem em área do padrão e das amostras de meio contendo ác. lignosulfônico dialisado cultivado com as linhagens selecionadas durante o período de 20 e 35 dias.

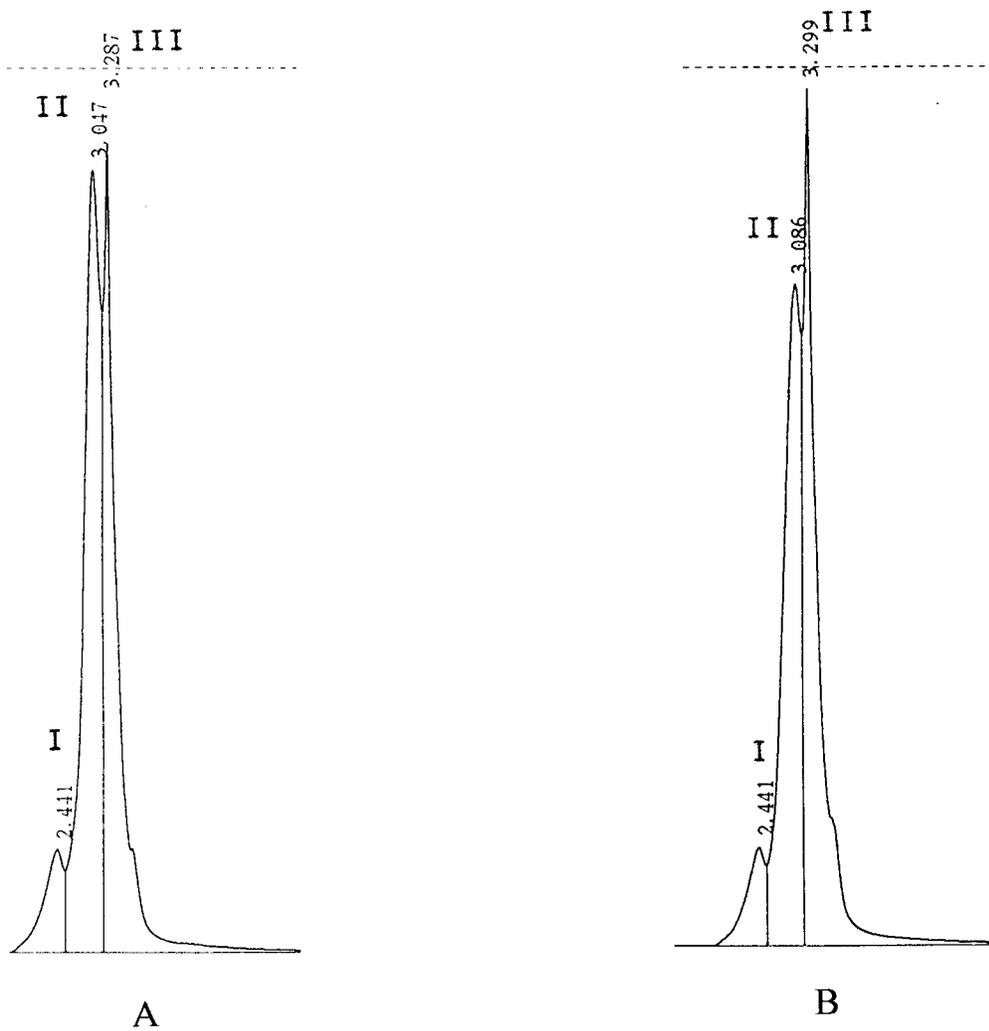
FUNGOS	DIAS	t. R.	ÁREA (%)
LH5	20	2,863	627527
H2	20	2,905	640830
LD	20	2,898	669644
20	20	2,894	668480
Q10	20	2,896	661138
LH5	35	2,885	646574
H2	35	2,945	625720
LD	35	2,925	928032
20	35	2,928	651316
Q10	35	2,861	634704
PADRÃO		2,887	695394

Fungos: LH5 (deuteromiceto), H2 (basidiomiceto), LD (*Geotrichum* sp), 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*).

Os melhores resultados relacionados com a diminuição da porcentagem em área das amostras em relação ao controle (695394), foram obtidos para os fungos basidiomiceto H2, crescido por 35 dias (625720); deuteromiceto LH5, crescido por 20 dias (627520) e para o fungo Q10 (*Trichocladium canadense*), quando cultivado por 35 dias (634704).

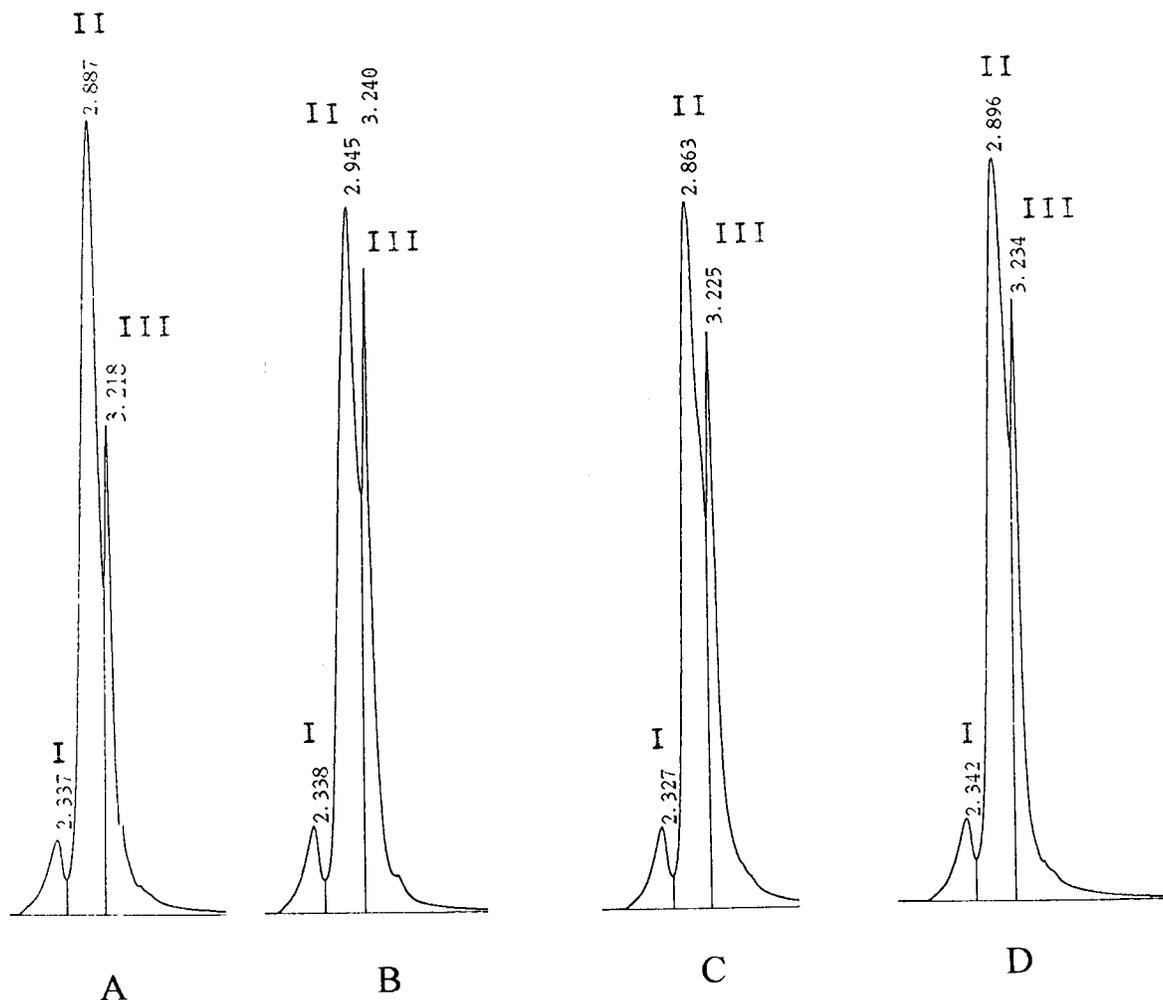
A análise da produção enzimática em meio contendo ácido lignosulfônico dialisado (Figura 11), revela bons níveis de atividade das enzimas LiP, MnP e AVO para as linhagens H2 (basidiomiceto), LH5 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*), as quais obtiveram melhores resultados relacionados com a diminuição da porcentagem em área. Na Figura 17 estão representados os cromatogramas das amostras de meio contendo ácido lignosulfônico dialisado cultivado com as linhagens H2 (basidiomiceto), LH5 (deuteromiceto) e Q10

(*Trichocladium canadense*), bem como o cromatograma do ácido lignosulfônico dialisado em meio líquido básico (padrão).



- I: Pico referente a componente do meio de cultura.
- II: Pico referente ao ácido lignosulfônico.
- III: Pico referente a componente do meio de cultura.

FIGURA 16. (A) Cromatograma do padrão; (B) Cromatograma referente a linhagem Q10 (*Trichocladium canadense*) cultivada por 35 dias a 30°C, sob condição de baixa oxigenação.



- I: Pico referente a componente do meio de cultura.
 II: Pico referente ao ácido lignosulfônico.
 III: Pico referente a componente do meio de cultura.

FIGURA 17. (A) Cromatograma do padrão; Cromatograma das amostras dos caldos de cultivo dos fungos crescidos em meio contendo ácido lignosulfônico dialisado, sob condição microaerofílica, a 30°C: (B) linhagem do basidiomiceto H2 crescida por 35 dias; (C) linhagem do deutericeto LH5 crescida por 20 dias; (D) linhagem do fungo Q10 (*Trichocladium canadense*) crescida durante o período de 20 dias.

5.5. Produção de Etanol

Os caldos enzimáticos das cinco linhagens de fungos selecionadas, LH5 (deuteromiceto), H2 (basidiomiceto), LD (*Geotrichum* sp), 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*), crescidas em material lignocelulósico (serragem e bagaço de cana), a uma temperatura de 30°C, durante um período total de 13 dias sob condição aeróbica com agitação (6 dias) mais microaerofílica (7 dias), e 35 dias sob condição microaerofílica; foram utilizados para determinação da produção de etanol através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, conforme relatado no item 4.8.5.

A presença do etanol nos caldos enzimáticos foi determinada em conjunto com Pavarina (1997), através da comparação do tempo de retenção do padrão com o tempo de retenção das amostras. O padrão de etanol utilizado apresentou tempo de retenção de 24,49 minutos.

Nas Tabelas 3 e 4 está demonstrada a produção de etanol pelas linhagens selecionadas crescidas respectivamente em meio contendo serragem e em meio contendo bagaço de cana, nas diferentes condições estudadas.

Em meio contendo serragem como fonte de carbono (Tabela 3) o etanol foi detectado nos cromatogramas obtidos dos caldos de cultivo das linhagens LH5 (deuteromiceto); LD (*Geotrichum* sp); 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*), quando crescidas por 6 dias sob condição de agitação e por mais 7 dias sob condição microaerofílica, e da linhagem da levedura LD (*Geotrichum* sp) quando cultivada por 35 dias sob condição microaerofílica.

Tabela 3. Produção de etanol pelas linhagens selecionadas crescidas em meio contendo serragem como fonte de carbono, por 13 dias sob condição de agitação mais condição microaerofílica e por 35 dias sob condição microaerofílica.

FUNGO	CONDIÇÃO	DIAS	ETANOL
LH5	AG/M	13	D
H2	AG/M	13	—
LD	AG/M	13	D
20	AG/M	13	D
Q10	AG/M	13	D
LH5	M	35	—
H2	M	35	—
LD	M	35	D
20	M	35	—
Q10*	M	35	—

Fungos: LH5 (deuteromiceto), H2 (basidiomiceto), LD (*Geotrichum* sp), 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*).

AG/M: condição aeróbica com agitação mais condição microaerofílica

M: condição microaerofílica

D: detectado

Q10*: amostra não analisada.

Em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono (Tabela 4), o etanol foi detectado apenas nos cromatogramas dos caldos de cultivo dos microrganismos LH5 (deuteromiceto), LD (*Geotrichum* sp), e 20 (deuteromiceto), quando crescidos primeiramente sob condição de agitação e posteriormente sob condição microaerofílica durante um período de 13 dias.

Tabela 4. Produção de etanol pelas linhagens selecionadas crescidas em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono, por 13 dias sob condição aeróbica com agitação mais condição microaerofólica e por 35 dias sob condição microaerofílica.

FUNGO	CONDIÇÃO	DIAS	ETANOL
LH5	AG/M	13	D
H2	AG/M	13	—
LD	AG/M	13	D
20	AG/M	13	D
Q10	AG/M	13	—
LH5	M	35	—
H2	M	35	—
LD	M	35	—
20	M	35	—
Q10*	M	35	—

Fungos: LH5 (deuteromiceto), H2 (basidiomiceto), LD (*Geotrichum* sp), 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*).

AG/M: condição aeróbica com agitação mais condição microaerofílica

M: condição microaerofílica

D: detectado

Q10*: amostra não analisada.

Os resultados de produção enzimática sob condição microaerofílica para o meio contendo serragem (Figura 13) e para o meio contendo bagaço de cana (Figura 14), demonstram que, de uma maneira geral, as enzimas ligninolíticas foram mais produzidas em meio contendo serragem. Esses resultados sugerem uma possível influência dessas enzimas na produção do etanol, visto que em meio contendo serragem o etanol foi detectado nos casos de crescimento de um maior número de microrganismos quando comparado com o meio contendo bagaço de cana.

5.6. Considerações Finais

Os resultados de produção das enzimas que participam do sistema de degradação da lignina para as diferentes classes de microrganismos utilizados nesse estudo LH5 (deuteromiceto), H2 (basidiomiceto), LD (*Geotrichum* sp), 20 (deuteromiceto) e Q10 (*Trichocladium canadense*), revelaram que os fungos imperfeitos LH5, 20 e Q10, bem como a levedura LD, foram capazes de produzir essas enzimas em quantidades superiores às produzidas pelo basidiomiceto H2 em algumas condições de cultivo. Até aonde temos conhecimento ainda não foi descrito na literatura leveduras com capacidade de produzir enzimas ligninolíticas, como as LiP, MnP, lacases, peroxidases e AVO.

Apesar da baixa concentração de atividade enzimática ligninolítica obtida, as cinco linhagens fúngicas selecionadas foram capazes de produzir enzimas em variadas condições de oxigenação, apresentando em alguns casos atividade enzimática após crescimento do microrganismo sob condição de baixa oxigenação semelhante à produção após o crescimento sob oxigenação, uma vez que a degradação da lignina é conhecida como um processo altamente oxidativo.

A capacidade de produção de enzimas ligninolíticas sob condições aeróbica e microaerofílica pode conferir ao microrganismo vantagens para a sua sobrevivência em seu meio natural, proporcionando a este uma maior versatilidade em relação aos estritamente aeróbicos ou anaeróbicos. A produção de enzimas do sistema ligninolítico sob condição microaerofílica, indica a possibilidade de degradação da lignina não apenas sob condição aeróbica mas também sob condição de baixa concentração de oxigênio, ampliando assim as possibilidades de aplicação desses microrganismos e/ou enzimas

6. CONCLUSÕES

- A produção de enzimas em condições variadas de oxigenação pode conferir ao microrganismo vantagens para a sua sobrevivência em comparação aos estritamente aeróbios ou anaeróbios. As dez linhagens fúngicas iniciais, utilizadas nesse estudo, foram capazes de produzir enzimas ligninolíticas em condição aeróbica com e sem agitação, e em condição microaerofílica, quando crescidas em substrato celulósico (papel de filtro). Os melhores resultados foram obtidos com as linhagens Q10 (*Trichocladium canadense*), LH5 (deuteromiceto), LD (*Geotrichum* sp), 20 (deuteromiceto) e H2 (basidiomiceto). A manganês peroxidase (MnP), de uma maneira geral, foi a enzima produzida em maior quantidade em meio contendo papel de filtro, seguida pela produção das enzimas lacase e lignina peroxidase (LiP).
- A produção de enzimas ligninolíticas para os seis tipos de substratos utilizados como fonte de carbono, sob condição de baixa oxigenação, apresentou-se de maneira diferenciada. Em meios contendo álcool veratrílico, xilana, serragem e bagaço de cana, houve melhor produção da enzima MnP. Para os meios contendo ácido lignosulfônico e ácido lignosulfônico dialisado, as enzimas LiP e álcool veratrílico oxidase (AVO) apresentaram, de maneira geral, melhores atividades. Tanto lacase quanto peroxidases foram produzidas em baixos níveis pelas cinco linhagens, para todos os seis diferentes substratos estudados.
- Os meios contendo como fonte de carbono papel de filtro, serragem e bagaço de cana, cultivados por 6 dias sob condição aeróbica com agitação, apresentaram melhores atividades para a enzima MnP, sendo a máxima atividade de lacase em meio contendo papel de filtro e de LiP em meio contendo bagaço de cana.

- De maneira geral, foi obtido um aumento de produção das enzimas ligninolíticas LiP e AVO quando os microrganismos foram cultivados em meios contendo papel de filtro, serragem e bagaço de cana, após a mudança de condição de crescimento de agitação para microaerofílica; o que não foi observado para a enzima MnP, que apresentou diminuição da atividade sob essas condições.
- Em meios onde o ácido lignosulfônico foi utilizado como fonte de carbono, as linhagens apresentaram melhores resultados de produção enzimática quando esse substrato foi dialisado. Observou-se através de CLAE que um maior número de linhagens foi capaz de degradar o ácido lignosulfônico do meio quando este era previamente dialisado.
- Com relação à capacidade de fermentação do material lignocelulósico (serragem e bagaço de cana) os resultados foram melhores em meio contendo serragem onde o etanol foi detectado em um maior número de caldos de cultivo analisados. A produção de enzimas ligninolíticas também foi melhor para esse substrato, sugerindo a influência dessas enzimas na degradação e posterior fermentação.
- Os fungos imperfeitos e a levedura utilizados nesse estudo, além de serem celulolíticos apresentaram potencial ligninolítico em diferentes condições de oxigenação, sugerindo que a macromolécula de lignina possa ser degradada também por outros tipos de fungos que não sejam basidiomicetos e sob condição de baixa oxigenação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, E. (1977) Lignin Chemistry-Past, Present and Future. Wood Sci. Technol., 11: 169-218.
- Ainsworth, G. C. e Sussman, A. S. (1968) The Fungi an Advanced Treatise Vol. 3. The Fungal Population. Academic Press, New York, London.
- Aitken, M.D. e Irvine, R.L. (1990) Characterization of Reactions Catalyzed by Manganese - peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys., 276: 405-414.
- Akin, D.E. (1987) Association of rumen fungi with various forage grasses. Anim. Feed Sci. Technol., 16: 273-285.
- Akin, D. E. e Rigsby, L. L. (1987) Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen. Appl. Environ. Microb., 53: 1987-1995.
- Akin, D. E., Borneman, W. S. e Windham, W. H. (1988) Rumen fungi : morphological types from Georgia cattle and attack on forage cell walls. BioSystems, 21: 385-391.
- Akin, D. E.; Lyon, C.E.; Windham, W.R. e Rigsby, L.L. (1989) Physical degradation of lignified stem tissues by ruminal fungi. Appl. Environ. Microbiol., 55: 611.
- Akin, D. E. e Borneman, W. S. (1990) Role of rumen fungi in fiber degradation. J. Dairy Sci., 73: 3023-3032.
- Akin, D.E.; Sethuraman, A.; Morrison, W.H.; Martin, S.A. e Eriksson, K-E.L. (1993). Microbial Delignification With White Rot Fungi Improves Forage Digestibility. Appl. And Environm. Microbiol., 59 (12): 4274-4282.

- Barr, D.P. e Aust, S.D. (1994) Conversion of Lignin Peroxidase Compound III to Active Enzyme by Cationic Radicals. Arch. Biochem. Biophys., 312: 511-515.
- Bauchop, T. (1989) Biology of gut anaerobic fungi. BioSystems, 23: 53-64.
- Blanchette, R. A. (1991) Delignification by wood-decay fungi. Annu. Rev. Phytopathol., 29: 381-398.
- Bogan, B.W. e Lamar, R. T. (1996) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and Its Extracellular Ligninolytic Enzymes. Appl. Environ. Microbiol., 62 (5) : 1597-1603.
- Bollag, J. M. e Leonowicz, A. (1984) Comparative studies of extracellular fungal laccases. Appl. Environ. Microbiol., 48: 849-854.
- Bollag, J. M., Shuttleworth K. L. e Anderson, D. H. (1988) Laccase mediated detoxification of phenolic compounds. Appl. Environ. Micro., 54 : 3086 - 3091.
- Bourbonnais, R. e Paice, M.G. (1990) Oxidation of non-phenolic substrates an expanded role of laccase in lignin biodegradation. FEBS Lett., 267: 99-102.
- Boyle, C.D; Kropp, B.R. e Reid, I.D. (1992) Solubilization and Mineralization of Lignin by White Rot Fungi. Appl. and Environm. Microbiol., 58 (10): 3217
- Buswell, J.A. e Hatfield, W.D. (1938) Anaerobic Fermentation, State of Illinois, Dept. of Registration and Education, Division of State Water Survey Bull. No. 32, 238p., Urbana, IL.
- Buswell, J. A. e Odier, E. (1987) Lignin Biodegradation. CRC Crit. Rev. Biotechnol., 6: 1-60.
- Buswell, J.A.; Cai, Y. e Chang, S. (1995) Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. FEMS Microbiol. Lett., 128: 81-88.

- Buttler, T.; Gorton, L.; Jarskog, H.; Marko-Varga, G.; Hahn-Hägerdal, B.; Meinander, N. e Olsson, L. (1994) Monitoring of Ethanol During Fermentation of a Lignocellulose Hydrolysate by On-Line Microdialysis Sampling, Collun Liquid Chromatography, and an Alcohol Biosensor. Biotechnology and Bioengineering, 44: 322-328.
- Cai, D. e Tien, M. (1993) Lignin-Degrading Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biotechnol., 30: 70-90.
- De Jong, E., Field, J. A. e De Bont, J. A. M. (1994) Aryl Alcohols in the Physiology of Ligninolytic Fungi. FEMS Microbiol. Rev., 13:153-188
- Dey, S., Maiti, T.K. e Bhattacharyya, B.C. (1994) Production of Some Extracellular Enzymes by a Lignin Peroxidase-Production Brown Rot Fungus, *Polyporus ostreiformis*, and Its Comparative Abilities for Lignin Degradation and Dye Decolorization. Appl. Environ. Microbiol., 60: 4216-4218.
- Dill, I. e Kraepelin, G. (1986) Palo podrido: Model for extensive delignification wood by *Ganoderma applanatum*. Appl. Environ. Microbiol. 52: 1305 - 1312.
- Durrant, L.R., Canale-Parola, E. e Leschine, S.B. (1995) Facultatively anaerobic cellulolytic fungi from soil. In: The significance an regulation of soil biodiversity. p.161-167. Netherlands: Kluwer Academic Publishers
- Durrant, L.R. (1996) Ethanol Production from Cellulose by Two Lignocellulolytic Soil Fungi. Appl. Bioch. and Biotechnol., 57/58: 401-406.
- Enoki, A. e Takahashi, M. (1983) Metabolism of lignin-related compounds by various wood-decomposing fungi. Recent Advances in Lignin Biodegradation Research. Tokyo: Uni, p. 119-133.
- Enoki, A., Takahashi, M., Tanaka, H., Fuse, G. (1985) Degaradation of lignin - related compounds and wood components by white-rot and brown - rot fungi. Mokusai Gakkaishi, 31: 397-408.

- Eriksson, K-E., Blanchette, R. A. e Ander, P. (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, New York.
- Eriksson, K-E. (1991) Lignin Biodegradation and Practical Utilization. J. of Biotechnology, 30: 149-158.
- Erwin, E.J.; De Jong, E. e Field, J.A. (1993). Stimulation of Lignolytic Peroxidase Activity by Nitrogen Nutrients in the White Rot Fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55. Appl. And Environm. Microbiol., 59 (12): 4031-4036.
- Evans, C.S. (1985) Laccase activity in lignin degradation by *Coriolus versicolor*: *in vivo* and *in vitro* studies. FEMS Microbiol. Lett., 27: 339-343.
- Faison, B. D. e Kirk, T. K. (1985) Factors involved in the regulation of ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., 49: 229-304.
- Fenn, P. e Kirk, T. K. (1981) Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 130: 59-65.
- Fukushima, Y. e Kirk, T.K. (1995) Laccase Component of the *Ceriporiopsis subvermispora* Lignin-Degrading System. Appl. And Environm. Microbiol., 61 (3): 872-876.
- Glasser, W. G. e Glasser, H. R. (1981) The evaluation of lignin's chemical structure by experimental and computer simulation techniques. Paperi Ja Puu, 63 (2): 71-83.
- Glenn, J. K. e Gold, M. H. (1985) Purification and Characterization of an Extracellular Mn(II) - dependent Peroxidase from the Lignin-degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys., 242: 339-341.

- Glenn, J.K., Akileswaran, L. e Gold, M.H. (1986) Mn (II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys., 251: 688-696.
- Gold, M. H., Glenn, J. K., Mayfield, M. B., Morgan, M. A., Kutsuki, H. (1983) Biochemical and genetic studies on lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Recent Advances in Lignin Biodegradation Research. Tokyo: Uni, p. 219-232.
- Gold, M. H., Wariishi, H., Valli, K. (1989) Extracellular Peroxidases Involved in Lignin Degradation by the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In: Biocatalysis in Agrocultural Biotechnology. (Whitaker, J. R., Sonnet, P. E. eds). ACS Symp. Series, Am. Chem. Soc., Whashington, DC., 389: 127-140.
- Gold, M.H. e Alic, M. (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiol. Rev., 57: 605-622.
- Grisebach, H. (1981) In: The Biochemistry of Plants (Stumpf, P.K. Conn, E.E. eds), Vol. 7, p. 457, New York: Academic Press.
- Hackett, W. F., Connors, W. J., Kirk, T. K. e Zeikus, J. H. (1977) Microbial Decomposition of Synthetic ¹⁴C-Labeled Lignins in Nature: Lignin Biodegradation in a Variety of Natural Materials. Appl. Environ. Microbiol., 33: 43-51.
- Hatakka, A. (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiol. Rev., 13: 125-135.
- Hammel, K.E., Tien, M., Kalyanaraman, B. e Kirk, T. . (1985) Mechanisms of oxidative C - C cleavage of a lignin model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. J. Biol. Chem., 260: 8348-8353.

- Healy, J.B., Young, L.Y. e Reinhard, M. (1980) Methanogenic Decomposition of Ferulic Acid, a Model Lignin Derivative. Appl. Environ. Microbiol., 39: 436.
- Highley, T. L., Bar-Lev, S.S., Kirk, T. K. e Larsen, M.J. (1983) Influence of O₂ and CO₂ on wood decay by heartrot and saprot fungi. Phytopathol., 73: 630-633.
- Higushi, T. (1990) Lignin Biochemistry: Biosynthesis and Biodegradation. Wood Sci. Technol., 24: 23-63.
- Ishihara, T. (1980) The Role of Laccase in Lignin Biodegradation. In: Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potencial Applications, (Kirk, T.K., Higushi, T. e Chang, H.M. eds), Boca Raton, CRC Press, 2: 17-32.
- Janshekar, H. e Fiechter, A. (1983) Lignin: Biosynthesis, Aplication, and Biodegradation. Adv. in Bioch. Engeneering/Biotechnology, 119-178
- Jensen, K.F. (1969) Oxygen and carbon concentrations in sound and decaying red oak trees. Enz. Sci., 15: 246-251.
- Kersten, P.J., Tien, M., Kalyanaraman, B. e Kirk, T.K. (1985) The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. J. Biol. Chem., 260: 2609-2612.
- Kersten, P. J., Kalyanaraman, B., Hammel, K. E., Reinhammar, B. e Kirk, T. K. (1990) Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. Biochem. J., 268: 475-480.
- Kirk, T. K., Schultz, E., Connors, W. J., Lorenz, L. F. e Zeikus, J. G. (1978) Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 117: 277-285.
- Kirk, T. K. e Tien, M. (1983) Biochemistry of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: Investigations with non-phenolic model

- compounds. Recent Advances in Lignin Biodegradation Research. Tokyo: Uni, p. 233-245.
- Kirk, T. K. (1984) Degradation of lignin. In: Microbial Degradation of Organic Compounds, ed. D.T. Gibson, p. 399-437. New York: Dekker.
- Kirk, T.K. e Cowling, E.B. (1984) Biological decomposition of solid wood. Adv. Chem. Ser., 207: 455-487.
- Kirk, T. K., Tien, M., Johnsrud, S. C. e Eriksson, K-E. (1986) Lignin Degrading Activity of *Phanerochaete chrysosporium* Burds: Comparision of Cellulase -negative and Other Strains. Enzyme Microbiol. Technol., 8: 75-80.
- Kirk, T. K. e Farrell, R. L. (1987) Enzymatic "Combustion": The Microbial Degradation of Lignin. Ann. Rev. Microbiol., 41: 465-505.
- Kuhad, R.C. e Singh, A(1993) Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. Critical Rev. in Biotechnol., 13(2): 151-172.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. e Gold, M.H. (1984) Separation and Characterization of Two Extracellular H₂O₂ Dependent Oxidases from Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett., 169: 247-250.
- Lai, Y.Z. e Sarkanen, K V. (1971) Isolation and structural studies. In: Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions, ed. K. V. Sarkanen, C.H Ludwig, Ch. 5, p. 165-240.
- Leatham, G.F. (1986) The Ligninolytic Activities of *Lentinnus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24: 51- 58.
- Leisola, M.S.A., Kozulic, B., Meusdoerffer, F. e Fiechter, A. (1987) Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem., 262: 419-424.
- Lewis, N. G. e Yamamoto, E. (1990) Lignin: Occurrence, Biogenesis and Biodegradation. Ann. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol., 41: 455-496

- Lundquist, K. e Kristersson, P. (1985) Exhaustive laccase-catalysed oxidation of a lignin compound (vanillyl glycol) produces methanol and polymeric quinoid products. Biochemistry J., 229: 277-279.
- Marzullo, L.; Cannio, R.; Giardina, P.; Santini, M.T. e Sanna, G. (1995) Veratryl Alcohol Oxidase from *Pleurotus ostreatus* Participates in Lignin Biodegradation and Prevents Polymerization of Laccase-oxidized Substrates. The Journal of Biological Chemistry, 270 (8): 3823-3827.
- Mayer, A. M. (1987) Polyphenol oxidases in plants- recent progress. Phytochemistry, 26: 11-20.
- Nimz, H. (1974) Beech lignin-proposal of a constitutional scheme. Angew Chem. Int. Ed. 13(5): 313-321.
- Olsson, L. e Hahn-Hägerdal, B. (1996) Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates for Ethanol Production. Enzyme and Microbial Technology, 18: 313-331.
- Orpin, C.G. (1975) Studies on the rumen flagellate *Neocallimatis frontalis*. J. of Gen. Microbiol., 91: 249.
- Orpin, C.G. (1977) The Rumen Flagellate *Piromonas communis*: Its Life-history and Invasion of Plant Material in the Rumen. Journal of General Microbiology, 99: 107-117.
- Orpin, C.G. (1983) The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell wall. Anim. Feed Sci. Technol., 10: 121.
- Orpin, C.G. (1988) Nutrition and biochemistry of anaerobic Chytridiomycetes. BioSystems, 21: 365-370.
- Orth, A. B., Royse, D. J., Tien, M. (1993) Ubiquity of Lignin - Degrading Peroxidases Among Various Wood - Degrading Fungi. Appl. Environ. Microbiol., 59: 4017-4023.

- Pavarina, E.C. (1996) Seleção de Fungos Capazes de Degradar Material Lignocelulósico Sob Condições Aeróbica e Microaeróbica. Anais do Workshop sobre biodegradação, Campinas, SP. ISSN 1413: 248.
- Pavarina, E.C. (1997) Estudos dos Sistemas Celulolítico e Fermentativo de Fungos Microaeróbios Facultativos. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.
- Paszczynski, A., Huynh, V-B. e Crawford, R. (1985) Enzymatic Activities of an Extracellular, Manganese-dependent Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Lett., 29: 37-41.
- Périé, F. e Gold, M.H.(1991) Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white-rot fungus *Dichomitus squalens*. Appl. Environ. Microbiol., 57: 2240-2245.
- Rao, M.; Deshpande, V.; Keskar, S. e Srinivasan, M.C. (1983) Cellulase and Ethanol Production from Cellulose by *Neurospora crassa*. Enzyme Microb. Technol., 5: 133-136.
- Reddy, C.A. e D'Souza, T.M. (1994) Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Rev., 13: 137-152.
- Reid, I.D. (1983) Effects of nitrogen supplements on degradation of aspen wood lignin and carbohydrate components by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 830-837.
- Reid, I.D. e Seifert, K.A. (1982) Effect of an atmosphere of oxygen on growth, respiration and lignin degradation by white rot fungi. Can. J.Bot., 60: 252-260.
- Reinhammar, B. (1984) Laccase: In: Copper Proteins and Copper Enzymes. (Lontie, R.L. ed), Boca Raton, CRC Press, 3: 2-35.

- Renganathan, V., Miki, K. e Gold, H. (1985) Multiple molecular forms of diaryl-propane oxygenase, an H_2O_2 -requiring, lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys., 342: 304-314.
- Schoemaker, H.E., Lundell, T., Hatakka, A. e Piontek, K. (1994) The oxidation of Veratryl Alcohol, Dimeric Lignins Models and Lignin by Lignin Peroxidase: The Redox Cycle Revisited. FEMS Microbiol.Rev., 13:21-332.
- Szklark, G.D., Antibus, R.K., Sinsabaugh, R.L. e Linkins, A.E.(1989) Production of Phenoloxidases and Peroxidases by Wood-rotting Fungi. Mycol., 81: 324-240.
- Vogels, G.D. (1991) Comparison of growth characteristics of anaerobic fungi isolated from ruminant and non-ruminant herbivores during cultivation in a defined medium. Journal of General Microbiology, 137: 1401-1408.
- Teunissen, M.J. e Op den Camp, H.J. (1993) Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. Antonie Van Leeuwenhoek, 63: 63-76.
- Thurston, C. F. (1994) The Structure and Function of Fungal Laccases. Microbiol. (UK), 140: 19-26.
- Tien, M. e Kirk, T.K.(1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science, 221: 661-663.
- Tien, M. e Kirk, T. K. (1984) Lignin-degrading Enzyme from *Panerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H_2O_2 -requiring Oxygenase. Proc. Nat.Acad. Sci.USA 81: 2280-2284.
- Trinci, A P.J.; Lowe, S.E.; Milne, A. e Theodorou, M.K. (1988) Growth and survival of rumen fungi. BioSyetems, 21: 357-363.
- Ueng, P.P. e Gong, C. (1982) Ethanol production from pentoses and sugar-cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Mucor* and *Fusarium* species. Enzyme Microb. Technol., 4: 169-171.

- Ulmer, D. C., Leisola, M. S. A., Schmidt, B. H., Fiechter, A. (1983) Rapid degradation of isolated lignins by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1795-1801.
- Valmasseda, M.; Martínez, M.J. e Martínez, A. (1991) Kinetics of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus* - lignin and polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. Appl. Microbiol. Biotechnol., 35: 817-823.
- Wariishi, H., Dunford, H.B., Mac Donald, I.D. e Gold, M.H. (1989) Manganese Peroxidase from the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Transient State Kinetics and Reaction Mechanism. J. Biol. Chem., 265: 3335-3340.
- Wariishi, H., Valli, K. e Gold, M. H. (1992) Manganese (II) Oxidation by Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem., 267: 23688-23695.
- Webb, J. e Theodorou, M. K. (1988) A rumen anaerobic fungus of the genus *Neocallimastix*: ultrastructure of the polyflagellate zoospore and young thallus. BioSystems, 21: 393-401.
- Wubah, D.A; Akin, D.E. e Bonnerman, W.S. (1993) Biology, Fiber-Degradation, and Enzymology of Anaerobic Zoosporic Fungi. Critical Reviews in Microbiology, 19 (2): 99-115.
- Wyman, C. E. (1994) Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Technology, Economics, and Opportunities. Bioresource Technology, 50: 3-16.
- Yu, H-S. e Eriksson, K-E. (1985) Influence of oxygen on the degradation of wood and straw by white-rot fungi. Svensk. Papperrstidn., 88: 57-60.
- Zeikus, J. G. (1980) In: Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potencial Aplications (Kirk, T.K., Higuchi, T., Chang, H-M. eds), V. 1 p.101. Florida: CRC Press.

APÊNDICE

Valores das atividades enzimáticas

Tabela 5. Atividade de MnP e de LiP das dez linhagens de fungos iniciais crescidas por 7, 15, 22 e 30 dias a 30°C, em meio contendo papel de filtro, sob condição aeróbica sem agitação.

Fungo	MnP (UI/L)				LiP (UI/L)			
	7 dias	15 dias	22 dias	30 dias	7 dias	15 dias	22 dias	30 dias
Q10-T	13,8	0,22	17,8	0	0	0	0	0
LH5-T	0,44	1,5	0	2,8	0	0	0,18	0,035
LD-T	8,43	27,48	17,7	3,67	0	0	0	0
20-T	0	0	0	0,27	0,05	0,035	0,053	0
FOR-T	0	4,9	6,4	3,5	0	0	0	0
30-T	0	0	5,15	2,5	0	0	0	0,35
5-T	0	0	3,3	11,07	0	0,009	0	0
H2-T	4,7	0	0	3,2	0	0	0	0
D7-T	4,0	2,15	0	1,65	0	0	0	0
L71-T	18,3	0	0	0,35	0	0	0	0
Q10-E	6,14	6,14	0	2,06	0	0	0,23	0
LH5-E	4,97	2,28	11,6	8,7	0	0,358	0	0
LD-E	0	14,17	33,4	6,63	0,017	0,053	0	0,017
20-E	0	0,58	0	1,07	0,035	0	0,44	0
FOR-E	0	0	12,1	0,27	0,05	0,018	1,15	0,062
30-E	0	0	6,8	0	0	0	0	0,17
5-E	4,7	0	3,8	14,0	0	0	0	0,026
H2-E	7,3	0	0	13,18	0	0,009	0	0,08
D7-E	15,5	0	0	0	0	0	0	0
L71-E	18,4	0	5,5	0,53	0	0	0	0

T = tubo de ensaio; E = Erlenmeyer

Tabela 6. Atividade de lacase e peroxidases das dez linhagens de fungos iniciais crescidas por 7, 15, 22 e 30 dias a 30° C, em meio contendo papel de filtro, sob condição aeróbica sem agitação.

Fungo	LACASE (UI/L)				PEROXIDASES (UI/L)			
	7 dias	15 dias	22 dias	30 dias	7 dias	15 dias	22 dias	30 dias
Q10-T	0,035	0,064	0,032	0,85	0,075	0,003	0,016	0,12
LH5-T	0,06	0,012	0,034	0,28	0,043	0	0,033	0,2
LD-T	0,488	0,014	0	0,1	0,114	0,01	0	0
20-T	0,1	0	0,007	0,1	0,016	0,01	0	0,01
FOR-T	0,003	0	0,033	0,07	0,1	0	0	0
30-T	0,006	0	0,029	0,09	0	0,046	0,36	0,45
5-T	0,07	0	0	1,2	0	0,016	0	0,4
H2-T	0,14	0	0	0	0,01	0	0,43	0,05
D7-T	0,06	0,15	0,09	0	0	0	0	0
L71-T	0	0,088	0,48	0,5	0	0,023	0,09	0,24
Q10-E	0,096	0	0,032	1,01	0,13	0	0,055	0,05
LH5-E	0	0,078	0	0,5	0,034	0,006	0	1,0
LD-E	0,016	0	0,035	0	0	0,05	0,01	0
20-E	0,12	0	0,018	0,065	0,11	0	0,023	0,23
FOR-E	0,137	0	0	0,3	0	0,082	0,02	0,42
30-E	0,14	0	0,27	0,25	0,078	0	0,8	0,46
5-E	0,032	0,03	0,22	0,15	0,035	0,027	0,42	0,26
H2-E	0,075	0,07	0,16	1,028	0,021	0	0	0,05
D7-E	0	0	0,52	0	0,038	0	0,61	0,53
L71-E	0,11	0	0,45	0	0	0,22	0,038	0,32

T = tubo de ensaio; E = Erlenmeyer

Tabela 7. Atividade de AVO das dez linhagens de fungos iniciais crescidas por 7, 15, 22 e 30 dias a 30°C, em meio contendo papel de filtro, sob condição aeróbica sem agitação.

Fungo	AVO (UI/L)			
	7 dias	15 dias	22 dias	30 dias
Q10-T	0	0	0	0
LH5-T	0	0	0	0
LD-T	0	0	0,036	0
20-T	0	0	0,027	0
FOR-T	0	0	0,08	0
30-T	0	0	0	0,009
5-T	0	0	0	0
H2-T	0	0	0	0
D7-T	0	0	0	0
L71-T	0	0	0	0
Q10-E	0	0,044	0	0
LH5-E	0,026	0	0	0
LD-E	0	0,5	0,027	0,11
20-E	0	0,018	0,09	0,018
FOR-E	0	0,035	0,018	0,026
30-E	0	0	0,018	0,045
5-E	0,07	0,035	0	0
H2-E	0	0,116	0	0
D7-E	0	0	0	0
L71-E	0	0	0	0

T = tubo de ensaio; E = Erlenmeyer

Tabela 8. Atividade de MnP e de LiP das dez linhagens de fungos iniciais crescidas por 4, 6 e 10 dias a 30°C, em meio contendo papel de filtro, sob condição aeróbica com agitação.

Fungo	MnP (UI/L)			LiP (UI/L)		
	4 dias	6 dias	10 dias	4 dias	6 dias	10 dias
Q10-E	5,7	2,15	6,1	0	0	0,18
LH5-E	1,12	2,1	6,4	0	0	0,11
LD-E	2,5	1,9	3,0	0	0	0
20-E	3,85	2,1	10,5	0	0,017	0
FOR-E	3,25	1,03	3,3	0	0	0,18
30-E	0,9	3,2	0	0	0	0
5-E	0	0	2,3	0	0	0
H2-E	0,54	0	0	0,08	0	0
D7-E	2,1	3,5	0	0,045	0	0
L71-E	0	0,5	2,8	0	0	0

E = Erlenmeyer

Tabela 9. Atividade de lacase e peroxidases das dez linhagens de fungos iniciais crescidas por 4, 6, e 10 dias a 30° C, em meio contendo papel de filtro, sob condição aeróbica com agitação.

Fungo	LACASE (UI/L)			PEROXIDASES (UI/L)		
	4dias	6 dias	10 dias	4 dias	6 dias	10 dias
Q10-E	0,6	1,4	1,3	0	0,04	0
LH5-E	0,65	1,25	0,8	0,7	0,21	0,63
LD-E	0,13	0,2	0,11	0	0,023	0,11
20-E	0,47	0,74	0,61	0	0,014	0,4
FOR-E	0,53	0,3	0,017	0,55	0,3	0,61
30-E	0,24	0,2	0,3	0,17	0,85	0
5-E	0,43	0,5	0,67	0,09	0,27	0,5
H2-E	0,012	0,25	0,28	0	0,6	0,31
D7-E	0,07	0	0	0,13	0	0,58
L71-E	0,63	0,63	0,24	0,012	0,38	0,12

E = Erlenmeyer

Tabela 10. Atividade de AVO das dez linhagens de fungos iniciais crescidas por 4, 6, e 10 dias a 30°C, em meio contendo papel de filtro sob condição aeróbica com agitação.

Fungo	AVO (UI/L)		
	4 dias	6 dias	10 dias
Q10-T	0	0	0,18
LH5-T	0	0	0,11
LD-T	0	0	0
20-T	0	0,017	0
FOR-T	0	0	0,18
30-T	0	0	0
5-T	0	0	0
H2-T	0,08	0	0
D7-T	0,045	0	0
L71-T	0	0	0

T = tubo de ensaio

Tabela 11. Atividade de MnP e de LiP das dez linhagens de fungos iniciais crescidas por 7, 15, 22 e 30 dias a 30°C, em meio contendo papel de filtro, sob condição microaerofílica.

Fungo	MnP (UI/L)				LiP (UI/L)			
	7 dias	15 dias	22 dias	30 dias	7 dias	15 dias	22 dias	30 dias
Q10-T	0	1,88	0	0	0	0	0	0
LH5-T	0,6	2,6	0,62	3,99	0	0	0	0
LD-T	4,8	0,5	4,17	0,18	0	0,009	0	0
20-T	9,8	0	0	0	0	0,044	0	0
FOR-T	8,8	0	2,73	2,73	0	0,071	0,09	0
30-T	1,6	0,53	2,6	2,6	0,045	0	0	0
5-T	1,55	0	0	0	0	0	0	0
H2-T	2,25	1,56	1,12	0	0	0	0	0,035
D7-T	1,03	0,76	0,13	0,13	0	0	0	0
L71-T	3,1	0	0,27	0,27	0	0	0	0

T = tubo de ensaio

Tabela 12. Atividade de lacase e peroxidases das dez linhagens de fungos iniciais crescidas por 7, 15, 22 e 30 dias a 30° C, em meio contendo papel de filtro, sob condição microaerofílica.

Fungo	LACASE (UI/L)				PEROXIDASES (UI/L)			
	7 dias	15 dias	22 dias	30 dias	7 dias	15 dias	22 dias	30 dias
Q10-T	1,2	0,06	0,72	0	0	0,3	0	0,12
LH5-T	0	0,018	0,83	0,22	0,02	0,015	0,89	0,87
LD-T	0,01	0,005	0	0,33	0,05	0,025	0,25	0,2
20-T	0	0,018	1,0	0	0,1	0,045	0,06	0
FOR-T	0	0	1,0	0	0,025	0,33	0,4	0,76
30-T	0,62	0,4	0,09	0,25	0,35	0,34	0	0,26
5-T	0,42	0	0,4	0	0,05	0	0	0,012
H2-T	0	0,4	0,58	0,09	0,28	0,3	0,19	1,32
D7-T	0,51	0,17	0	0,04	0	0,14	0,2	0,76
L71-T	0,45	0	0,58	0	0,08	0,46	0	0,04

T = tubo de ensaio

Tabela 13. Atividade de AVO das dez linhagens de fungos iniciais crescidas por 7, 15, 22 e 30 dias a 30° C, em meio contendo papel de filtro sob condição microaerofílica.

Fungo	AVO (UI/L)			
	7 dias	15 dias	22 dias	30 dias
Q10-T	0	0	0	0
LH5-T	0	0	0	0
LD-T	0	0	0	0
20-T	0	0,018	0	0
FORT	0,1	0,027	0	0
30-T	0	0	0	0
5-T	0	0	0	0
H2-T	0	0	0	0
D7-T	0	0	0	0
L71-T	0	0	0	0

T = tubo de ensaio

Tabela 14. Atividade de LiP, MnP, lacase, peroxidases e AVO das cinco linhagens selecionadas crescidas em Erlenmeyer, por 20 e 35 dias a 30° C, em diferentes meios, sob condição microaerofílica.

Fungo	Atividade após 20 dias (UI/L)					Atividade após 35 dias (UI/L)				
	LiP	MnP	Lacase	Peroxid	AVO	LiP	MnP	Lacase	Peroxid	AVO
LH5-A	0	4,4	0	0,08	0	0	6,0	0,14	0,13	0,08
H2-A	0	9,2	0,44	0	0	0	1,8	0,16	0,38	0
LD-A	0	13,3	0,48	0	0	0,009	0	0,46	0,33	0
20-A	0	1,2	0,4	0,14	0	0	2,0	0,47	0,003	0
Q10-A	0	9,37	0	0	0	0	2,0	0	0	0,018
LH5-B	17,8	0,27	0,53	0,022	3,06	14,7	1,61	0,046	0	6,5
H2-B	0,08	0	0,4	0,39	4,18	2,9	3,4	0,098	0,027	10,5
LD-B	0,37	1,25	0,38	0,21	2,44	2,6	0,76	0,24	0,24	4,7
20-B	3,47	2,7	0,16	0,18	4,15	0	0,18	0,29	0,032	0
Q10-B	0	0	0	0	0	8,13	2,8	0,07	0,03	2,2
LH5-C	13,2	6,0	0	0,077	8,8	1,93	3,54	0	0,016	12,0
H2-C	1,66	0	0,35	0	2,8	2,6	2,55	0,11	0	8,4
LD-C	2,8	1,3	0,36	0,15	0	4,6	2,73	0,16	0	4,0
20-C	5,0	0,67	0,016	4,13	12,2	0	1,07	0,6	0,32	4,13
Q10-C	0,36	11,2	0	0,73	8,51	2,36	0,67	0,12	0	10,8
LH5-D	0	1,8	1,12	0,085	0	0	0	0,54	0	0
H2-D	0	0	0,037	0	0	0	0	0,75	0	0
LD-D	0	0	0	0,009	0	0	1,34	0,062	0	0
20-D	3,0	7,44	1,0	0	0	0	0,062	0	0	0
Q10-D	0	0,9	0,9	0	0	0	4,88	0	0	0
LH5-E	0,77	1,48	0,37	0,2	0,66	0,33	3,54	0,49	0	0,43
H2-E	0,197	4,4	0,25	0,4	0,24	0,25	3,31	0,065	0	0
LD-E	0,86	2,24	0,28	0,4	0,81	0,11	3,18	0,25	0,095	0,3
20-E	0,09	0	0,46	0,14	0,035	0,14	3,58	0,25	0,29	0,06
Q10-E	0	0	0,125	0,74	0	0,02	0	0,03	0,018	0

Tabela 14. continuação

LH5-F	0	0,085	0,24	0,66	0,018	0	0	0,07	0	0
H2-F	0	0	0,33	0,74	1,03	0	0	0	0,1	0,06
LD-F	0,06	3,4	0,025	0	0	0,06	1,2	0,21	0	0,22
20-F	0	1,35	0	0,17	0	0,37	1,3	0,18	0	0
Q10-F	0	7,17	0,09	0	0	0,35	1,8	0,022	0	0,014

A = álcool veratrílico; B = ácido lignosulfônico; C = ácido lignosulfônico dialisado; D = xilana; E = serragem; F = bagaço de cana.

Tabela 15. Atividade de LiP, MnP, lacase, peroxidases e AVO, das cinco linhagens selecionadas, crescidas em Erlenmeyer por 6 dias a 30°C, em diferentes meios sob condição aeróbica com agitação; e crescidas por 20 dias sob condição aeróbica com agitação (6 dias) mais condição microaerofílica (14 dias).

Fungo	Condição aeróbica com agitação (UI/L)					Condição aeróbica com agitação e microaerofílica (UI/L)				
	LiP	MnP	Lacase	Peroxid	AVO	LiP	MnP	Lacase	Peroxid	AVO
LH5-S	0	0	0,06	0	0	1,469	0	0	0	0
H2-S	0	4,48	0	0,248	0	0	0,22	0	0	0
LD-S	0	2,96	0	0	0	0	0,78	0,006	0,054	0,304
20-S	0	1,97	0,233	0,233	0	0	0	0,003	0	0,017
Q10-S	0	3,27	0	0,357	0	0,157	0	0	0	0
LH5-B	0	0,134	0	0,366	0	0,609	0	0,09	0,074	0,25
H2-B	0,976	3,58	0,242	0	0,18	0	0	0,035	0	2,22
LD-B	0	2,017	0,194	0,267	1,0	0	0	0	0	0
20-B	0	0	0	0,312	0,026	0	0	0,08	0,012	0
Q10-B	1,236	10,98	0	0,101	0	0	0	0,033	0,096	0,089
LH5-P	0	2,15	1,43	0,21	0	0	0	0,057	0,08	0
H2-P	0	0	0,25	0,6	0	1,7	0	0	0	0
LD-P	0	2,47	0,21	0,028	0	0	0	0	0	0
20-PF	0,0005	2,1	0,746	0,014	0,018	1,54	0	0,044	0	0
Q10-P	0	2,15	1,41	0,04	0	1,22	0	0	0	0,295

S = serragem; B = bagaço de cana; P = papel de filtro.