



UNICAMP

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

BIOCONVERSÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR FUNGOS LIGNINOLÍTICOS

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por FABIANA ANDRÉ FALCONI aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de fevereiro de 1998.

Campinas, 19 de fevereiro de 1998.


Profa. Dra. LÚCIA R. DURRANT
Presidente da Banca

Fabiana André Falconi

Farmacêutica-Bioquímica

Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Regina Durrant

Orientadora

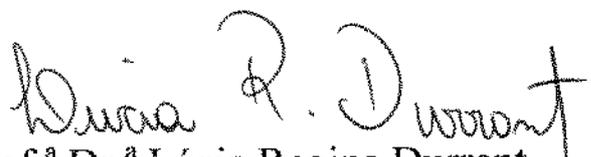
Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas, fevereiro de 1998

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

808204

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Lúcia Regina Durrant

(ORIENTADORA)


Dr.^a Tânia Akiko Anazawa

(MEMBRO)


Dr.^a Eliana Pereira Chagas

(MEMBRO)

Prof. Dr. Fumio Yokoya

(MEMBRO)

É melhor tentar e falhar

Que preocupar-se e ver a vida passar.

É melhor tentar ainda em vão

Que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,

que em dias tristes em casa me esconder.

Prefiro ser feliz, embora louco

Que em conformidade viver.

Martin Luther King

À minha mãe,

*Pelo incentivo e apoio constantes e pelo exemplo de força e
coragem que tenho recebido em todos os momentos de minha vida.*

Ao meu irmão e à minha avó

Dedico

Agradecimentos

A DEUS, que me deu a liberdade, a inteligência e a força de lutar pela conquista de minhas realizações.

À Prof^{ra}. Dr^a. Lucia Regina Durrant, minha orientadora, pela orientação, competência, dedicação e incentivo durante esta etapa.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

À Banca Examinadora, Dr. Prof. Fumio Yokoya, Dr^a. Tânia Akiko Anazawa, Dr^a. Eliana Pereira Chagas, pelas valiosas correções.

À Margareth, pela competência e paciência.

Ao pessoal da Biblioteca, do Microcentro e ao Jonas do Xérox, pela disposição e colaboração.

À Dani e ao Hamilton, pela amizade, colaboração e ajuda na parte prática.

À Dona Noberta, pela dedicação e valioso serviço.

Ao pessoal do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, em especial à Eliana e Edilsa, pela colaboração e amizade.

Aos amigos Heloísa, Chico, Paty, Marcelo Thomazini, Adriana, Ana Lúcia, Egito, Tereza, Evelise, Rosi, Janice, Sandra, pela amizade e em especial, à Cris pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Às amigas Dani e Giselle, pelas alegrias e força nos momentos de frustrações e angústias que passamos juntas.

Ao Carlos, pelo carinho, apoio, colaboração, compreensão e paciência.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. LIGNINA.....	5
2.2. SISTEMA ENZIMÁTICO LIGNINOLÍTICO:	7
2.2.1. <i>Peroxidases</i>	7
2.2.1.1. <i>Lignina Peroxidase (LiP; EC 1.11.1.7)</i>	8
2.2.1.2. <i>Peroxidase dependente de manganês (MnP; EC 1.11.1.7)</i>	9
2.2.2. <i>Lacase (Benzenediol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2)</i>	11
2.2.3. <i>Enzimas produtoras de H₂O₂</i>	12
2.3. MICRORGANISMOS RESPONSÁVEIS PELA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS LIGNOCELULÓSICOS:.....	13
2.3.1. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	16
2.4. UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS E/OU FUNGOS LIGNINOLÍTICOS NA BIORREMEDIAÇÃO	16
2.5. COMPOSTOS FENÓLICOS E/OU MODELOS DE LIGNINA.....	19
2.5.1. <i>Ácido tânico</i>	19
2.5.2. <i>Ácido Lignossulfônico</i>	19
2.5.3. <i>Álcool Veratrílico</i>	20
2.5.4. <i>Fenol</i>	21
3 - OBJETIVOS	24

4 . MATERIAL E MÉTODO.....	25
4.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS	25
4.2. MICRORGANISMOS	25
4.3. MEIOS DE CULTURA.....	26
4.3.1. Meio de Manutenção	26
4.3.2. Meio de Produção Enzimática.....	26
4.4. INÓCULO	28
4.5. PRÉ-SELEÇÃO	28
4.5.1. 1ª etapa	28
4.5.2. 2ª etapa	29
4.6. SELEÇÃO DAS MELHORES LINHAGENS	29
4.7. EFEITO DA ADIÇÃO DE GLICOSE.....	30
4.8. DETERMINAÇÃO DE MASSA SECA	30
4.9. ATIVIDADE ENZIMÁTICA	31
4.9.1. Lacase	31
4.9.2. Peroxidases	31
4.9.3. Lignina Peroxidase (LiP).....	31
4.9.4. Álcool Veratrílico Oxidase (AVO).....	32
4.9.5. Manganês Peroxidase (MnP).....	32
4.10. DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)	33
4.11. DEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E MODELOS DE LIGNINA.....	33
4.11.1. Extração do ácido tânico	34
4.12. DEGRADAÇÃO DE FENÓIS	34
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. PRÉ-SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS	35
5.1.1. 1ª etapa	35
5.1.2. 2ª etapa	39
5.1.2.1. Condição Estacionária	39

5.1.2.1.1. <i>Ácido Tânico</i>	40
5.1.2.1.2. <i>Ácido Lignossulfônico</i>	43
5.1.2.1.3. <i>Álcool Veratrílico</i>	45
5.1.2.1.4. <i>Fenol</i>	49
5.1.2.2. <i>Condição sob Agitação</i>	51
5.2. SELEÇÃO DAS MELHORES LINHAGENS	55
5.2.1. <i>Efeito da Oxigenação</i>	55
5.2.2. <i>Efeito da adição de glicose</i>	62
5.2.2.1. <i>Sem Oxigenação</i>	62
5.2.2.2. <i>Com oxigenação</i>	69
5.2.3. <i>Massa seca das linhagens selecionadas</i>	76
5.3. DETERMINAÇÃO DE DQO	77
5.4. DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E/OU MODELOS DE LIGNINA	79
5.5. DEGRADAÇÃO DE FENÓIS	84
5.6. DISCUSSÃO FINAL.....	85
6 - CONCLUSÃO.....	88
7 –REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
8 - APÊNDICE.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula esquemática estrutural da lignina	6
Figura 2: Ciclo catalítico da lignina peroxidase.....	9
Figura 3: Ciclo catalítico da manganês peroxidase	10
Figura 4: Atividade enzimática de lacase de fungos 4a, 480, 897, 898, 984 e 1051, após 7 dias de crescimento sob condição estacionária em meio contendo ácido tânico ou ácido lignossulfônico.....	35
Figura 5: Atividade da enzima peroxidase dos fungos 4a, 480, 897, 898, 984 e 1051, após 7 dias de crescimento sob condição estacionária em meio contendo ácido tânico ou ácido lignossulfônico	36
Figura 6: Atividade da enzima lignina peroxidase dos fungos 4a, 480, 897, 898, 984 e 1051, após 7 dias de crescimento sob condição estacionária em meio contendo ácido tânico ou ácido lignossulfônico.....	37
Figura 7: Atividade da enzima álcool veratrílico oxidase dos fungos 4a, 480, 897, 898, 984 e 1051, após 7 dias de crescimento sob condição estacionária em meio contendo ácido tânico ou ácido lignossulfônico.	37
Figura 8: Atividade da enzima manganês peroxidase dos fungos 4a, 480, 897, 898, 984 e 1051, após 7 dias de crescimento sob condição	38
Figura 9: Massa seca dos fungos 4a, 897 , 898, 984 e 1051 após 7 dias de crescimento sob condição estacionária em meio contendo ácido tânico ou ácido lignossulfônico.	39
Figura 10: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e <i>PC- P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,05% de ácido tânico.....	40

Figura 11: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,1% de ácido tânico.	41
Figura 12: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,5% de ácido tânico.	42
Figura 13: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,05% de ácido lignossulfônico.....	43
Figura 14: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,1% de ácido lignossulfônico.	44
Figura 15: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,5% de ácido lignossulfônico.	45
Figura 16: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,05% de álcool veratrílico.	46
Figura 17: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,1% de álcool veratrílico.	47
Figura 18: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,5% de álcool veratrílico.	48
Figura 19: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,05% de fenol.....	49

Figura 20: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,1% de fenol.	50
Figura 21: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,5% de fenol.	51
Figura 22: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo ácido tânico, sob agitação.....	52
Figura 23: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo ácido lignossulfônico, sob agitação.....	53
Figura 24: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo álcool veratrílico, sob agitação.	53
Figura 25 Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC- <i>P. chrysosporium</i> após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo fenol, sob agitação.....	54
Figura 26: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,1% de ácido tânico.....	56
Figura 27: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos (897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i>), após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,5% de ácido tânico como fonte de carbono.	57
Figura 28: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,1% de ácido lignossulfônico.....	57

Figura 29: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,5% de ácido lignossulfônico	58
Figura 30: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,1% de álcool veratrílico.	59
Figura 31: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 7 e 10 dias crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,5% de álcool veratrílico.	60
Figura 32: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,1% de fenol.....	61
Figura 33: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,5% de fenol.....	61
Figura 34: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,1% de ácido tânico, sem oxigenação com adição de glicose.	63
Figura 35: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,5% de ácido tânico, sem oxigenação com adição de glicose.	64
Figura 36: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,1% de ácido lignossulfônico, sem oxigenação com adição de glicose.	64

Figura 37: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,5% de ácido lignossulfônico, sem oxigenação com adição de glicose.....	65
Figura 38: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,1% de álcool veratrílico, sem oxigenação com adição de glicose..	66
Figura 39: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,5% de álcool veratrílico,sem oxigenação com adição de glicose.	66
Figura 40: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,1% de fenol, sem oxigenação com adição de glicose.....	67
Figura 41: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,5% de fenol, sem oxigenação com adição de glicose.....	68
Figura 42: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,1% de ácido tânico, com oxigenação e com adição de glicose.....	70
Figura 43: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,5% de ácido tânico, com oxigenação e com adição de glicose.....	70
Figura 44: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,1% de ácido lignossulfônico, com oxigenação e com adição de glicose.....	71
Figura 45: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,5% de ácido lignossulfônico, com oxigenação e com adição de glicose.....	72

Figura 46: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,1% de álcool veratrílico, com oxigenação e com adição de glicose.	73
Figura 47: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,5% de álcool veratrílico, com oxigenação e com adição de glicose.	73
Figura 48: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,1% de fenol, com oxigenação e com adição de glicose.....	74
Figura 49: Atividade das enzimas ligninolíticas dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,5% de fenol, com oxigenação e com adição de glicose.....	75
Figura 50: Massa seca dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,5% de ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico ou fenol.....	76
Figura 51: Massa seca dos fungos 897, 898 e PC - <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,5% de ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico ou fenol, com adição de glicose.....	77
Figura 52: Cromatogramas do controle e da amostra 898, em meio contendo ácido tânico, sem adição de glicose, a 30°C.....	81
Figura 53: Cromatogramas do controle e da amostra 898, em meio contendo ácido lignossulfônico, a 30°C.	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Substratos xenobióticos e enzimas ligninolíticas produzidas por fungos e purificadas	18
Tabela 2: Fontes de fenol e compostos aromáticos relatados em efluentes industriais.....	22
Tabela 3: Valores da % de redução de DQO das linhagens 897, 898 e PC, crescido em meio contendo ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico ou fenol, por 3 e 7 dias, sem e com adição de glicose.	78
Tabela 4: Área dos picos e porcentagem de ácido tânico degradado, obtido através dos cromatogramas das linhagens 897, 898 e PC, crescidas em meio contendo ácido tânico, por 3 e 7 dias, sem e com adição de glicose.	80
Tabela 5: Área dos picos e porcentagem de ácido lignossulfônico degradado, obtido através dos cromatogramas das linhagens 897, 898 e PC, crescidas em meio contendo ácido lignossulfônico, por 3 e 7 dias, sem e com de glicose. .	82
Tabela 6: Áreas dos picos e porcentagem de fenol degradado, obtido através dos cromatogramas das linhagens 897, 898 e PC, crescidas em meio contendo fenol, por 3 e 7 dias, sem adição de glicose.....	85

RESUMO

Os fungos basidiomicetos de degradação branca apresentam um mecanismo enzimático não específico, que permite degradar não somente a lignina, mas uma série de poluentes tóxicos altamente recalcitrantes. Neste trabalho, utilizou-se o *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, considerado fungo modelo de degradação branca e duas linhagens fúngicas (897 e 898), isoladas da Reserva Ecológica Juréia-Itatins, que embora não identificadas, sabe-se que não pertencem ao grupo dos basidiomicetos. Os fungos foram crescidos em diversas condições de cultivo (estacionária, agitação, oxigenação, adição de glicose e oxigenação com adição de glicose), por 3, 7 e 10 dias, em meio contendo 0,1 ou 0,5% de ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico ou fenol como fontes de carbono. Após a medida das atividades das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase), os resultados revelaram que o melhor meio para produção enzimática foi aquele contendo 0,5% de fonte de carbono em condição estacionária sem oxigenação. A degradação dos compostos (ácido tânico, ácido lignossulfônico e fenol) contidos neste meio, foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), chegando-se à conclusão que a maior porcentagem de degradação foi a do ácido tânico pela linhagem 898. A porcentagem de redução da Demanda Química de Oxigênio (DQO), quantidade de oxigênio necessária para oxidar quimicamente a matéria orgânica, também foi determinada e chegou-se a resultados semelhantes aos encontrados por CLAE. Tanto o fungo 897 como o 898, apresentaram maiores atividades enzimáticas, porcentagem de degradação e redução de DQO, que o fungo *P. chrysosporium*.

ABSTRACT

The basidiomycetes white-rot fungi present a non-specific enzymatic mechanism, which degrades not only lignin, but also various toxic pollutants. In this work, the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, considered a model lignin degrading fungus, and two strains (897 and 898), isolated from the Jureia-Itatins Ecological Reserve were used. These two strains are not basidiomycetes. The fungi were grown under diverse conditions (stationary, agitation, oxygenation, addition of glucose and oxygenation with glucose addition), for 3, 7 and 10 days, in culture containing 0.1% or 0.5% of tannic acid, lignosulfonic acid, veratryl alcohol and phenol as carbon sources. After measuring ligninolytic activities (laccase, lignin peroxidase, manganese peroxidase, veratryl alcohol oxidase and peroxidases), the results revealed that the best medium was that containing 0.5% of the carbon source without agitation or oxygenation. The degradation of compounds (tannic acid, lignosulfonic acid and phenol) contained in this medium was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), revealing that the greatest degradation was that of tannic acid by strain 898. The percentage reduction of Chemical Oxygen Demand (COD), was also determined, showing similar results to those obtained by HPLC. Both fungus 897 and 898 showed higher enzymatic activities, percentage degradation, and reduction of COD than the fungus *Phanerochaete chrysosporium*.

1 - INTRODUÇÃO

Recentemente, a aplicação de biotecnologia e de engenharia genética nos campos da agricultura, da medicina e de programas ambientais para o bem-estar humano tem ganhado grande importância. Desde que os microrganismos podem adaptar-se a diversas mudanças ambientais, pesquisadores têm explorado a possibilidade do uso deles como instrumento para o controle da poluição ambiental.

A biorremediação, ou seja, o uso de microrganismos na degradação de poluentes ambientais, é uma tecnologia em expansão, uma vez que, com o desenvolvimento industrial, a quantidade de efluentes, muitas vezes, tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos, descartados no meio ambiente é muito grande.

A indústria de polpa e papel é uma das maiores fontes de poluição ambiental, pois na fabricação dos mesmos são usados componentes químicos para degradar o material lignocelulósico, principalmente a lignina, que é de difícil decomposição. Estes compostos são responsáveis por sérios problemas ambientais, sendo que um dos mais importantes é a forte coloração dos efluentes, devido à eliminação da lignina e seus produtos.

A degradação da lignina apresenta sérios problemas a nível fisiológico e enzimológico, sendo realizada pela ação de várias enzimas extracelulares que variam de um microrganismo para outro. Entre elas, pode-se citar as fenoloxidasas (manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase) denominadas de ligninolíticas.

A lignina pode ser degradada por vários microrganismos, incluindo fungos e bactérias. Os fungos são os principais e entre eles, os de degradação branca são os mais importantes, pois degradam completamente a lignina. Os fungos de degradação branca e de degradação marrom também degradam o material lignocelulolítico, mas com menor intensidade, pois o sistema ligninolítico destes fungos parece não estar completamente formado.

O sistema enzimático não específico e oxidativo dos fungos ligninolíticos é capaz de degradar, além da lignina, poluentes aromáticos tóxicos, incluindo uma variedade de compostos fenólicos. Compostos fenólicos de baixo peso molecular são encontrados em efluentes de diversas indústrias, tais como, as de azeite de oliva, cafeeira, química, farmacêutica, corantes, pesticidas, solventes, destilarias de vinho e outras. Estes efluentes são ácidos, têm grande conteúdo orgânico e podem causar consideráveis problemas ambientais. Além disso, compostos fenólicos são tóxicos tanto para organismos superiores como para maioria dos microrganismos, sendo que pequenas quantidades em água potável e em rios, podem causar problemas para a saúde humana. Portanto, a eliminação destes compostos é uma necessidade para a preservação da qualidade do meio ambiente.

Em vista disto, atualmente, tem havido muito interesse em se conhecer o sistema enzimático de diferentes fungos ligninolíticos, uma vez que estes possuem um grande potencial de aplicação tanto nos processos de bioconversão como nos de biorremediação.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A lignocelulose é a principal fonte de biomassa e recursos renováveis da natureza. É constituída por 3 classes de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina (BRODA, 1992). O uso de lignocelulose como fonte de combustível, de alimento e de fibra é de grande importância econômica (BRODA *et al.*, 1996). Entretanto, a maior dificuldade de sua degradação se deve a um de seus componentes: lignina (BABITSKAYA, 1994), que depois da celulose, é o segundo mais abundante grupo de polímeros na biosfera; portanto, a sua biodegradação ocupa uma importante posição no ciclo global do carbono (EGGERT *et al.*, 1996). Os estudos de degradação da lignina têm grande importância devido as suas aplicações biotecnológicas, onde seu uso inclui produção de rações, enzimas, produtos químicos e matéria-prima para a indústria de papel e celulose (ARORA, 1995; EGGERT *et al.*, 1996).

Os efluentes tóxicos da indústria de papel e celulose, provenientes do tratamento da polpa e da eliminação da lignina causam sérios problemas de poluição ambiental, além da forte coloração e do cheiro desagradável de seus efluentes (MANZANARES *et al.*, 1995).

A degradação completa da lignina, na natureza, ocorre como resultado cooperativo de diferentes microrganismos. Entre eles, os fungos de degradação branca são os mais importantes na deslignificação e o *Phanerochaete chrysosporium* tem atraído o grande interesse de vários pesquisadores, por ser capaz de degradar completamente a lignina (EVANS *et al.*, 1991; SRINIVASAN *et al.*, 1995; ARORA, 1995; AIKEN & LOGAN, 1996). Os fungos de degradação marrom e de degradação branda, também degradam a

lignina, mas em um grau limitado devido à falta da completa formação de seu sistema enzimático.

As linhagens ligninolíticas podem ser usadas na bioconversão de efluentes industriais, contribuindo para a diminuição da poluição ambiental (BABITSKAYA, 1994; ARORA, 1995). Os fungos de degradação branca apresentam um sistema enzimático não específico, tornando-os capazes de metabolizar a lignina e seus subprodutos (MANZANARES *et al.*, 1995), além de uma série de poluentes ambientais, como compostos fenólicos e compostos policíclicos aromáticos. A natureza irregular da lignina e o fato de poluentes conterem subestruturas encontradas na mesma, tais como, fenóis, bifenis e diarilésteres, permite que o sistema enzimático não específico dos fungos ligninolíticos possa degradar estes compostos (SAYADI & ELLOUZ, 1995; MESTER *et al.*, 1995; AIKEN & LOGAN, 1996; BOGAN *et al.*, 1996; KAY-SHOEMAKE & WATWOOD, 1996).

A importância de se estudar os fungos que degradam a lignina também se deve ao fato de que eles são capazes de suportar altas concentrações de poluentes tóxicos, ao contrário das bactérias, que são sensíveis, por exemplo, aos compostos fenólicos de baixa massa molecular, como ácido gálico, caféico e cumárico (BORJA *et al.*, 1993-a). Outra vantagem destes fungos é que o seu sistema de degradação não é induzido por um determinado poluente, mas pela deficiência de nutrientes, principalmente, carbono e nitrogênio (BARR & AUST, 1994).

2.1. Lignina

A lignina é uma macromolécula que constitui 20 a 30% da madeira, conferindo rigidez à estrutura da parede celular de gimnospermas (madeiras moles) e angiospermas (madeiras duras) (GOLD & ALIC, 1993).

A lignina é constituída de ligações de unidades de monômeros de fenilpropano não repetitivas, sintetizadas a partir de precursores fenólicos, como os álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico. A condensação de radicais livres provenientes desses precursores, iniciada pelas peroxidases da parede celular da planta, resulta na formação de um polímero heterogêneo, amorfo, opticamente inativo, hidrófobo, extremamente resistente ao ataque microbiano e altamente ramificado, com uma massa molar que pode variar em torno de 100.000 g/mol ou mais. Sua estrutura (mostrada na figura 1) apresenta no mínimo 12 tipos de ligações diferentes, tais como, aril éster e ligação carbono-carbono, ligadas ao núcleo aromático, que não estão sujeitas à hidrólise enzimática (JANSHEKAR & FIECHTER, 1983; GOLD & ALIC, 1993; MONTIES, 1994).

A lignina se encontra no interior da parede celular, associada à hemicelulose através de interações físicas e ligações covalentes (JANSHEKAR & FIECHTER, 1983). Essa associação sugere que o ataque inicial na parede celular da madeira requer uma degradação enzimática que se inicia na hemicelulose, e em seguida na lignina, pois a primeira restringe fisicamente o acesso das enzimas que degradam a segunda (TUOR *et al.*, 1995).

2.2. Sistema Enzimático Ligninolítico:

As enzimas lignocelulolíticas podem ser intra ou extracelulares e estão divididas em 2 categorias: hidrolíticas e oxidativas. As enzimas hidrolíticas degradam celulose e hemicelulose e têm substratos específicos. Ao contrário, as enzimas oxidativas são não-específicas e agem via mediadores não protéicos. Enquanto a degradação da celulose ocorre durante o metabolismo primário, a mineralização da lignina até CO_2 e H_2O , tem sido caracterizada no metabolismo secundário, quando se esgota a fonte de carbono, nitrogênio ou enxofre. Sendo assim, existem 2 sistemas de degradação de lignocelulose que funcionam em diferentes tempos e sob diferentes condições (AKAMATSU & SHIMADA, 1996; BRODA *et al.*, 1996).

A degradação da lignina, mais especificamente, a regulação da produção de enzimas ligninolíticas é um fenômeno complexo (HATAKKA, 1994). O ataque fúngico ao polímero de lignina ocorre através de várias enzimas extracelulares, como peroxidases do tipo, lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), lacase e enzimas produtoras de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) (FU *et al.*, 1997; PÉREZ *et al.*, 1997).

2.2.1. Peroxidases

Fazem parte de um grupo de enzimas envolvidas na degradação da lignina. No ciclo catalítico, o peróxido oxida o sítio ativo da enzima, que por sua vez, oxida o substrato (AITKEN *et al.*, 1989).

Os fungos ligninolíticos produzem 2 tipos especiais de peroxidases: lignina peroxidase e manganês peroxidase.

2.2.1.1. Lignina Peroxidase (LiP; EC 1.11.1.7)

Esta enzima constitui o maior componente do sistema de degradação do fungo *P. chrysosporium* (DE JONG *et al.*, 1994). É uma glicoproteína que contém Fe^{+3} como grupo prostético, e requer H_2O_2 para sua atividade catalítica (HATAKKA, 1994; REDDY & D'SOUZA, 1994).

A LiP catalisa a oxidação de vários compostos aromáticos através da remoção de um elétron, com subsequente formação de radicais catiônicos tipo aril, os quais são decompostos espontaneamente dando origem a uma variedade de produtos finais (HATAKKA, 1994). A LiP oxida substratos fenólicos para radicais fenoxilas e catalisa a clivagem oxidativa de β -O-4, C α -C β e outras ligações presentes na lignina e em compostos modelos de lignina (PÉREZ *et al.*, 1997).

Durante o ciclo catalítico da enzima, o Fe^{+3} contido no grupamento heme da LiP passa por 5 estados de oxidação (figura 2). O primeiro passo compreende a oxidação do Fe (III) da enzima nativa para Fe (IV), gerando o composto I. Através da redução do composto I, é formado o composto II, que ainda contém Fe (IV). O agente redutor pode ser um substrato como álcool veratrílico ou H_2O_2 . Finalmente, uma etapa de redução, via um elétron, retorna a enzima ao seu estado nativo, completando o ciclo catalítico. Na ausência do substrato redutor o composto II é oxidado para o composto III, uma forma com limitada capacidade catalítica (BARR & AUST, 1994; DE JONG *et al.*, 1994).

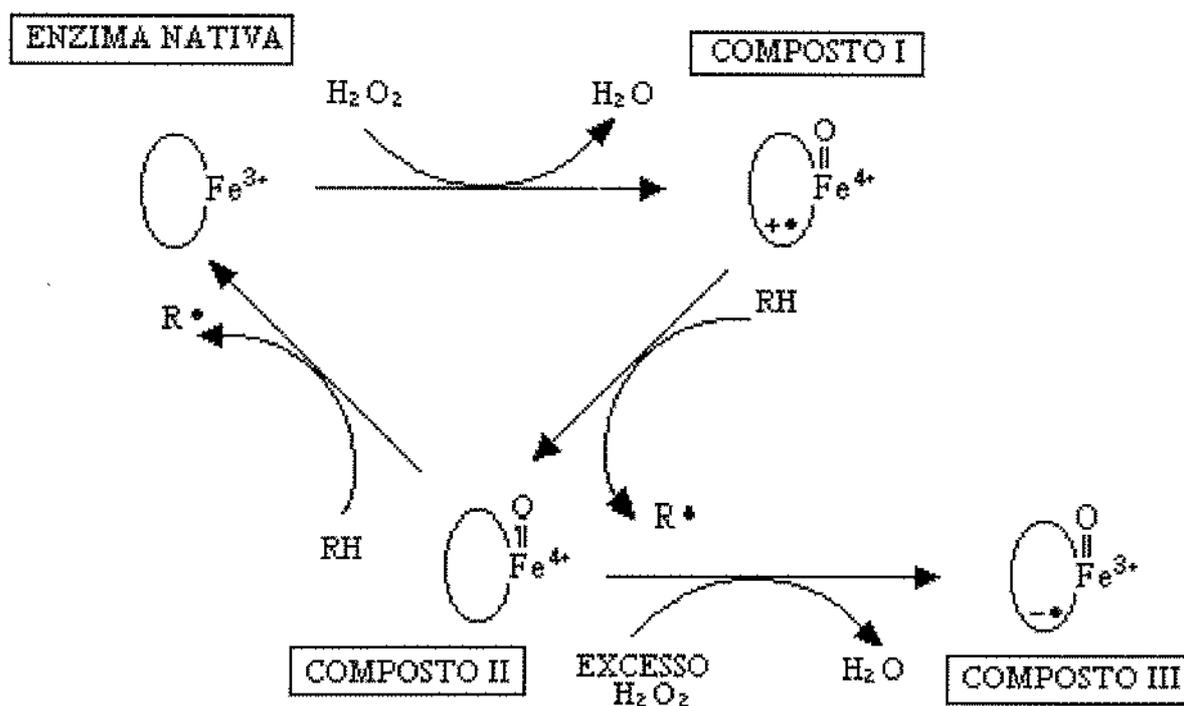


Figura 2: Ciclo catalítico da lignina peroxidase. RH representa o substrato enzimático na forma reduzida e R^\bullet representa o substrato na forma oxidada (GOLD *et al.*, 1989).

Diferentemente da MnP e da lacase, a LiP é a única enzima com capacidade de oxidar compostos não fenólicos metabolizados com alto potencial oxi-redução (KERSTEN *et al.*, 1990). A LiP catalisa reações em meio fortemente ácido (pH 2-3), sendo que não existe muita variação no seu modo de ação entre os diferentes fungos.

2.2.1.2. Peroxidase dependente de manganês (MnP; EC 1.11.1.7)

É uma glicoproteína com Fe^{+3} como grupo prostético, sendo a principal enzima envolvida no branqueamento de polpa kraft e na descoloração de efluentes da indústria papelreira (DE JONG *et al.*, 1994).

A MnP é cataliticamente dependente de H_2O_2 e de Mn^{2+} , onde Mn(II) é oxidado para Mn(III) , e comporta-se como um mediador de baixa massa molar que pode se difundir para regiões distantes na molécula de lignina e iniciar o processo de oxidação. Esta enzima pode agir sobre os compostos modelos de lignina, fenóis simples e aminas, oxidando-os (SAYADI & ELLOUZ, 1995; D'ANNIBALE *et al.*, 1996; EGGERT *et al.*, 1996; PÉREZ *et al.*, 1997).

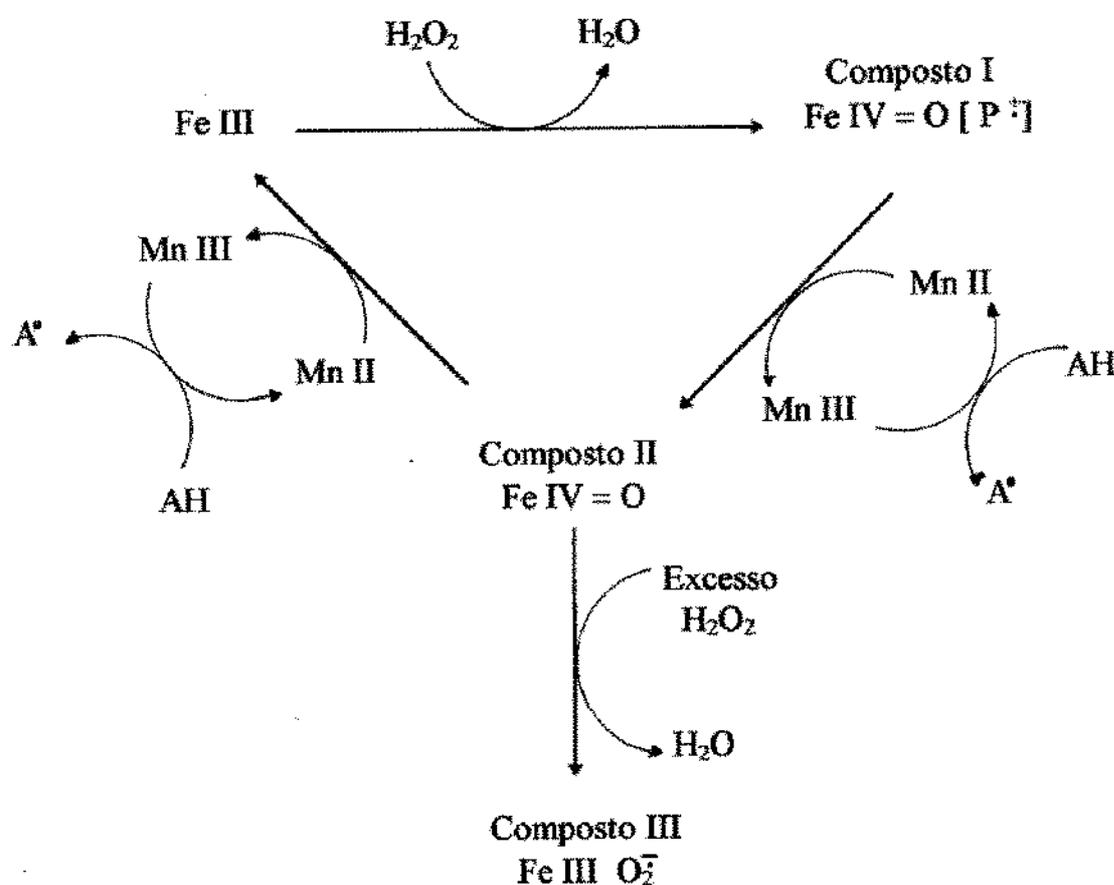


Figura 3: Ciclo catalítico da manganês peroxidase. AH representa o substrato enzimático na forma reduzida e A^\bullet representa o substrato na forma oxidada (GOLD *et al.*, 1989).

Durante o ciclo catalítico da MnP, o Mn (II) atua como doador de elétrons para gerar o composto II (figura 3). O mesmo Mn (II) participa da conversão do composto II na enzima nativa. Os íons Mn (III) gerados são estabilizados por quelação com ácidos orgânicos, tais como, lactato, citrato ou malonato. O Mn (III) quelado atua como mediador redox difusível para catalisar a oxidação, via um elétron, de compostos fenólicos, gerando radicais fenoxila. Um excesso de H₂O₂ dá origem ao composto III (DE JONG *et al.*, 1994).

2.2.2. Lacase (Benzenodiol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2)

É uma fenoloxidase com larga especificidade de substratos, sendo uma enzima produzida por quase todos os fungos de degradação branca (EVANS *et al.*, 1991; DE JONG *et al.*, 1994; TUOR *et al.*, 1995). A lacase utiliza o O₂ para oxidar anéis fenólicos formando radicais fenoxilas. Sob certas condições, esta enzima pode também oxidar compostos não fenólicos e clivar anéis fenólicos contendo grupos volumosos (HATAKKA, 1994). Esta enzima está envolvida na degradação da lignina e na destoxificação de compostos fenólicos, bem como na desclorificação de compostos clorofenólicos (BARBOSA *et al.*, 1996).

Até recentemente, acreditava-se que o fungo *Phanerochaete chrysosporium* não produzia lacase, e conseqüentemente, esta enzima recebeu pouca atenção. Entretanto, estudos recentes, mostram que a lacase pode ser muito importante na degradação da lignina e de compostos modelos de lignina (SRINIVASAN *et al.*, 1995; EGGERT *et al.*, 1996) e a incapacidade de demonstrar a produção de lacase por *P. chrysosporium* se deveu ao uso de condições de cultura não favoráveis a sua produção (SRINIVASAN *et al.*, 1995).

2.2.3. Enzimas produtoras de H₂O₂

Estas enzimas exercem importante papel na degradação do material lignocelulósico, pois duas enzimas ligninolíticas requerem H₂O₂ como substrato: LiP e MnP (ZHAO & JANSE, 1996). As oxidases sugeridas como possíveis doadoras de H₂O₂ durante o processo de degradação da lignocelulose são: glicose-1-oxidase, glicose-2-oxidase, glioxal oxidase, celobiose-oxidase, álcool veratrílico oxidase, metanol oxidase, piranose-2-oxidase, acil-CoA-oxidase (DE JONG *et al.*, 1994; ZHAO & JANSE, 1996). As principais enzimas produtoras de H₂O₂ são:

Glicose-1-oxidase (E.C. 1.1.3.4) e Glicose-2-oxidase (E.C. 1.1.3.10): utilizam a glicose como doadora de elétrons na redução de O₂ para H₂O₂. Estas enzimas são intracelulares e possuem diferentes especificidades de substratos (ERIKSSON *et al.*, 1986).

Glioxal-oxidase (GLOX): enzima extracelular envolvida na degradação da lignina (HATAKKA, 1994) e entre as produtoras de H₂O₂ é a que tem sido estudada mais intensamente, por ser uma importante fonte de H₂O₂ (ZHAO & JANSE, 1996). A atividade catalítica desta enzima é dependente de Cu (II) e os substratos podem ser metabólitos fúngicos secundários como glioxal e metilglioxal ou produtos de atividade ligninolítica como formaldeído (KERSTEN & KIRK, 1987)

Álcool Veratrílico Oxidase (AVO): é outra enzima produtora de H₂O₂. As isoenzimas da AVO são capazes de reduzir O₂ para H₂O₂ e de oxidar álcoois aromáticos primários para aldeídos. Esta enzima apresenta um alto grau de especificidade de substrato (HATAKKA, 1994), mostrando atividade com

álcoois alifáticos com duplas ligações conjugadas e maior atividade com aril álcoois não fenólicos. Aldeídos aromáticos são também oxidados pela enzima para seus correspondentes ácidos, porém de forma muito lenta. (DE JONG *et al.*, 1994).

2.3. Microrganismos responsáveis pela degradação de compostos lignocelulósicos:

As diferenças estruturais entre as enzimas indicam que as diferentes espécies de fungos podem empregar diferentes maneiras de degradar lignina (NERUD *et al.*, 1991).

Os fungos responsáveis pela degradação da madeira estão divididos em 3 classes, segundo SZKLARZ *et al.* (1989):

- Fungos de decomposição branda: são ascomicetos e fungos imperfeitos (deuteromicetos), que decompõem eficientemente a celulose, mas degradam a lignina lenta e incompletamente;

- Fungos de decomposição parda: são basidiomicetos, que causam apenas uma desmetilação da lignina, desorganizando a parede celular e permitindo a entrada de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas;

- Fungos de decomposição branca: também são basidiomicetos e degradam completamente a lignina e a celulose.

Dentre as 3 classes, a mais importante é a dos fungos de decomposição branca. Estes fungos e seus sistemas ligninolíticos têm grande aplicação na biopolpação e no biobranqueamento, bem como, na biorremediação de poluentes aromáticos (MESTER, 1995).

Os fungos de degradação branca podem ser ainda divididos em 5 classes, de acordo com a enzima que produzem (TUOR *et al.*, 1995):

- Classe 1 - Produzem LiP, MnP e lacase. Este grupo contém os melhores fungos de degradação branca;
- Classe 2 - Produzem MnP e lacase, e não apresentam níveis detectáveis de LiP. São fortes degradadores de lignina;
- Classe 3 - Produzem LiP e somente uma fenoloxidase: MnP ou lacase;
- Classe 4 - Secretam somente LiP sem fenoloxidases;
- Classe 5 - São fungos caracterizados incompletamente quanto à degradação da lignina.

Fungos de degradação marrom e branca decompõem a lignina com menos intensidade, pois o sistema ligninolítico destes fungos não está completamente formado (ARORA, 1995). FERRAZ & DURÁN (1995) demonstraram que alguns ascomicetos degradam a madeira com a mesma intensidade do *Trametes versicolor*.

BABITSKAYA (1994) comparou os fungos da classe basidiomicetos e os da classe deuteromicetos, determinando a atividade das enzimas: lacase, peroxidase, tirosinase, catalase, glicose oxidase, celulase e xilanase. Ele observou que os deuteromicetos produziam níveis relativamente baixos de atividades de enzimas ligninolíticas, apesar da degradação da lignina por estes fungos ter sido bastante ativa, sugerindo que estes fungos deviam produzir outro tipo de enzima, além das estudadas neste trabalho.

Tanto os fungos de degradação branca como os fungos de degradação marrom, utilizam H_2O_2 no sistema de degradação da lignina. Nos fungos de

degradação marrom, a H_2O_2 está envolvida no ataque inicial da celulose, enquanto que nos de degradação branca, a H_2O_2 é utilizada como co-substrato pelas peroxidases produzidas por estes fungos (ZHAO & JANSE, 1996).

Bactérias também podem participar da degradação da madeira, sendo que estes microrganismos podem inibir ou promover sinergisticamente o crescimento dos fungos que a degradam. A degradação da lignina por fungos resulta na formação de substâncias de baixa massa molar, como ácidos carboxílicos aromáticos, os quais podem ser metabolizados pelas bactérias (TUOR *et al.*, 1995).

O principal fungo de degradação branca é o *P. chrysosporium*, que tem sido altamente estudado por sua habilidade em degradar a lignina e uma variedade de poluentes ambientais (BONNARME & JEFFRIES, 1990; SRINIVASAN *et al.*, 1995; AIKEN & LOGAN, 1996). Outro fungo de degradação branca bastante eficiente é o *Coriolus versicolor* (*Trametes versicolor*), que degrada simultaneamente a lignina, a celulose e a hemicelulose (COLLINS & DOBSON, 1995).

O interesse pelo *P. chrysosporium* é recente. Em 1983, descobriu-se a primeira enzima extracelular associada às reações de degradação da lignina (GLENN *et al.*, 1983; TIEN & KIRK, 1983). Depois desta descoberta, observou-se que estas enzimas, produzidas por estes fungos, também poderiam degradar uma variedade de compostos aromáticos persistentes no meio ambiente (AITKEN *et al.*, 1989).

2.3.1. *Phanerochaete chrysosporium*

O *P. chrysosporium* produz as peroxidases (LiP e MnP), em boas condições de cultura, durante metabolismo secundário em resposta à falta de nitrogênio, carbono ou enxofre (PÉREZ *et al.*, 1997). As melhores condições de cultura para que o *P. chrysosporium* apresente uma alta produção enzimática são: cultura estacionária, meio enriquecido com oxigênio, baixa concentração de nitrogênio, fonte de carbono apropriada (em geral, glicose), *pH* entre 4,0 e 4,5 e meio balanceado de nutrientes minerais (BONNARME & JEFFRIES, 1990; SRINIVASAN *et al.*, 1995; ZHAO *et al.*, 1996). É interessante ressaltar que este fungo não utiliza lignina como fonte de carbono para seu crescimento, mas ele a degrada para obter a celulose que está no interior da fibra da madeira (CANCEL *et al.*, 1993).

2.4. Utilização de enzimas e/ou fungos ligninolíticos na biorremediação

O sistema ligninolítico extracelular dos fungos de degradação branca tem encontrado significantes aplicações na área de biotecnologia, graças ao sistema enzimático não específico produzido pelos mesmos (COLLINS & DOBSON, 1995).

A indústria de polpa e papel é uma das maiores fontes de poluição ambiental. Os processos de produção de papel utilizam agentes químicos que têm como principal objetivo a eliminação da lignina. Entretanto, a deslignificação resulta no aparecimento de mais de 300 compostos, muitas vezes, tóxicos e persistentes no meio ambiente (LAMAR, 1992). Uma vez que, os produtos de transformação da lignina são os maiores contribuintes de cor

destes efluentes, a descoloração por fungos ligninolíticos, principalmente baseados nas linhagens de *P. chrysosporium*, tem sido bastante estudada (MANZANARES *et al.*, 1995; BOGAN *et al.*, 1996).

Além da descoloração de efluentes, os fungos ligninolíticos e seus sistemas enzimáticos podem ser utilizados na indústria de papel e celulose, nas fases de polpação e de branqueamento para fabricação do papel. A utilização dos fungos nestas fases pode reduzir a utilização de reagentes químicos, como o cloro, e conseqüentemente, diminuir a formação de compostos tóxicos (ERIKSSON, 1990).

A complexibilidade das reações químicas do mecanismo enzimático existente nos fungos, com uma ampla variedade de oxidações e reduções, torna a estratégia de biorremediação diferente das tecnologias já existentes (BARR & AUST, 1994).

A degradação de compostos policíclicos aromáticos, biopolímeros com estrutura relacionada à lignina e/ou seus monômeros por fungos ligninolíticos, é devido, em parte, à atividade do sistema da LiP. As LiPs não são somente importantes na biodegradação da lignina, mas também têm uma aplicação potencial na destoxificação de uma larga faixa de poluentes ambientais, tais como, PCBs e dioxinas; na biopolpação e na conversão de material lignocelulolítico para combustíveis e outros compostos químicos (AITKEN *et al.*, 1989; REDDY & D'SOUZA, 1994; TUOR *et al.*, 1995).

A MnP também está envolvida na degradação de compostos aromáticos e outros xenobióticos. Entretanto, certos compostos aromáticos não são oxidáveis por peroxidases. A lacase, produzida pelos fungos de degradação branca,

também está envolvida na degradação destes compostos (FIELD *et al.*, 1993). A tabela 1 mostra alguns substratos degradados pelas enzimas ligninolíticas.

Tabela 1: Substratos xenobióticos e enzimas ligninolíticas produzidas por fungos e purificadas (FIELD *et al.*, 1993)

Enzima	Compostos xenobióticos
LiP	Clorofenol Diclorofenol Pentaclorofenol Antraceno Pireno Benzopireno Benzoantraceno
MnP	Diclorofenol Clorocatecol Corantes poliméricos Nitroaminotolueno
lacase	Clorofenol Diclorofenol Pentaclorofenol Cloroguaiacol Clorocatecol

Compostos fenólicos aromáticos são produtos comuns da degradação da lignina, portanto, é esperado que as diferentes fenoloxidasas reajam do mesmo modo com os substratos fenólicos. LiP e MnP oxidam compostos fenólicos como álcool vanílico para aldeídos (DE JONG *et al.*, 1994).

2.5. Compostos fenólicos e/ou modelos de lignina:

2.5.1. Ácido tânico

Os taninos são um grupo de compostos fenólicos poliméricos bastante comuns em plantas. Os taninos são moléculas recalcitrantes e resistentes ao ataque microbiano. De acordo com suas propriedades, são divididos em duas categorias: hidrolisáveis e condensados, sendo estes mais resistentes ao ataque microbiano que os primeiros (SAXENA *et al.*, 1995).

O ácido tânico é um tipo de tanino hidrolisável, composto de uma molécula de carboidrato, geralmente, glicose, no qual ácido gálico ou ácidos similares estão unidos por ligações ésteres (SAXENA *et al.*, 1995). O ácido tânico tem sido utilizado há muitos anos, como aditivo em aromas de bebidas e doces, agente clarificador na fermentação e nas indústrias de vinho (ONODERA *et al.*, 1994).

ARCHAMBAULT *et al.* (1996) demonstraram que o ácido tânico pode ser degradado por enzimas produzidas pelo fungo de degradação branca *Trametes versicolor*.

2.5.2. Ácido Lignossulfônico

Os lignossulfonatos são produtos de efluentes de indústrias de papel gerados durante o processo de branqueamento e polpação. Estas soluções são altamente coloridas (marrom escura) devido ao seu alto conteúdo de lignina. Os lignossulfonatos contêm larga concentração de carboidratos de madeira (como glicose, xilose), nitrogênio e outros traços minerais necessários para o

crescimento dos fungos, fazendo dos lignossulfonatos uma escolha lógica como alternativa de substrato para o desenvolvimento destes microrganismos (AIKEN & LOGAN, 1996).

2.5.3. Álcool Veratrílico

Álcoois aril (veratril, anisil e anisil clorado) são metabólitos secundários comuns de fungos de degradação branca. Os metabólitos secundários são produzidos simultaneamente com as enzimas ligninolíticas, sendo que o álcool veratrílico é um indutor destas enzimas. A produção de metabólitos secundários depende da linhagem, do substrato e das condições de crescimento. Estes compostos apresentam funções fisiológicas junto com as enzimas extracelulares, envolvidas na biodegradação da lignina e sua concentração no fluido extracelular é altamente regulada por enzimas intracelulares. Os papéis dos aril álcoois junto à atividade ligninolítica são: indução das enzimas ligninolíticas, estabilização da LiP, formação de uma espécie de O_2 ativado e podem ainda agir como mediadores na transferência de cargas e como substratos para enzimas produtoras de H_2O_2 (DE JONG *et al.*, 1994). Os aril álcoois podem ser produzidos pelos fungos na biossíntese de carboidratos e na metilação e subsequente redução de intermediários da degradação da lignina (DE JONG *et al.*, 1994).

O álcool veratrílico é oxidado pela LiP para uma espécie de radical, um intermediário, antes de se formar o veratraldeído, e a sua taxa de oxidação aumenta com a diminuição do *pH* (AITKEN *et al.*, 1989).

2.5.4. Fenol

O fenol e seus homólogos são moléculas aromáticas formadas por um anel benzênico contendo grupos hidroxila, metila, amidas ou sulfônicos (KUMARAN & PARUCHURI, 1997). Ele pode ser um produto natural ou sintético com alto grau de toxicidade tanto para organismos superiores como para maioria dos microrganismos (TORNISIELO, 1996). A ingestão contínua de fenol, por um período prolongado, provoca diarreia, urina escura e danos na visão, em níveis de concentração entre 10 e 240 mg/L (KUMARAN & PARUCHURI, 1997). A concentração letal de fenol no sangue é por volta de 4,7 a 130 mg/100 mL. Na concentração de 5 µg/L, o fenol causa mau cheiro em águas de rios e são proibidos em águas potáveis na concentração de 1 µg/L. Portanto, a eliminação do fenol é uma necessidade para a preservação da qualidade do meio ambiente.

Compostos fenólicos são compostos biogênicos altamente distribuídos na natureza, podendo ser provenientes do metabolismo secundário de plantas e da decomposição de lignina e de proteínas (CILLIERS & SINGLETON, 1989; TORNISIELO, 1996; KUMARAN & PARUCHURI, 1997). Sua oxidação promove o escurecimento de frutas e tem um papel importante no processamento de sucos e vinhos, na transformação e retirada de lignina de polpa de papel, nas águas contaminadas e na destoxificação de solos (XU, 1996).

Artificialmente, os compostos fenólicos são comumente encontrados em efluentes derivados da conversão de carvão, do refinamento de petróleo, de resina, de plásticos e de têxteis (LEE *et al.*, 1996) e em muitas outras indústrias, tais como, farmacêutica, petroquímica, cafeeira (AMBUJON & MANILAL, 1995), azeite de oliva, corantes, pesticidas, solventes (ABU-SALAH *et al.*, 1996; BENITEZ *et al.*, 1997). Algumas fontes industriais de fenóis e compostos

aromáticos são mostradas na tabela 2.

Tabela 2: Fontes de fenol e compostos aromáticos relatados em efluentes industriais (KUMARAN & PARUCHURI, 1997).

Fonte	Compostos Aromáticos
Refinação de Petróleo	Hidrocarbonetos, benzeno, tolueno, n-octanos, n-decanos, naftalenos, bifenis, fenol, cianetos, sulfetos, amônia
Petroquímicos	Naftaleno, heptanos, benzeno, butadieno, álcoois C-4, fenol e resorcinol
Produção de químicos orgânicos básicos	<i>m</i> -amino fenóis, resorcinol, dinitrofenol, <i>p</i> -nitrofenol, anilina, clorobenzenol, tolueno, trinitrofenol
Refinação de carvão	Fenol, catecol, <i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -cresóis, resorcinol, hidroquinonas, hidrocarbonetos poliaromáticos, piridinas, xileno, tolueno, ácido benzóico
Farmacêuticos	Toluenos, álcool benzilílico, ácido fenilacético, produtos clorados de benzeno, clorofórmio, éter, álcool etílico
Derivados tânicos	Tanino, catequina, fenol, clorofenol, nitrofenol
Polpa e Papel	Lignina, vanilina, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido siríngico, ácido benzóico, catecol, álcool coniferílico, fenol e clorofenol

A degradação ou biotransformação de compostos fenólicos em ambientes aquáticos e terrestres não está limitada à atividade de poucos microrganismos versáteis, já que ocorre nas bactérias, nos fungos filamentosos, nas leveduras e nas plantas superiores (SEMPLE & CAIN, 1996).

BORJA *et al.* (1992) utilizaram a levedura *Geotricum candidum* para remover compostos fenólicos em efluentes de uma indústria de óleo de oliva. Estes são grandes inibidores da atividade bacteriana e um tratamento com esta levedura fornece um efluente que posteriormente é degradado por tratamento anaeróbico, podendo ser eliminado no meio ambiente. Em um outro trabalho, BORJA *et al.* (1993-b) usaram este mesmo tipo de tratamento com efluentes das destilarias de vinhos e obtiveram resultados semelhantes.

Os fungos de degradação branca são capazes de degradar estes compostos devido à atividade do sistema da LiP (KAY-SHOEMAKE & WATWOOD, 1996). Esta enzima catalisa a oxidação de vários compostos fenólicos, utilizando peróxido de hidrogênio (AITKEN *et al.*, 1989). As reações de oxidação, hidroxilação e polimerização de derivados de fenol são muito importantes na área de produção de compostos químicos finos ou na prevenção de poluição de efluentes aquosos (COURTEIX & BERGEL, 1995).

O fenol e seus compostos são considerados produtos de difícil tratamento, e as alternativas para recuperação de ambientes contaminados por essas moléculas necessitam do desenvolvimento de tecnologias inovadoras, procurando a eficiência e o baixo custo do processo (TORNISIELO, 1996).

3 - OBJETIVOS

Utilização de microrganismos ligninolíticos, já isolados no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, para:

*Estudo do sistema ligninolítico destes microrganismos quando crescidos em meios de cultura contendo: ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico, fenol e seus derivados, sob diferentes condições de cultivo;

*Estudo da remoção ou biodegradação destes compostos fenólicos;

*Relacionar as atividades ligninolíticas desses fungos com a capacidade de degradação dos compostos em estudo.

4 . MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes e Equipamentos

- Banho-maria, marca Eyela, modelo SB-650;
- Câmara de fluxo laminar, marca Veco;
- Centrífuga, marca Hitachi, modelo Himac CR21;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência marca Shimadzu, modelo LC-6A com detector ultravioleta modelo SPD-6A acoplado a integrador modelo CR-4A e colunas cromatográficas Cosmosil, 15cm x 4,6mm
- Espectrofotômetro marca Shidadzu, modelo UV - 1201;
- Espectrofotômetro marca HACH, modelo DR/2010;
- Filtros para fase móvel, marca Millipore;
- Incubadora, marca Tecnal, modelo TE- 420;
- Reagentes grau para análise;
- Reagentes grau cromatográfico;
- Ultra purificador de água para uso em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), marca Milli Q-Plus;
- Micropipetadores com volumes reguláveis, marca Gilson
- Equipamentos de uso comum de laboratório: balança analítica, autoclave, estufas, câmaras de fluxo contínuo, etc.

4.2. Microrganismos

Os fungos utilizados neste trabalho foram isolados de amostra de solos provenientes das margens do Rio Una do Prelado, que é rico em ácido húmico, possui pH entre 3,5 e 7,0 e localiza-se na Reserva Ecológica da Juréia-Itatins. O interesse de se trabalhar com estes fungos deve-se ao fato de que o ácido

húmico é um dos metabólitos finais da degradação do material lignocelulolítico, portanto estes fungos são capazes de degradar a lignina. Estes fungos foram isolados no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana da Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp, não foram identificados, mas não pertencem ao grupo dos basidiomicetos. Os fungos (4a, 480, 897, 898, 984 e 1051) foram escolhidos para início de trabalho por apresentarem atividade ligninolítica no 3º dia de crescimento. O fungo *P. chrysosporium* (ATCC 24725) foi escolhido como padrão, pois tem sido muito usado como microrganismo modelo para estudo do sistema enzimático responsável pela degradação da lignina.

4.3. Meios de cultura

4.3.1. Meio de Manutenção

Os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo meio PDA (Potato Dextrose Agar) e incubados à temperatura de 30°C. O fungo *P. chrysosporium* foi inoculado em placas de Petri contendo meio Extrato de Malte e incubado à temperatura de 37°C. Após crescimento, os fungos foram mantidos em câmara fria a 16°C.

4.3.2. Meio de Produção Enzimática

Composição inicial do meio para produção enzimática (por litro):

- 0,5g de fosfato de amônia dibásico;
- 0,8g de fosfato de potássio monobásico;
- 0,3g de fosfato de potássio dibásico;

- 0,3g de sulfato de magnésio;
- 4,0mg de sulfato de zinco;
- 5,0mg de sulfato de manganês;
- 5,5mg de cloreto de cálcio;
- 0,2g de extrato de levedura;
- 5g de fonte de carbono.

As fontes de carbono utilizadas para início de trabalho foram ácido tânico e ácido lignossulfônico na concentração de 0,5%.

O meio final para produção enzimática continha a seguinte composição por litro:

- 0,5g de fosfato de amônia dibásico;
- 0,8g de fosfato de potássio monobásico;
- 0,3g de sulfato de magnésio;
- 4,0mg de sulfato de zinco;
- 5,0mg de sulfato de manganês;
- 0,1g de cloreto de cálcio;
- 0,2g de extrato de levedura;
- 2,0mg de cloreto de cobalto;
- 1,0mg de sulfato de ferro hexahidratado;
- fonte de carbono.

As fontes de carbono utilizadas foram: ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico e fenol. As concentrações finais (m/v) das fontes de carbono foram: 0,05%; 0,1% e 0,5%.

Após a esterilização do meio, adicionou-se 0,5 mL de tiamina, na concentração de 10mg/L. A tiamina foi esterilizada em membrana de Millipore (0,22 μ m) e guardada em geladeira a 16°C.

4.4. Inóculo

As placas que apresentaram crescimento micelial total (após 7 dias de crescimento) foram utilizadas para retirada de inóculos. O procedimento para a padronização dos inóculos constitui em se quadricular as placas, no tamanho de 1,0cm x 1,0cm. Cada quadrado de 1,0cm x 1,0cm foi inoculado em Erlenmeyers contendo 10 mL de meio para produção enzimática, tomando-se os devidos cuidados na transferência dos inóculos, evitando-se ao máximo que o ágar das placas também fosse transferido, o que poderia ocasionar um crescimento devido a nutrientes provenientes do meio sólido. Após inoculação, os frascos foram incubados nas suas respectivas temperaturas de crescimento.

4.5. Pré-seleção

4.5.1. Primeira etapa

Os fungos foram inoculados como descrito em 4.4, no meio inicial para produção enzimática com ácido tânico ou ácido lignossulfônico, na concentração (m/v) de 0,5%, como fonte de carbono. Após crescimento por 7 dias, foram medidas as atividades enzimáticas como descritas no item 4.9 e então selecionaram-se as melhores linhagens.

4.5.2. Segunda etapa

As linhagens selecionadas foram inoculadas e incubadas, no meio final para produção enzimática, em mais duas diferentes fontes de carbono (álcool veratrílico e fenol), nas concentrações (m/v) de 0,05%, 0,1% e 0,5% e sob duas condições de cultivo:

*Estacionária: após inoculação, os fungos foram incubados por 3, 7 e 10 dias em suas respectivas temperaturas de crescimento. Após crescimento em fase estacionária, utilizando-se a concentração de 0,1% de fonte de carbono, foi feito o cultivo com agitação.

*Com agitação: após inoculação os frascos Erlenmeyers foram colocados sob agitação à velocidade de 100 rpm também por 3, 7 e 10 dias nas mesmas temperaturas da fase estacionária.

4.6. Seleção das melhores linhagens

Com os resultados obtidos nos experimentos descritos acima, escolheram-se os melhores fungos e a melhor condição de crescimento para se estudar o efeito da oxigenação na atividade enzimática. Para tanto, os frascos foram oxigenados durante 1 minuto após o 3º dia de crescimento. Para este procedimento os tampões de algodão foram substituídos por tampões de borracha. Nestes tampões, foram conectadas 2 agulhas, 1 para entrada de oxigênio do cilindro e outra para saída de gases. Esta troca de gases foi realizada durante 1min/10mL.

As atividades enzimáticas foram medidas no 7º e 10º dias de crescimento.

A partir desta fase, as concentrações finais das fontes de carbono utilizadas foram sempre 0,1% e 0,5% (m/v).

4.7. Efeito da adição de glicose

Foi utilizada a glicose como co-substrato para crescimento, adicionada ao meio para produção enzimática na concentração final de 0,5% (m/v). Os fungos foram incubados em condição estacionária com ou sem oxigenação e nos 3^o, 7^o e 10^o dias de crescimento, as amostras foram coletadas e medidas as atividades enzimáticas.

4.8. Determinação de massa seca

Para todas as condições foi feita a determinação da massa seca. Os fungos, depois de incubados, foram filtrados através de lã de vidro (a qual é inerte e impossibilita a ligação inespecífica com enzimas presentes nos meios líquidos) previamente pesada. As lãs de vidro foram colocadas em estufa a 100°C por 24hs, pesadas e por diferença de peso foi calculada a massa seca para cada fungo.

O líquido filtrado foi centrifugado em centrífuga, marca Hitachi, modelo Himac CR21 e usado para determinação das atividades das enzimas ligninolíticas.

4.9. Atividade enzimática

As atividades das seguintes enzimas foram determinadas a partir do cálculo da diferença de absorbâncias, medidas em espectrofotômetro:

4.9.1. Lacase

A atividade da lacase foi determinada utilizando-se a siringaldazina como substrato enzimático. Colocou-se numa cubeta 0,6mL do caldo filtrado, 0,2mL de tampão citrato-fosfato $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 5,0), 0,1mL de água e 1,0 mL de siringaldazina 0,1%. A reação iniciou-se com adição da siringaldazina e sua oxidação foi acompanhada até a forma quinona no tempo inicial (0) e à 10 minutos a 525nm (HERRERA, 1995).

4.9.2. Peroxidases

As peroxidases foram determinadas da mesma maneira que lacase, mas na presença de H_2O_2 . Colocou-se 0,6mL do caldo filtrado, 0,2mL de tampão citrato-fosfato, 0,1mL de siringaldazina e 0,1mL de H_2O_2 $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$. Mediu-se a atividade também a 525nm, mas a reação iniciou-se com adição de H_2O_2 .

4.9.3. Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade da lignina peroxidase foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico a aldeído veratrílico (TIEN & KIRK, 1983). A mistura da reação continha 0,6mL do caldo filtrado, 0,2mL de uma solução de álcool veratrílico $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ em tampão tartarato de sódio $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 3,0). A

reação iniciou-se com adição de H_2O_2 e determinou-se a absorbância a 310nm em 0 e após 10 minutos.

4.9.4. Álcool Veratrílico Oxidase (AVO)

A atividade da AVO foi determinada quase que da mesma forma que para LiP exceto porque omite-se a H_2O_2 do meio de reação. Colocou-se 0,6mL do caldo filtrado, 0,2mL de álcool veratrílico em tampão tartarato de sódio e 0,2mL de água destilada. Mediu-se a atividade a 310nm.

4.9.5. Manganês Peroxidase (MnP)

A atividade da MnP foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol (KUMAKARA *et al.*, 1984). A mistura da reação contém 0,5mL do caldo filtrado, 0,1mL de lactato de sódio $0,25\text{mol.L}^{-1}$, 0,2mL de albumina bovina 0,5%, 0,05mL de $MnSO_4$ $2,0\text{mmol.L}^{-1}$, 0,05mL de uma solução de H_2O_2 $2,0\text{mmol.L}^{-1}$ em tampão succinato de sódio $0,2\text{mol.L}^{-1}$ (pH 4,5) e 0,1mL de vermelho de fenol 0,1%. Determinou-se a absorbância no tempo zero e após 5 minutos, interrompeu-se a reação pela adição de 0,04mL de NaOH 2,0N e determinou-se novamente a absorbância a 610nm.

-Controle: colocou-se o caldo filtrado em banho-maria marca Eyela, Modelo SB-650, por 30 minutos e depois adicionaram-se os reagentes e leu-se a atividade da mesma forma.

4.10. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

É a quantidade de oxigênio necessária para oxidar quimicamente a matéria orgânica.

A determinação foi feita utilizando-se o espectrofotômetro DR/2010 da HACH. Colocou-se 1mL das amostras em frascos HACH (devidamente limpos e com tampas apropriadas) previamente adicionados de: 0,04 a 0,05g de HgSO_4 , 2,5ml de uma solução de $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{AgSO}_4$, 0,3ml de H_2O destilada e 0,5ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Para facilitar a leitura, 1ml de água destilada foi acrescentado a cada frasco, que foram colocados em um reator, à temperatura constante de 140°C . Ao fim de 2 horas nesta temperatura, os frascos foram retirados e a leitura foi realizada em um comprimento de onda de 620nm.

Os valores de porcentagem de redução do DQO foram determinados através da comparação dos resultados, entre o controle e as amostras, encontrados a partir das medidas feitas no espectrofotômetro.

4.11. Degradação dos compostos fenólicos e/ou modelos de lignina

A degradação dos compostos fenólicos e/ou modelos de lignina foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), nos mesmos caldos usados para determinação da atividade enzimática, em um cromatógrafo marca Shimadzu, utilizando-se coluna de fase reversa, Cosmosil C18, com dimensões de 15cm x 4,5mm. O volume da amostra injetado foi de 20 μL . Como fase móvel foi utilizado um sistema isocrático de solventes, constituído por água/metanol (70:30 v/v), a uma vazão de 0,5 mL/min. A detecção foi realizada em detector ultravioleta, a 254nm.

A degradação destes compostos foi determinada através da comparação da porcentagem em área do controle com a porcentagem em área das amostras. O controle foi obtido, incubando-se os meios de cultura, sem inóculo, nas mesmas condições das amostras.

4.11.1. Extração do ácido tânico

O ácido tânico foi extraído tratando-se 5ml do sobrenadante com 5 mL de propanol (5%) em heptano, precipitando-o. As amostras foram centrifugadas, evaporadas sob fluxo de nitrogênio, e então ressuspensas em 5 mL da fase móvel (metanol/água, 30:70), baseado em GAATHON *et al.*, 1989.

Após este processo, as amostras foram microfiltradas em membranas Millipore e injetadas no cromatógrafo.

4.12. Degradação de fenóis

Para avaliar o grau de degradação de fenol foi utilizada também CLAE, mas com as seguintes condições cromatográficas: coluna Cosmosil C18 fase reversa, 5 μ m, 15cm x 4,6mm; fase móvel: acetato de amônio (30mM, pH 5,0)/acetonitrila/metanol (56:34:10, v/v/v); vazão: 0,8 a 1,0 mL/min; volume da amostra injetada: 20 μ L e detecção: UV, 280nm.

O cálculo de degradação do fenol foi determinado através da comparação da porcentagem em área do controle com a porcentagem em área das amostras, sendo o controle obtido através da incubação dos meios de cultura, sem inóculo, nas mesma condições das amostras.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Pré-seleção dos microrganismos

5.1.1. Primeira etapa

No início deste trabalho, os fungos foram crescidos por 7 dias, em meio contendo ácido tânico ou ácido lignossulfônico como fontes de carbono, na concentração de 0,5% (m/v), sob condição estacionária, a uma temperatura de 30°C.

As medidas da atividade das enzimas lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase, para os seis fungos a serem selecionados, estão apresentadas nas figuras de 4 a 8 (resultados na tabela 7, em apêndice).

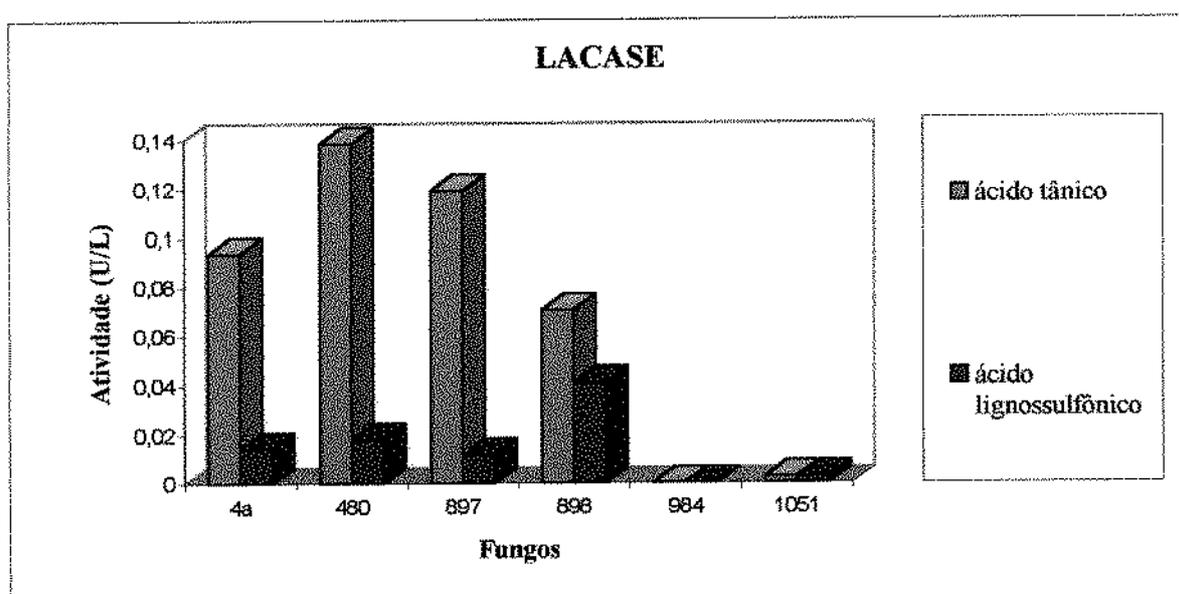


Figura 4: Atividade enzimática de lacase de seis linhagens de fungos (4a, 480, 897, 898, 984 e 1051), após 7 dias de crescimento sob condição estacionária em meio contendo ácido tânico ou ácido lignossulfônico como fontes de carbono.

Todas as linhagens apresentaram baixa atividade de lacase, como mostra a figura 4. As melhores linhagens produtoras de lacase foram 4a, 480, 897 e 898 (0,09 a 0,12 U/L) e a melhor fonte de carbono para produção de lacase foi o ácido tânico. Todos os fungos apresentaram atividade máxima de 0,04 U/L quando o ácido lignossulfônico foi utilizado como fonte de carbono.

Apresenta-se na figura 5 a atividade de peroxidase, onde observa-se que as linhagens 480 e 897 apresentaram as melhores atividades em meio ácido tânico (0,51 e 0,50 U/L respectivamente). A linhagem 4a apresentou uma atividade em torno de 0,25 U/L e os demais fungos apresentaram uma atividade bastante baixa nas duas fontes de carbono estudadas, não sendo superior a 0,09 U/L.

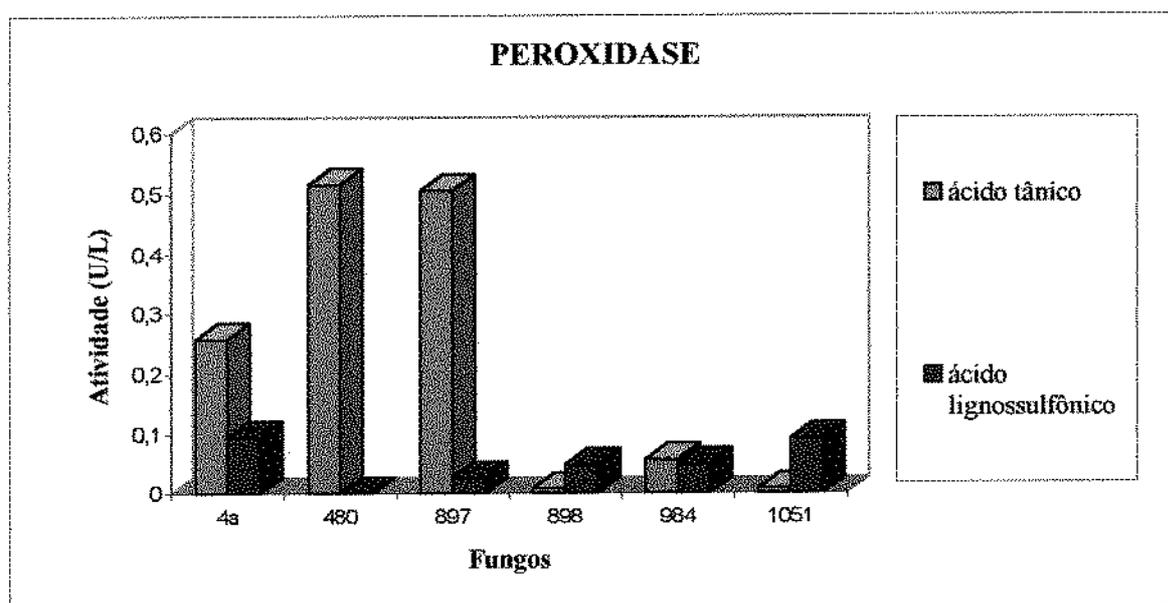


Figura 5: Atividade da enzima peroxidase de seis linhagens de fungos (4a, 480, 897, 898, 984 e 1051), após 7 dias de crescimento sob condição estacionária em meio contendo ácido tânico ou ácido lignossulfônico como fontes de carbono.

Na figura 6 estão apresentadas as atividades de LiP, onde observa-se que todos os fungos produziram esta enzima no meio ácido tânico, sendo a maior produção a da linhagem 4a (~9,20 U/L). Em meio ácido lignossulfônico somente

a linhagem 480 não apresentou atividade de LiP e as demais apresentaram atividade entre 2,50 e 4,20 U/L.

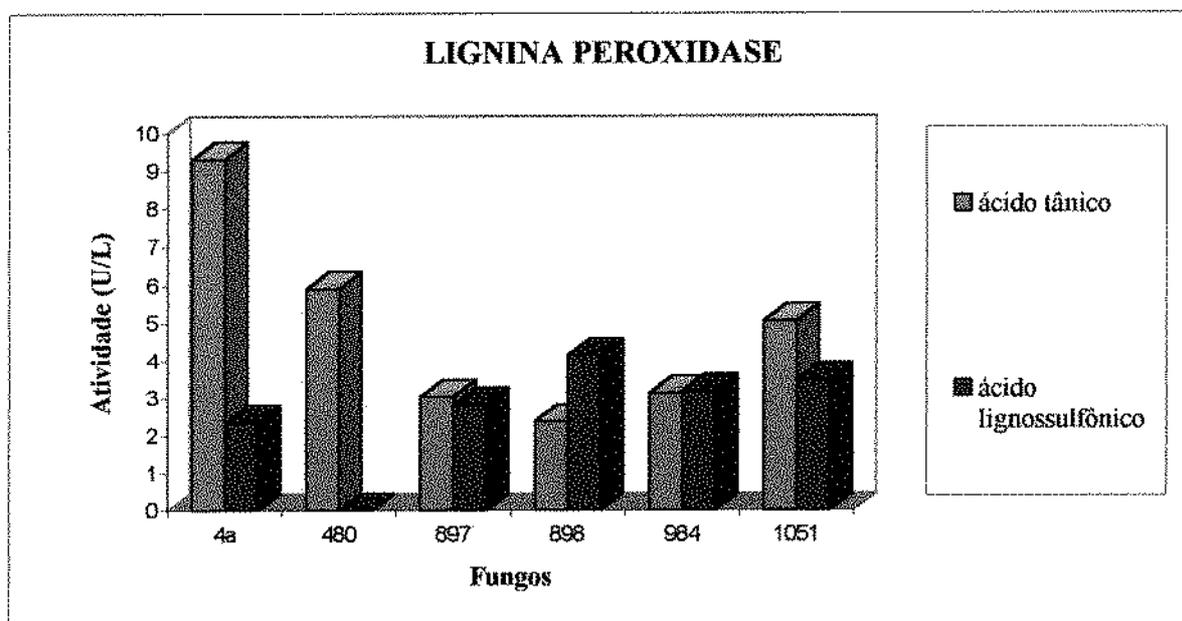


Figura 6: Atividade da enzima lignina peroxidase de seis linhagens de fungos (4a, 480, 897, 898, 984 e 1051), após 7 dias de crescimento sob condição estacionária em meio contendo ácido tânico ou ácido lignossulfônico como fontes de carbono.

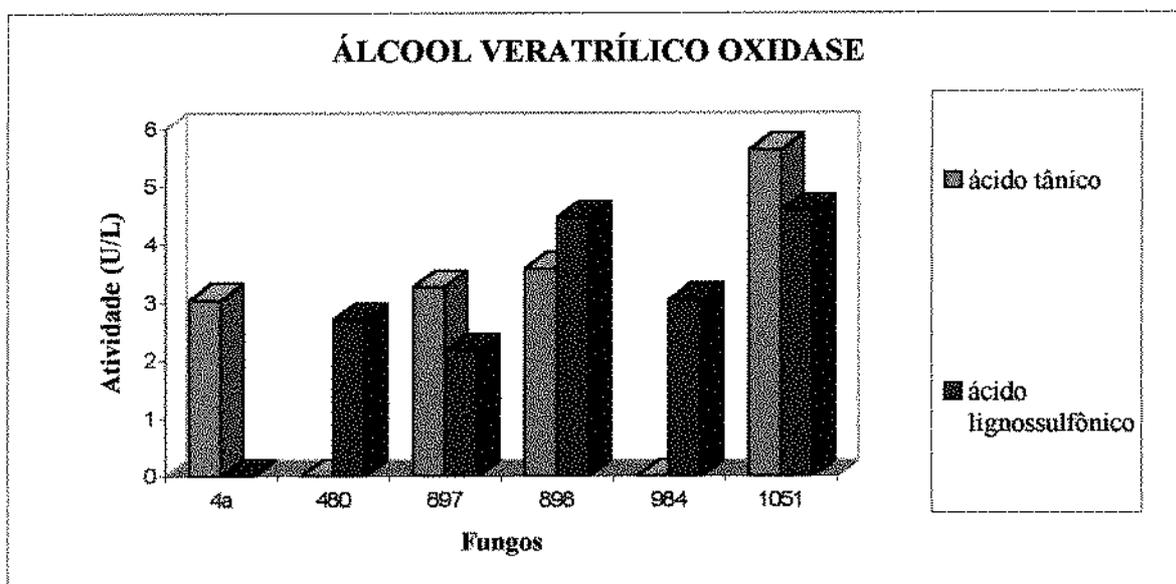


Figura 7: Atividade da enzima álcool veratrílico oxidase de seis linhagens de fungos (4a, 480, 897, 898, 984 e 1051), após 7 dias de crescimento sob condição estacionária em meio contendo ácido tânico ou ácido lignossulfônico como fontes de carbono.

A atividade de álcool veratrílico oxidase está apresentada na figura 7. A maior produção desta enzima foi do fungo 1051 tanto em meio ácido tânico como em ácido lignossulfônico (~5,60 e 4,60 respectivamente). Os fungos 480 e 984 não apresentaram atividades de AVO em ácido tânico e o fungo 4a em ácido lignossulfônico. Os valores das demais atividades enzimáticas estão entre 2,00 e 4,50 U/L.

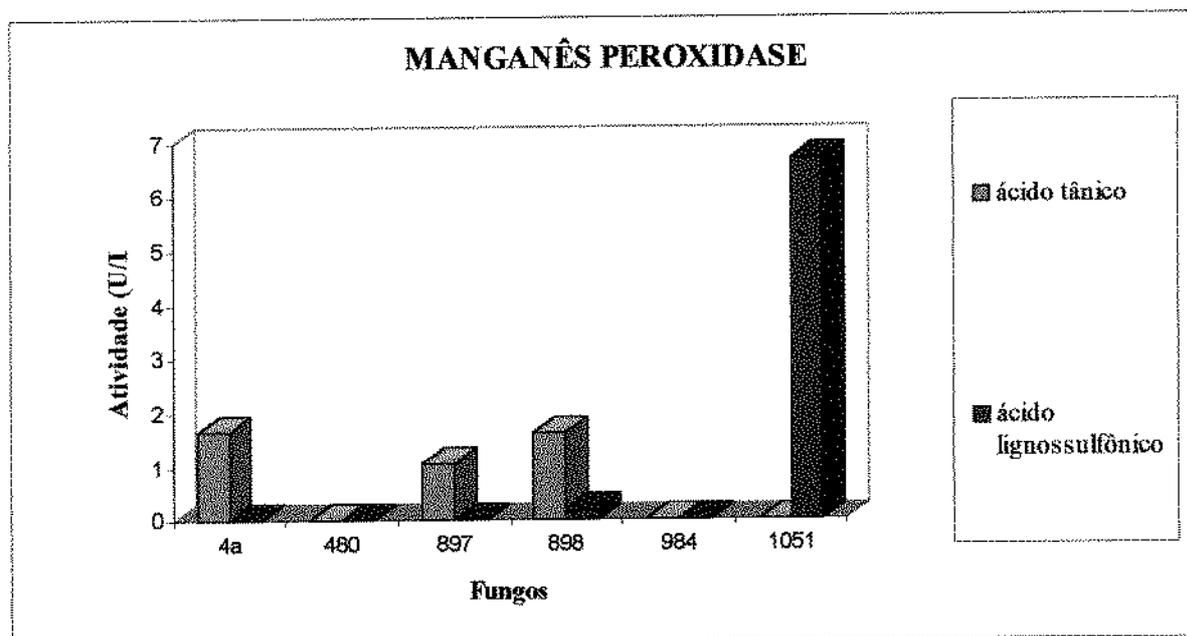


Figura 8: Atividade da enzima manganês peroxidase de seis linhagens de fungos (4a, 480, 897, 898, 984 e 1051), após 7 dias de crescimento sob condição estacionária em meio contendo ácido tânico ou ácido lignossulfônico como fontes de carbono.

A enzima MnP foi produzida por poucas linhagens de fungos, como é observado na figura 8. A máxima atividade desta enzima foi produzida pelo fungo 1051 em meio ácido lignossulfônico como fonte de carbono (~6,70 U/L). Os demais fungos apresentaram atividades em torno de 2,0 U/L, sendo que as linhagens 480 e 984 não apresentaram nenhuma atividade enzimática.

Na figura 9 pode-se observar o crescimento fúngico através da massa seca para cada fungo. De modo geral, o melhor crescimento foi em meio ácido tânico.

As linhagens com maior crescimento foram 4a, 480, 898, 984 em meio ácido tânico e em ácido lignossulfônico.

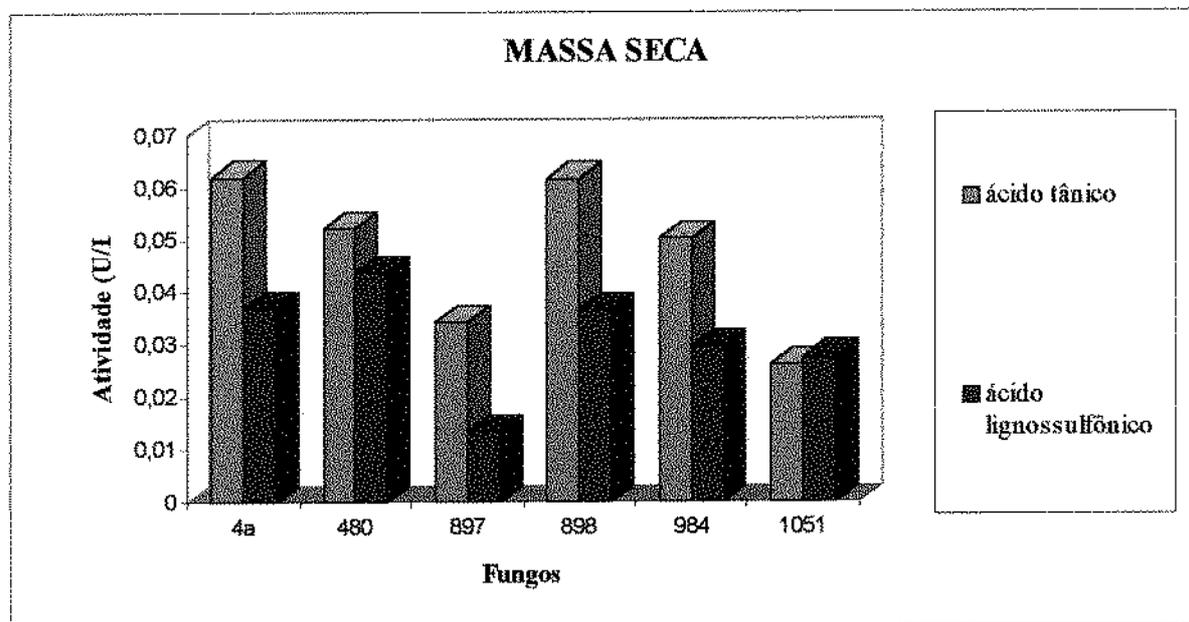


Figura 9: Massa seca de seis linhagens de fungos (4a, 897, 898, 984 e 1051) após 7 dias de crescimento sob condição estacionária em meio contendo ácido tânico ou ácido lignossulfônico como fonte de carbono.

Após a medida da atividade enzimática e a determinação da massa seca, as linhagens 897 e 898 foram selecionadas para dar continuação ao trabalho.

5.1.2. Segunda etapa

5.1.2.1. Condição Estacionária

Nesta etapa estudou-se a melhor concentração (0,05%, 0,1% ou 0,5%), para produção enzimática, dos meios de cultura contendo ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico ou fenol como fontes de carbono. A escolha da concentração foi feita através da determinação da atividade das enzimas ligninolíticas no 3^o, 7^o e 10^o dias de crescimento. Os dados das atividades

enzimáticas podem ser vistos nas tabelas de 8 a 12, em apêndice. O fungo *Phanerochaete chrysosporium* (PC) foi utilizado a partir desta fase do trabalho.

5.1.2.1.1. Ácido Tânico

Nas figuras 10, 11 e 12, observam-se as atividades ligninolíticas em meio contendo ácido tânico nas concentrações 0,05%; 0,1% e 0,5%, respectivamente.

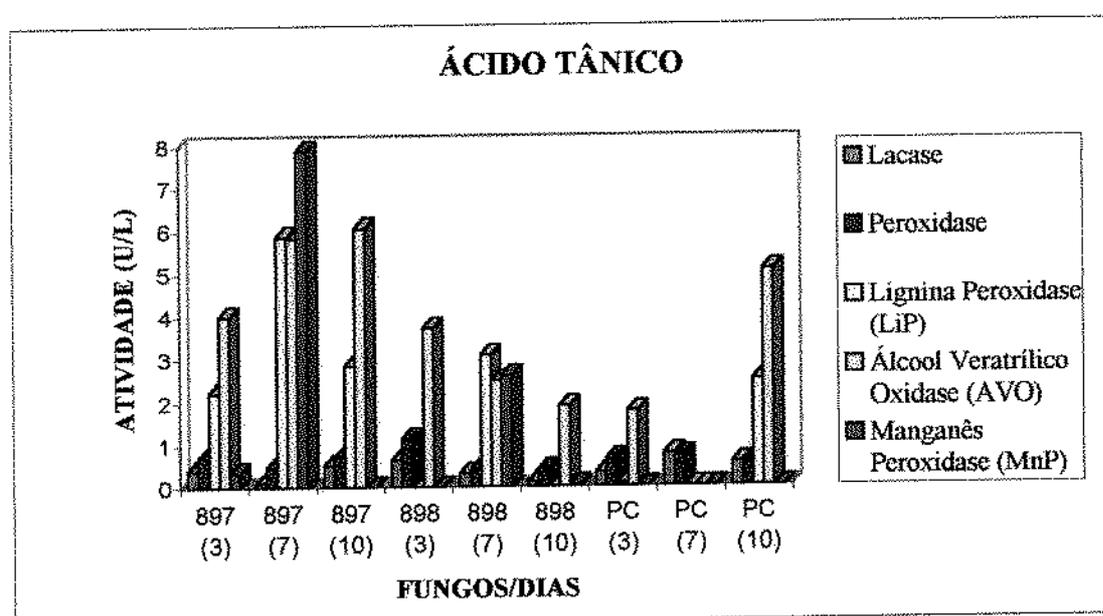


Figura 10: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,05% de ácido tânico como fonte de carbono.

De modo geral, na concentração de 0,05%, observa-se que a enzima AVO foi produzida por quase todos os fungos e em todos os dias de crescimento, sendo que as maiores atividades foram observadas para linhagem 897 (figura 10). A maior atividade de LiP e MnP foi produzida pelo fungo 897 (~5,80 e 7,80 U/L), quando crescido por 7 dias. As atividades de lacase e peroxidase foram muito baixas para todos os fungos e em todos os dias de crescimento, com valores máximos de 1,00 U/L.

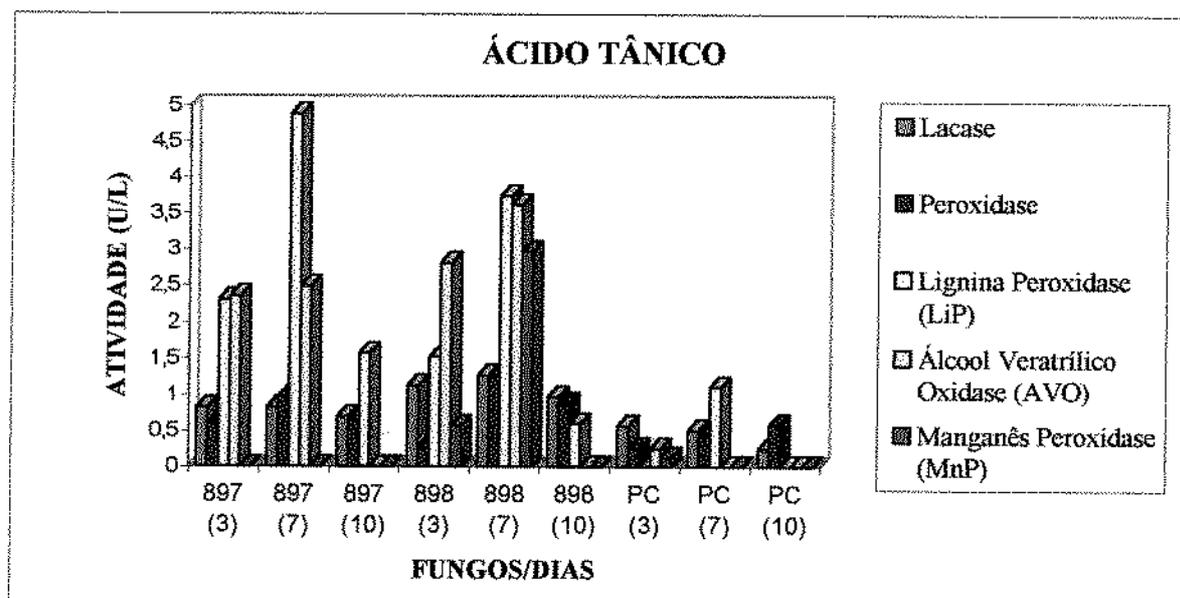


Figura 11: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,1% de ácido tânico como fonte de carbono.

Na concentração de 0,1% de fonte de carbono (figura 11), houve maior atividade das enzimas lacase e peroxidase do que na concentração de 0,05%. A maior atividade de LiP também foi produzida pela linhagem 897, quando crescida por 7 dias, mas a maior atividade de MnP foi produzida pelo fungo 898 em 7 dias de crescimento. A atividade de AVO não é observada para os fungos em todos os dias de crescimento, como na concentração de 0,05%.

Na concentração 0,5% as atividades de lacase (figura 12), peroxidase e AVO foram muito baixas para todos os fungos. As linhagens 897 e PC, quando crescidas por 7 dias e as 898 e PC, quando crescidas por 10 dias, apresentaram altas atividades de LiP (entre ~6,50 e 11,00 U/L). A máxima atividade de MnP é observada para os fungos 897 e 898, quando crescidos por 7 e 10 dias, com valores entre ~8,00 e 10,00 U/L.

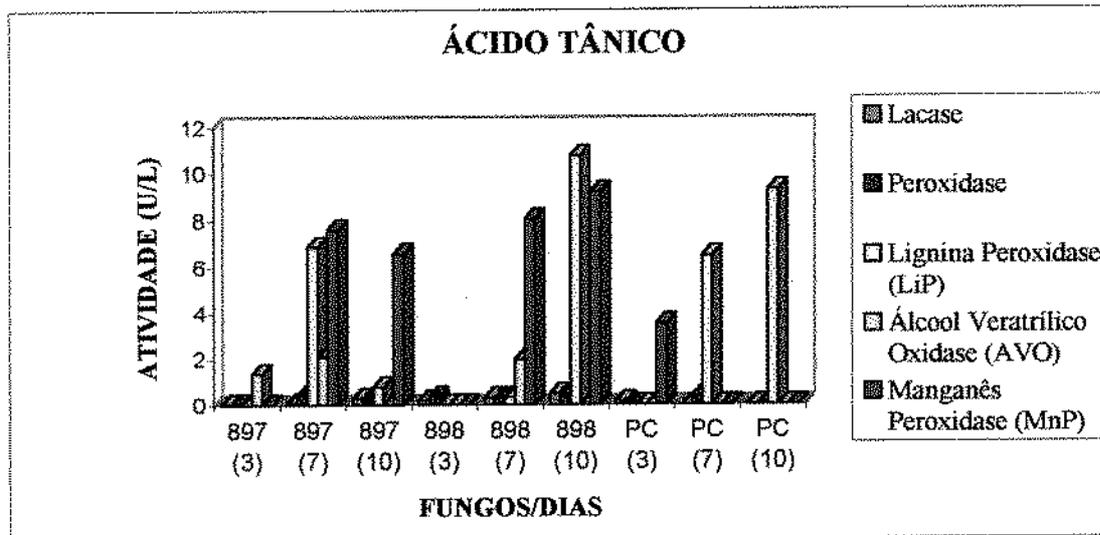


Figura 12: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,5% de ácido tânico como fonte de carbono.

Em meio contendo ácido tânico como fonte de carbono, as melhores atividades de lacase e peroxidase foram produzidas quando os fungos cresceram na concentração de 0,1% e as melhores atividades de LiP e MnP foram observadas na concentração de 0,5% de fonte de carbono.

SAXENA *et al.*(1995) trabalharam com degradação de ácido tânico por *Aspergillus niger* em diversas concentrações de meio e observaram que a maior porcentagem de degradação ocorreu quando a concentração de ácido tânico era de 0,3%, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho. De acordo com estes mesmos autores, os compostos polifenólicos, como o ácido tânico, geralmente são inibidores do crescimento microbiano, pois podem inativar várias enzimas. Entretanto, estes compostos podem estimular o crescimento, respiração, fermentação e excreção de aminoácidos.

5.1.2.1.2. Ácido Lignossulfônico

As figuras 13, 14 e 15 se referem à produção enzimática quando os fungos foram crescidos em meio contendo ácido lignossulfônico nas concentrações de 0,05%, 0,1% ou 0,5%.

Na figura 13, nota-se que a máxima atividade de MnP (~3,80 U/L) foi produzida pelo fungo 897, quando crescido por 7 dias. As enzimas lacase e peroxidase foram produzidas em pequena quantidade por todos os fungos. O fungo 897, depois de crescido por 3 e 10 dias e o fungo 898, depois de crescido por 10 dias, apresentaram as maiores atividades de LiP e AVO.

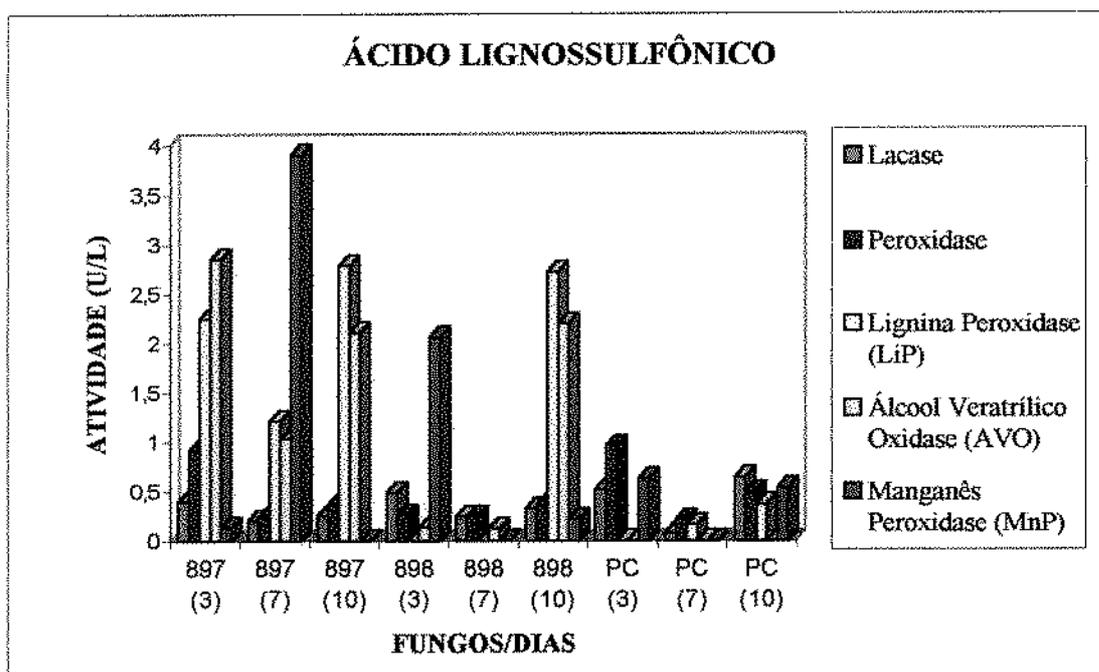


Figura 13: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,05% de ácido lignossulfônico como fonte de carbono.

A atividade de lacase detectada em quase todos os fungos, quando crescidos em meio com concentração de 0,1% de ácido lignossulfônico foi alta,

visto que de modo geral, os níveis de atividade desta enzima não são superiores a 1,00 U/L (figura 14). A máxima atividade de LiP foi produzida pela linhagem PC, no 10º dia de crescimento, e de AVO pela linhagem 897, no 3º dia de crescimento. Os níveis de atividade para enzima MnP e peroxidase foram baixos para todos os fungos.

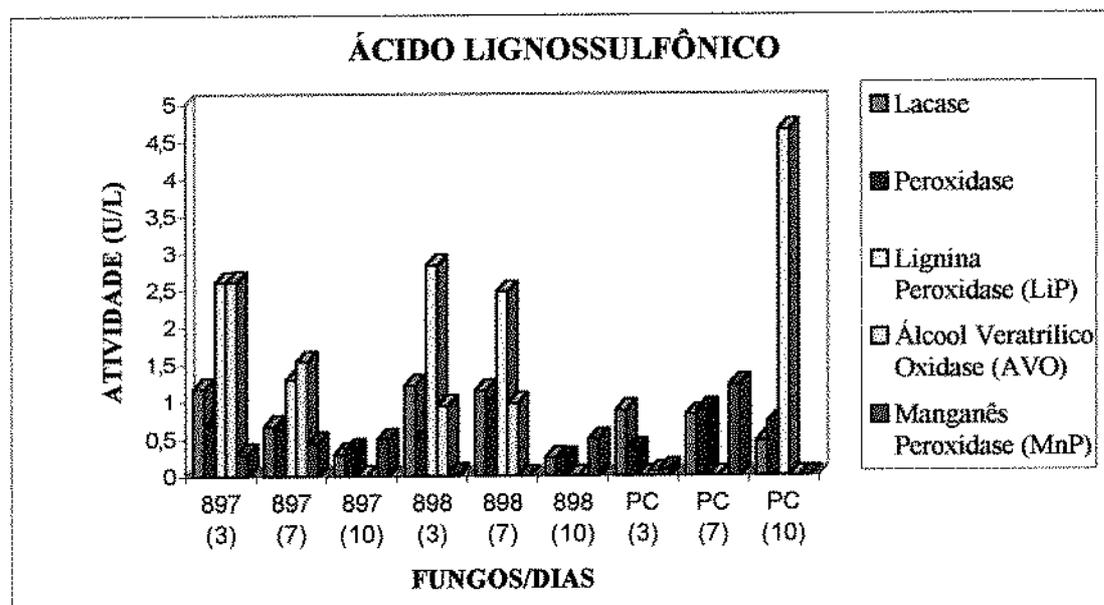


Figura 14: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,1% de ácido lignossulfônico como fonte de carbono.

Pela figura 15, pode-se observar que as atividades das enzimas lacase e peroxidase foram praticamente zero para todos os fungos e em todos os dias de crescimento. A atividade de AVO foi máxima para linhagem 898, quando crescida por 3 dias, mas as linhagens 897 e PC, no 3º dia de crescimento, também apresentaram boa atividade desta enzima. Os fungos 897 e PC, quando crescidos por 7 dias, apresentaram a mais alta atividade de LiP. A MnP foi produzida somente pelas linhagens 897 e 898, no 7º dia de crescimento, mas com baixa atividade.

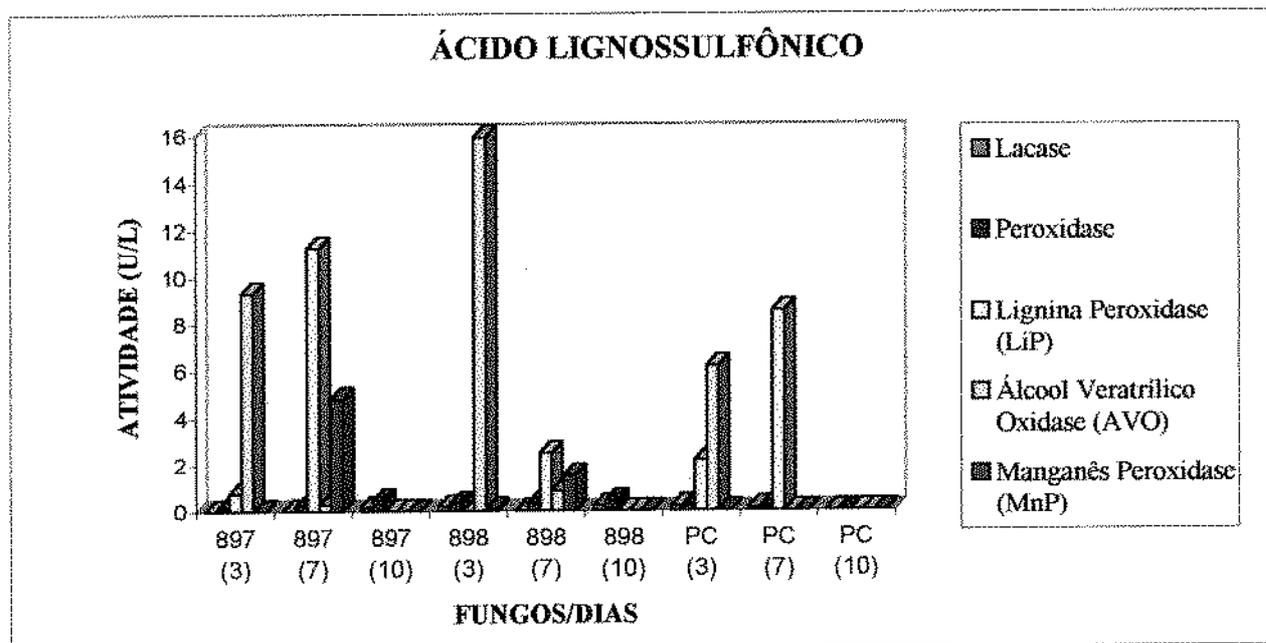


Figura 15: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,5% de ácido lignossulfônico como fonte de carbono.

Pode-se observar que a melhor concentração para produção enzimática no meio contendo ácido lignossulfônico foi a de 0,1%. Na concentração de 0,5%, os fungos, de modo geral, não apresentaram atividade, mas quando produzidas, os níveis foram altos.

As altas atividades na mais alta concentração podem estar relacionadas com a estrutura do ácido lignossulfônico, uma vez que este é constituído apenas por moléculas derivadas de lignina, as quais podem estar induzindo o sistema ligninolítico.

5.1.2.1.3. Álcool Veratrílico

Nas figuras 16, 17 e 18 estão apresentadas as atividades das enzimas ligninolíticas, quando os fungos foram crescidos em meio contendo

álcool veratrílico como fonte de carbono nas concentrações de 0,05%, 0,1% e 0,5%.

Na figura 16, observa-se que a atividade de todas as enzimas foram baixas para todos os fungos e em todos os dias de crescimento, não ultrapassando valores de ~1,50 U/L. De uma maneira geral, as enzimas que apresentaram maiores atividades foram lacase e peroxidase, sendo produzidas por todos os fungos. As enzimas LiP e AVO foram produzidas pelo fungo 898, em todos os dias de crescimento. Os fungos 897, no 10^o dia de crescimento e PC, no 3^o dia de crescimento, produziram baixas atividades destas enzimas. A enzima MnP só não foi produzida pela linhagem 897 no 7^o dia de crescimento.

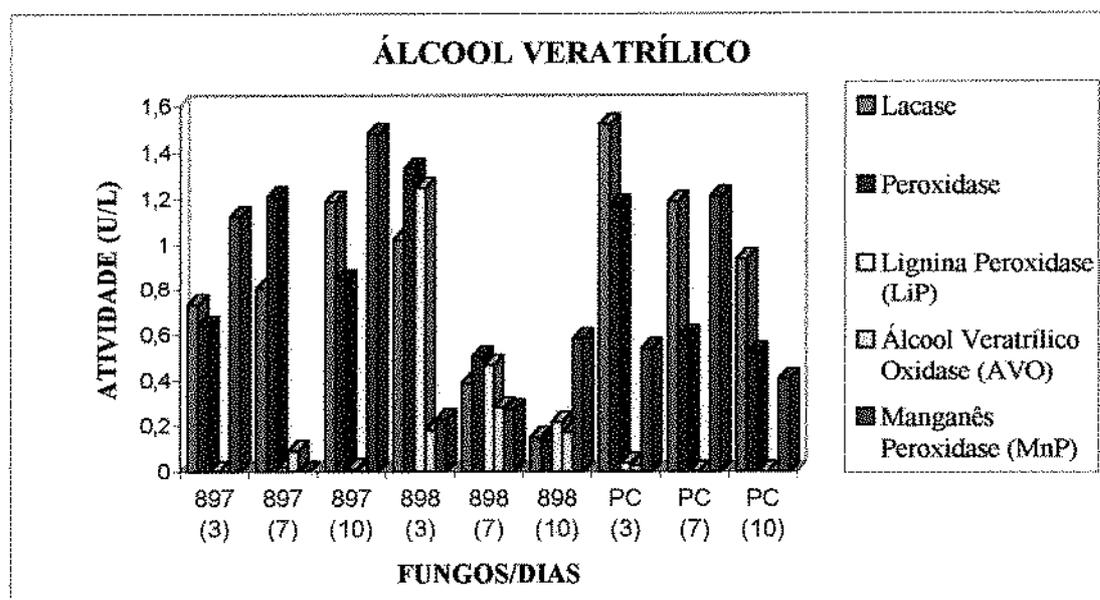


Figura 16: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,05% de álcool veratrílico como fonte de carbono.

A atividade de lacase na concentração de 0,1% de álcool veratrílico como fonte de carbono, foi alta para todos os fungos, com valores em torno de 2,50 U/L (figura 17). O fungo 898, quando crescido por 3 dias e o fungo PC, quando

crescido por 10 dias, produziram as mais altas atividades da enzima MnP (entre 2,00 a 2,70 U/L). A máxima atividade de peroxidase foi produzida pelas linhagens 897, no 3^o e 7^o dias de crescimento, e 898 e PC, no 7^o dia de crescimento. As enzimas LiP e AVO apresentaram atividades baixas para todos os fungos.

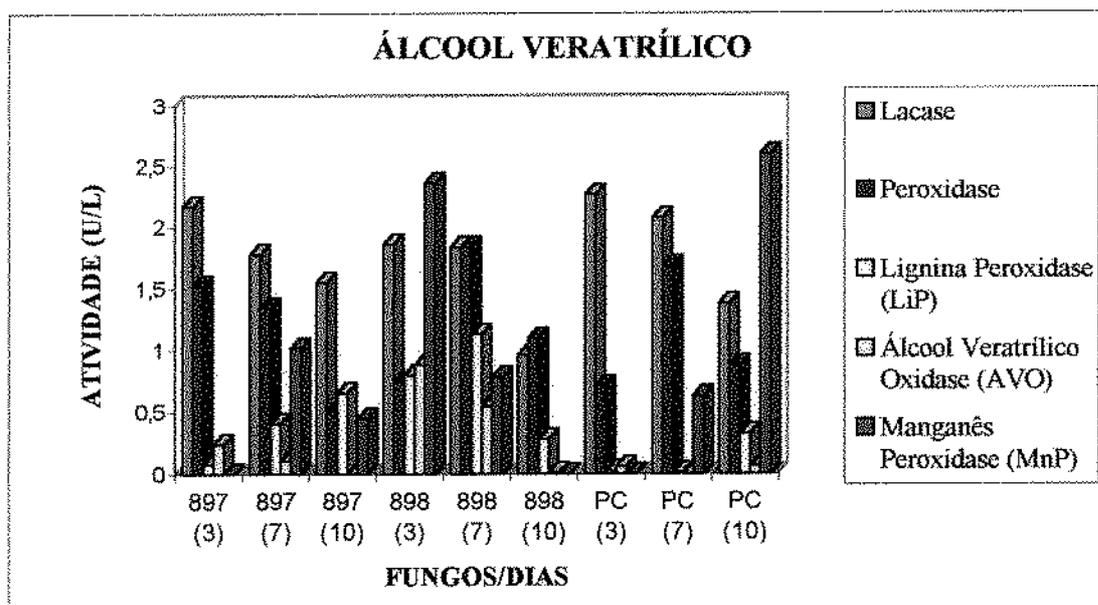


Figura 17: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,1% de álcool veratrílico como fonte de carbono.

Pela figura 18, observa-se que todos os fungos produziram baixa atividade de quase todas as enzimas, quando crescidos em meio contendo álcool veratrílico como fonte de carbono na concentração de 0,5%. Somente as linhagens 897, no 7^o dia de crescimento, e a PC, no 3^o dia de crescimento, produziram alta atividade de MnP (~7,30 e 4,80 U/L respectivamente) e o fungo PC, quando crescido por 7 dias, produziu atividade de AVO (~3,80 U/L).

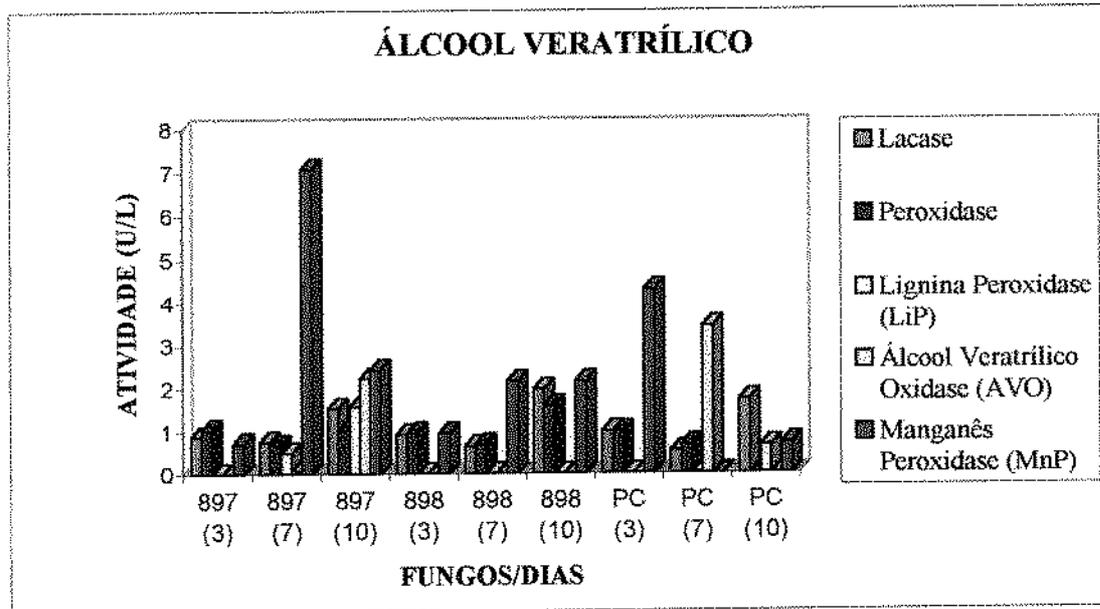


Figura 18: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,5% de álcool veratrílico como fonte de carbono.

Observou-se que a melhor concentração de álcool veratrílico para produção enzimática foi de 0,1%, sendo que somente a enzima MnP, de uma maneira geral, apresentou melhor atividade quando os fungos foram crescidos na concentração de 0,5% de fonte de carbono. Na concentração de 0,05% de álcool veratrílico, a produção enzimática foi bastante baixa para todos os fungos.

A presença de álcool veratrílico é considerada um fator importante para maior produção enzimática dos fungos ligninolíticos (WU *et al.*, 1996). Observou-se aqui, que o álcool veratrílico como fonte de carbono não aumentou a atividade das enzimas ligninolíticas, de uma maneira geral. COLLINS & DOBSON (1995) observaram em seu trabalho que o álcool veratrílico aumentava a atividade de LiP, mas não afetava os níveis de MnP. O álcool veratrílico tem a capacidade de proteger a enzima LiP da inativação por H_2O_2 , mas não funciona como indutor para produção desta enzima (CANCEL *et al.*, 1993).

5.1.2.1.4. Fenol

Observam-se, nas figuras 19, 20 e 21, as atividades das enzimas lacase, peroxidase, LiP, AVO e MnP, produzidas por fungos quando crescidos em meio contendo 0,05%, 0,1% e 0,5% de fenol como fonte de carbono.

Na figura 19, nota-se que, quando os fungos foram crescidos em 0,05% de fenol não apresentaram atividade das enzimas LiP e AVO. As melhores atividades foram da enzima MnP, sendo que os valores ficaram entre 2,50 e 3,30 U/L. Todos os fungos produziram atividades de lacase e peroxidase entre valores de 0,50 e 1,50 U/L.

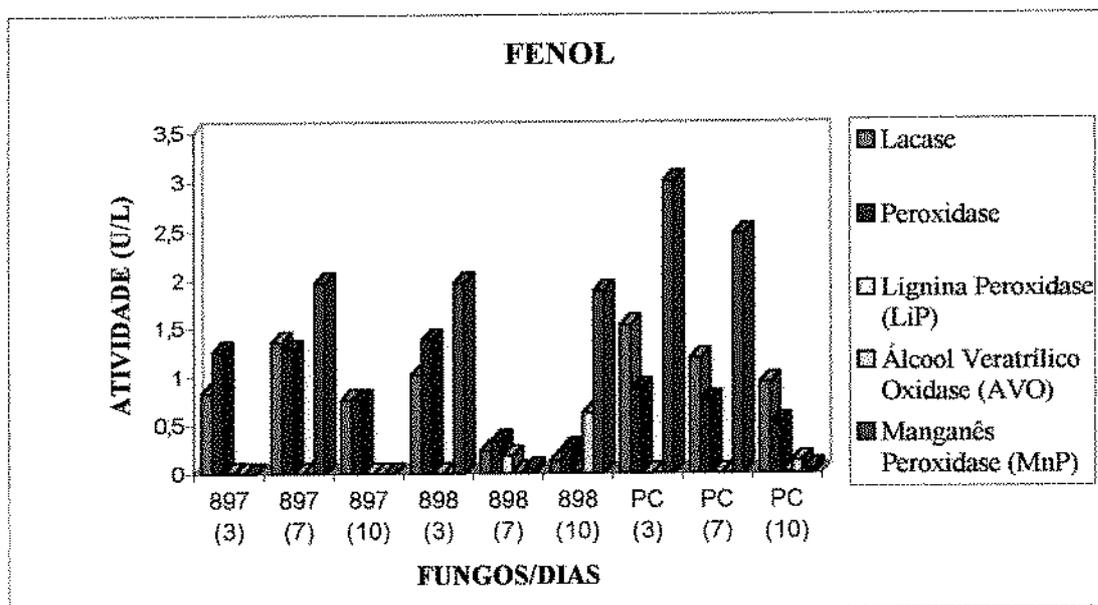


Figura 19: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,05% de fenol como fonte de carbono.

De maneira geral, todos os fungos apresentaram alta atividade de lacase, com valores superiores a 2,00 U/L, quando cultivados em meio com 0,1% de fenol (figura 20). As mais altas atividades de MnP foram produzidas pelos fungos

897 e PC, quando crescidos por 7 dias (~2,80 e 1,30 U/L). Os valores de peroxidase ficaram em torno de 1,00 e 2,00 U/L para todos os fungos e em todos os dias de crescimento. As atividades de LiP ou AVO, quando produzidas, foram baixas para todos os fungos.

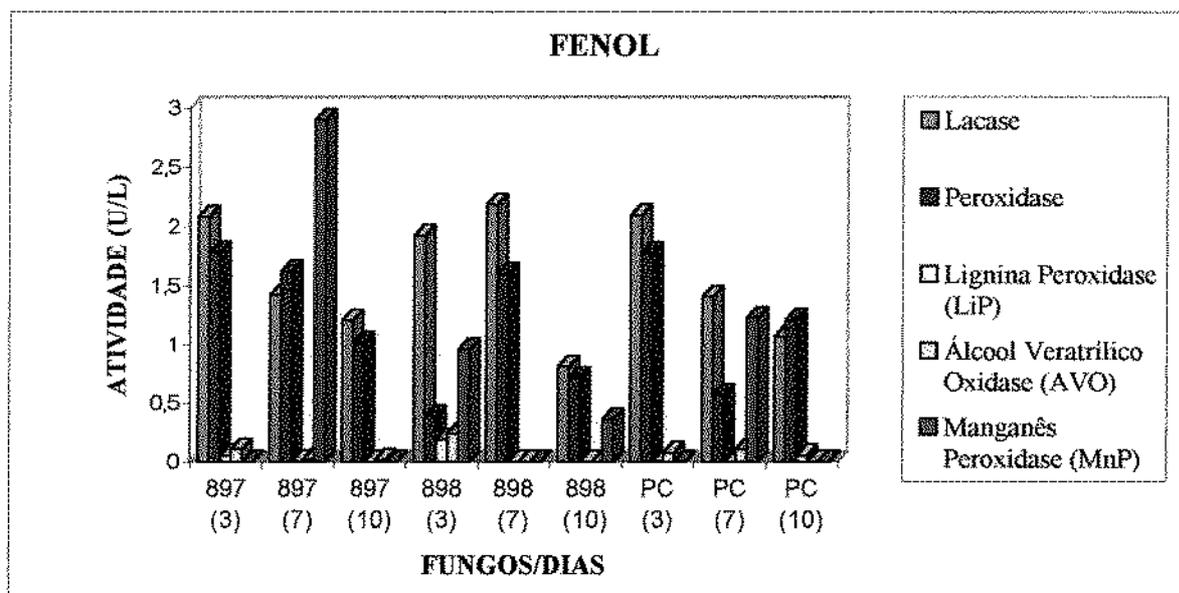


Figura 20: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,1% de fenol como fonte de carbono.

As máximas atividades de MnP, quando os fungos foram crescidos em 0,5% de fenol, foram produzidas pelas linhagens 898, no 7^o dia de crescimento, e PC, no 7^o e 10^o dias de crescimento (figura 21). As enzimas lacase e peroxidase apresentaram valores entre 1,00 e 2,00 U/L, e as enzimas LiP e AVO não foram produzidas por nenhum fungo e em nenhum dia de crescimento.

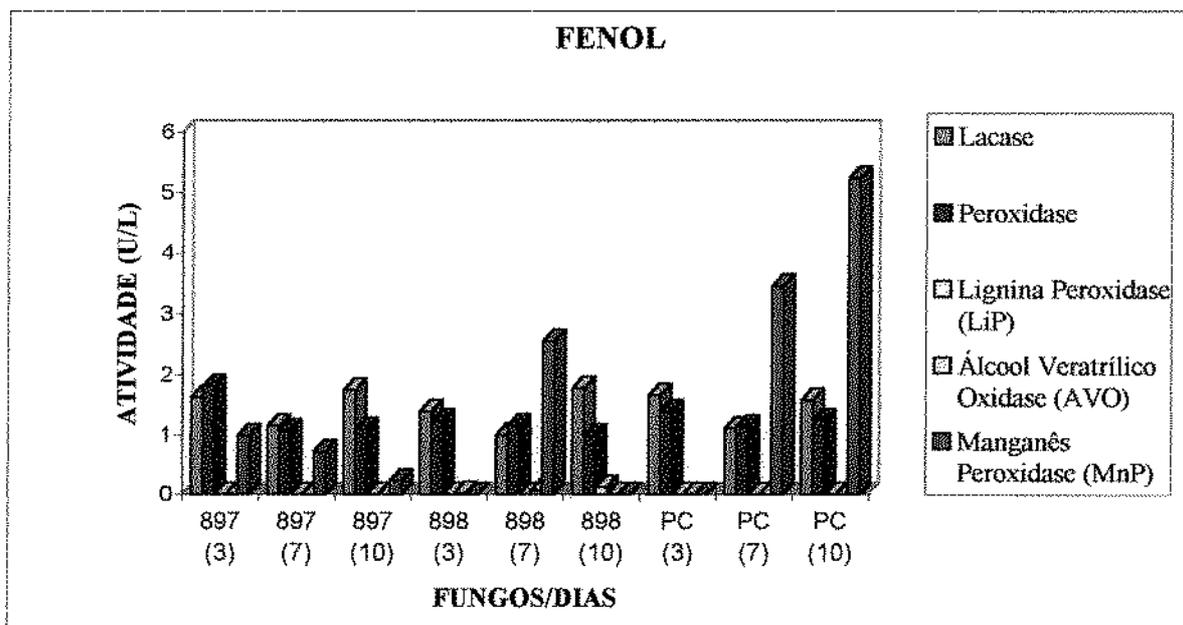


Figura 21: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo 0,5% de fenol como fonte de carbono.

Para o meio contendo fenol como fonte de carbono, observa-se que os fungos apresentaram valores de atividade enzimática semelhantes nas concentrações de 0,05% e 0,1%. Na concentração de 0,5% de fonte de carbono somente algumas linhagens apresentaram altas atividades de MnP. As baixas atividades enzimáticas encontradas para este meio, deve-se talvez à alta toxicidade deste composto, impedindo o crescimento dos fungos e portanto, a produção de enzimas por estes.

5.1.2.2. Condição sob Agitação

Após a produção das enzimas ligninolíticas em três diferentes concentrações de fonte de carbono, utilizou-se a concentração de 0,1% para o estudo do efeito da agitação sobre produção enzimática. As figuras 22 a 25 e as tabelas 13 e 14 (em apêndice), mostram o resultados obtidos neste estudo.

Na figura 22, observa-se a produção enzimática de três fungos em meio contendo ácido tânico, sob agitação. As atividades enzimáticas, de uma maneira geral, foram baixas, destacando-se, porém, as atividades das enzimas LiP e AVO. A máxima atividade de LiP foi produzida pelo fungo PC, quando crescido por 7 dias, seguida dos valores para os fungos PC, no 10º dia e 897, no 7º dia de crescimento. A mais alta atividade de AVO também foi produzida pelo fungo PC, quando crescido por um período de 7 dias. Todos os fungos produziram baixas atividades de lacase e peroxidase, em todos os dias de crescimento.

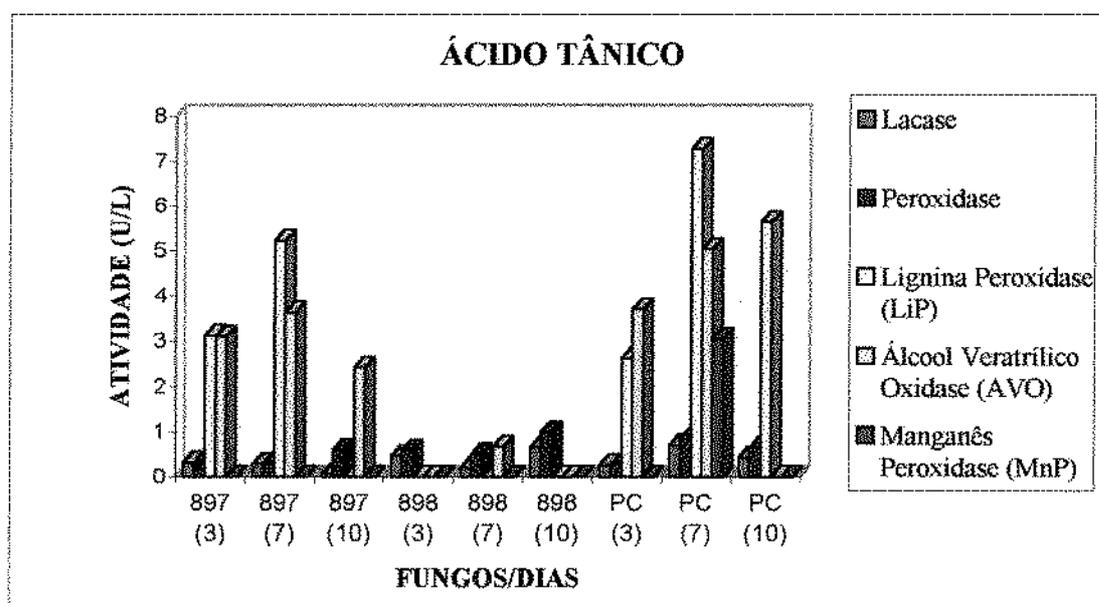


Figura 22: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo ácido tânico como fonte de carbono, sob agitação.

Em meio contendo ácido lignossulfônico, sob agitação, os fungos produziram atividades semelhantes de lacase e peroxidase, em torno de 1,00 U/L (figura 23). Observa-se a máxima atividade de LiP para os fungos 897 e PC (~3,00 U/L), quando crescido por 3 dias e de AVO para os fungos 897, no 3º dia de crescimento. Somente a linhagem 897, quando crescida por 10 dias, apresentou uma alta atividade de MnP (~3,00 U/L), comparando-se com as outras linhagens.

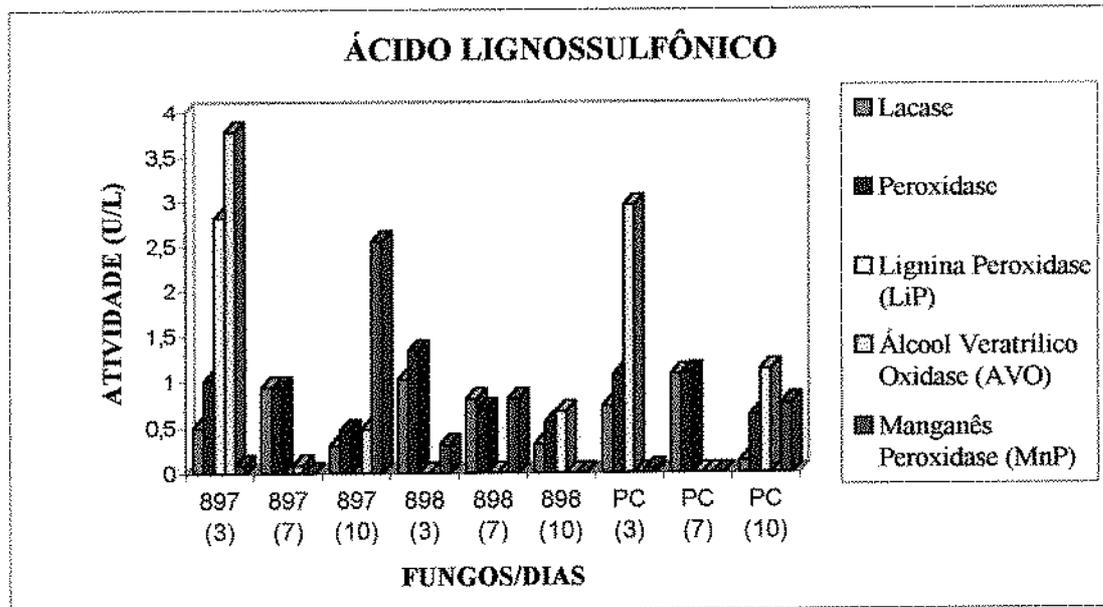


Figura 23: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo ácido lignossulfônico como fonte de carbono, sob agitação.

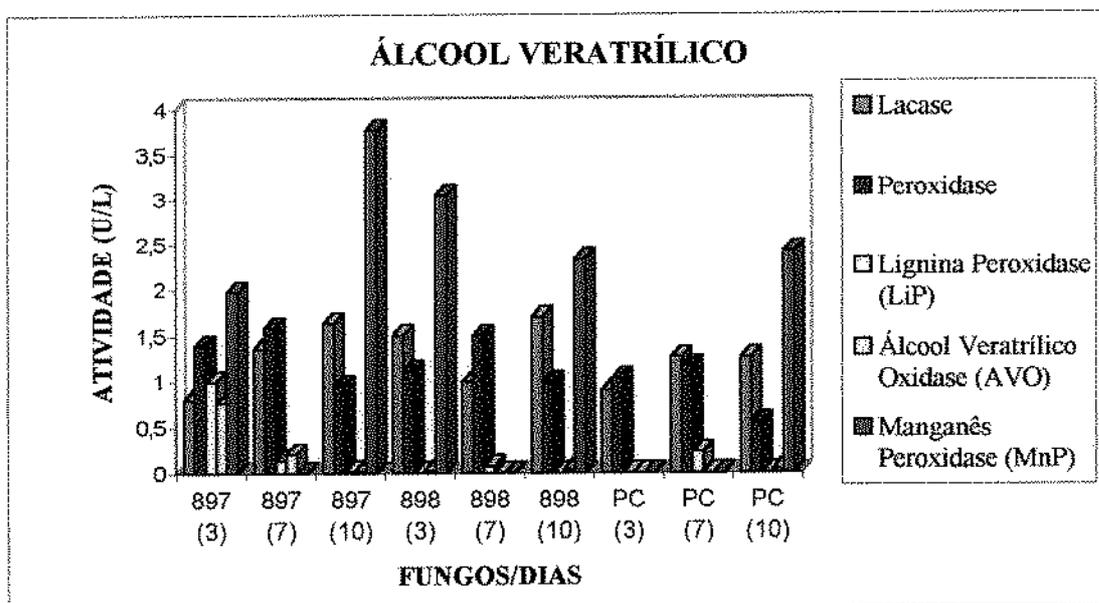


Figura 24: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo álcool veratrílico como fonte de carbono, sob agitação.

Todos os fungos produziram lacase e peroxidase, em todos os dias de crescimento (com valores entre 0,50 e 2,00 U/L), quando crescidos em meio

contendo álcool veratrílico, sob agitação (figura 24). A máxima atividade de MnP foi produzida por todos os fungos, no 10º dia de crescimento e pelos fungos 897 e 898, quando crescidos por 3 dias. A linhagem 897, no 3º e 7º dias de crescimento e os fungos 898 e PC, no 7º dia de crescimento produziram baixa atividade de LiP e AVO e os demais fungos não produziram esta enzima.

Na figura 25, observam-se as atividades das enzimas ligninolíticas quando os fungos foram crescidos em meio contendo fenol como fonte de carbono, sob agitação. A máxima atividade de MnP foi produzida pelas linhagens 897, no 3º dia de crescimento e 898, no 3º e 10º dias de crescimento. Não foram encontradas atividades de LiP e AVO para a maioria dos fungos. As atividades de lacase e peroxidase foram produzidas com valores entre 0,50 e 2,00 U/L.

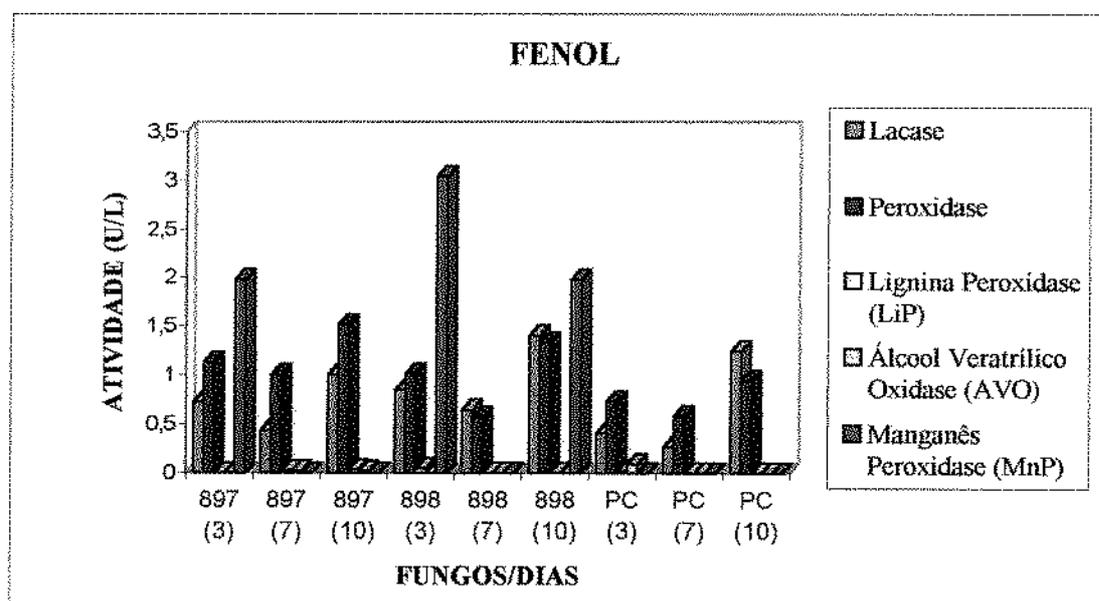


Figura 25: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase) de três fungos (897, 898 e PC- *P. chrysosporium*) após 3, 7 e 10 dias de crescimento em meio contendo fenol como fonte de carbono, sob agitação.

Ao comparar-se as atividades ligninolíticas produzidas pelos fungos em condição estacionária e sob agitação, na mesma concentração de fonte de carbono, observa-se que os fungos produziram atividades enzimáticas

semelhantes nas duas condições de cultivo, sendo que, algumas vezes, apresentaram maior atividade quando crescidos em condição sob agitação, como o PC em meio contendo ácido tânico. Segundo FAISON & KIRK (1985), a atividade de ligninase era abolida por agitação durante o crescimento das culturas, que resultavam na formação de “pellets miceliais”. A atividade de ligninase foi inativada nas culturas de *P. chrysosporium* sob condições de agitação em culturas líquidas (VENKATADRI & IRVINE, 1990). PELAEZ *et al.* (1995), trabalhando com 68 linhagens de basidiomicetos, observaram que em culturas sob agitação, a atividade de MnP foi menor para algumas das linhagens testadas, entretanto, a atividade de LiP não foi detectada em nenhuma das culturas estudadas.

5.2. Seleção das Melhores Linhagens

5.2.1. Efeito da Oxigenação

Nesta fase do trabalho, estudou-se o efeito da oxigenação sobre o crescimento dos fungos e a produção das enzimas ligninolíticas por eles. Os frascos foram oxigenados no 3^o dia de crescimento dos fungos, em meio contendo 0,1% ou 0,5% de ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico ou fenol como fontes de carbono. Segundo BAR-LEV & KIRK (1981), a adição de O₂ durante a transição entre o metabolismo primário e secundário influencia fortemente a atividade do sistema ligninolítico que está se desenvolvendo, provavelmente porque o O₂ induz a síntese de uma ou mais enzimas ligninolíticas.

Os dados das atividades enzimáticas, quando os microrganismos foram oxigenados estão nas tabelas 15 e 16, no apêndice.

Na figura 26, observa-se que quando os fungos foram crescidos em meio oxigenado contendo 0,1% de ácido tânico, a única linhagem que produziu as cinco enzimas ligninolíticas foi a 897 no 7º dia de crescimento, inclusive a atividade máxima de MnP (8,75 U/L). O fungo 898 produziu LiP, quando crescido por 7 dias e os demais fungos produziram somente atividade das enzimas lacase e peroxidase, com valores abaixo de 1,00 U/L.

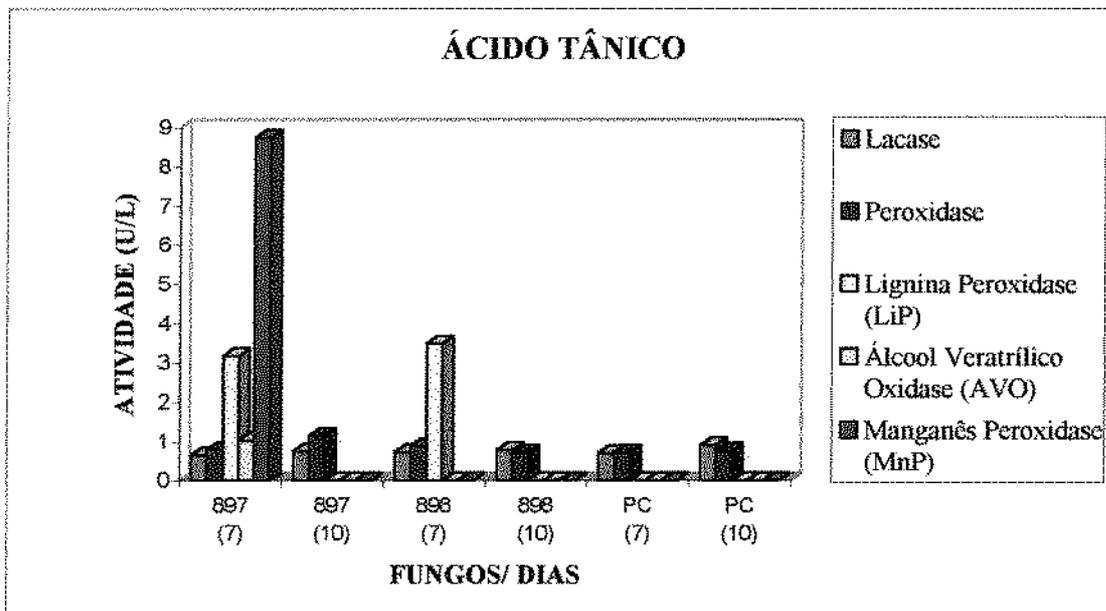


Figura 26: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,1% de ácido tânico como fonte de carbono.

Quando os fungos foram crescidos em meio contendo 0,5% de ácido tânico, com oxigenação, observou-se uma maior produção de enzimas ligninolíticas (figura 27). A máxima atividade de MnP (7,80 U/L) foi produzida pela linhagem 897 após 10 dias de crescimento. A atividade de LiP foi maior após 7 dias de crescimento em todos os fungos (5,50 a 6,50 U/L). As atividades de lacase e peroxidase não apresentaram valores maiores que 1,50 U/L. O fungo 897 produziu as melhores atividades de AVO, quando crescido por 7 e 10 dias.

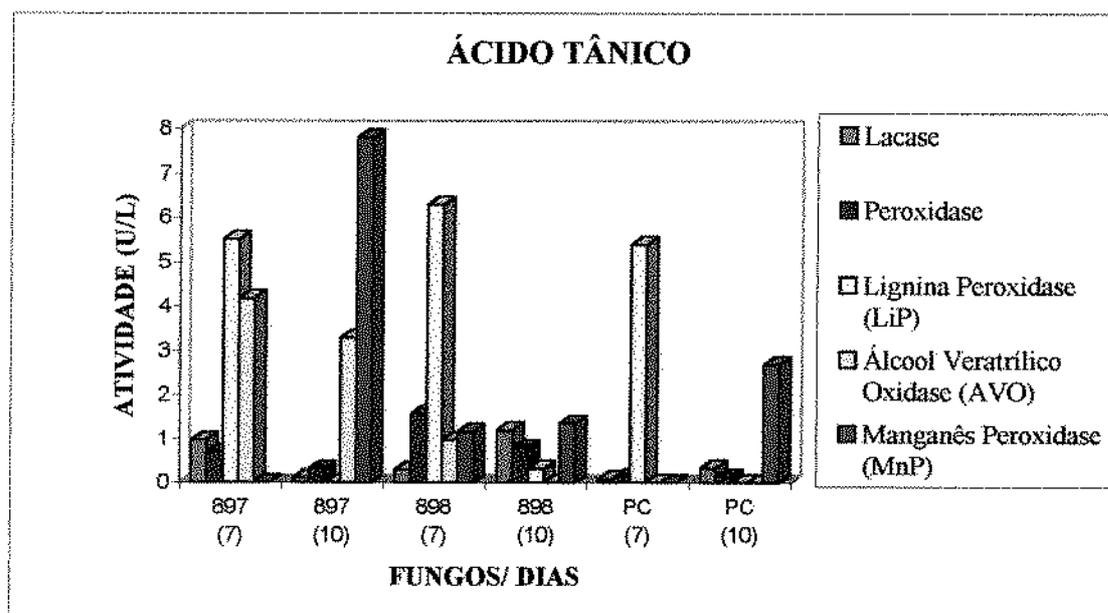


Figura 27: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,5% de ácido tânico como fonte de carbono.

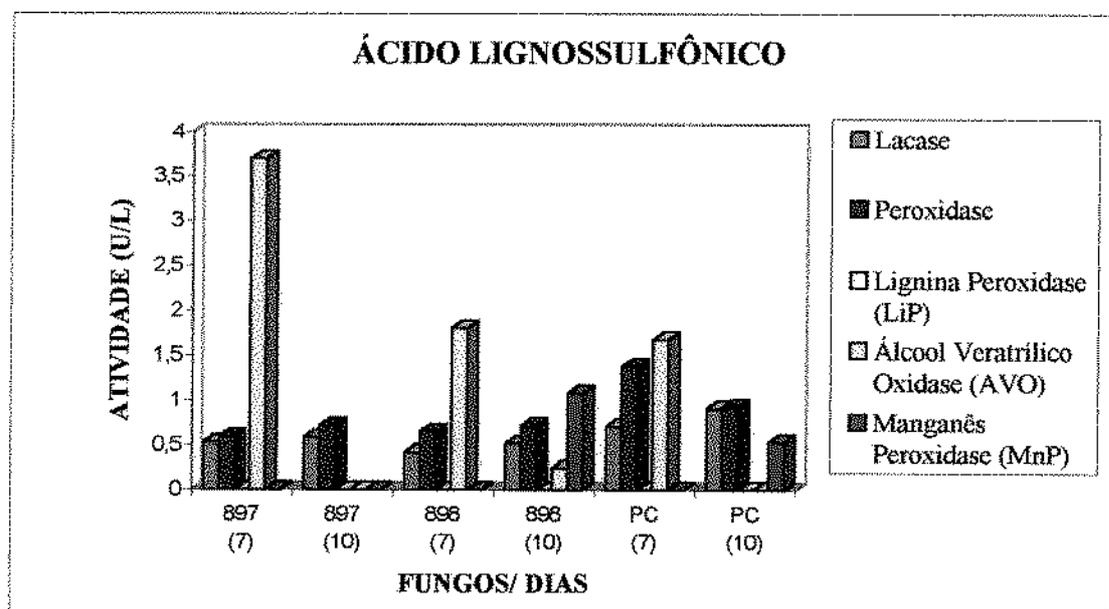


Figura 28: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,1% de ácido lignossulfônico como fonte de carbono.

Em meio contendo 0,1% de ácido lignossulfônico, nenhum dos fungos estudado foi capaz de produzir a enzima LiP (figura 28). A maior atividade de AVO (3,69 U/L) foi produzida pela linhagem 897, quando crescida por 7 dias, sendo produzida pelas linhagens 898 e PC, também após 7 dias de crescimento, mas em menor atividade. O fungo PC, no 7^o dia de crescimento, produziu a maior atividade de peroxidase e 898, no 10^o dia, a maior atividade de MnP. Os valores da enzima lacase ficaram em torno de 0,50 U/L.

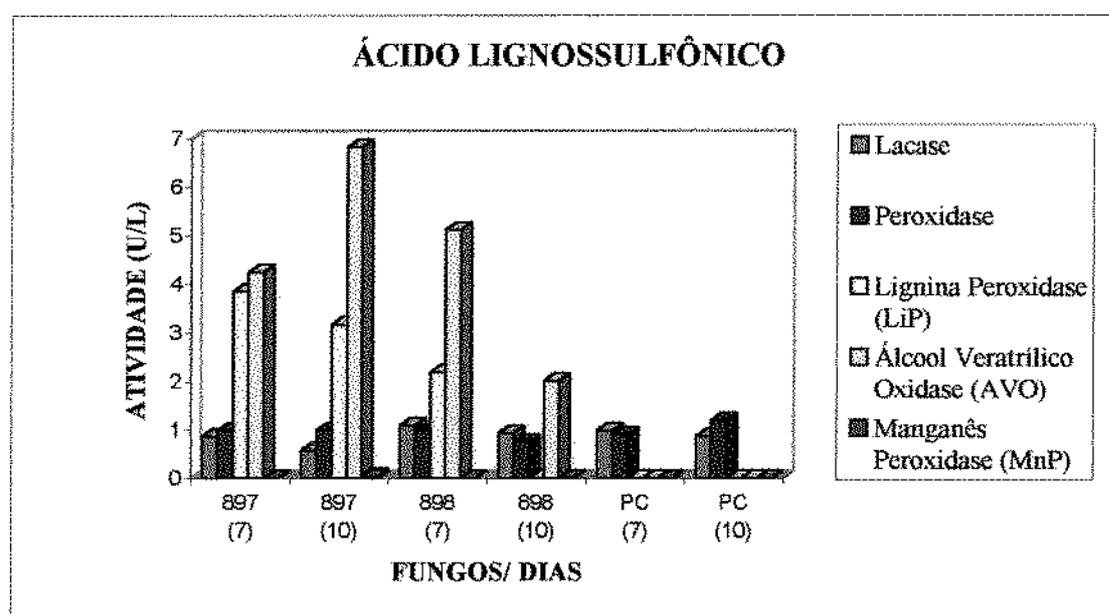


Figura 29: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,5% de ácido lignossulfônico como fonte de carbono.

Na figura 29, observa-se a atividade enzimática dos fungos crescidos em 0,5% de ácido lignossulfônico, com oxigenação. A AVO foi a enzima que apresentou maior produção pelas linhagens estudadas, com exceção de PC, que não produziu esta enzima. A maior atividade de LiP foi produzida pelo fungo 897, quando crescido por 7 dias (3,84 U/L). Esta enzima não foi produzida pela linhagem 898, após 10 dias de crescimento e pela PC, após 7 e 10 dias de

crescimento. As enzimas lacase e peroxidase apresentaram valores próximos a 1,00 U/L e a enzima MnP não foi produzida por nenhum fungo.

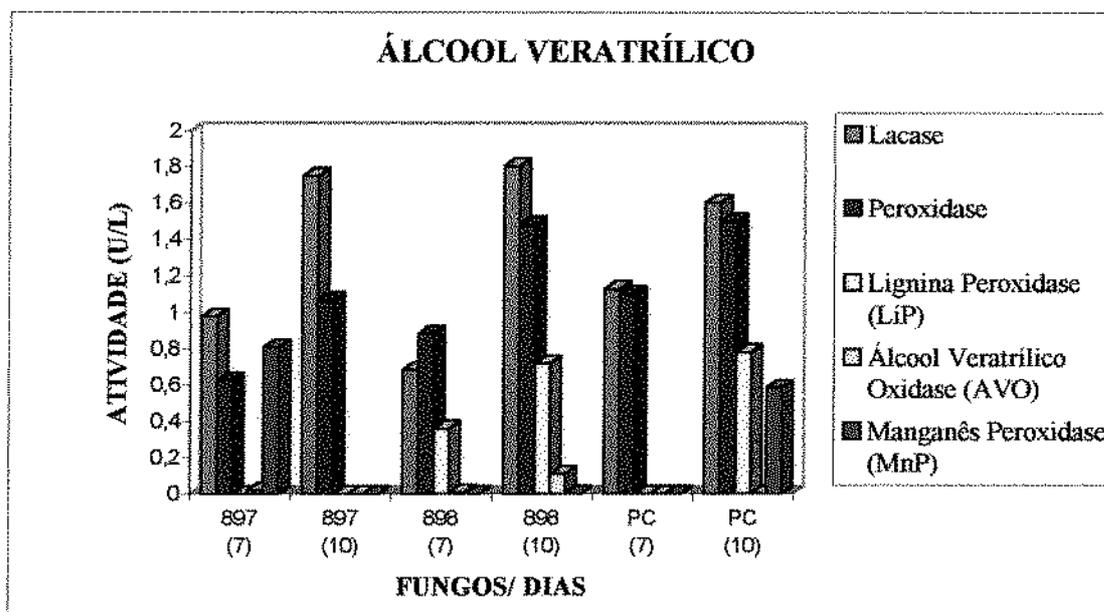


Figura 30: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,1% de álcool veratrílico como fonte de carbono.

Na figura 30, observa-se que quando os fungos foram crescidos em meio contendo 0,1% de álcool veratrílico, com oxigenação, as atividades enzimáticas foram produzidas em pequena quantidade, sendo que nenhuma enzima apresentou atividade superior a 2,00 U/L. Os fungos 897 e 898, após 10 dias de crescimento, produziram as maiores atividades de lacase (~1,80 U/L). As maiores atividades de peroxidase foram produzidas pelos fungos 898 e PC, quando crescidos por 10 dias (~1,60 U/L).

Na figura 31, está apresentada a atividade ligninolítica produzida pelos fungos, quando crescidos em meio oxigenado, contendo 0,5% de álcool veratrílico. Os fungos 897 e 898, após 7 dias de crescimento e PC, quando crescido por 10 dias, produziram as maiores atividades de MnP (~4,30 U/L). As

enzimas lacase e peroxidase foram produzidas por todos os fungos, apresentando valores entre 0,50 e 1,50 U/L. As enzimas AVO e LiP não foram produzidas por nenhum fungo.

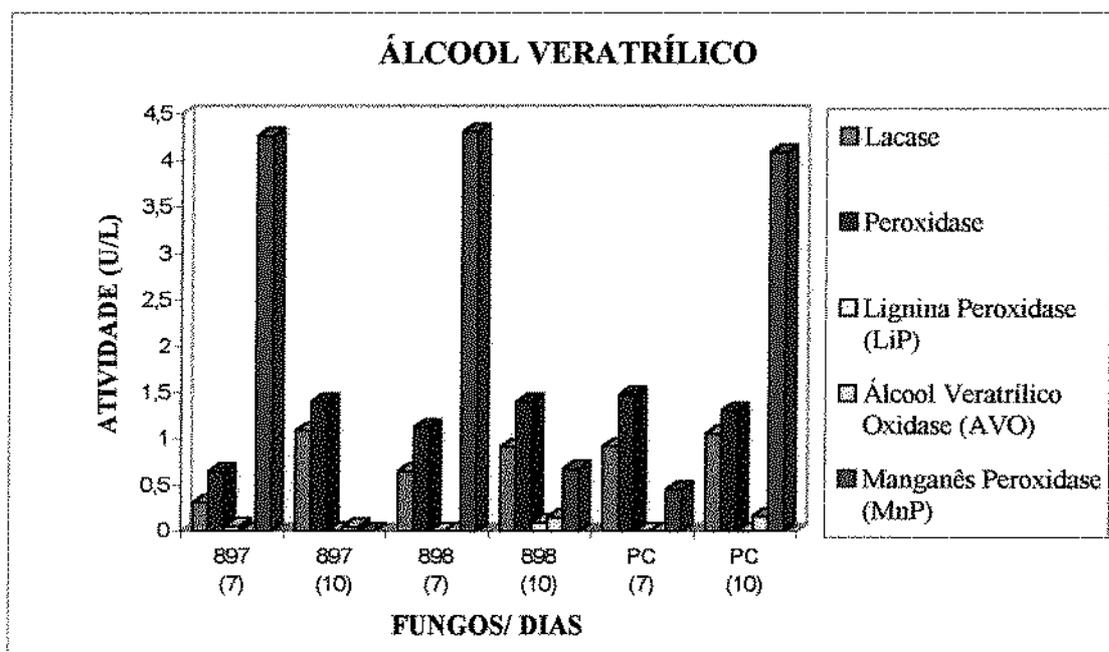


Figura 31: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 7 e 10 dias crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,5% de álcool veratrílico como fonte de carbono.

Quando os fungos foram crescidos em meio contendo 0,1% de fenol, com oxigenação, a enzima lacase foi produzida em maior quantidade, com valores entre 1,0 e 1,6 U/L (figura 32). A atividade de peroxidase foi produzida em maior quantidade pelas linhagens 897, quando crescidas por 7 e 10 dias e 898, após 7 dias de crescimento. Os fungos não produziram ou apresentaram baixos valores das demais enzimas.

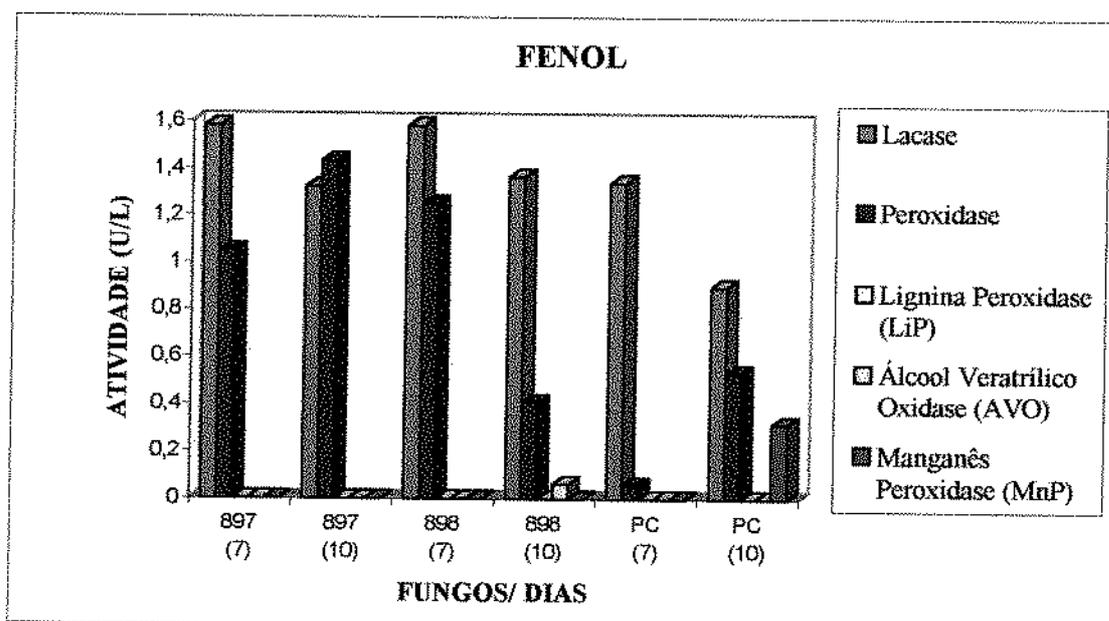


Figura 32: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,1% de fenol como fonte de carbono.

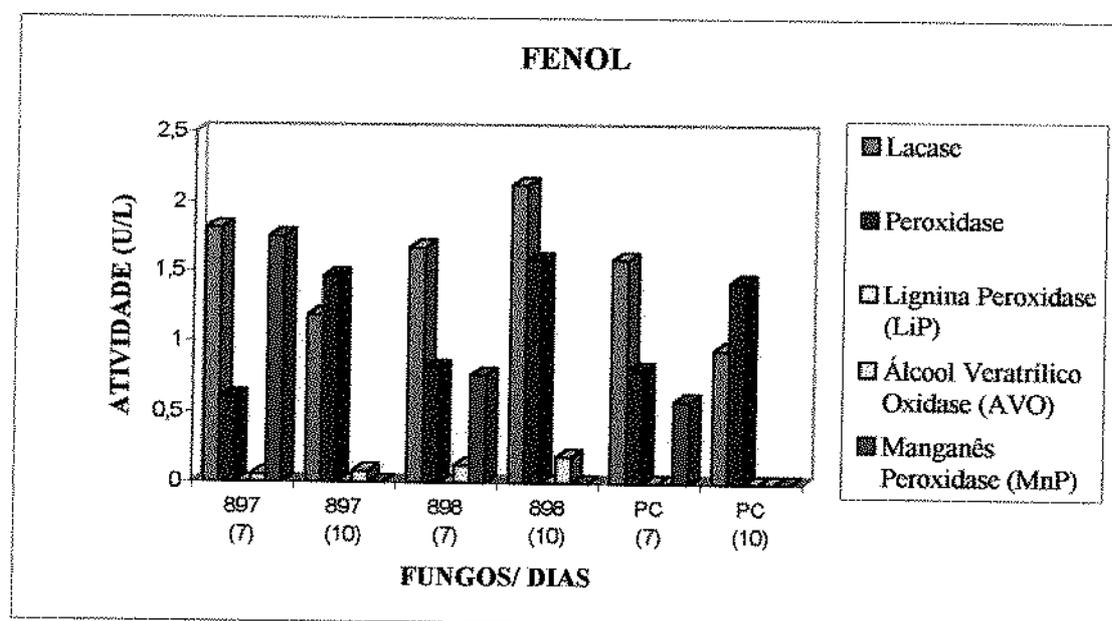


Figura 33: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 7 e 10 dias de crescimento, em meio com oxigenação, contendo 0,5% de fenol como fonte de carbono.

Os fungos produziram a enzima lacase em maior atividade (1,00 a 2,30 U/L), quando crescidos em meio contendo 0,5% de fenol (figura 33). A atividade

de MnP só foi produzida pelos fungos após 7 dias de crescimento. A atividade de peroxidase foi produzida pelos fungos estudados, em todos os dias de crescimento (0,50 a 1,50 U/L). A enzima LiP não foi produzida por nenhum fungo e a AVO foi produzida em pequena quantidade.

Observando-se todos os resultados, nota-se que não existe uma enzima que é produzida com atividade superior, isto é, uma enzima pode ser produzida em maior ou menor atividade pelo mesmo fungo, dependendo da concentração e da fonte de carbono utilizada. Mas, na concentração de 0,5% a produção enzimática é maior quando comparada à concentração de 0,1%.

Comparando-se esses dados com os obtidos na condição estacionária sem oxigenação, observou-se também que a oxigenação não aumentou a produção enzimática, ao contrário do que é observado na literatura, onde a presença de O₂ aumenta consideravelmente a atividade de MnP e LiP (WU *et al.*, 1996; ZHAO *et al.*, 1996; FAISON & KIRK, 1985).

5.2.2. Efeito da adição de glicose

Os fungos foram crescidos em meio contendo 0,1 ou 0,5% de ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico ou fenol, adicionando-se 0,5% de glicose como outra fonte de carbono, nas condições sem e com oxigenação. Os dados estão apresentados nas tabelas de 17 a 21, no apêndice.

5.2.2.1. Sem Oxigenação

Na figura 34, observa-se que a atividade máxima de AVO (2,33 U/L) foi produzida pela linhagem 897, após 10 dias de crescimento, em meio com 0,1%

de ácido tânico. Os demais fungos não produziram esta enzima. Todos os fungos produziram as enzimas lacase e peroxidase, com valores próximos a 1,00 U/L. A enzima LiP só foi produzida pelas linhagens 897 e PC, no 3^o dia de crescimento.

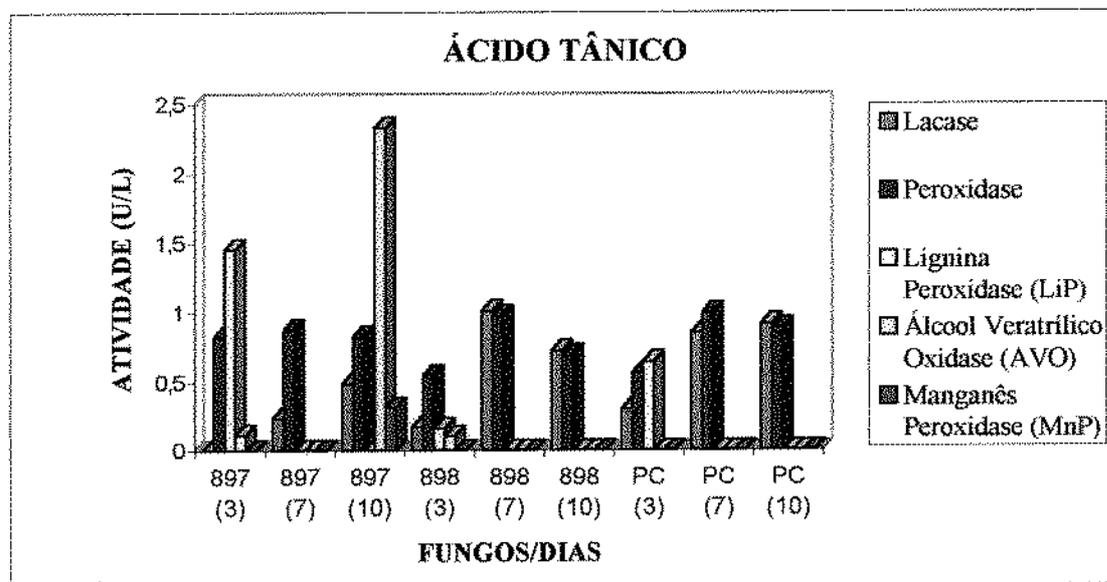


Figura 34: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,1% de ácido tânico como fonte de carbono, na condição sem oxigenação com adição de glicose.

Os fungos crescidos em meio contendo glicose e 0,5% de ácido tânico, produziram uma alta atividade enzimática (figura 35). A maior atividade de LiP foi produzida pela linhagem 897, quando crescida por 3 dias (14,50 U/L). O fungo PC, quando crescido por 3 e 10 dias, produziu as maiores atividades de AVO, respectivamente 12,71 e 10,79 U/L, e quando crescido por 7 dias a maior atividade de MnP (13,0 U/L). As enzimas lacase e peroxidase foram produzidas em baixas concentrações por todos os fungos.

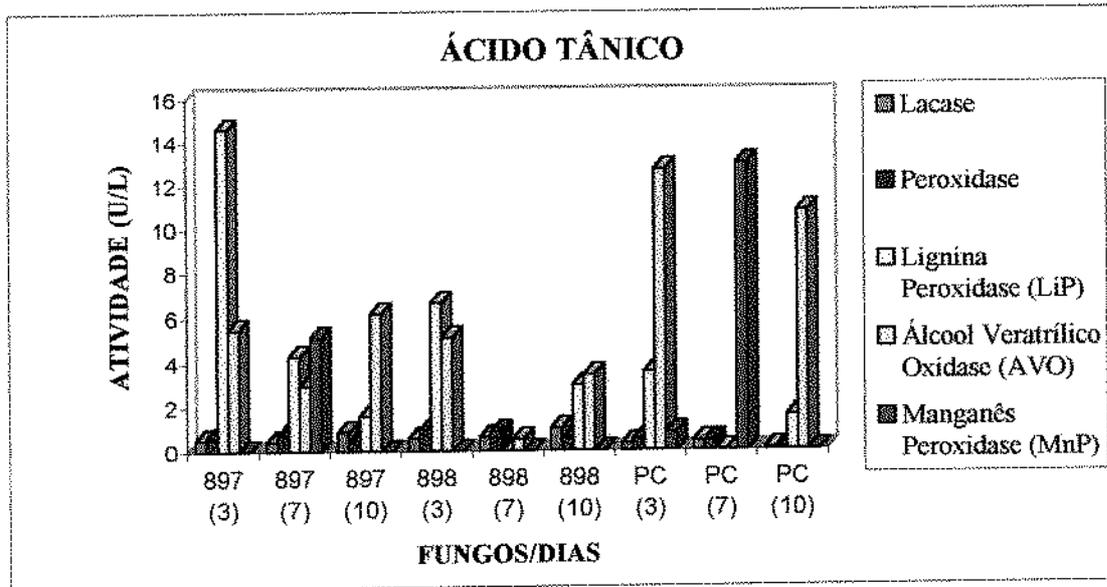


Figura 35: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,5% de ácido tânico como fonte de carbono, na condição sem oxigenação com adição de glicose.

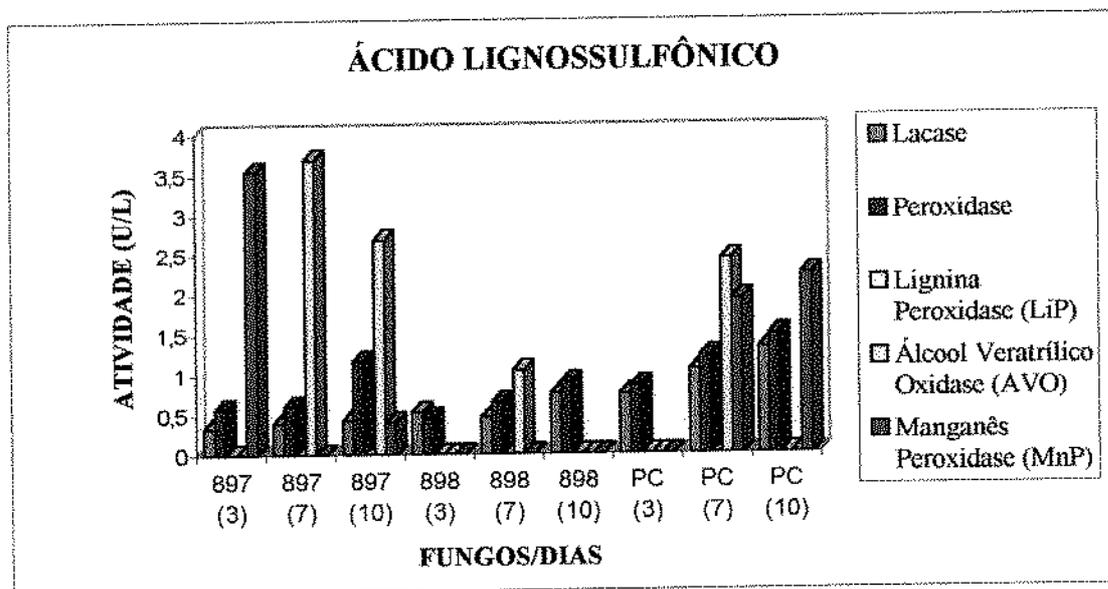


Figura 36: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,1% de ácido lignossulfônico como fonte de carbono, na condição sem oxigenação com adição de glicose.

Em meio contendo 0,1% de ácido lignossulfônico (figura 36), as maiores atividades de MnP foram produzidas pelos fungos 897, no 3º dia de crescimento e PC, no 7º e 10º dias de crescimento (2,00 a 3,50 U/L). As linhagens que

produziram atividade mais alta de AVO foram 897, no 7^o e 10^o dias de crescimento e PC, quando crescido por 7 dias. As enzimas lacase e peroxidase apresentaram valores próximos para todos os fungos e a enzima LiP não foi produzida por nenhum deles.

Em meio contendo 0,5% de ácido lignossulfônico, os fungos 898 e PC, quando crescidos por um período de 10 dias, produziram alta atividade de LiP, respectivamente 21,50 e 13,74 U/L (figura 37). As demais enzimas foram produzidas com valores entre 1,00 e 3,00 U/L, por todos os fungos e em todos os dias de crescimento.

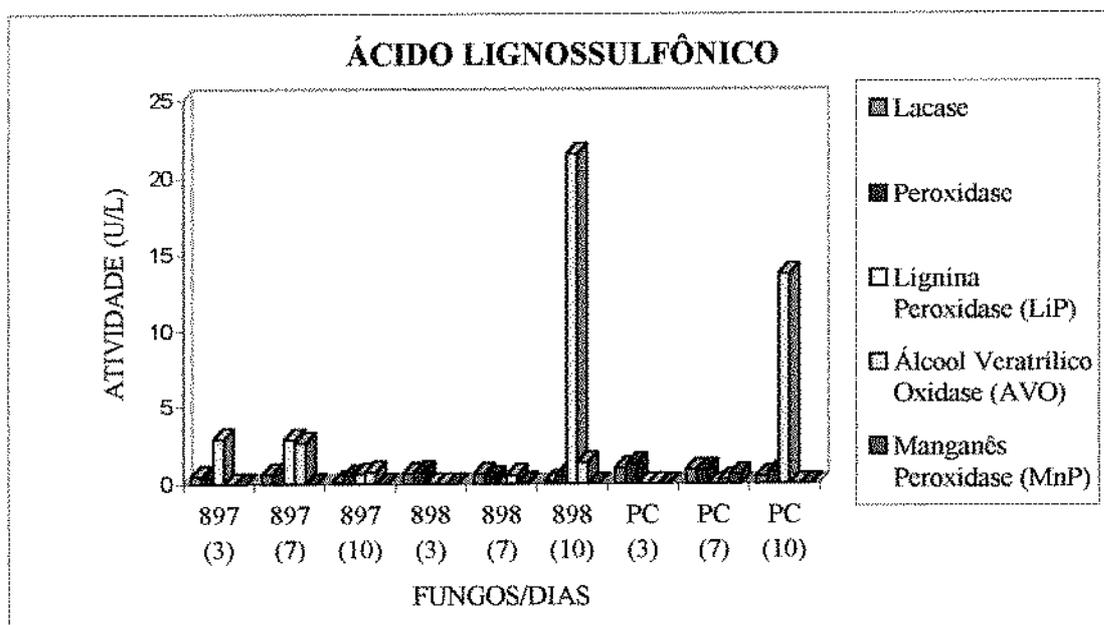


Figura 37: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,5% de ácido lignossulfônico como fonte de carbono, na condição sem oxigenação com adição de glicose.

Na figura 38, observa-se que os fungos 897 e 898, após 7 dias de crescimento e PC, após 10 dias de crescimento produziram as maiores atividades de MnP. Somente algumas linhagens produziram LiP e AVO, mas apresentaram

baixas atividades. As enzimas lacase e peroxidase foram produzidas com valores entre 0,50 e 1,50 U/L.

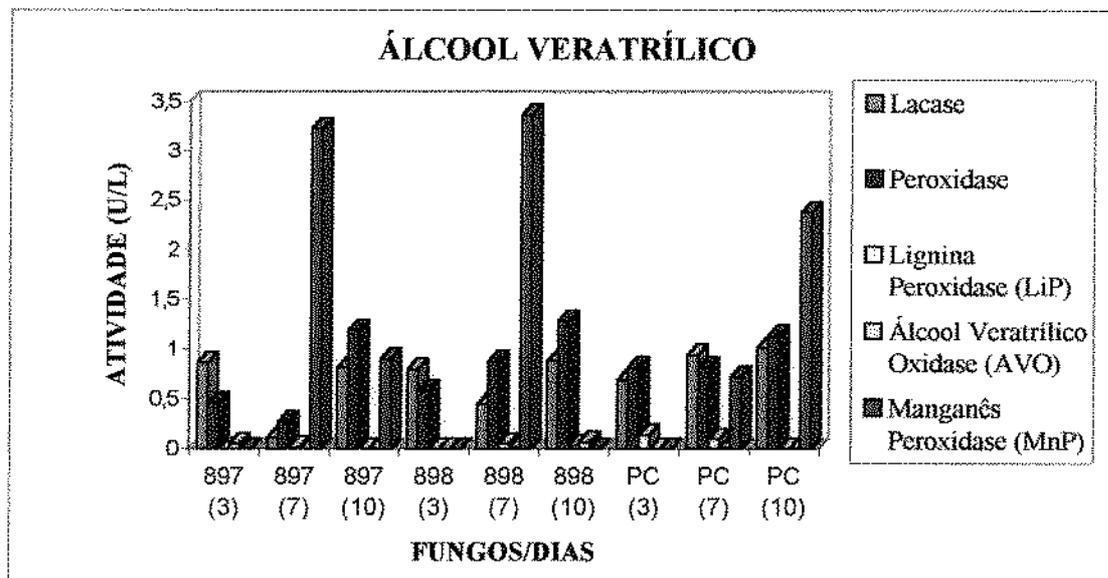


Figura 38: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,1% de álcool veratrílico como fonte de carbono, na condição sem oxigenação com adição de glicose.

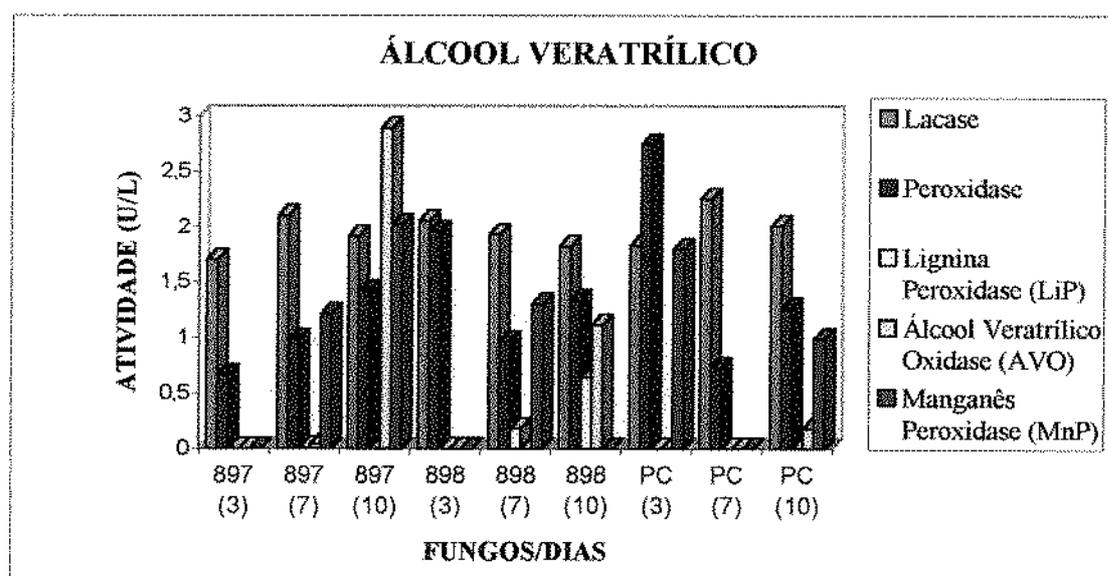


Figura 39: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,5% de álcool veratrílico como fonte de carbono, na condição sem oxigenação com adição de glicose.

A enzima lacase apresentou alta atividade para todos os fungos, aproximadamente 2,00 U/L (figura 39), quando crescidos em meio contendo 0,5% de álcool veratrílico. A mais alta atividade de peroxidase foi produzida pelo fungo PC, após 3 dias de crescimento, e de AVO, pela linhagem 897, após 10 dias de crescimento. Somente a linhagem 898 produziu a enzima LiP, mas com baixa atividade. Os fungos 897, no 10º dia e PC, no 3º dia de crescimento produziram as mais altas atividades de MnP (~2,00 U/L), entretanto, as linhagens 897 e 898, no 7º dia e o fungo PC, no 10º dia de crescimento também produziram atividade desta enzima.

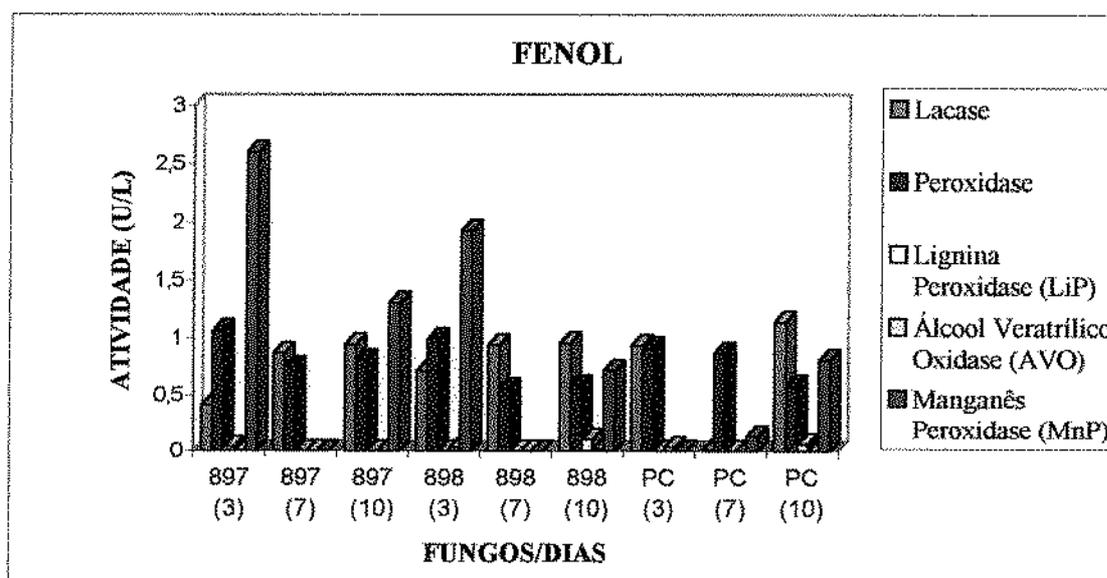


Figura 40: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,1% de fenol como fonte de carbono, na condição sem oxigenação com adição de glicose.

As enzimas AVO e LiP foram produzidas pelos fungos com atividades bastante baixas, no 3º e 10º dias de crescimento em meio contendo 0,1% de fenol como fonte de carbono (figura 40). As enzimas lacase e peroxidase apresentaram atividades em torno de 1,00 U/L para todos os fungos, e a máxima atividade de MnP foi produzida pela linhagem 897, após 3 dias de crescimento (2,60 U/L),

mas também apresentou atividade nas linhagens 897, no 10^o dia, 898, no 3^o e 10^o dias, e PC, no 10^o dia de crescimento.

A maior atividade de AVO foi produzida pela linhagem PC, após 10 dias de crescimento (5,82 U/L), em meio contendo 0,5% de fenol (figura 41). A atividade de lacase foi produzida por todos os fungos com valores entre 1,00 e 2,00 U/L. Os fungos produziram em baixa concentração ou não produziram as demais enzimas.

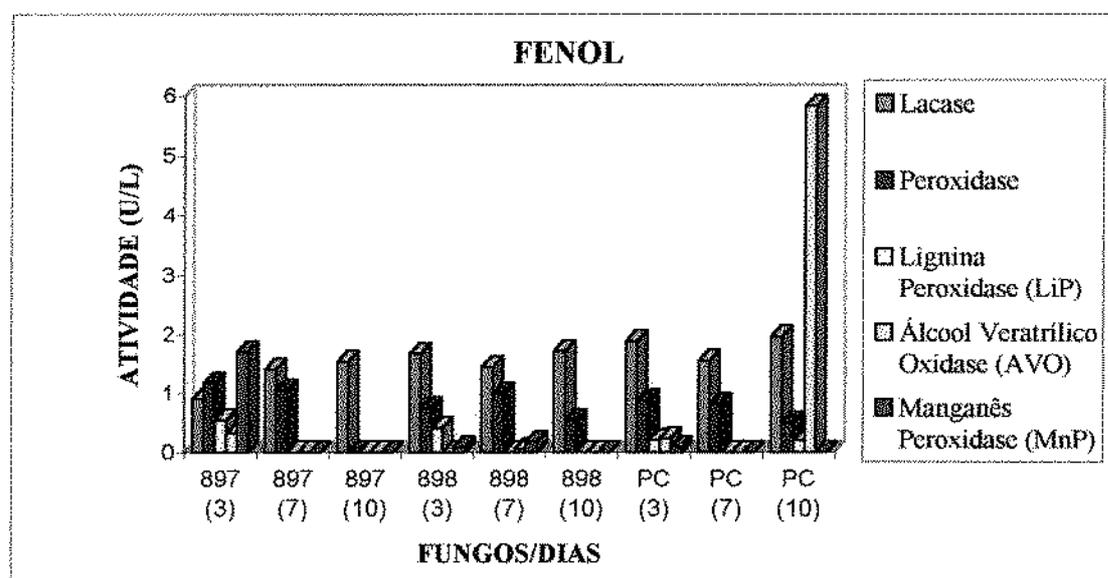


Figura 41: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,5% de fenol como fonte de carbono, na condição sem oxigenação com adição de glicose.

Observa-se que quando os fungos foram crescidos em meio contendo glicose, a produção enzimática não aumentou muito, comparada com o mesmo meio sem glicose. Mas algumas enzimas foram produzidas em altas atividades, como por exemplo, LiP, AVO e MnP em ácido tânico e LiP em ácido lignossulfônico, em presença de 0,5% de glicose, ao contrário do que acontece quando a glicose não é adicionada ao meio. De acordo com SAXENA *et al.* (1995), os taninos são degradados rapidamente na presença de outra substância

metabolizável, como glicose. O efeito da presença de uma fonte de carbono alternativa, mais facilmente metabolizável, na degradação de efluentes tóxicos é de grande importância prática. Quando uma fonte de carbono alternativa está presente no meio, podem ocorrer interações entre as fontes de carbono tóxicas e não tóxicas, facilitando a degradação dos compostos tóxicos pelos microrganismos (ROZICH & COLVIN, 1985).

Segundo LIVERNOCHE *et al.* (1983), a adição de sacarose, aumenta significativamente a descoloração de efluentes kraft. Em seu experimento, outras fontes de carbono também foram usadas, como xilose, glicose, glicerol e etanol. Após um dia de crescimento, a glicose apresentou-se mais eficiente que as demais fontes de carbono, mas após 4 dias, todas apresentaram valores semelhantes de descoloração dos efluentes.

5.2.2.2. Com oxigenação

Os fungos, crescidos em meio contendo 0,1 ou 0,5% de ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico ou fenol como fontes de carbono além da adição de 0,5% de glicose, foram oxigenados no 3^o dia de crescimento. Os dados estão nas tabelas 20 e 21, em apêndice.

Na figura 42, observa-se que a mais alta atividade de MnP foi produzida pelo fungo 898, quando crescido por um período de 10 dias em meio contendo 0,1% de ácido tânico. O fungo 897, após 7 dias de crescimento, produziu a mais alta atividade de AVO. As enzimas lacase e peroxidase foram produzidas por todos os fungos, com valores entre 1,00 e 2,00 U/L e a LiP, quando produzida, foi em pequena quantidade.

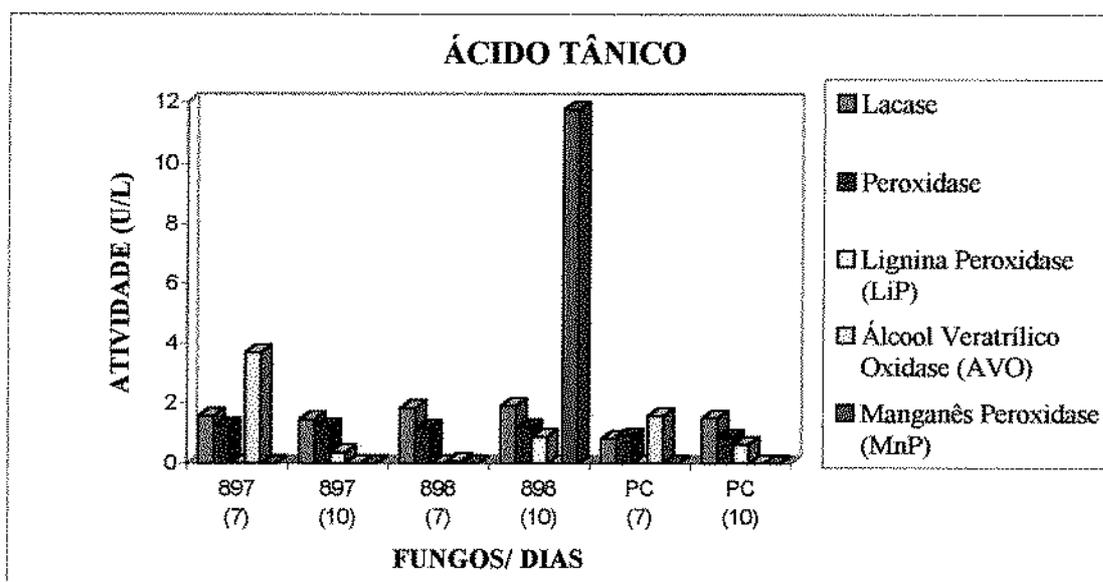


Figura 42: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,1% de ácido tânico como fonte de carbono, na condição com oxigenação e com adição de glicose.

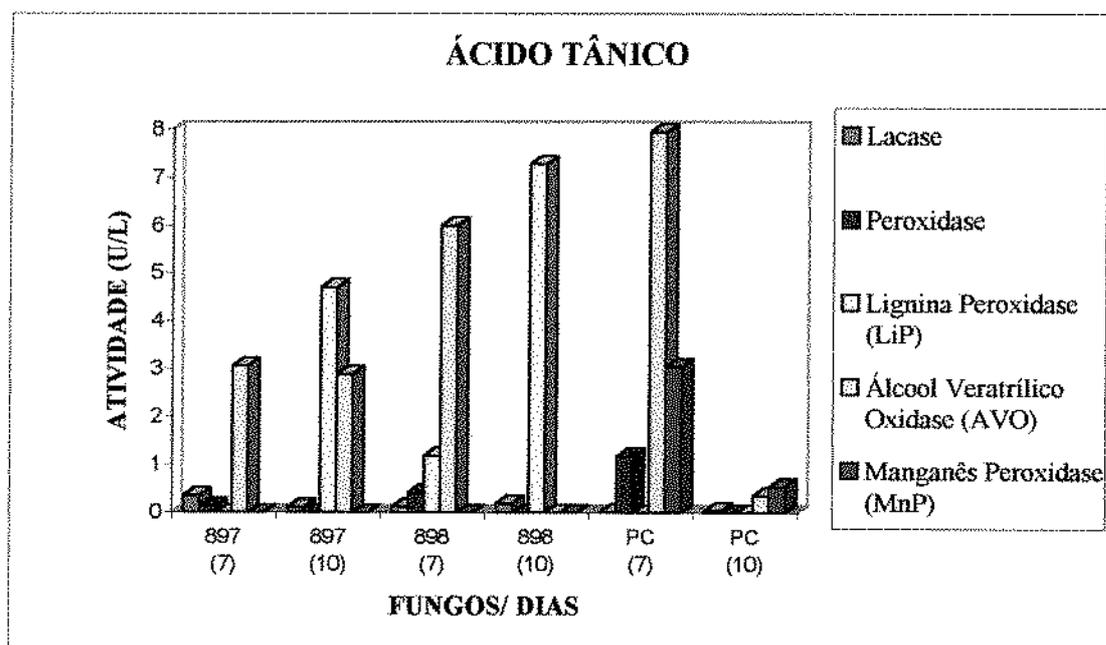


Figura 43: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,5% de ácido tânico como fonte de carbono, na condição com oxigenação e com adição de glicose.

O fungo PC, no 7^o dia de crescimento produziu a maior atividade de AVO (7,95 U/L), seguida pelos fungos 898, no 7^o dia e 897, no 7^o e 10^o dias de

crescimento (figura 43), em meio contendo 0,5% de ácido tânico. A maior atividade de LiP foi produzida pelas linhagens 897 e 898, no 10^o dia de crescimento (4,69 e 7,29 U/L). O fungo PC, quando crescido por 7 dias, produziu a maior atividade de MnP. As demais enzimas quando produzidas apresentaram atividades muito baixas.

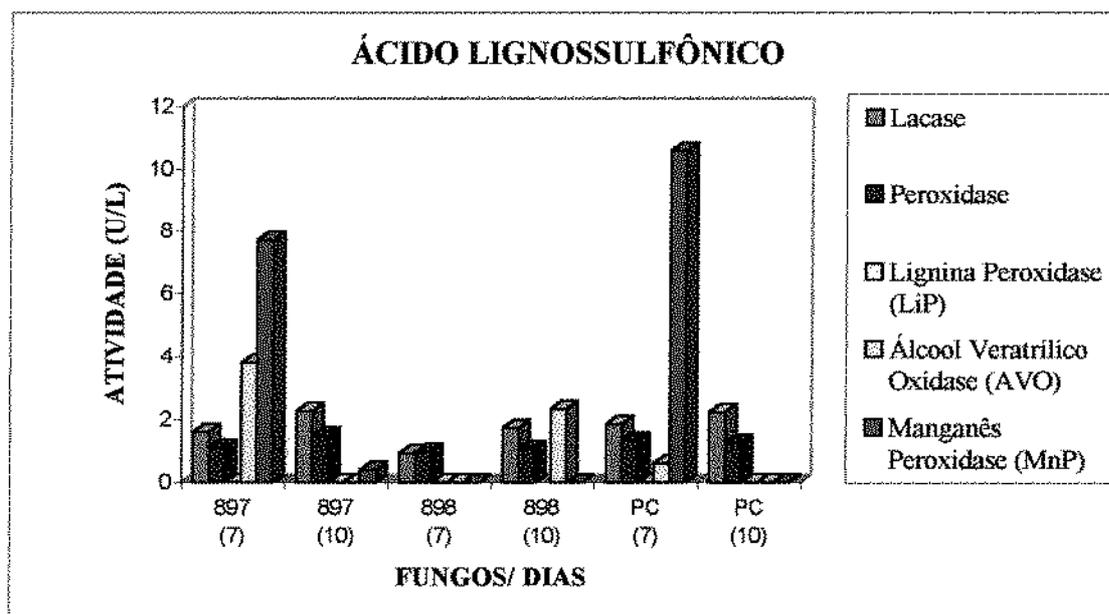


Figura 44: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,1% de ácido lignossulfônico como fonte de carbono, na condição com oxigenação e com adição de glicose.

Quando crescidos em meio contendo 0,1% de ácido lignossulfônico, os fungos que produziram as maiores atividades de MnP foram 897 e PC, após 7 dias de crescimento (7,71 e 10,58 U/L), conforme mostra a figura 44. As enzimas lacase e peroxidase apresentaram atividades próximas a 2,00 U/L. Os fungos 897, no 7^o dia e 898, no 10^o dia de crescimento, produziram as mais altas atividades de AVO. Nenhum fungo produziu a enzima LiP.

Na figura 45, observa-se o crescimento dos fungos em meio contendo 0,5% de ácido lignossulfônico. A enzima produzida em maior atividade foi a

AVO (valores entre 8,0 e 16,0), não sendo produzida somente pela linhagem 897, após 10 dias de crescimento. A MnP não foi produzida pelo fungo 897 e as demais enzimas por nenhum fungo.

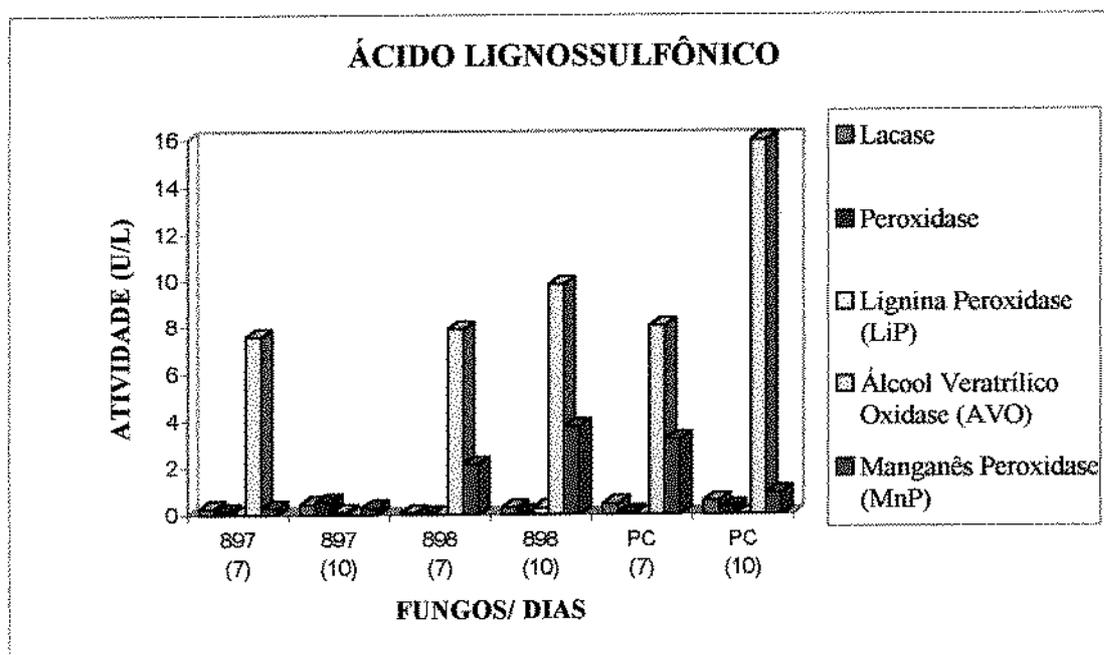


Figura 45: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,5% de ácido lignossulfônico como fonte de carbono, na condição com oxigenação e com adição de glicose.

A maior atividade enzimática quando os fungos foram crescidos em 0,1% de álcool veratrílico foi da enzima MnP (8,07 U/L), observado na figura 46. As enzimas lacase e peroxidase apresentaram atividade máxima de 2,00 U/L. A LiP foi produzida com baixa atividade pelos fungos 897 e 898, no 7º dia de crescimento e a AVO não foi produzida por nenhum fungo.

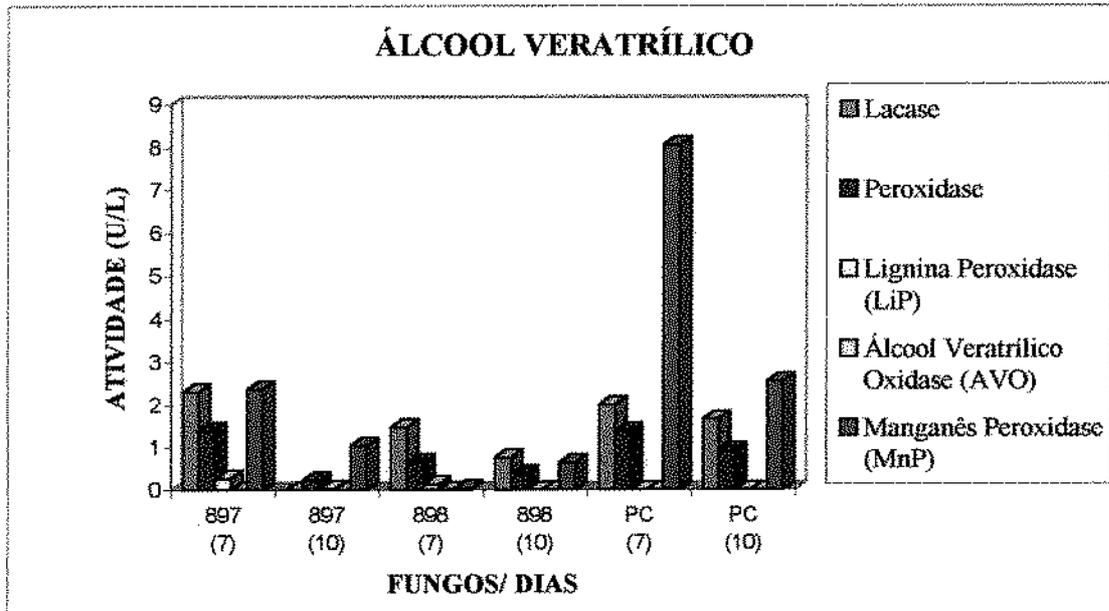


Figura 46: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,1% de álcool veratrílico como fonte de carbono, na condição com oxigenação e com adição de glicose.

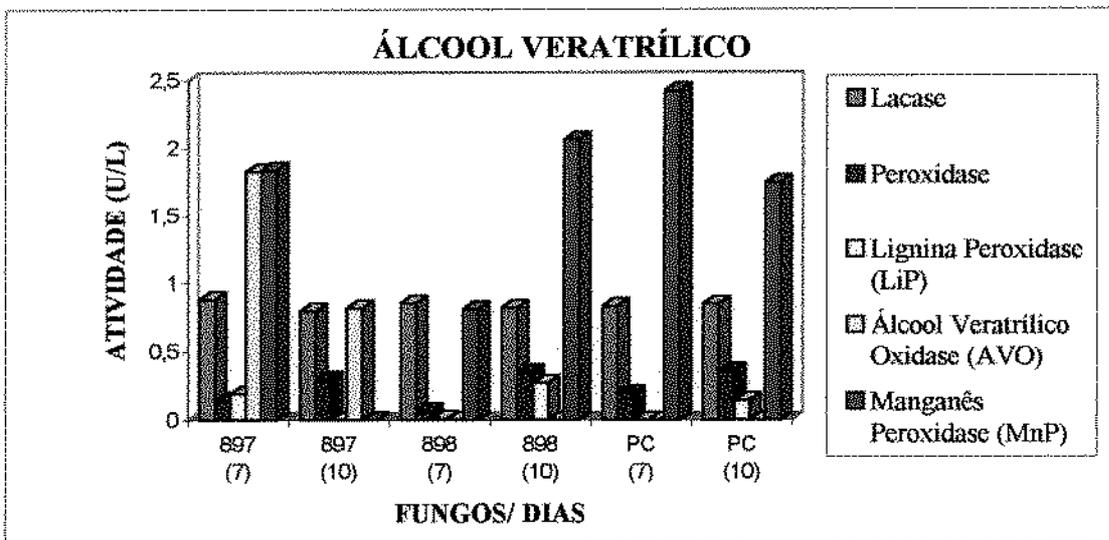


Figura 47: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,5% de álcool veratrílico como fonte de carbono, na condição com oxigenação e com adição de glicose.

Na figura 47, observa-se que a atividade enzimática em meio contendo 0,5% de álcool veratrílico foi menor, pois nenhum fungo produziu atividade superior a 2,50 U/L. A maior atividade foi da MnP, produzida pelos fungos 897,

no 7^o dia, 898, no 10^o dia e PC, no 7^o e 10^o dias de crescimento (2,00 a 2,50 U/L). A enzima lacase apresentou a mesma produção para todas as linhagens (~1,00 U/L) e AVO foi produzida somente pela 897. As enzimas peroxidase e LiP apresentaram atividades muito baixas.

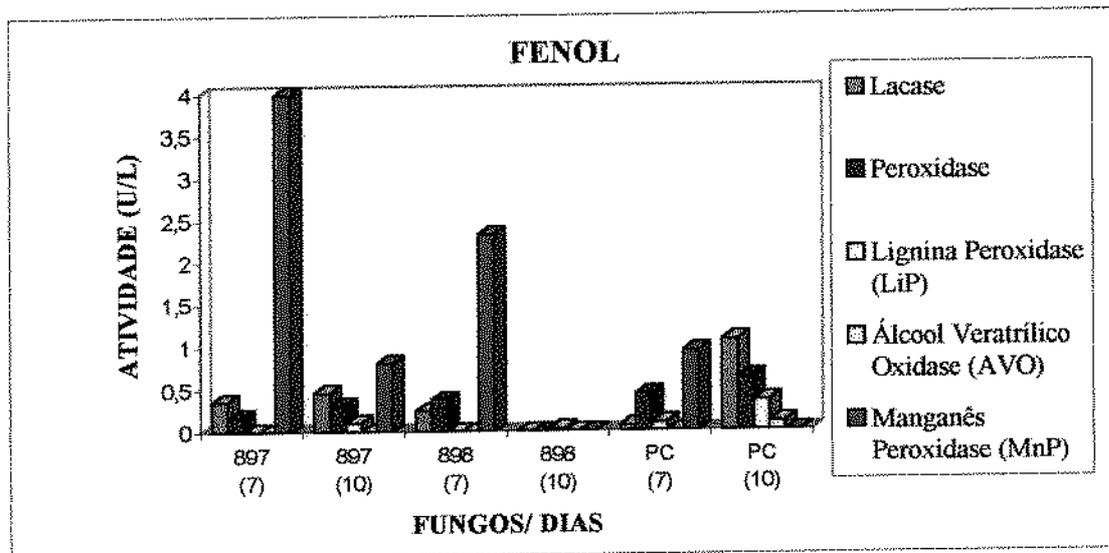


Figura 48: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,1% de fenol como fonte de carbono, na condição com oxigenação e com adição de glicose.

Quando os fungos foram crescidos em 0,1% de fenol, somente a enzima MnP foi produzida com maior atividade pelos fungos 897 e 898, no 7^o dia de crescimento, com valores 3,99 e 2,33 U/L (figura 48). As demais enzimas não apresentaram valores superiores a 1,00 U/L. O fungo 898, quando crescido por 10 dias, produziu somente uma baixa atividade de LiP.

O fungo PC, quando crescido por 7 dias, produziu alta atividade de MnP, próxima a 9,64 U/L (figura 49). A enzima lacase foi produzida por todos os fungos com valores entre 1,00 e 2,00 U/L. As demais enzimas apresentaram baixas atividades para todos os fungos.

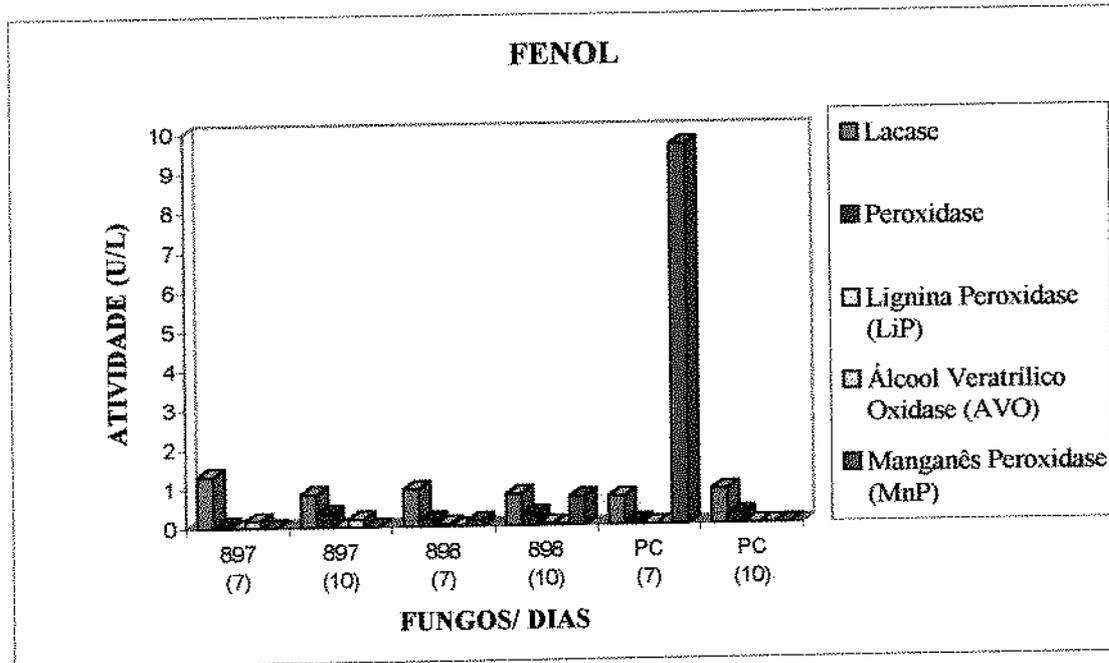


Figura 49: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase, manganês peroxidase), de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), por 7 e 10 dias, em meio contendo 0,5% de fenol como fonte de carbono, na condição com oxigenação e com adição de glicose.

De modo geral, observa-se que quando os fungos foram oxigenados, o aumento da concentração da fonte de carbono aumenta a atividade enzimática, com exceção do álcool veratrílico, onde a atividade foi maior na concentração de 0,1%. As enzimas foram produzidas em maior quantidade quando os fungos foram crescidos na condição sem oxigenação. Algumas linhagens produziram somente a enzima MnP, em maior atividade na condição com oxigenação.

Depois de comparada a atividade enzimática em todas condições de crescimento, a melhor condição para as linhagens ligninolíticas foi considerada a concentração de 0,5% de fonte de carbono, sem agitação e sem oxigenação. Esta concentração foi a escolhida para dar continuidade ao trabalho, utilizando-se a condição sem e com adição de glicose.

5.2.3. Massa seca das linhagens selecionadas

Nas figuras 50 e 51, estão apresentados os valores de massa seca, quando os fungos foram crescidos em meio contendo 0,5% de fonte de carbono, sem e com adição de glicose.

Na figura 50, observa-se a massa seca dos fungos crescidos sem adição de glicose. Os fungos 897 e 898 apresentaram maior crescimento entre os 3^o e 7^o dias enquanto que o PC apresentou melhor crescimento à partir do 7^o dia, sugerindo que sob esta condição o PC necessita de um maior tempo de adaptação e utilização das fontes de carbono. O fenol e o álcool veratrílico foram as melhores fontes de carbono para crescimento dos fungos 897 e 898, enquanto que para o PC foi o ácido tânico.

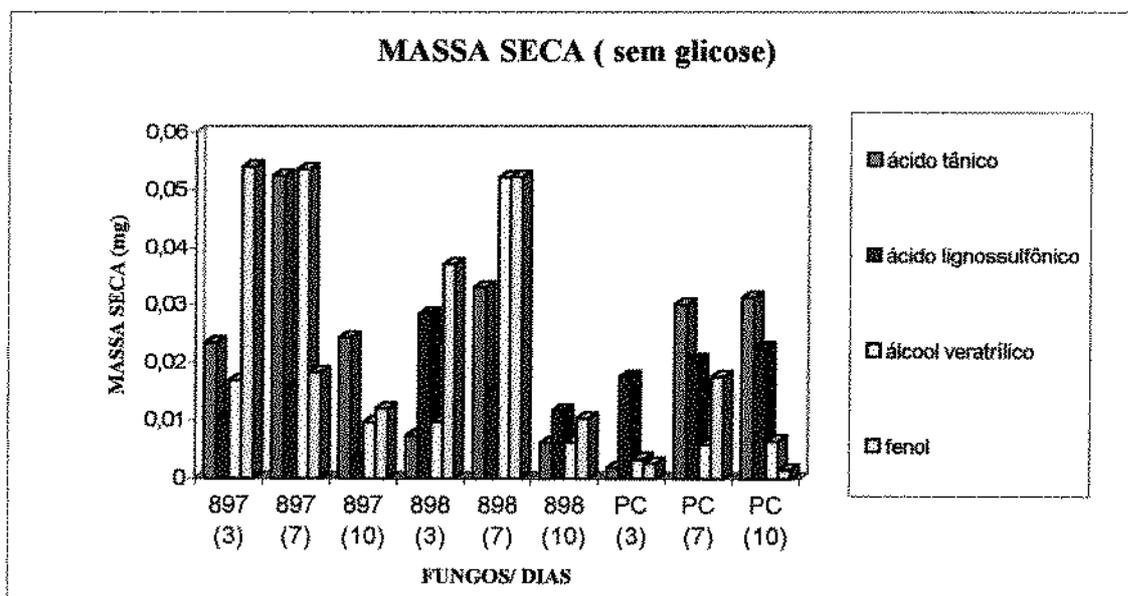


Figura 50: Massa seca de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), determinada após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,5% de ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico ou fenol como fontes de carbono.

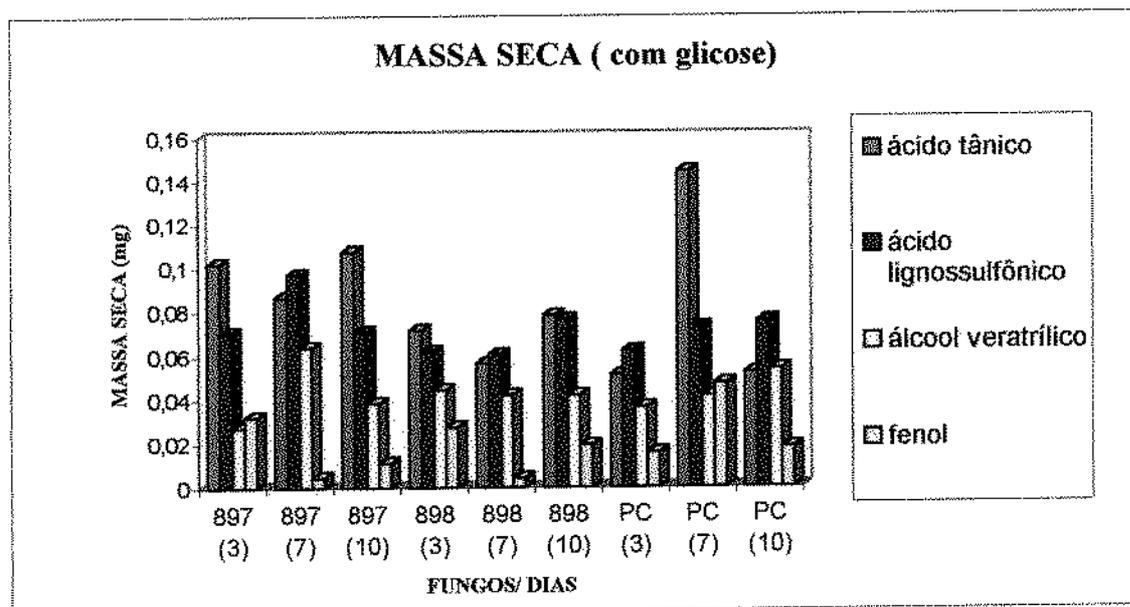


Figura 51: Massa seca de três linhagens de fungos (897, 898 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*), determinada após 3, 7 e 10 dias de crescimento, em meio contendo 0,5% de ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico ou fenol como fontes de carbono, com adição de glicose.

Na figura 51, observa-se que os fungos apresentaram maior crescimento em meio com adição de glicose. De uma maneira geral, os fungos cresceram melhor em meio contendo ácido tânico como fonte de carbono, seguidos pelo ácido lignossulfônico, álcool veratrílico e fenol. Entre as linhagens não houve muita diferença quanto à massa seca produzida nos diferentes tempos de crescimento, que foi semelhante em todas as linhagens à partir do 3^o dia. Isso sugere que a adição de glicose tem um efeito positivo na adaptação das linhagens, o qual foi mais acentuado para o PC.

5.3. Determinação de DQO

Os valores apresentados na tabela 3, representam a porcentagem de DQO dos fungos 897, 898 e PC, quando crescidos em meio contendo ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico ou fenol como fontes de carbono. Em meio contendo ácido tânico sem adição de glicose, a porcentagem de redução de DQO é maior no 3^o dia de crescimento e, com adição de glicose, é maior quando

quando os fungos foram crescidos por 7 dias, com exceção da linhagem 897. Em meio contendo ácido lignossulfônico, as porcentagens de redução de DQO também foram maiores, com adição de glicose após 7 dias de crescimento, sendo que a linhagem 897 apresentou os melhores valores. Os mesmos resultados também foram observados para o álcool veratrílico e o fenol, isto é, a adição de glicose aumentou a porcentagem de redução de DQO pelos fungos utilizados neste trabalho.

O fungo que apresentou os melhores valores de redução de DQO em todos os meios, com exceção do álcool veratrílico, foi o 898. Este microrganismo apresentou as mais altas porcentagens de redução, quando crescido em meio contendo ácido tânico e fenol, com adição de glicose, após 7 dias de crescimento (67,37 e 55,89%).

Tabela 3: Valores da % de redução de DQO das linhagens 897, 898 e PC, crescidas em meio contendo 0,5% de ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico ou fenol como fontes de carbono, por 3 e 7 dias, sem e com adição de 0,5% de glicose ao meio de cultura.

Meios	T	T	L	L	AV	AV	F	F
Amostras/ Dias	(s/ G)	(c/ G)						
897-3	28,14	31,42	0,00	0,00	0,00	9,49	0,00	0,00
898-3	48,14	28,32	21,34	1,43	0,00	3,73	0,00	0,00
PC-3	23,05	0,00	0,00	27,24	0,00	68,83	13,44	0,00
897-7	0,00	0,00	0,00	59,76	48,89	69,39	0,00	11,58
898-7	28,64	67,37	0,00	41,42	0,00	44,89	19,21	55,89
PC-7	0,00	14,63	0,64	15,62	0,00	99,40	1,78	48,78

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol; s/G = sem glicose; c/G = com glicose; PC = *Phanerochaete chrysosporium*.

Em meio contendo álcool veratrílico como fonte de carbono, o melhor fungo foi o *P. chrysosporium*, quando se adicionou glicose ao meio. Os resultados estão de acordo com a literatura (FAISON & KIRK, 1985; CANCEL *et al.*, 1993; COLLINS & DOBSON, 1995; ZHAO *et al.*, 1996; WU *et al.*, 1996), pois a glicose e o álcool veratrílico funcionam como indutores para o sistema enzimático deste fungo, contribuindo para o aumento da porcentagem de redução do DQO.

5.4. Degradação de compostos fenólicos e/ou modelos de lignina

A degradação de ácido tânico e ácido lignossulfônico estão nas tabelas 4 e 5, respectivamente. A degradação de álcool veratrílico não foi determinada, pois este composto foi usado somente para conhecimento de seu poder indutor sobre os microrganismos estudados.

Na tabela 4, observam-se os resultados obtidos nos cromatogramas, quando os fungos foram crescidos em meio contendo ácido tânico, sem ou com adição de glicose. De uma maneira geral, as melhores porcentagens de degradação do ácido tânico, foram observadas quando os fungos foram crescidos em meio sem adição de glicose. Os resultados obtidos podem estar ocorrendo porque os fungos utilizam primeiro a glicose e depois a fonte de carbono (ácido tânico) e, portanto, sua degradação diminui. O fungo que melhor degradou o ácido tânico foi o 898, tanto no 3^o como no 7^o dia de crescimento, no meio sem glicose.

Tabela 4: Área dos picos e porcentagem de ácido tânico degradado, obtidas através dos cromatogramas das amostras inoculadas com as linhagens 897, 898 e PC, crescidas em meio contendo ácido tânico como fonte de carbono, durante 3 e 7 dias, sem e com adição de 0,5% de glicose ao meio de cultura.

Linhagem	Área	% de ácido tânico degradado	Linhagem	Área	% de ácido tânico degradado
3 dias (sem glicose)			3 dias (com glicose)		
controle	179763	--	controle	96179	--
897	175775	2,22	897	60536	37,05
898	51505	71,35	898	84045	12,62
PC	220221	0,00	PC	96075	0,11
7 dias (sem glicose)			7 dias (com glicose)		
controle	117451	--	controle	115549	--
897	68639	41,56	897	74134	35,84
898	58906	72,79	898	66628	42,38
PC	114985	2,09	PC	108794	5,85

Na figura 52, observam-se os cromatogramas do controle e das amostras contendo ácido tânico, sem adição de glicose, cultivadas com o fungo 898, por um período de 3 e 7 dias, a 30°C. Nos cromatogramas B e C observa-se o aparecimento de um segundo pico com tempo de retenção de 2 minutos, à medida que o ácido tânico é degradado. Provavelmente este pico refere-se a um composto de degradação do ácido tânico.

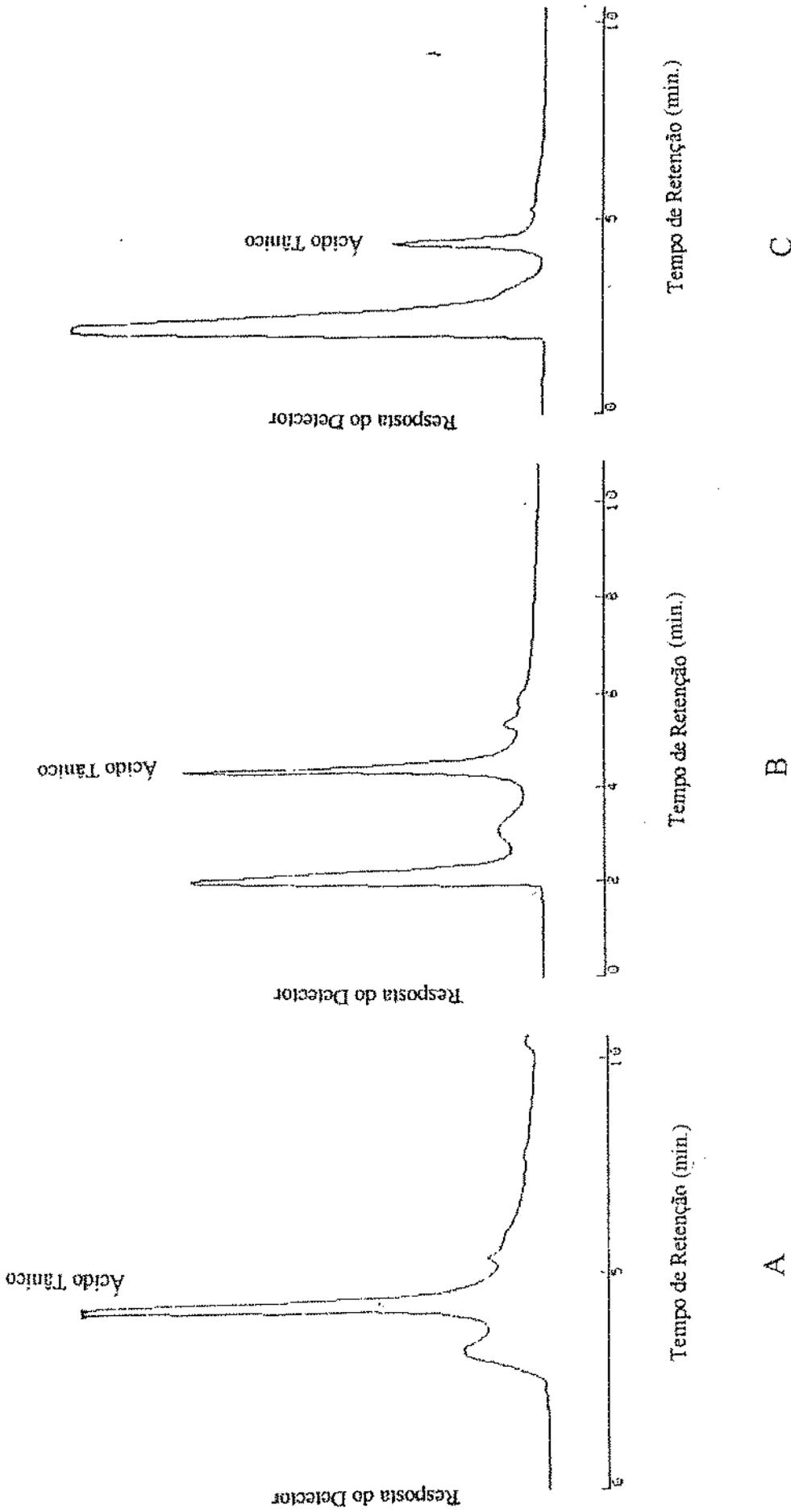
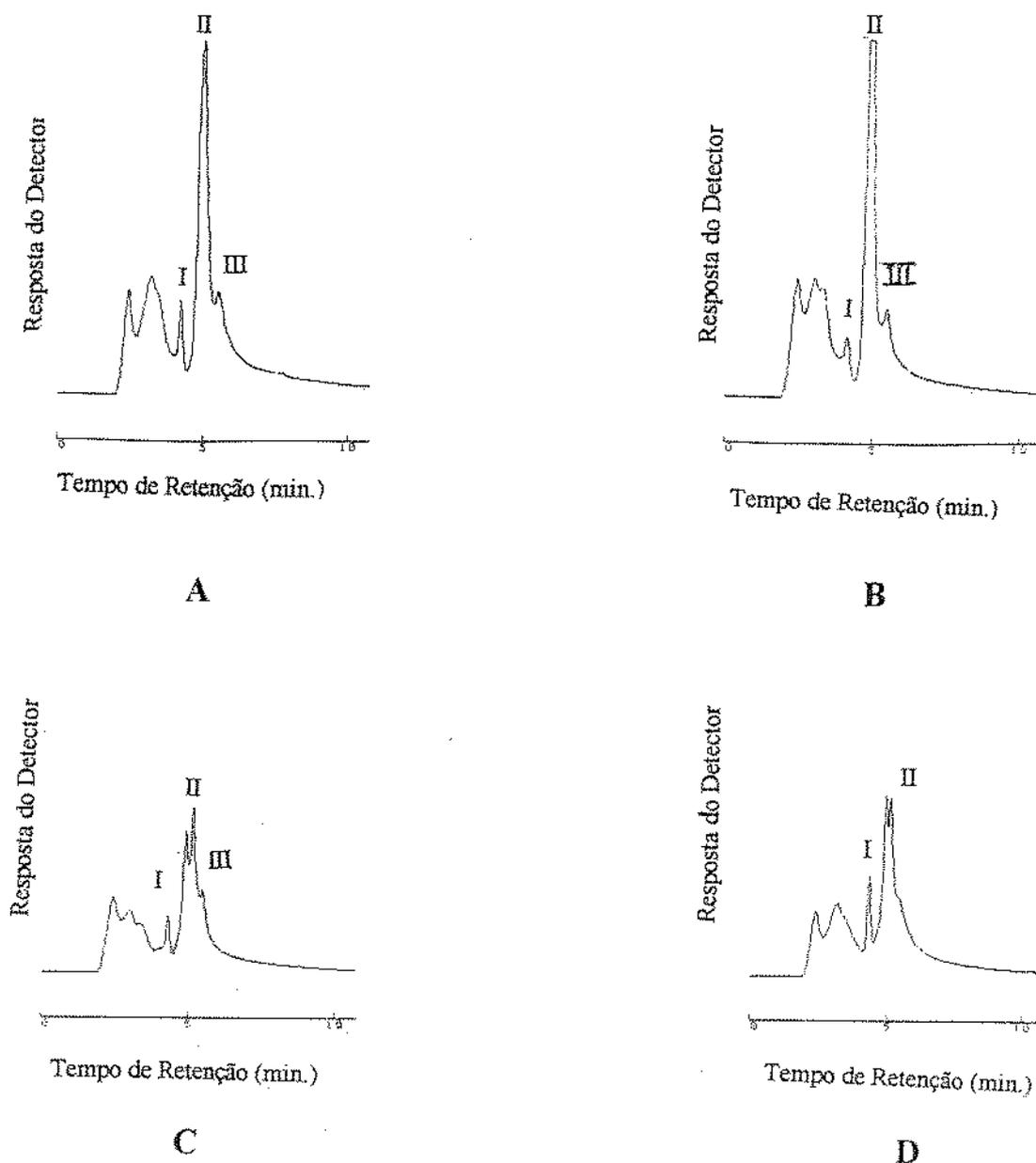


Figura 52: Cromatograma dos caldos coletados do controle e da amostra 898, cultivados em meio contendo ácido tânico, sem adição de glicose, como fonte de carbono, a 30°C. Condições cromatográficas: coluna Cosmosil C18, fase reversa, comprimento de onda 254 nm. A = controle; B = 898, após 3 dias de crescimento; C = 898, após 7 dias de crescimento.

Tabela 5: Área dos picos e porcentagens de ácido lignossulfônico degradado, obtidas através dos cromatogramas das amostras inoculadas com as linhagens 897, 898 e PC, crescidas em meio contendo ácido lignossulfônico como fonte de carbono, durante 3 e 7 dias, sem e com adição de 0,5% de glicose ao meio de cultura.

Linhagem	Área	% de ácido lignos. degradado	Linhagem	Área	% de ácido lignos. degradado
3 dias (sem glicose)			3 dias (com glicose)		
controle	570263	--	controle	570263	--
	834032	--		834032	--
	522347	--		522347	--
897	486587	14,73	897	1028189	0,00
	923291	0,00		1769022	0,00
	590531	0,00		1870758	0,00
898	272615	51,25	898	389873	31,63
	858932	0,00		230795	72,32
	548774	0,00		831352	0,00
PC	325861	42,86	PC	836154	0,00
	1028647	0,00		2650722	0,00
	628788	0,00		--	0,00
7 dias (sem glicose)			7 dias (com glicose)		
controle	355511	--	controle	836154	--
	1008516	--		2650722	--
	470485	--			
897	319516	10,12	897	247453	70,40
	1012784	0,00		324138	87,77
	638586	0,00			
898	223313	34,18	898	159709	80,89
	914478	9,32		213699	91,93
	682816	0,00			
PC	625529	0,00	PC	954332	0,00
	1890738	0,00		1334851	49,64
	--	--			



I, II, III = picos referentes ao ácido lignossulfônico

Figura 53: Cromatogramas dos caldos coletados do controle e da amostra 898 cultivados em meio contendo ácido lignossulfônico, a 30°C. Condições cromatográficas: coluna Cosmosil C18, fase reversa, comprimento de onda 254 nm. A = controle; B = 898, após 3 dias de crescimento, em meio sem adição de glicose; C = 898, após 3 dias de crescimento, em meio com adição de glicose; D = 898, após 7 dias de crescimento, em meio com adição de glicose.

Na tabela 5, observam-se os resultados, quando os fungos foram crescidos em meio contendo ácido lignossulfônico como fonte de carbono. O ácido lignossulfônico por ser um composto heterogêneo, formado por substâncias de diferentes pesos moleculares, apresentou três picos com diferentes tempos de retenção, os quais são decorrentes de sua variada composição. Estes picos característicos foram usados para analisar as degradações produzidas pelas linhagens aqui estudadas. A degradação deste composto foi pequena no meio sem adição de glicose. Entretanto, com adição de glicose, a degradação do ácido lignossulfônico foi grande, principalmente no 7^o dia de crescimento pela linhagem 898.

Na figura 53, observam-se os cromatogramas da amostra 898, cultivada em meio contendo ácido lignossulfônico, sem glicose, após 3 dias de crescimento e com glicose após 3 e 7 dias.

5.5. Degradação de Fenóis

Na tabela 6, observa-se a porcentagem de degradação de fenol pelos fungos, quando crescidos por 3 e 7 dias, em meio sem ou com adição de glicose.

A degradação destes compostos foi maior quando se adicionou glicose ao meio de cultura, ao contrário dos resultados obtidos para o ácido tânico. Os melhores resultados foram obtidos no 3^o dia de crescimento para linhagens 897 e PC (34 e 37%) e no 7^o dia de crescimento para linhagem 898 (36%).

Tabela 6: Área dos picos e porcentagem de fenol degradado, obtidas através dos cromatogramas das amostras inoculadas com as linhagens 897, 898 e PC, crescidas em meio contendo fenol como fonte de carbono, durante 3 e 7 dias, sem e com adição de 0,5% de glicose ao meio de cultura.

Linhagem	Área	% de fenol degradado	Linhagem	Área	% de fenol degradado
3 dias (sem glicose)			3 dias (com glicose)		
controle	325664	--	controle	275969	--
897	357723	0,00	897	181166	34,35
898	511163	0,00	898	248878	9,82
PC	449406	0,00	PC	174122	36,91
7 dias (sem glicose)			7 dias (com glicose)		
controle	223936	--	controle	249064	--
897	153035	31,66	897	386806	0,00
898	211293	5,64	898	161822	35,03
PC	397649	0,00	PC	334510	0,00

PC = *Phanerochaete chrysosporium*

5.6. Discussão Final

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, todos os fungos apresentaram grande variação de produção enzimática de acordo com a fonte de carbono e as condições de cultivo. As linhagens 897 e 898 (fungos deuteromicetos) apresentaram melhores valores de atividade enzimática que o *Phanerochaete chrysosporium*, considerado o principal fungo de degradação branca. Este fungo tem sido utilizado na maioria dos trabalhos feitos para elucidar os efeitos dos parâmetros de cultivo na atividade ligninolítica de fungos de degradação branca (BONNARME & JEFFRIES, 1990; SRINIVASAN *et al.*, 1995; AIKEN *et al.*, 1996). Grandes diferenças entre os fungos basidiomicetos

de degradação branca, com relação à habilidade de transformação e mineralização de poluentes aromáticos, têm sido reportadas (BOGAN & LAMAR, 1996).

Na literatura estão relatadas condições que correspondem à máxima produção de enzimas implicadas na degradação da lignina e/ou xenobióticos com estruturas relacionadas à lignina ou seus derivados. Variações intergenéricas e intragenéricas assim como entre diferentes linhagens de *P. chrysosporium*, decorrentes de variações nas condições de crescimento (aeração, agitação, imobilização), *pH* e tampões, presença de indutores (por exemplo, álcool veratrílico), diferentes concentrações de fontes de carbono e nitrogênio e de Mn(II) têm sido observadas (WAYTT & BRODA, 1995; WU *et al.*, 1996; FAISON & KIRK, 1985; VENKATADRI & IRVINE, 1990; ZHAO *et al.*, 1996).

A variação de degradação de compostos aromáticos é consequência da diferença na enzimologia de várias espécies e da diferença no crescimento e respostas de produção enzimática de vários fungos para diferentes meios de cultura. LiP, MnP e lacase são produzidas por fungos de degradação branca, embora a enzima específica de diferentes espécies responsáveis pela degradação de diferentes compostos sejam bastante variáveis (BOGAN & LAMAR, 1996).

Os fungos aqui estudados, de uma maneira geral, produziram maior quantidade de enzimas em meio estacionário, sem oxigenação, o que para uma aplicação industrial é vantajoso, pois a agitação e oxigenação aumentam o custo do tratamento de efluentes.

Estes fungos, principalmente o 898, quando crescidos em meio contendo 0,5% de ácido tânico, por 3 e 7 dias, a 30°C, conseguiram degradar uma grande quantidade deste composto. Isto é interessante, pois este composto é de difícil degradação (SAXENA *et al.*, 1995), e é encontrado em muitos efluentes industriais.

Altos valores de DQO são encontrados nos efluentes da indústria de papel e celulose e nas indústrias de azeite de oliva e destilarias de vinho. Dos fungos estudados, o 898 reduziu bastante a DQO dos meios contendo fenol ou ácido tânico como fonte de carbono, com adição de glicose, sugerindo que este fungo pode ser usado para tal finalidade.

Devido às aplicações dos fungos ligninolíticos, estes têm sido estudados cada vez mais em processos de biorremediação, destoxificação de solos e águas contaminadas, descoloração de efluentes. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os fungos em estudo apresentaram resultados que tornam interessante a continuação do estudo para posterior uso destes em tratamentos de efluentes, principalmente tânicos, pois as linhagens 897 e 898 foram capazes de degradar o ácido tânico, composto tóxico encontrado em grande parte dos efluentes industriais.

6 - CONCLUSÃO

- Quanto maior a concentração da fonte de carbono usada, maior foi a produção enzimática, isto é, na concentração de 0,5%, os fungos produziram uma maior atividade ligninolítica do que nas concentrações de 0,1 e 0,05%.
- Ao adicionar-se glicose ao meio de cultura, as linhagens produziram uma maior atividade enzimática do que quando em meio sem adição de glicose.
- A condição com agitação diminuiu a produção enzimática, quando comparada com a condição estacionária, utilizando-se a mesma concentração de fonte de carbono.
- Quando as culturas foram oxigenadas, a produção enzimática diminuiu tanto na concentração de 0,1% como na de 0,5% de fonte de carbono.
- O melhor meio para produção enzimática foi aquele contendo ácido tânico. Foi o composto mais degradado pelos fungos e com maior valor de redução de DQO.
- De uma maneira geral, as enzimas produzidas em maior atividade foram AVO e LiP, alcançando valores de 16 a 25 U/L, quando crescidas em meio com adição de glicose, sem oxigenação.
- Das linhagens estudadas, a melhor foi 898, apresentando as mais altas taxas de degradação dos compostos e redução do valor de DQO. A linhagem 897, apesar de produzir alta atividade enzimática, apresentou redução de DQO menor que a 898, nas mesmas condições de crescimento. O fungo *P.*

chryso sporium, quando crescido nas mesmas condições que as outras duas linhagens, produziu uma menor quantidade de enzimas que as linhagens 897 e 898. Ele também apresentou uma menor degradação dos compostos que os outros dois.

- Concluiu-se finalmente que, a melhor condição para o crescimento dos fungos e para a produção enzimática, foi a estacionária, sem oxigenação, com adição de 0,5% de glicose e na concentração de 0,5% de fonte de carbono (ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico e fenol).

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-SALAH, K.; SHELEF, G.; LEVANON, D.; ARMON, R.; DOSORETZ, C.G. Microbial degradation of aromatic and polyaromatic toxic compounds adsorbed on powdered activated carbon. Journal of Biotechnology, Amsterdam, v. 51, p.265-272, 1996.
- AIKEN, B.S.; LOGAN, B.E. Degradation of pentachlorophenol by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown in ammonium lignosulphonate media. Biodegradation, Dordrecht, v. 7, p. 175-182, 1996.
- AITKEN, M.D.; VENKATADRI, R; IRVINE, R.L. Oxidation of phenolic pollutants by a lignin degrading enzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Water Research, New York, v. 23, n. 4, p. 443-450, 1989.
- AKAMATSU, Y.; SHIMADA, M. Suppressive effect of *L*-phenylalanine on manganese peroxidase in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 145, p. 83-86, 1996.
- AMBUJON, S.; MANILAL, V.B. Phenol degradation by stable aerobic consortium and its bacterial isolates. Biotechnology Letters, Kew, v. 17, n. 4, p. 443-448, 1995.
- ARCHAMBAULT, J.; LACKI, K.; DUVNJAK, Z. Conversion of catechin and tannic acid by an enzyme preparation from *Trametes versicolor*. Biotechnology Letters, Kew, v. 18, n. 7, p. 771-774, 1996.

- ARORA, D.A. Biodelignification of wheat straw by different fungal associations. Biodegradation, Dordrecht, v. 6, p. 57-60, 1995.
- BABITSKAYA, V.G. Enzymatic degradation of lignin in plant substrates by micelial fungi. Applied Biochemistry and Microbiology, New York, v. 30, p. 670-676, 1994.
- BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; HARDY, G.E.S. Veratryl alcohol an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. Letters in Applied Microbiology, Blackwell, v. 23, p. 93-96, 1996.
- BAR-LEV, S.S; KIRK, T.K. Effects of molecular oxygen on lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, v. 99, n. 2, mar., 1981.
- BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanisms white-rot fungi use the degrade pollutants. Environmental Science & Technology, Easton, v. 28, n. 2, p. 78-87, 1994.
- BENITEZ, J.; BELTRAN-HEREDIA, J.; TORREGOSA, J.; ACERO, J.L.; CERCA, V. Aerobic degradation of olive mill wastewaters. Applied Microbiology Biotechnology, v. 47, p. 185-188, 1997.
- BOGAN, B.W.; LAMAR, R.T. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. Applied Environmental Microbiology, Washington, v. 62, n. 5, p. 1567-1603, 1996.

- BOGAN, B.W.; SCHOENIKE, B.; LAMAR, R.T.; CULLEN, D. Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during biorremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, p. 2381-2386, 1996.
- BONNARME, P.; JEFFRIES, T.W. Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white-rot fungi. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 56, n.1, p. 210-217, 1990.
- BORJA, R.; MARTÍN, A.; MAESTRO, R.; ALBA, J.; FIESTAS, J.A. Enhancement of the anaerobic digestion of live mill wastewater by the removal phenolic inhibitors. Process Biochemistry, London, v. 27, p. 231-237, 1992.
- BORJA, R.; MARTÍN, A.; MAESTRO, R., LUQUE, M.; DURÁN, M.M. Improvement of the kinetics of anaerobic digestion of molasses by the removal of phenolics compounds. Biotechnology Letters, Kew, v. 15, n. 3, p. 311-316, 1993 a.
- BORJA, R.; MARTÍN, A.; MAESTRO, R., LUQUE, M.; DURÁN, M.M. Enhancement of the anaerobic digestion of wine distillery wastewater by removal of phenolic inhibitors. Bioresource Technology, Essex, v. 45, p. 99-104, 1993 b.
- BRODA, P. Biotechnology in the degradation and utilization of lignocellulose. Biodegradation, Dordrecht, v. 3, p. 219-238, 1992.

- BRODA, P.; BIRCH, P.R.J.; BROOKS, P.R.; SIMS, P.F.G. Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: gene families and gene expression for a complex process. Molecular Microbiology, Salem, v. 19, p. 923-932, 1996.
- CANCEL, A.M.; ORTH, A.B., TIEN, M. Lignin and Veratryl Alcohol are not inducers of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Environmental Microbiology, Washington, v. 59, n. 9, p. 2909-2913, set., 1993.
- CILLIERS, J.L.; SINGLETON, V.L. Nonenzymatic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v. 37, p. 890-896, 1989.
- COLLINS, P.J.; DOBSON, A.D.W. Extracellular lignin and manganese peroxidase production by the white-rot fungus *Coriolus versicolor* 290. Biotechnology Letters, Kew, v. 17, n. 9, p. 989-992, 1995.
- COURTEIX, A.; BERGEL, A. Horseradish peroxidase-catalyzed hydroxylation of phenol: I- Thermodynamic analysis. Enzyme and Microbial Technology, Surrey, v. 17, p. 1087-1093, 1995.
- D'ANNIBALE, A.; CRESTINI, C.; DI MATTIA, E., SERMANNI, G.G. Veratryl alcohol oxidation by manganese-dependent peroxidase from *Lentinus edodes*. Journal of Biotechnology, Amsterdam, v. 48, p. 231-239, 1996.

- DE JONG, E.; FIELD, J.A.; BONT, J.A.M. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 13, p. 153-188, 1994.
- EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K.L. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. Applied and Environmental Microbiology, Washington, p. 1151-1158, 1996.
- ERIKSSON, K. E.; PETTERSSON, B.; VOLC, J.; MUSILEK, V. Formation and partial characterization of glucose-2-oxidase, a H₂O₂ producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbial Biotechnology, Washington, v. 23, p. 257-262, 1986.
- ERIKSSON, K.E. Biotechnology in the pulp and paper industry. Wood Science and Technology, New York, v. 24, p. 79-101, 1990.
- EVANS, C.S.; GALLAGHER, I.M.; ATKEY, P.T.; WOOD, D.A. Localization of degradative enzymes in white-rot decay of lignocellulose. Biodegradation, Dordrecht, v. 2, p. 93-106, 1991.
- FAISON, B.D.; KIRK, T.K. Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 39, n.2, p. 299-304, feb., 1985.
- FERRAZ, A.; DURÁN, N. Lignin degradation during softwood decaying by the ascomycete *Chrysonila sitophila*. Biodegradation, Dordrecht, v. 6, p. 265-274, 1995.

- FIELD, J. A.; DE JONG, E.; FEIJOO-COSTA, G.; DE BONT, J. A. M. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. Trends in Biotechnology, Amsterdam, v. 11, p. 44-49, 1993.
- FU, S.Y.; YU, H.; BUSWELL, J.A. Effect of nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju*. FEMS Microbiology Letters, v. 147, p. 133-137, 1997.
- GAATHON, A.; GROSS, Z.; ROZHANSKI, M. Propyl gallate: enzymatic synthesis in reverse micelle system. Enzyme Microbiology Technology, v.11, p. 604-609, 1989.
- GLENN, J.K.; AKILESWARAN, L.; GOLD, M.H. Mn (II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Archives Biochemical Biophysical, v. 251, p. 688-696, 1983.
- GOLD, M.H.; ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiology Reviews, v.57, p. 605-622, 1993.
- GOLD, M.H.; WARIISHI, H.; VALI, K. Extracelular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In: Biocatalysis in Agricultural Biotechnology (WHITAKER, J. R.; SONNET, P.E. eds). ACS Symposium Series American Chemical Society. Washington, DC., v. 389, p. 127-140, 1989.

- HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 13, p. 125-135, 1994.
- HERRERA, A. E. M. Produção e caracterização parcial de um composto de baixa massa molecular com atividade fenoxidásica de *Thermoascus aurantiacus*. Campinas, 1995. 145. Doutor em Ciências, área Bioquímica. Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas.
- JANSHEKAR, H.; FIECHTER, A. Lignin: biosynthesis, application, and biodegradation. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, New York, p. 119-178, 1983.
- KAY-SHOEMAKE, J.L.; WATWOOD, M.E. Limitations of the lignin peroxidase system of the white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biotechnology, Washington, v. 46, p. 438-442, 1996.
- KERSTEN, P.J.; KIRK, T.K. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Bacteriology, v. 169, p. 2195-2201, 1987.
- KERSTEN, P.J.; KALYANARAMAN, B.; HAMMEL, K.E.; REINHAMMAR, B.; KIRK, T.K. Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. The Biochemical Journal, London, v. 268, p. 475-480, 1990.

- KUMAKARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ - dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Letters, Amsterdam, v. 169, p. 247-250, 1984.
- KUMARAN, P.; PARUCHURI, Y.L. Kinetics of phenol biotransformation. Water Research, New York, v. 31, n. 1, p. 11-22, 1997.
- LAMAR, R.T. The role of fungal lignin-degrading enzymes in xenobiotic degradation. Current Opinion in biotechnology, v. 3, p. 261-266, 1992.
- LEE, S.; HONG, S.; SUNG, M. Removal and bioconversion of phenol in wastewater by a thermostable β -tyrosinase. Enzyme and Microbial Technology, Surrey, v. 19, p. 374-377, 1996.
- LIVERNOCHE, D.; JURASEK, L.; DESROCHERS, M.; DORICA, J. Removal of color from Kraft mill wastewaters with cultures of white-rot fungi and with immobilized mycelium of *Coriolus Versicolor*. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. XXV, p. 2055-2065, 1983.
- MANZANARES, P.; FAJARDO, S.; MARTIN, C. Production of ligninolytic activities when treating paper pulp effluents by *Trametes versicolor*. Journal of Biotechnology, Washington, v. 43, p. 125-132, 1995.
- MESTER, T.; DE JONG, E.; FIELD, J.A. Manganese regulation of veratryl alcohol in white-rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase. Applied and Environmental Microbiology, Washington, p. 1881-1887, 1995.

- MONTIES, B. Chemical assessment of lignin biodegradation some qualitative and quantitative aspects. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 13, p. 277-284, 1994.
- NERUD, F.; ZOUCHOVÁ, Z.; MISURCOVÁ, Z. Ligninolytic properties of different white-rot fungi. Biotechnology Letters, Kew, v. 13, n. 9, p. 657-660, 1991.
- ONODERA, H.; KITaura, K.; MITSUMORI, K.; YOSHIDA, J.; YASHUARA, K.; SHIMO, T.; TAKAHASHI, M.; HAYASHI, Y. Study on the carcinogenicity of tannic acid in F 344 rats. Food and Chemical Toxicology, New York, v. 12, p. 1101-1106, 1994.
- PELAEZ, F.; MARTINEZ, M.J.; MARTINEZ, A. T. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. Mycology Research, v. 99, p. 37-42, 1995.
- PÉREZ, J.; SAEZ, L.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. *Phanerochaete flavido-alba* ligninolytic activities and decolorization of partially bio-depurated paper mill wastes. Water Research, New York, v. 31, n. 3, p. 495-502, 1997.
- REDDY, C.A.; D'SOUZA, T.M. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 13, p. 137-152, 1994.
- ROZICH, A.F.; COLVIN, R.J. Effects of glucose on phenol biodegradation by heterogeneous populations. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 28, p. 965-971, 1985.

- SAXENA, R.K.; SHARMILA, P.; SINGH, V.P. Microbial degradation of tannins. Biotransformations: Microbial degradation of health risk compounds, Progress in Industrial Microbiology, New York, v. 32, p. 259-270, 1995.
- SAYADI, S.; ELLOUZ, R. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. Applied and Environmental Microbiology, Washington, p. 1098-1103, 1995.
- SEMPLE, K.T.; CAIN, R.B. Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. Applied Environmental Microbiology, Washington, v. 62, n. 4, p. 1265-1273, 1996.
- SRINIVASAN, C.; D'SOUZA, T.M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C.A. Demonstration of laccase in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 61, n. 12, p. 4274-4277, 1995.
- SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. Mycology, New York, v. 81, p. 234-240, 1989.
- TIEN, M.; KIRK, T.K. In: Biomass, part B. Editors WOOD, W.A.; KELLOJ, S.T., London, p. 238-249, 1983.
- TORNISIELO, V.L. Degradação de fenol por microrganismos do solo. In: I REUNIÃO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA APLICADA AO MEIO AMBIENTE, 1996, Campinas. Anais. p. 05.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. Journal of Biotechnology, Amsterdam, v. 41, p. 1-17, 1995.

VENKATADRI, R.; IRVINE, R.L. Effect of agitation on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Environmental Microbiology, Washington, p. 2684-2691, set., 1990.

WU, F.; OZAKI, H.; TERASHIMA, Y.; IMADA, T.; OHKOUCHI, Y. Activities of ligninolytic enzymes of the white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* and its recalcitrant substance degradability. Water Science and Technology, New York, v. 34, n. 7-8, p. 69-78, 1996.

XU, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. Biochemistry, v. 35, p. 7608-7614, 1996.

ZHAO, J.; JANSE, B.J.H. Comparison of H₂O₂-producing enzymes in selected white rot fungi. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 139, p. 215-221, 1996.

ZHAO, J.; KOKER, H.; JANSE, B.J.H. Comparative studies of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases produced by selected white-rot fungi in solid media. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 145, p. 393-399, 1996.

8 - APÊNDICE

Tabela 7: Atividade das enzimas lacase, peroxidase, lignina peroxidase, álcool veratrílico oxidase e manganês peroxidase de seis linhagens de fungos (4a, 480, 897, 898, 984 e 1051), crescidos por 7 dias, em duas diferentes fontes de carbono (ácido tânico e ácido lignossulfônico), sob condição estacionária.

Fungos/ Meios	Atividade Enzimática (U/L)				
	Lacase	Peroxidase	LiP	AVO	MnP
4a - T	0,09	0,26	9,22	3,05	1,66
480 - T	0,14	0,51	5,99	0,00	0,00
897 - T	0,12	0,50	3,03	3,26	1,08
898 - T	0,07	0,01	2,43	3,58	1,61
984 - T	0,00	0,06	3,13	0,00	0,00
1051 - T	0,01	0,01	5,05	5,64	0,00
4a - L	0,01	0,09	2,34	0,00	0,00
480 - L	0,02	0,01	0,00	2,70	0,00
897 - L	0,01	0,03	2,83	2,17	0,00
898 - L	0,04	0,05	4,13	4,62	0,18
984 - L	0,00	0,05	3,18	3,05	0,00
1051 - L	0,01	0,09	3,48	4,58	6,68

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico

Tabela 8: Atividade das enzimas lacase e peroxidase de três linhagens de fungos (897, 898, 1051 e PC - *Phanerochaete chrysosporium*) crescidos por 3, 7 e 10 dias, em diferentes fontes de carbono na concentração de 0,05%.

Fungos/ Meios	Atividade Enzimática (U/L)					
	Lacase			Peroxidase		
	3	7	10	3	7	10
897-T	0,41	0,11	0,52	0,71	0,48	0,71
898-T	0,64	0,32	0,12	1,14	0,41	0,41
PC-T	0,34	0,77	0,57	0,65	0,71	0,50
897-L	0,39	0,20	0,25	0,91	0,24	0,37
898-L	0,49	0,25	0,33	0,26	0,25	0,36
PC-L	0,52	0,08	0,64	0,96	0,21	0,49
897-AV	0,73	0,81	1,19	0,64	1,21	0,84
898-AV	1,02	0,39	0,15	1,33	0,50	0,13
PC-AV	1,52	1,19	0,94	1,17	0,59	0,52
897-F	0,83	1,35	0,76	1,25	1,27	0,76
898-F	1,07	0,23	0,13	1,37	0,34	0,26
PC-F	1,41	1,04	0,72	0,87	0,75	0,51

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.

Tabela 9: Atividade de LiP, AVO, MnP de três linhagens de fungos (897, 898, 1051 e PC - *P. chrysosporium*) crescidos por 3, 7 e 10 dias, em diferentes fontes de carbono na concentração de 0,05%.

Fungos	Atividade Enzimática (U/L)								
	LiP			AVO			MnP		
	3	7	10	3	7	10	3	7	10
897-T	2,22	5,86	2,83	4,01	5,85	6,06	0,36	7,89	0,00
898-T	0,00	3,08	0,00	3,71	2,48	1,89	0,00	2,60	0,05
PC-T	0,08	0,00	2,47	1,77	0,00	5,05	0,00	0,00	0,00
897-L	2,25	1,21	2,80	2,86	1,03	2,11	0,13	3,90	0,00
898-L	0,00	0,00	2,74	0,13	0,13	2,19	2,06	0,00	0,22
PC-L	0,00	0,16	0,37	0,00	0,00	0,00	0,63	0,00	0,54
897-AV	0,00	0,02	0,01	0,00	0,09	0,00	1,12	0,00	1,48
898-AV	1,24	0,47	0,22	0,18	0,28	0,17	0,22	0,27	0,58
PC-AV	0,04	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,54	1,21	0,40
897-F	0,01	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	1,97	0,00
898-F	0,00	0,18	0,04	0,00	0,18	0,66	1,97	0,04	1,88
PC-F	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,13	3,00	2,47	0,05

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.

Tabela 10: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, LiP, AVO, MnP) após 3 dias de crescimento, em diferentes meios (ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico, fenol) na concentração de 0,1% e 0,5% de fonte de carbono, sem oxigenação.

Fungos/ Meios	Atividade Enzimática após 3 dias de crescimento									
	Concentração 0,1%					Concentração 0,5%				
	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP
897-T	0,74	0,59	2,31	2,35	0,00	0,05	0,03	0,00	1,35	0,00
898-T	1,14	0,26	1,52	2,81	0,57	0,21	0,37	0,00	0,00	0,00
PC-T	0,57	0,26	0,00	0,25	0,12	0,15	0,00	0,00	0,00	3,54
897-L	1,17	0,67	2,60	2,61	0,30	0,00	0,18	0,78	9,32	0,00
898-L	1,22	0,50	2,78	0,94	0,10	0,52	0,33	0,00	15,92	0,09
PC-L	0,88	0,36	0,00	0,05	0,09	0,21	0,23	2,18	6,17	0,00
897-AV	2,17	1,52	0,08	0,23	0,00	0,87	1,03	0,00	0,00	0,72
898-AV	1,86	0,74	0,79	0,88	2,36	0,92	0,95	0,00	0,00	0,94
PC-AV	2,27	0,72	0,02	0,06	0,00	0,99	0,98	0,00	0,00	4,80
897-F	2,08	1,78	0,06	0,11	0,00	1,63	1,81	0,00	0,00	0,99
898-F	1,92	0,39	0,18	0,24	0,96	1,40	1,21	0,00	0,04	0,00
PC-F	2,09	1,78	0,01	0,08	0,00	1,65	1,39	0,00	0,00	0,00

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.

Tabela 11: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, LiP, AVO, MnP) após 7 dias de crescimento, em diferentes meios (ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico, fenol) na concentração de 0,1% e 0,5% de fonte de carbono, sem oxigenação.

Fungos/ Meios	Atividade Enzimática após 7 dias de crescimento									
	Concentração 0,1%					Concentração 0,5%				
	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP
897-T	0,83	0,97	4,89	2,48	0,00	0,08	0,43	6,88	2,09	7,62
898-T	1,27	1,25	3,74	3,61	2,96	0,31	0,32	0,33	1,98	8,07
PC-T	0,51	0,45	1,11	0,00	0,00	0,00	0,04	6,51	0,00	0,00
897-L	0,67	0,65	1,29	1,54	0,45	0,03	0,20	11,25	0,22	4,79
898-L	1,14	0,96	2,47	0,97	0,00	0,03	0,33	2,48	0,86	1,52
PC-L	0,82	0,89	0,00	0,00	1,23	0,13	0,20	8,55	0,00	0,00
897-AV	1,78	1,35	0,41	0,11	1,02	0,75	0,68	0,49	0,08	7,29
898-AV	1,84	1,84	1,13	0,54	0,78	0,64	0,69	0,00	0,00	2,15
PC-AV	2,07	1,69	0,02	0,00	0,63	0,53	0,67	0,00	3,44	0,00
897-F	1,42	1,62	0,01	0,03	2,89	1,14	1,07	0,00	0,00	0,72
898-F	2,18	1,60	0,00	0,00	0,00	0,99	1,15	0,00	0,07	2,56
PC-F	1,41	0,57	0,00	0,15	1,23	1,10	1,13	0,00	0,00	3,45

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.

Tabela 12: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, LiP, AVO, MnP) após 10 dias de crescimento, em diferentes meios (ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico, fenol) na concentração de 0,1% e 0,5% de fonte de carbono, sem oxigenação.

Fungos/ Meios	Atividade Enzimática após 10 dias de crescimento									
	Concentração 0,1%					Concentração 0,5%				
	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP
897-T	0,69	0,64	1,58	0,00	0,00	0,30	0,18	0,78	0,00	6,59
898-T	0,96	0,89	0,60	0,00	0,00	0,44	0,37	10,77	0,00	9,24
PC-T	0,25	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,32	0,00	0,00
897-L	0,30	0,36	0,00	0,00	0,49	0,10	0,48	0,00	0,00	0,00
898-L	0,25	0,24	0,00	0,00	0,49	0,22	0,45	0,00	0,00	0,00
PC-L	0,47	0,72	4,65	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
897-AV	1,55	0,50	0,65	0,00	0,45	1,54	1,02	1,56	2,11	2,42
898-AV	0,96	1,10	0,28	0,01	0,00	1,96	1,59	0,00	0,00	2,15
PC-AV	1,38	0,82	0,32	0,06	2,60	1,72	0,00	0,64	0,00	0,72
897-F	1,22	1,02	0,00	0,02	0,00	1,74	1,09	0,00	0,00	0,22
898-F	0,81	0,71	0,00	0,00	0,36	1,77	0,98	0,12	0,00	0,00
PC-F	1,07	1,21	0,05	0,00	0,00	1,58	1,24	0,00	0,00	5,25

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.

Tabela 13: Atividade das enzimas LiP, AVO, MnP de três linhagens de fungos (897, 898, 1051 e PC- *Phanerochaete chrysosporium*) crescidos por 3, 7 e 10 dias, em diferentes fontes de carbono (ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico, fenol), sob agitação.

Fungos	Atividade Enzimática com agitação (U/L)								
	LiP			AVO			MnP		
	3	7	10	3	7	10	3	7	10
897-T	3,13	5,21	0,00	3,10	3,64	2,42	0,00	0,00	0,00
898-T	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00
PC-T	2,62	7,28	5,64	3,70	5,03	0,00	0,00	3,05	0,00
897-L	2,81	0,00	0,00	3,78	0,09	0,48	0,09	0,00	2,56
898-L	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,31	0,81	0,00
PC-L	2,96	0,00	1,13	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,76
897-AV	0,99	0,13	0,02	0,76	0,20	0,03	2,08	0,00	3,77
898-AV	0,00	0,07	0,00	0,03	0,00	0,06	2,91	0,00	2,33
PC-AV	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	2,42
897-F	0,00	0,02	0,03	0,00	0,02	0,02	1,97	0,00	0,00
898-F	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	3,05	0,00	1,97
PC-F	0,02	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.

Tabela 14: Atividade das enzimas lacase e peroxidase de três linhagens de fungos (897, 898, 1051, PC- *Phanerochaete chrysosporium*) crescidos por 3, 7 e 10 dias, em diferentes fontes de carbono (ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico, fenol), sob agitação.

Fungos	Atividade Enzimática com Agitação (U/L)					
	Lacase			Peroxidase		
	3	7	10	3	7	10
897-T	0,31	0,24	0,07	0,15	0,30	0,58
898-T	0,47	0,20	0,65	0,58	0,50	0,98
PC-T	0,26	0,70	0,43	0,26	0,84	0,64
897-L	0,50	0,94	0,31	1,00	0,94	0,47
898-L	1,02	0,81	0,32	1,33	0,70	0,55
PC-L	0,73	1,08	0,13	1,07	1,09	0,63
897-AV	0,80	1,36	1,64	1,38	1,59	0,95
898-AV	1,50	0,99	1,70	1,12	1,50	0,99
PC-AV	0,90	1,26	1,26	1,03	1,17	0,55
897-F	0,72	0,44	1,00	1,13	1,00	1,52
898-F	0,85	0,65	1,40	1,01	0,57	1,33
PC-F	0,41	0,27	1,25	0,73	0,58	0,94

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.

Tabela 15: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, LiP, AVO, MnP) após 7 dias de crescimento, em diferentes meios (ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico, fenol) na concentração de 0,1% e 0,5% de fonte de carbono, na condição com oxigenação.

Fungos/ Meios	Atividade Enzimática após 7 dias de crescimento									
	Concentração 0,1%					Concentração 0,5%				
	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP
897-T	0,65	0,79	3,16	1,03	8,74	1,01	0,69	5,51	4,18	0,00
898-T	0,74	0,89	3,48	0,00	0,00	0,29	1,57	6,29	0,97	1,17
PC-T	0,70	0,72	0,00	0,00	0,00	0,08	0,13	5,39	0,00	0,00
897-L	0,53	0,60	0,00	3,69	0,00	0,86	0,99	3,84	4,23	0,00
898-L	0,42	0,65	0,00	1,80	0,00	1,09	0,94	2,18	5,12	0,00
PC-L	0,71	1,37	0,00	1,67	0,00	0,98	0,89	0,00	0,00	0,00
897-AV	0,98	0,62	0,00	0,02	0,81	0,31	0,64	0,05	0,00	4,26
898-AV	0,68	0,88	0,34	0,01	0,00	0,65	1,12	0,00	0,00	4,30
PC-AV	1,13	1,10	0,00	0,00	0,00	0,91	1,47	0,00	0,00	0,45
897-F	1,58	1,05	0,00	0,00	0,00	1,81	0,60	0,00	0,05	1,75
898-F	1,58	1,25	0,00	0,00	0,00	1,67	0,82	0,00	0,12	0,76
PC-F	1,34	0,06	0,00	0,00	0,00	1,58	0,80	0,00	0,00	0,58

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.

Tabela 16: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, LiP, AVO, MnP) após 10 dias de crescimento, em diferentes meios (ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico, fenol) na concentração de 0,1% e 0,5% de fonte de carbono, na condição com oxigenação.

Fungos/ Meios	Atividade Enzimática após 10 dias de crescimento									
	Concentração 0,1%					Concentração 0,5%				
	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP
897-T	0,75	1,13	0,00	0,00	0,00	0,11	0,31	0,00	3,28	7,80
898-T	0,78	0,72	0,00	0,00	0,00	1,19	0,79	0,31	0,00	1,34
PC-T	0,91	0,77	0,00	0,00	0,00	0,33	0,14	0,00	0,00	2,69
897-L	0,59	0,72	0,00	0,00	0,00	0,56	0,98	3,16	6,82	0,04
898-L	0,51	0,72	0,00	0,20	1,07	0,93	0,75	0,00	2,01	0,00
PC-L	0,91	0,93	0,00	0,00	0,54	0,86	1,19	0,00	0,00	0,00
897-AV	1,75	1,07	0,00	0,00	0,00	1,08	1,40	0,02	0,05	0,00
898-AV	1,80	1,48	0,72	0,01	0,00	0,91	1,40	0,10	0,15	0,67
PC-AV	1,60	1,49	0,78	0,00	0,58	1,05	1,30	0,00	0,16	4,08
897-F	1,32	1,43	0,00	0,00	0,00	1,18	1,46	0,00	0,08	0,00
898-F	1,36	0,40	0,00	0,12	0,00	2,12	1,58	0,00	0,19	0,00
PC-F	0,90	0,53	0,02	0,00	0,31	0,95	1,43	0,00	0,00	0,00

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.

Tabela 17: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, LiP, AVO, MnP) após 3 dias de crescimento, em diferentes meios (ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico, fenol) na concentração de 0,1% e 0,5% de fonte de carbono, na condição sem oxigenação e com adição de glicose.

Fungos/ Meios	Atividade Enzimática após 3 dias de crescimento									
	Concentração 0,1%					Concentração 0,5%				
	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP
897-T	0,00	0,80	1,45	0,12	0,00	0,54	0,63	14,50	5,47	0,00
898-T	0,18	0,55	0,16	0,11	0,00	0,58	0,97	6,63	5,11	0,00
PC-T	0,30	0,56	0,64	0,00	0,00	0,31	0,49	3,56	12,71	0,00
897-L	0,34	0,57	0,00	0,00	3,54	0,50	0,31	2,88	0,00	0,00
898-L	0,53	0,45	0,00	0,00	0,00	0,65	0,76	0,00	0,00	0,00
PC-L	0,75	0,85	0,00	0,00	0,00	1,04	1,28	0,00	0,00	0,00
897-AV	0,86	0,46	0,00	0,05	0,00	1,70	0,66	0,00	0,00	0,00
898-AV	0,79	0,58	0,00	0,00	0,00	2,05	1,95	0,00	0,00	0,00
PC-AV	0,68	0,81	0,14	0,00	0,00	1,83	2,74	0,00	0,00	1,79
897-F	0,49	1,06	0,04	0,00	2,60	0,91	1,18	0,55	0,33	1,70
898-F	0,71	0,99	0,00	0,03	1,93	1,67	0,75	0,41	0,42	0,09
PC-F	0,94	0,92	0,00	0,04	0,00	1,89	0,88	0,21	0,23	0,00

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.

Tabela 18: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, LiP, AVO, MnP) após 7 dias de crescimento, em diferentes meios (ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico, fenol) na concentração de 0,1% e 0,5% de fonte de carbono, na condição sem oxigenação e com adição de glicose.

Fungos/ Meios	Atividade Enzimática após 7 dias de crescimento									
	Concentração 0,1%					Concentração 0,5%				
	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP
897-T	0,24	0,87	0,00	0,00	0,00	0,45	0,76	4,14	2,97	5,11
898-T	1,01	0,97	0,00	0,00	0,00	0,65	0,89	0,00	0,53	0,00
PC-T	0,85	0,99	0,00	0,00	0,00	0,45	0,49	0,00	0,00	13,00
897-L	0,39	0,60	0,00	3,89	0,00	0,62	0,69	2,86	2,65	0,00
898-L	0,46	0,65	0,00	1,05	0,00	0,63	0,45	0,00	0,58	0,09
PC-L	1,05	1,22	0,00	2,44	1,93	0,92	0,90	0,00	0,26	0,63
897-AV	0,11	0,26	0,02	0,00	3,23	2,10	0,98	0,01	0,03	1,21
898-AV	0,44	0,87	0,05	0,02	3,36	1,93	0,96	0,18	0,00	1,30
PC-AV	0,93	0,81	0,09	0,01	0,72	2,24	0,72	0,00	0,00	0,00
897-F	0,87	0,74	0,00	0,00	0,00	1,41	1,05	0,00	0,01	0,00
898-F	0,94	0,56	0,00	0,00	0,00	1,45	0,10	0,00	0,06	0,18
PC-F	0,00	0,87	0,00	0,00	0,13	1,55	0,81	0,00	0,00	0,00

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.

Tabela 19: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, LiP, AVO, MnP) após 10 dias de crescimento, em diferentes meios (ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico, fenol) na concentração de 0,1% e 0,5% de fonte de carbono, na condição sem oxigenação e com adição de glicose.

		Atividade Enzimática após 10 dias de crescimento									
Fungos/ Meios	Concentração 0,1%					Concentração 0,5%					
	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP	
897-T	0,50	0,82	0,00	2,33	0,31	0,87	0,43	1,59	6,17	0,00	
898-T	0,72	0,69	0,00	0,00	0,00	1,02	0,55	2,97	3,44	0,00	
PC-T	0,92	0,89	0,00	0,00	0,00	0,09	0,03	1,56	10,78	0,00	
897-L	0,43	1,17	0,00	2,69	0,40	0,16	0,54	0,66	0,78	0,00	
898-L	0,76	0,90	0,00	0,00	0,00	0,20	0,51	21,50	1,38	0,00	
PC-L	1,43	1,49	0,00	0,00	2,24	0,52	0,72	13,74	0,00	0,00	
897-AV	0,81	1,19	0,00	0,00	0,90	1,91	1,42	0,00	2,79	2,02	
898-AV	0,87	1,28	0,04	0,07	0,00	1,82	1,33	0,64	1,11	0,00	
PC-AV	1,01	1,13	0,00	0,00	2,38	2,01	1,26	0,00	0,18	0,99	
897-F	0,95	0,81	0,00	0,00	1,30	1,54	0,01	0,00	0,00	0,00	
898-F	0,96	0,58	0,12	0,02	0,72	1,71	0,54	0,00	0,00	0,00	
PC-F	1,13	0,63	0,06	0,00	0,81	1,96	0,51	0,19	5,82	0,00	

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.

Tabela 20: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, LiP, AVO, MnP) após 7 dias de crescimento, em diferentes meios (ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico, fenol) na concentração de 0,1% e 0,5% de fonte de carbono, na condição com oxigenação e com adição de glicose.

		Atividade Enzimática após 7 dias de crescimento									
Fungos/ Meios	Concentração 0,1%					Concentração 0,5%					
	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP	
897-T	1,57	1,23	0,00	3,68	0,00	0,35	0,13	0,00	3,06	0,00	
898-T	1,82	1,17	0,00	0,05	0,00	0,13	0,42	1,18	6,00	0,00	
PC-T	0,81	0,89	0,00	1,57	0,00	0,02	1,16	0,00	7,95	3,05	
897-L	1,60	1,11	0,00	3,80	7,71	0,26	0,12	0,00	7,56	0,27	
898-L	0,93	0,98	0,00	0,00	0,00	0,08	0,01	0,00	7,89	2,11	
PC-L	1,83	1,33	0,00	0,61	10,58	0,44	0,07	0,00	8,03	3,18	
897-AV	2,32	1,39	0,27	0,00	2,38	0,88	0,14	0,19	1,83	1,84	
898-AV	1,47	0,64	0,13	0,00	0,04	0,85	0,06	0,01	0,00	0,81	
PC-AV	1,99	1,37	0,00	0,00	8,07	0,83	0,19	0,00	0,00	2,42	
897-F	0,36	0,18	0,00	0,00	3,99	1,31	0,06	0,00	0,17	0,00	
898-F	0,25	0,38	0,00	0,00	2,33	0,95	0,16	0,05	0,00	0,13	
PC-F	0,06	0,44	0,10	0,00	0,94	0,72	0,07	0,00	0,00	9,64	

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.

Tabela 21: Atividade das enzimas ligninolíticas (lacase, peroxidase, LiP, AVO, MnP) após 10 dias de crescimento, em diferentes meios (ácido tânico, ácido lignossulfônico, álcool veratrílico, fenol) na concentração de 0,1% e 0,5% de fonte de carbono, na condição com oxigenação e com adição de glicose.

Fungos/ Meios	Atividade Enzimática após 10 dias de crescimento									
	Concentração 0,1%					Concentração 0,5%				
	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP	Lacase	Peroxid	LiP	AVO	MnP
897-T	1,45	1,21	0,35	0,00	0,00	0,12	0,00	4,69	2,88	0,00
898-T	1,89	1,20	0,87	0,00	11,74	0,19	0,01	7,29	0,00	0,00
PC-T	1,49	0,83	0,61	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,36	0,54
897-L	2,25	1,49	0,00	0,00	0,40	0,45	0,55	0,10	0,00	0,38
898-L	1,73	1,06	0,00	2,32	0,00	0,24	0,11	0,29	9,82	3,72
PC-L	2,21	1,27	0,00	0,00	0,00	0,57	0,30	0,00	15,97	0,90
897-AV	0,00	0,22	0,03	0,00	1,03	0,79	0,30	0,00	0,82	0,00
898-AV	0,74	0,37	0,00	0,00	0,63	0,82	0,34	0,27	0,00	2,06
PC-AV	1,66	0,91	0,00	0,00	2,56	0,85	0,35	0,14	0,00	1,75
897-F	0,47	0,31	0,11	0,00	0,81	0,83	0,34	0,00	0,20	0,00
898-F	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,81	0,29	0,04	0,04	0,72
PC-F	1,07	0,63	0,04	0,11	0,00	0,87	0,25	0,00	0,00	0,00

T = ácido tânico; L = ácido lignossulfônico; AV = álcool veratrílico; F = fenol.