



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA
AMAZÔNIA**

MÁRCIA JAQUELINE MENDONÇA MACIEL

**INFLUÊNCIA E PARÂMETROS FÍSICOS NA ATIVIDADE OXIDATIVA DO
FUNGO *Hexagonia glabra* (P.BEAUV) RYVARDEN**

**ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Helena Camarão Telles Ribeiro
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir Castro e Silva**

**MANAUS
FEVEREIRO – 2011**

MÁRCIA JAQUELINE MENDONÇA MACIEL

**INFLUÊNCIA E PARÂMETROS FÍSICOS NA ATIVIDADE OXIDATIVA DO
FUNGO *Hexagonia glabra* (P.BEAUUV) RYVARDEN**

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Helena Camarão Telles Ribeiro

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir Castro e Silva

Dissertação apresentada à
Coordenação do Curso de Mestrado
em Biotecnologia e Recursos Naturais
da Amazônia da Universidade do
Estado do Amazonas – UEA, como
parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia e Recursos Naturais.

MANAUS
FEVEREIRO – 2011

Ficha Catalográfica

M152i	Maciel, Márcia Jaqueline Mendonça
	Influência e parâmetros físicos na atividade oxidativa do fungo <i>Hexagonia glabra</i> (P.BEAUV) RYVARDEN / Márcia Jaqueline Mendonça Maciel. -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2011. xvii, 124 f. : il.
	Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2011. Orientadora: Dra. Helena Camarão Telles Ribeiro. Co-orientador: Dr. Ademir Castro e Silva. 1. Produtos biotecnológicos. 2. Enzimas ligninolíticas. 3. <i>Hexagonia glabra</i> . 4. Estabilidade térmica. I. Ribeiro, Helena Camarão Telles. II. Silva, Ademir Castro e. III. Universidade do

Ficha catalográfica elaborada por
Maria de Lourdes Davila de Andrade Lima-CRB 11/675

*"Os conceitos e princípios
fundamentais da ciência são
invenções livres do espírito humano."*

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Primeiramente à **Deus** pelas oportunidades a mim concedidas, pela minha família, pelas pessoas maravilhosas que encontro em meu caminho e por sempre me guiar em minhas decisões e em minhas escolhas.

Aos meus pais **Luiz** e **Marlene** pela total dedicação à mim e às minhas irmãs, sempre fazendo o melhor que podem, e sempre me apoiando em meu caminho, o que sou hoje é fruto do amor e educação que vocês me deram.

Ao meu pai **Luiz** por sempre investir na minha educação e na das minhas irmãs, obrigada pelo apoio e incentivo.

À minha mãe **Marlene** pelas orações e torcida, sempre apoiando e incentivando novas conquistas, você é meu espelho e minha luz em tudo que faço.

Ao meu noivo **Daniel Lima**, pela paciência em dias ausentes destinados à pesquisa, pela compreensão e pelo amor à mim dedicado.

Às minhas irmãs **Jéssica** e **Juliane** pela amizade, paciência e risadas sempre presentes, como irmã mais velha faço tudo pensando em ser um exemplo para vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha imensa família por me apoiar e torcer pela minha vida acadêmica, obrigada.

À **Prof.^ª. Dra. Helena Camarão Telles Ribeiro**, minha orientadora, pela paciência constante, pela amizade, pelas longas conversas, compreensão, atenção e confiança durante este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ademir Castro e Silva** pela idéia que deu início a este trabalho, pelos ensinamentos e oportunidades concedidas.

À amiga **Maria Dolores Pinheiro Fonseca** por ter me ensinado sobre fungos e me despertado para esse mundo maravilhoso dos basidiomicetos, ao qual me apaixonei.

Ao amigo **Emerson Bacelar** pela sempre presente ajuda no laboratório, pelo presente sorriso, e o sempre bom-humor presente até nas horas difíceis.

Aos amigos de longa caminhada **Daniely Pinheiro, Dannielle Ribeiro, Márcia Seixas** e **Patrick Gomes**, que me acompanharam desde a graduação na Ufam, obrigada pela amizade duradoura, torço muito por vocês.

Aos amigos conquistados **Elissandro Fonseca, Andrey Damasceno, Rafaelle Paz, Ângela Andrade, Natália Martins, Paula Figliuolo, Dulcilene Martins, Ydrielly Veras, Tamara Araújo, Douglas Siqueira, Bruno Medeiros, André Luiz, André Higa** e **Miriam Santos**.

À minha amiga de longa data **Séfora Antela**, pela presença, atenção e ouvidos a mim emprestados nas nossas conversas.

Aos amigos de laboratório **Jucileuza, Nadielly, Priscila, Daniely, Sandro, Andrey, e Alane**.

Aos professores sempre presentes na hora das dúvidas **Dr. Jorge Losano, Dr. Aldo Procópio, Dr. Luciano Fernandes e Dra. Ana Hilda**.

Aos professores que ministram disciplinas do Mestrado, sempre nos despertando para novos conhecimentos e nos guiando em busca do caminho certo.

À Secretaria do Mestrado pela ajuda, eficiência e disponibilidade, especialmente **Felipe, Mayra e Claudete**.

À **Capes** pela bolsa de estudos concedida.

À **Universidade do Estado do Amazonas**, mas precisamente à **Escola Superior de Ciências da Saúde – ESA**, local onde foi desenvolvida esta pesquisa.

À todos que contribuíram direta e indiretamente em minha jornada nesta pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Basidiomiceto <i>Pycnoporus sanguineus</i> colonizando madeira.....	26
Figura 02 - Estruturas dos fungos.....	29
Figura 03 - Fungo <i>Hexagonia glabra</i>	30
Figura 04 - Modelo chave-fechadura de enzima.....	39
Figura 05 - Etapas do trabalho.....	46
Figura 06 - Crescimento do fungo na placa de Petri.....	47
Figura 07 - Matérias-primas dos meios de cultura para <i>H. glabra</i>	47
Figura 08 - Produção de Biomassa Fúngica, em 22 dias de crescimento micelial, em cinco pH's diferentes e quatro meios de cultura.....	53
Figura 09 - Produção de Lacase em meio de cultura de Batata.....	61
Figura 10 - Produção de Lacase em meio de cultura de Bagaço de Cana-de-açúcar.....	62
Figura 11 - Produção de Lacase em meio de cultura de cará roxo.....	63
Figura 12 - Produção de Lacase em meio de cultura de Araçá boi.....	63
Figura 13 - Produção de Lignina Peroxidase em meio de cultura de batata.....	72
Figura 14 - Produção de Lignina Peroxidase em meio de cultura de bagaço de cana-de-açúcar.....	72
Figura 15 - Produção de Lignina Peroxidase em meio de cultura de cará roxo.....	73
Figura 16 - Produção de Lignina Peroxidase em meio de cultura de araçá boi.....	74
Figura 17 - Produção de Manganês Peroxidase em meio de cultura de batata.....	81
Figura 18 - Produção de Manganês Peroxidase em meio de cultura de bagaço de cana-de-açúcar.....	82
Figura 19 - Produção de Manganês Peroxidase em meio de cultura de cará roxo.....	83
Figura 20 - Produção de Manganês Peroxidase em meio de cultura de araçá boi.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Composição Média do Bagaço de Cana-de-açúcar.....	34
Tabela 02 – Comparação das diferentes fontes de nutrientes dos meios de cultivo.....	35
Tabela 03 - Enzimas ligninolíticas produzidas por fungos de podridão branca.....	41
Tabela 04 - Produção de Biomassa Final no período de 22 dias em estado estacionário em pH 3, 4, 5, 6 e 7.....	53
Tabela 05 - Análise de variância (ANOVA) da biomassa produzida em diferentes meios de cultura sob condição estacionária em diferentes pH's.....	54
Tabela 06 - Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura com pH 3.....	54
Tabela 07 - Atividade de Lacase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 3.....	55
Tabela 08 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase a partir de meios de cultura com pH 3.....	56
Tabela 09 - Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura com pH 3.....	56
Tabela 10 - Atividade de Lacase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 4.....	57
Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase a partir de meios de cultura com pH 4.....	57
Tabela 12 - Atividade de Lacase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 5.....	58
Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase a partir de meios de cultura com pH 5.....	58
Tabela 14 - Atividade de Lacase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 6.....	59
Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase a partir de meios de cultura com pH 6.....	59
Tabela 16 - Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura com pH 6.....	59
Tabela 17 - Atividade de Lacase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 7.....	60
Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase a partir de meios de cultura com pH 7.....	60
Tabela 19 - Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura com pH 7.....	61
Tabela 20 - Atividade de Lignina Peroxidase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 3.....	64
Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lignina peroxidase a partir de meios de cultura com pH 3.....	65
Tabela 22 - Análise de Tukey para produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 3.....	65

Tabela 23 - Atividade de Lignina Peroxidase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 4.....	66
Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lignina peroxidase a partir de meios de cultura com pH 4.....	66
Tabela 25 - Análise de Tukey para produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 4.....	67
Tabela 26 - Atividade de Lignina Peroxidase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 5.....	67
Tabela 27 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lignina peroxidase a partir de meios de cultura com pH 5.....	68
Tabela 28 - Análise de Tukey para produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 5.....	68
Tabela 29 - Atividade de Lignina Peroxidase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 6.....	69
Tabela 30 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lignina peroxidase a partir de meios de cultura com pH 6.....	69
Tabela 31 - Análise de Tukey para produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 6.....	70
Tabela 32 - Atividade de Lignina Peroxidase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 7.....	70
Tabela 33 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lignina peroxidase a partir de meios de cultura com pH 7.....	71
Tabela 34 - Análise de Tukey para produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 7.....	71
Tabela 35 - Atividade de Manganês Peroxidase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 3.....	75
Tabela 36 - Análise de variância (ANOVA) da produção de manganês peroxidase a partir de meios de cultura com pH 3.....	75
Tabela 37 - Análise de Tukey para produção de manganês peroxidase em meios de cultura com pH 3.....	76
Tabela 38 - Atividade de Manganês Peroxidase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 4.....	76
Tabela 39 - Análise de variância (ANOVA) da produção de manganês peroxidase a partir de meios de cultura com pH 4.....	77
Tabela 40 - Análise de Tukey para produção de manganês peroxidase em meios de cultura com pH 4.....	77
Tabela 41 - Atividade de Manganês Peroxidase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 5.....	78
Tabela 42 - Análise de variância (ANOVA) da produção de manganês peroxidase a partir de meios de cultura com pH 5.....	78
Tabela 43 - Análise de Tukey para produção de manganês peroxidase em meios de cultura com pH 5.....	78
Tabela 44 - Atividade de Manganês Peroxidase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 6.....	79

Tabela 45 - Análise de variância (ANOVA) da produção de manganês peroxidase a partir de meios de cultura com pH 6.....	79
Tabela 46 - Análise de Tukey para produção de manganês peroxidase em meios de cultura com pH 6.....	80
Tabela 47 - Atividade de Manganês Peroxidase produzida por <i>H. glabra</i> durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 7.....	80
Tabela 48 - Análise de variância (ANOVA) da produção de manganês peroxidase a partir de meios de cultura com pH 7.....	81
Tabela 49 - Estabilidade térmica da enzima Lacase no meio de cultura líquido de Batata.....	85
Tabela 50 - Estabilidade térmica da enzima Lignina peroxidase no meio de cultura líquido de Batata.....	86
Tabela 51 - Estabilidade térmica da enzima Manganês peroxidase no meio de cultura líquido de Batata.....	88
Tabela 52 - Estabilidade térmica da enzima Lacase no meio de cultura líquido de Bagaço de cana-de-açúcar.....	89
Tabela 53 - Estabilidade térmica da enzima Lignina peroxidase no meio de cultura líquido de Bagaço de cana-de-açúcar.....	92
Tabela 54 - Estabilidade térmica da enzima Manganês peroxidase no meio de cultura líquido de Bagaço de cana-de-açúcar.....	94
Tabela 55 -Estabilidade térmica da enzima Lacase no meio de cultura líquido de cará roxo.....	96
Tabela 56 - Estabilidade térmica da enzima Lignina Peroxidase no meio de cultura líquido de Cará roxo.....	98
Tabela 57 - Estabilidade térmica da enzima Manganês peroxidase no meio de cultura líquido de Cará roxo.....	99
Tabela 58 - Estabilidade térmica da enzima Lacase no meio de cultura líquido de Araçá boi.....	101
Tabela 59 - Estabilidade térmica da enzima Lignina Peroxidase no meio de cultura líquido de Araçá boi.....	102
Tabela 60 - Estabilidade térmica da enzima Manganês peroxidase no meio de cultura líquido de Araçá boi.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- **BDA** – Batata dextrose ágar
- **BOD** – Demanda de oxigênio bioquímico
- **H₂O₂** – Água oxigenada
- **LiP** – Lignina Peroxidase
- **MnP** – Manganês Peroxidase
- **ha** – Hectare
- **pH** – Potencial de hidrogênio
- **mm** – Milímetro
- **Kg** – Kilograma
- **Hab** – Habitante
- **O** – Oxigênio
- **C** – Carbono
- **Fe** – Ferro
- **kDa** – Kilodaltos
- **g** – Grama
- **ml** – Mililitro
- **M** – Molar
- **NaOH** – Hidróxido de sódio
- **HCl** – Ácido clorídrico
- **mM** – Milimolar
- **nm** - Nanômetro

RESUMO

Os fungos são considerados os principais decompositores da biosfera, quebrando a matéria orgânica e reciclando o carbono, o nitrogênio e outros componentes, que são liberados no solo e no ar. Os fungos são produtores de metabólitos de interesse industrial como antibióticos e enzimas que representam um grande mercado mundial, e estes micro-organismos são também utilizados na biorremediação, biopolpação, controle biológico de pragas, etc. A Biotecnologia é uma área de investigação que explora sistemas biológicos, microbianos ou de culturas vegetais e animais, visando a obtenção de produtos de interesse industrial, onde os fungos têm muitas utilidades já aplicadas e muitas outras a serem descobertas, necessitando assim de cada vez mais estudos que vinculem o potencial biotecnológico dos fungos às necessidades encontradas atualmente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de variáveis físicas que influenciam o crescimento, a produção da biomassa e a atividade das enzimas ligninolíticas, em quatro meios de cultivo diferentes do fungo *Hexagonia glabra* (P.Beauv.) Ryvardeen. A produção de biomassa de *Hexagonia glabra* foi influenciada diretamente pelos meios de cultura e pH's. O fungo *H. glabra* produziu diferentes valores de biomassa micelial nos pH's e meios testados. A melhor produção de biomassa micelial de *H. glabra* foi verificada no pH 6 no meio suplementado com cará e a menor produção foi obtida no pH 5 no meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar. O fungo *Hexagonia glabra* produziu Lacase, Lignina Peroxidase (LiP) e Manganês Peroxidase (MnP) em todos os meios de cultivo e pH's testados. Neste trabalho, a maior produção das três enzimas ligninolíticas ocorreu no meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar em todos os pH's analisados. Nos experimentos de termoestabilidade a enzima Lignina Peroxidase (LiP) foi a que teve maior conservação da atividade em comparação com a Lacase e o Manganês Peroxidase (MnP) para o fungo *H. glabra*, nas condições testadas. Os resultados afirmam a boa termoestabilidade da Lacase e Lignina Peroxidase (LiP) em estudo, onde estas enzimas preservaram suas atividades, indicando que as mesmas podem ser utilizadas posteriormente em processos industriais.

PALAVRAS-CHAVE: Enzimas ligninolíticas, Biomassa, Estabilidade térmica e *Hexagonia glabra*.

ABSTRACT

The fungi are known as the main decomposers in the earth, breaking the organic matter and recycling the carbon, the nitrogen, and others components that are released in the soil and in the air. The fungi are metabolite producers that have industrial interest as antibiotics and enzymes that represent a great world market, and these microorganisms are used in bioremediation, biopolpation, biologic control of plague, etc. The Biotechnology is an investigation area that explores biologic systems, microbial, or in animals and vegetables cultures, aim to have the products for industrial interest, where the fungi has many uses already applied and many others that have to be discovered, that is why the fungi needs more studies that explores the biotechnological potentials from them for the actual needs. The aim of this work was evaluating the influence of physical variables that influence the growth, the biomass production and the activity from ligninolytic enzymes, in four different cultivation mediums from *Hexagonia glabra* (P.Beauv.) Ryvardeen. The biomass production from *Hexagonia glabra* was directly influenced by the cultivation mediums and the pH's. The *H. glabra* fungi produced different biomass values in the pH's and mediums tested. The best biomass production from *H. glabra* was checked in pH 6 at the cará roxo medium and the lesser biomass production was at the pH 5 in sugar cane bagasse. The fungi *Hexagonia glabra* produced Laccase, Lignin Peroxidase (LiP) and Manganese Peroxidase (MnP) in all the cultivation medium and pH's tested. In this work, the best ligninolytic enzymes production was in the cultivation medium from sugar cane bagasse in all pHs tested. The results affirm the good thermal stability of Laccase and Lignin Peroxidase (LiP), which these enzymes maintained its activities, showing that they can be used in industrial proceedings.

KEYWORDS: Ligninolytic enzymes, Biomass, Thermic stability and *Hexagonia glabra*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1. Fungos	21
3.1.1. Características gerais	24
3.1.2. Importância ecológica	25
3.1.3. Importância econômica.....	26
3.2. Fungos deterioradores de madeira	28
3.2.1. Basidiomicetos	29
3.2.2. Basidiomicetos do gênero <i>Hexagonia</i>	29
3.2.3.1. Basidioma do gênero <i>Hexagonia</i>	30
3.2.3.2. Morfofisiologia de <i>Hexagonia glabra</i>	31
3.2.3.3. Distribuição e Hábitat da <i>Hexagonia glabra</i>	31
3.2.3.4. Sinônimos taxonômicos de <i>Hexagonia glabra</i>	31
3.2.3.5. Composição química	32
3.2.4. Meios de cultivo	32
3.2.5. Fontes de nutrientes dos meios de cultura	32
3.2.5.1. Cará roxo – <i>Dioscorea alata</i>	33
3.2.5.2. Araçá-boi – <i>Eugenia stipitata</i>	33
3.2.5.3. Bagaço de Cana-de-açúcar	33
3.2.5.4. Batata – <i>Solanum tuberosum</i>	35

3.2.6. Resíduos Agroindustriais.....	36
3.3 Condições físico-químicas.....	38
3.3.1 pH	38
3.3.2. Temperatura	38
3.4. Enzimas	38
3.4.1. Enzimas fúngicas ligninolíticas	39
3.4.1.1. Lignina Peroxidase ou Lignase (LiP).....	42
3.4.1.2. Manganês Peroxidase (MnP).....	42
3.4.1.3. Lacase	43
3.5. Condições físico-químicas e atividade enzimática	44
3.5.1. Atividade Enzimática e pH.....	44
3.5.2 Atividade Enzimática e Termoestabilidade	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1. Repicagem dos fungos.....	46
4.2. Meio de cultura líquido.....	47
4.4. Variação do pH.....	48
4.7. Avaliação do crescimento micelial	49
4.8. Determinação das atividades enzimáticas	49
4.8.1. Lignase ou lignina peroxidase (LiP)	49
4.8.2. Lacase	49
4.8.3. Manganês peroxidase (MnP).....	50
4.9. Avaliação da estabilidade térmica das enzimas.....	50
4.10. Análise estatística	51
5. RESULTADOS.....	52
5.1. Produção de Biomassa Fúngica	52
5.2. Produção Enzimática de Lacase	55
5.2.1. Produção enzimática de Lacase em pH 3.....	55
5.2.2. Produção enzimática de Lacase em pH 4.....	56
5.2.3. Produção enzimática de Lacase em pH 5.....	57

5.2.4. Produção enzimática de Lacase em pH 6.....	58
5.2.5. Produção enzimática de Lacase em pH 7.....	60
5.2.6. Produção enzimática de Lacase em meio de Batata.....	61
5.2.7. Produção enzimática de Lacase em meio de Bagaço de Cana-de-Açúcar.....	62
5.2.8. Produção enzimática de Lacase em meio de Cará roxo.....	62
5.2.9. Produção enzimática de Lacase em meio de Araçá boi	63
5.3. Produção Enzimática de Lignina Peroxidase	64
5.3.1. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em pH 3.....	64
5.3.2. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em pH 4.....	65
5.3.3. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em pH 5.....	67
5.3.4. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em pH 6.....	68
5.3.5. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em pH 7.....	70
5.3.6. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em meio de Batata.....	71
5.3.7. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em meio de Bagaço de Cana-de-açúcar	72
5.3.8. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em meio de Cará Roxo	73
5.3.9. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em meio de Araçá boi	73
5.4. Produção enzimática de Manganês Peroxidase.....	74
5.4.1. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em pH 3.....	74
5.4.2. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em pH 4.....	76
5.4.3. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em pH 5.....	77
5.4.4. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em pH 6.....	79
5.4.5. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em pH 7.....	80
5.4.6. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em meio de Batata	81
5.4.7. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em meio de Bagaço de cana-de-açúcar	82
5.4.8. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em meio de Cará roxo	82
5.4.9. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em meio de Araçá boi	83
5.5. Estabilidade térmica das enzimas ligninolíticas	84

5.5.1. Estabilidade térmica no meio de batata	85
5.5.1.1. Estabilidade térmica de Lacase.....	85
5.5.1.2. Estabilidade térmica de Lignina Peroxidase.....	86
5.5.1.3. Estabilidade térmica de Manganês Peroxidase	88
5.5.2. Estabilidade térmica no meio de bagaço de cana-de-açúcar	90
5.5.2.1. Estabilidade térmica de Lacase.....	90
5.5.2.2. Estabilidade térmica de Lignina Peroxidase.....	92
5.5.2.3. Estabilidade térmica de Manganês Peroxidase	94
5.5.3. Estabilidade térmica no meio de cultura líquido de Cará roxo	96
5.5.3.1. Estabilidade térmica de Lacase.....	96
5.5.3.2. Estabilidade térmica de Lignina Peroxidase.....	98
5.5.3.3. Estabilidade térmica de Manganês Peroxidase	99
5.5.4. Estabilidade térmica no meio de cultura líquido de Araçá boi.....	101
5.5.4.1. Estabilidade térmica de Lacase.....	101
5.5.4.2. Estabilidade térmica de Lignina Peroxidase.....	102
5.5.4.3. Estabilidade térmica de Manganês Peroxidase	104
6. DISCUSSÃO	106
6.1. Efeito de diferentes meios de cultura e diferentes pH's na produção de biomassa do fungo <i>Hexagonia glabra</i>	106
6.2. Efeito de diferentes meios de cultura e diferentes pHs na produção de enzimas ligninolíticas do fungo <i>Hexagonia glabra</i>	108
6.3. Estabilidade térmica das enzimas ligninolíticas produzidas pelo fungo <i>Hexagonia glabra</i>	111
7. CONCLUSÃO	114
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
ANEXOS	124

1. INTRODUÇÃO

No Brasil há uma grande diversidade natural, devido à sua extensão e à sua heterogeneidade de ecossistemas e dentre os organismos mais conhecidos estão as plantas e os animais, mas há também uma grande variedade de protozoários, fungos, bactérias, entre outros.

Na região Amazônica o clima quente e úmido é favorável à proliferação de linhagens microbianas, especialmente os fungos que se reproduzem com grande eficiência neste hábitat e isso pode ser constatado pela grande diversidade de espécies encontradas nesta região. Por esta razão a região Amazônica ainda abriga espécies desconhecidas de fungos com grande potencial biotecnológico que podem ser aplicados de forma benéfica ao homem.

Os fungos são seres heterotróficos, eucariontes, saprófitos, que se alimentam de matéria morta, sendo muito importantes para o ambiente por decomporem matéria orgânica, ajudando na ciclagem de nutrientes.

Os fungos são produtores de metabólitos de interesse industrial como antibióticos e enzimas que representam um grande mercado mundial, e estes micro-organismos são também utilizados na biorremediação, biopolpação, controle biológico de pragas, etc. Além disso, os fungos são utilizados na alimentação humana, devido à sua grande quantidade de proteína.

Os fungos basidiomicetos são conhecidos popularmente como orelhas de pau e são produtores de enzimas ligninolíticas capazes de degradar a madeira. Essas enzimas que são produzidas pelos fungos basidiomicetos são de grande interesse por causa de sua vasta aplicação industrial e biotecnológica (Maciel et al., 2010).

Na Biotecnologia os fungos têm muitas utilidades já aplicadas e muitas outras a serem descobertas, necessitando assim de cada vez mais estudos que vinculem o potencial biotecnológico dos fungos às necessidades encontradas atualmente, como o grande problema da poluição dos rios e dos solos, escassez de água e comida, doenças, etc.

O estudo sobre as enzimas ligninolíticas secretadas pelos fungos basidiomicetos se faz importante para a determinação das características da colonização da madeira, bem como na resolução dos aspectos físicos necessários à produção metabólica envolvida na sua degradação, como: composição do meio indispensável ao seu crescimento, o pH ótimo, produção de massa micelial, temperatura, etc.

Diante do exposto, é necessária a avaliação dos parâmetros físicos na atividade enzimática e no crescimento do fungo *Hexagonia glabra*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de variáveis físicas que influenciam no crescimento, na produção da biomassa e na atividade das enzimas ligninolíticas do fungo *Hexagonia glabra* (P.Beauv.) Ryvarden (UEA_10201).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento micelial em quatro diferentes meios de cultura (araçá-boi, bagaço de cana-de-açúcar, batata e cará) em diferentes pH's para o fungo *Hexagonia glabra*.
- Verificar a faixa de pH ótima necessária para a produção da biomassa e para a atividade das enzimas ligninolíticas: lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase do basidiomiceto *Hexagonia glabra*.
- Determinar as atividades das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase do fungo *Hexagonia glabra* (P.Beauv.) Ryvarden.
- Caracterizar as enzimas produzidas pelo fungo *H. glabra* quanto a termoestabilidade, a fim de estimar seu potencial de aplicação em diferentes condições de tratamento biológico envolvendo as substâncias estudadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Fungos

O potencial dos fungos envolve uma habilidade para conseguir quase todas as conversões de substratos orgânicos aquo-solúveis (isto incluindo compostos de solubilidade muito baixa, como hidrocarbonetos e esteróides) através de complexas seqüências de reações catalisadas por enzimas, geralmente produzidas por eles (Moraes, 2001).

Cada fungo responde com seu próprio comportamento ao ambiente e é este comportamento que lhe provê uma seletiva e competitiva vantagem em seu nicho ecológico. A resposta do fungo ao ambiente é por vezes interativa: enquanto cresce e se reproduz, o quanto se adapta ao ambiente, o fungo modifica o próprio ambiente, como uma consequência de suas atividades de crescimento e, em alguns casos, para melhorar suas vantagens competitivas contra outros micro-organismos (Moraes, 2001).

O crescimento de fungos, de modo geral, pode ser avaliado pelo aumento da massa celular ou pelo número de células, e é resultado de uma série de eventos altamente coordenados e enzimaticamente catalisados. A expressão máxima do crescimento fúngico é dependente do transporte dos nutrientes necessários, fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas e sais minerais, que se transferem a célula e de parâmetros

ambientais, como temperatura e pH, que devem ser mantidos no valor ótimo (Falanghe, 1975).

A maioria dos processos biotecnológicos industriais usa carbono e nitrogênio a partir de misturas complexas de produtos ou subprodutos naturais de baixo custo, buscando resíduos e águas residuárias com boa composição e em disponibilidade (Kamida et al., 2005).

Mesmo existindo tratamentos físicos e químicos para efluentes têxteis, os fungos têm sido intensamente estudados com a finalidade de remover compostos tóxicos do meio ambiente. Estudos indicam os fungos basidiomicetos degradadores de lignina como eficientes na degradação de diversos compostos e de corantes, além do alto potencial de ação de recuperação de ambientes contaminados (Kamida et al., 2005).

Os fungos são seres eucarióticos altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos, podendo apresentar-se sob a forma leveduriforme, formar um pseudomicélio ou constituir hifas. Constituem um grande grupo heterogêneo encontrado em qualquer nicho ecológico.

Os fungos são conhecidos como bolores, mofos ou cogumelos comestíveis ou alucinógenos. São tratados de forma pejorativa, como venenosos ou comidas exóticas. Além disso, estes micro-organismos são mais lembrados por seus efeitos prejudiciais, como as doenças que causam nos homens e inúmeros materiais que degradam, do que pelos benefícios produzidos por eles. Este grupo de organismos é muito amplo, mesmo havendo espécies prejudiciais ao homem, a grande maioria deles é benéfica e é responsável pela sobrevivência de outros seres vivos, incluindo a espécie humana

(Esposito e Azevedo, 2004), visto que sem os fungos a espécie humana não seria capaz de sobreviver no planeta Terra.

Os fungos são responsáveis pela produção de importantes ácidos orgânicos, fármacos, produção de enzimas de interesse industrial, produção de bebidas fermentadas, como o vinho e a cerveja, fermentação de queijos e outros alimentos, realização de controle biológico, controle de pragas em plantas, produção de etanol, etc. (Esposito e Azevedo, 2004).

Os fungos são um dos agentes mais importantes de degradação da Terra, isso acontece principalmente em florestas onde os mesmos são os principais decompositores de celulose e lignina, constituintes da madeira. A produção de biomassa em um ecossistema florestal é, na sua maior parte, controlada por fungos degradadores de madeira, que liberam os nutrientes hidrolisados no ambiente após a morte das árvores. E para que estes nutrientes liberados pelos fungos retornem ao ambiente é primeiramente necessária a “quebra” das macromoléculas pelas enzimas fúngicas, que serão liberadas no meio a fim de nutrir os fungos, e os componentes não utilizados por eles serão dispostos na natureza.

O interesse do homem por fungos surgiu desde a antiguidade em função da eterna busca por alimento, logo se descobriu que eles eram uma nova fonte de alimentação, porém vários envenenamentos acidentais ocorreram e estes fungos venenosos receberam o nome de “fermentos venenosos da terra” (Morais, 2003).

Muitos fungos já eram empregados desde a mais longínqua antiguidade, quando o homem descobriu os métodos de preparação do pão, do queijo e das bebidas. Na época

não se sabia exatamente o que provocava a fermentação, o pão e as bebidas alcoólicas surgiram em diversas partes do planeta independentemente. Durante séculos várias tribos indígenas aprenderam quais eram os fungos comestíveis na natureza (Putzke e Putzke, 2004).

É estimada a existência de pelo menos um milhão e quinhentas mil espécies de fungos espalhadas pelo mundo. Desse total estimado apenas cerca de 70.000 espécies de fungos foram até hoje descritas, ou seja, pelo menos de 5% das possivelmente existentes (Araújo, 2007).

3.1.1. Características gerais

Os fungos são seres eucariontes, podendo ser unicelulares (leveduras) ou multicelulares (filamentosos), aclorofilados e aeróbios, heterótrofos (decompositores de matéria orgânica ou parasitas), crescem rapidamente e formam filamentos celulares microscópicos denominados hifas, cujo conjunto constitui uma espécie de tecido próprio chamado de micélio, responsável por todas as funções vegetativas do organismo (Hudson et al., 1986).

Por causa da parede celular rígida, os fungos não são capazes de absorver micro-organismos ou outras partículas, e para tal os fungos secretam enzimas através do micélio sobre a fonte de alimento e absorvem pequenas moléculas que são disponíveis (Raven, 2001). Às vezes o micélio emite órgãos chamados haustórios, que penetram nos tecidos dos organismos hospedeiros, absorvendo o alimento (Griffin, 1994). Há ainda os fungos que vivem em simbiose, formando associações benéficas com outros seres vivos.

A parede celular de alguns fungos contém celulose, como alguns fungos aquáticos inferiores, mas a maioria deles possui a parede celular com quitina (Black, 2002). A constituição da parede celular dos fungos é uma das características que levou a sua separação em um reino a parte entre os seres vivos. O material de reserva dos fungos é o glicogênio (Laurense, 2005).

Alguns fungos podem se apresentar de duas formas: em forma de bolor na vida saprofítica, ou na forma de levedura na vida parasitária, isso ocorre com mudanças bruscas de pH, temperatura, etc. A reprodução dos fungos ocorre por meio da formação de esporos que podem se formar sexuada ou assexuadamente, podendo estar dentro de uma estrutura, endósporos, ou livres, ectosporos. A reprodução assexuada ocorre através de brotamento, fragmentação e produção de conídios, no caso dos ascomicetos. Já na reprodução sexuada resulta a produção de basidiosporos, no caso dos basidiomicetos (Pelczar et al., 1996; Raven, 2001).

Os fungos são divididos em cinco classes, de acordo com a sua estrutura: Ascomycota, Chytridiomycota, Basidiomycota, Zygomycota e Deuteromycota.

3.1.2. Importância ecológica

Os fungos junto com as bactérias heterotróficas podem ser considerados os principais decompositores da biosfera, quebrando a matéria orgânica e reciclando o carbono, o nitrogênio e outros componentes, que são liberados no solo e no ar. Na realidade, esses micro-organismos são capazes de translocar através de suas hifas elementos entre microsítios, de forma a suprir recursos potencialmente limitantes para o seu metabolismo em um dado sítio (Anderson, 1988). Como decompositores os fungos

entram em conflito direto com os interesses do homem, atacando quase todas as espécies. A maioria dos fungos é saprófita, isto é, vivem sobre matéria orgânica em decomposição (Figura 01).

Os basidiomicetos ligninolíticos secretam enzimas que convertem os polímeros externos em moléculas menores, que são assimiladas e utilizadas como nutrientes. A secreção de proteínas parece ocorrer durante o crescimento apical das hifas, sendo liberadas pela parede celular recém sintetizada (Moreira Neto, 2006).



Figura 01. Basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* colonizando madeira

3.1.3. Importância econômica

A biotecnologia é uma área de investigação que explora sistemas biológicos, microbianos ou de culturas vegetais e animais, visando à obtenção de produtos de interesse industrial. Devido aos microrganismos apresentarem crescimento rápido, menor custo e espaço para crescimento, possibilitando maior controle dos processos

operacionais, há mais vantagens no seu uso, principalmente nos processos fermentativos (Demain, 1996).

O desenvolvimento da Biotecnologia tem muita importância, sobretudo para o ambiente, pois ela busca alternativas no controle das atividades que causem degradação a natureza, visando solucionar diversos problemas encontrados atualmente.

A maioria dos processos biotecnológicos utilizando fungos baseia-se nos seus produtos metabólicos como: fermentação, enzimas e polissacarídeos, que podem ser utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Além dessas utilizações estas enzimas são utilizadas na biodegradação de compostos xenobióticos, como, por exemplo, na biorremediação de solos contaminados e no tratamento de efluentes da indústria papelreira e têxtil (Mateus e Okino, 1998; Maciel et al., 2010).

A vantagem de métodos biotecnológicos é que suas reações são altamente específicas, não acarretam efeitos adversos ao ambiente, são mais econômicos e podem ser utilizados onde processos químicos são impraticáveis. Do ponto de vista biotecnológico, fungos são micro-organismos “atraentes” por possuírem metabolismo dinâmico e rápido, produtores de metabólitos secundários de interesse, heterótrofos e adsorptivos e são bons degradadores de substratos (Boominathan e Reddy, 1992).

Os fungos são também utilizados como fonte de alimentação por possuírem até cinco vezes mais proteínas que as carnes de bovinos e suínos (Silva e Coelho, 2006).

Os produtos finais da degradação do substrato pelas enzimas fúngicas podem ser utilizados como fertilizantes em plantações, suplementos para ração de animais ou ainda serem reciclados e misturados a outros materiais orgânicos para cobertura de plantações.

No mercado encontra-se o tofu, que é um queijo fermentado da soja, o shitaki, e o champignon, cogumelos que são utilizados na alimentação, entre outros.

As leveduras são de grande importância econômica na produção de bebidas alcoólicas e pães, por liberarem etanol e dióxido de carbono a partir de sua fermentação.

Os fungos também foram os pioneiros na descoberta dos antibióticos, a penicilina que foi descoberta em 1928 por Alexander Fleming, isolada do fungo do gênero *Penicillium* (Laurense, 2005).

3.2. Fungos deterioradores de madeira

De modo geral, os fungos são classificados com base na forma do corpo frutífero e nas estruturas sob os quais os esporos são formados (estágio sexual). Os fungos deterioradores de madeira estão classificados na classe dos Basidiomicetos, principalmente nas ordens Polyporales e Agaricales (Putzke, 2002).

Os fungos deterioradores de madeira podem ser classificados em três grupos ecofisiológicos: os causadores de podridão branca, os de podridão parda e de podridão mole. Os basidiomicetos atuam na deterioração da madeira, decompondo a matéria orgânica, dinamizando a ciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres (Tuomela et al., 2000). Os basidiomicetos são os únicos organismos capazes de mineralizar a molécula da lignina presente na madeira (Kirk e Farrell, 1987).

3.2.1. Basidiomicetos

O grupo dos basidiomicetos inclui os fungos que produzem esporos (basidiósporos) de origem sexuada em uma estrutura especializada denominada de basídio e popularmente chamados de cogumelos e orelhas de pau (Figura 02). A fase vegetativa dos basidiomicetos é denominada de micélio, que por sua vez é formada por muitos filamentos septados chamados hifas. Os basidiomicetos são caracterizados por possuírem dois tipos básicos de basidiósporos. Os denominados balisfosforos, que são liberados violentamente dos basídios e os denominados estatismosporos que são liberados passivamente (Gugliotta e Capelari, 1998).

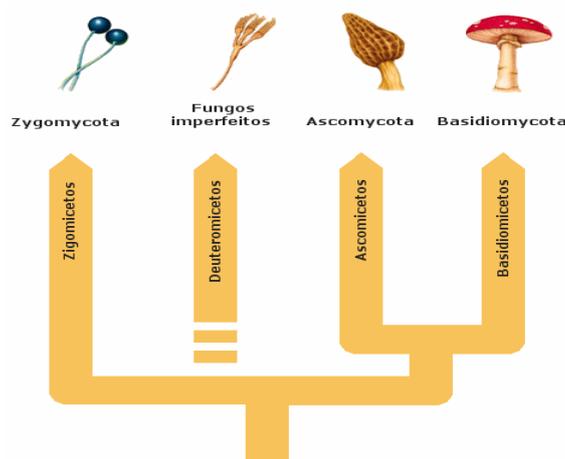


Figura 02. Estruturas dos fungos

3.2.2. Basidiomicetos do gênero *Hexagonia*

Os basidiomicetos do gênero *Hexagonia* compreende aproximadamente 136 espécies amplamente distribuídas no mundo todo.

O gênero *Hexagonia* foi proposto antes da nomenclatura dos políporos baseado unicamente na espécie *Hexagonia mori* (Fidalgo, 1968).

3.2.3. Enquadramento taxonômico do fungo *Hexagonia glabra*

De acordo com *Hexagonia glabra* (P.Beauv) Gilbertson e Ryvardeen, 1986, o fungo apresenta o seguinte enquadramento taxonômico.

REINO: Fungi

SUBREINO: Dikaria

DIVISÃO: Eumycota

FILO: Basidiomycota

CLASSE: Basidiomycetes

ORDEM: Polyporales

FAMÍLIA: Polyporaceae

GÊNERO: *Hexagonia*

ESPÉCIE: *glabra*

3.2.3.1. Basidioma do gênero *Hexagonia*

Hexagonia glabra produz basidioma macroscópico bem desenvolvido e superfície abtrimental vilosa, glabra na maturidade, concentricamente zonadas. Consiste de Basidiósporos cilíndricos e grandes. Os Basidiocarpos são anuais e perenes, fileados, sésseis, flabeliformes a semicirculares, consistência coriácea (Figura 03).



Fonte: Jucileuza Santos

Figura 03. Fungo *Hexagonia glabra*

3.2.3.2. Morfofisiologia de *Hexagonia glabra*

O sistema hifal trimítico e os basidiósporos cilíndricos são características que podem ser confundidas com as espécies *Trametes* e *Coriolopsis rigida*; os poros grandes (1 por mm) e rasos, de formato hexagonal, o basidioma fino (1-3 mm de espessura), o píleo velutino e fortemente zonado concentricamente são caracteres distintivos da espécie.

3.2.3.3. Distribuição e Hábitat da *Hexagonia glabra*

Os basidiomicetos do gênero *Hexagonia* apresentam ampla distribuição nos biomas terrestres, possuindo papel fundamental na degradação da celulose e lignina de materiais vegetais lenhosos e, portanto, na ciclagem de nutrientes e na manutenção dos ecossistemas e seu hábitat natural é o interior de matas.

No gênero *Hexagonia* há aproximadamente 136 espécies e a espécie *Hexagonia glabra* apresenta distribuição pantropical e está amplamente distribuída no mundo. No Brasil foi citada para os estados do Amazonas, Roraima, Rondônia, Maranhão, Pará, Rio de Janeiro e São Paulo (Gilbertson e Ryvarden, 1986).

3.2.3.4. Sinônimos taxonômicos de *Hexagonia glabra*

Favolus glaber (P.Beauv.) 1819

Hexagonia glabra (P.Beauv.) 1846

Daedalea flavida (P.Beauv.) 1946

3.2.3.5. Composição química

As principais substâncias produzidas pelo gênero *Hexagonia* são polissacarídeos, encontrados amplamente nos fungos (Chen et al., 2001).

3.2.4. Meios de cultivo

O meio de cultivo para *Hexagonia glabra* pode ser semi-sólido ou líquido. O meio semi-sólido é muitas vezes considerado o mais indicado, pois os substratos naturais de muitos fungos são sólidos ou semi-sólidos, como é o caso da madeira, tecido animal e vegetal ou solo. Dentre os agentes semi-sólidos, o ágar é o mais indicado, por não se liquefazer antes de atingir 100 °C e permanecer líquido até próximo de 45 °C, no resfriamento. Meios líquidos apresentam vantagens e desvantagens em relação aos semi-sólidos. O crescimento micelial em meio líquido ocorre na forma de tapete bastante heterogêneo. Um melhor sistema de homogeneização, com crescimento submerso é obtido com agitação, que pode ser feito com o uso de um alternador, recipiente com agitação e aeração forçada ou Shaker rotatório (Griffin, 1994). Contudo, serão necessários outros estudos para o estabelecimento de meio de cultivo ideal para *H. glabra*.

3.2.5. Fontes de nutrientes dos meios de cultura

Um dos vários fatores que podem influir no crescimento de um micro-organismo é a natureza do meio de cultura. A diferença de composição dos meios é fator que pode alterar os metabólitos que irão ser produzidos.

3.2.5.1. Cará roxo – *Dioscorea alata*

O cará é uma hortaliça com expressivo consumo mundial e considerada cultura alternativa em expansão, pois seu consumo ultrapassou a batata-doce, a mandioca e a própria batata. Como alimento, é rico em carboidratos, proteínas, fósforo, cálcio, ferro e vitaminas B1 e B2 (Abramo, 1990) (Tabela 02). Os teores de amido (51,59%) e de proteínas (9,04%) são altos e comparativamente parecidos e até superiores aos de milho (52,32% de amido e 8,28% de proteínas) (Vieira et al., 1999).

3.2.5.2. Araçá-boi – *Eugenia stipitata*

Na Bacia Amazônica há um grande número de espécies frutíferas, dentre elas o araçá-boi que é consumido em forma de sucos, licores, sorvetes e cremes. O fruto apresenta baixo pH, o que indica elevada acidez e o que impede seu consumo *in natura*. O fruto apresenta ainda alto teor de umidade, expressiva quantidade de ácido ascórbico, pouca quantidade de açúcar total e grande quantidade de compostos fenólicos (Andrade et al., 1997).

3.2.5.3. Bagaço de Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta que pertence ao gênero *Saccharum*. As espécies de cana-de-açúcar são provenientes do Sudeste Asiático. É uma planta da família Poaceae. As principais características dessa família são a forma da inflorescência, o crescimento do caule em colmos e as folhas como lâminas de sílica em suas bordas e bainha aberta. É uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo tropical, gerando centenas de milhares de empregos diretos (Machado, 2000).

O bagaço da cana é o resíduo da cana-de-açúcar após a moagem da mesma. O bagaço da cana-de-açúcar é o maior resíduo da agroindústria brasileira. O bagaço da cana, além de ser usado como fonte energética é utilizado também como matéria-prima na indústria de papel, papelão, na fabricação de aglomerado, na indústria química, como material alternativo na construção civil, como ração animal e na produção de biomassa microbiana. Mesmo assim há ainda um excedente deste resíduo que não é totalmente utilizado, causando sérios problemas de estocagem e poluição ambiental (Botão e Lacava, 2003; Machado, 2000).

A composição química do bagaço da cana-de-açúcar (Tabela 01) varia de acordo com diversos fatores, entre eles, o tipo de cana, o tipo de solo, as técnicas de colheita e até o manuseio (Carvalho et al, 2006).

Tabela 01 – Composição Média do Bagaço de Cana-de-Açúcar

Composição Química Média dos Elementos do Bagaço de Cana-de-Açúcar			
Carbono	Oxigênio	Hidrogênio	Nitrogênio
39,7 – 49%	40 - 46%	5,5 - 7,4%	0 - 0,3%
Composição Média da Fibra de Bagaço da Cana-de-Açúcar			
Celulose	Hemicelulose	Lignina	
26,6 – 54,3%	14,3 – 24,4%	25,7 – 29,7%	

Carvalho et al, 2006

O resíduo da cana-de-açúcar tem grande importância econômica no nosso país. O bagaço da cana subproduto da indústria sucroalcooleira, apesar dos inúmeros empregos deste resíduo em diferentes setores e áreas da indústria brasileira, hoje tem sido alvo de vários estudos visando utilizar todo seu potencial.

3.2.5.4. Batata – *Solanum tuberosum*

A batata (*Solanum tuberosum*) é considerada a quarta fonte de alimento para a humanidade, tendo seu cultivo expandido mundialmente. Trata-se de uma cultura de grande importância para o homem, não só devido ao seu alto valor energético como também ao seu teor de proteínas, sais minerais e vitaminas. É a cultura que mais acumula energia/ha/dia. Adicionalmente, a batata é boa fonte de vitamina C e de algumas vitaminas do complexo B, especialmente niacina, tiamina e vitamina B6. Entre os alimentos energéticos, é o mais rico em niacina. Esta ainda é razoável fonte de ferro, boa fonte de fósforo e magnésio e ótima fonte de potássio (Bernardi et al., 2008) (Tabela 02).

A batata é muito utilizada como produto para meio de cultura para isolamento, cultivo e contagem (placa) de fungos e leveduras, pode ser também utilizada como meio para manutenção de culturas. Diferentes tipos de compostos e com diferentes fontes nutricionais podem ser mais propícios ao desenvolvimento de uma linhagem de fungos do que de outras, bem como fatores externos como temperatura e luminosidade exercem influências nas diferentes fases de produção de basidiomicetos (Bernardi et al., 2008).

Tabela 02 – Comparação das diferentes fontes de nutrientes dos meios de cultivo

	Umidade	Proteína	Cinza	Lipídeos	Carboidrato	Fibra	Energia
	g	g	g	g	g	G	Kcal
Cará roxo	74,62	1,24	0,52	0,00	23,62	-	99,44
Araçá boi	90,00	0,60	0,30	0,20	8,90	-	39,80
Bagaço de Cana-de-açúcar	-	2,32	1,22	-	-	59,02	-
Batata	81,47	2,25	0,33	0,06	17,72	-	80,40

Aguiar, 1996

3.2.6. Resíduos Agroindustriais

Resíduos podem ser gerados por diversos processos industriais e por indústrias de base florestal, na transformação de matérias-primas em produtos. De acordo com Brienzo (2005), essa massa residual, rica em celulose, hemicelulose e lignina, apresenta-se como opção de baixo custo na aplicação em processos biotecnológicos. Ao contrário do que acontecia no passado, os conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários às cadeias agroindustriais (Pinto, 2007). Os fungos são alternativas viáveis na reincorporação de resíduos ao meio-ambiente, ao realizarem a bioconversão (Piero, 2003).

Nos últimos anos, há um interesse crescente no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos. O uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de poder ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (Alexandrino et al., 2007).

A laranja está entre as frutas mais produzidas e consumidas no mundo, sendo que sua produção ultrapassa 80 milhões de toneladas/ano. A citricultura é uma das atividades agrícolas que mais vem se desenvolvendo na região noroeste do Estado do Paraná, sendo produzidas mais de 200 mil toneladas anuais de produtos. Em média, 34% da produção é transformada em suco, mas em grandes países produtores (Brasil e Estados Unidos), esta percentagem chega a 96%, o que gera grande quantidade de resíduos. Este material

equivale a 50% do peso da fruta e tem uma umidade aproximada de 82%. Atualmente o uso principal dos resíduos da laranja é como complemento para a ração animal, tendo boa aceitação por bovinos e caprinos (Alexandrino et al., 2007).

Os micro-organismos fazem uso da matéria orgânica constituída de um resíduo servindo-se de uma boa parte desta para sua autoconstrução e reprodução. O restante é oxidado por meio da respiração aproveitando sua energia e compensando ao meio, elementos na forma de subprodutos do seu metabolismo. Desta maneira, carbono, nitrogênio e fósforo, entre outros elementos, constituintes das moléculas orgânicas dos resíduos, são devolvidas ao meio (ar, água, solo) na forma de compostos mais simples, com gás carbônico, fosfatos, nitratos, etc. (Lopes et al., 2008).

Enfim, os resíduos agroindustriais são a fonte mais abundantes de materiais orgânicos renováveis. Dentre estes, o resíduo da cana-de-açúcar utilizado nos experimentos realizados neste trabalho, não possui ainda total disposição adequada, poluindo o ambiente. Contudo, o cultivo de basidiomicetos a partir de resíduos agroindustriais tem se revelado uma boa alternativa para melhor aproveitamento desses resíduos, uma vez que ao final do cultivo obtém-se um resíduo com grande potencial de aplicação, uma vez que já foi parcialmente digerido pelo complexo ligninolítico do fungo (Bonatti et al., 2003).

3.3. Condições físico-químicas

3.3.1 pH

Os fungos têm tendência a colonizar os ambientes ácidos e para suas atividades metabólicas freqüentemente acidificam ainda mais o meio. O crescimento ótimo dos basidiomicetos se faz em geral em pH entre 4 a 6.5 e muitas espécies toleram grandes variações de pH. Os fungos podem se adaptar em meios bem ácidos (2 a 3) ou bem alcalinos que variam na faixa de pH 8 a 8.5 (Karima, 2008).

3.3.2. Temperatura

A temperatura corrente do cultivo dos fungos basidiomicetos, incluindo o gênero *Hexagonia*, se situa entre 25 °C e 30 °C, para assegurar o crescimento adequado da maioria destes micro-organismos. Entretanto, essas temperaturas não são rigorosamente as temperaturas ótimas de crescimento que os fungos encontram em seus habitats naturais. A temperatura máxima de crescimento dos basidiomicetos pode se situar entre 35 °C e 45 °C (Vieille e Zeikus, 2001).

3.4. Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos de natureza protéica que intervém em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis as quais elas aceleram por ativação específica, permanecendo intactas após cada ciclo de reação, como no modelo chave-fechadura (Figura 04). Elas permitem atingir rapidamente o estado de equilíbrio da reação sem modificá-lo. As enzimas são as peças chaves da biotecnologia e da bioindústria. São elas que, na engenharia microbiológica catalisam as reações

metabólicas acionadas e asseguram a sua regulação. Da mesma forma, elas levaram a engenharia genética a realizar modificações no equipamento enzimático de alguns micro-organismos com vistas a torná-los aptos à biossíntese de metabólitos de interesse (Richard, 1985).

O conhecimento das enzimas, da sua natureza, de suas propriedades, assim como da cinética das reações que elas catalisam é, portanto, fundamental em biotecnologia.

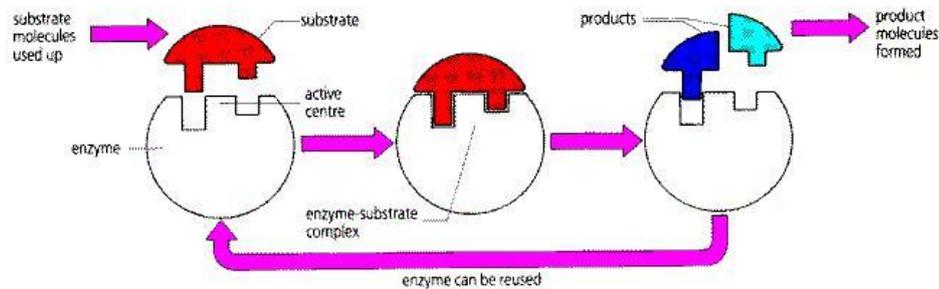


Figura 04 - Modelo chave-fechadura de enzima

3.4.1. Enzimas fúngicas ligninolíticas

O crescimento e as atividades metabólicas distintas dos organismos são uma resposta às condições ambientais que os rodeiam. Os fungos, como todos os organismos vivos, podem modificar seu ambiente e utilizar os compostos químicos presentes no meio como fonte de energia para seu crescimento e reprodução.

Assim os fungos dependem de certos elementos ou compostos presentes no ambiente para o seu crescimento. Alguns compostos (monossacarídeos, alguns dissacarídeos, aminoácidos, vitaminas, etc.) entram na célula sem modificações, porém outros (alguns di e trissacarídeos, polissacarídeos, peptídeos e proteínas), devem ser

hidrolisados extracelularmente, a um tamanho que o fungo os possa absorver (Galvagno e Forchiassin, 2004).

Essa atividade, assim como todas as atividades celulares estão mediadas por enzimas, sendo a capacidade enzimática uma característica de cada indivíduo. A ausência de enzimas específicas pode fracassar o crescimento de um fungo em um determinado substrato, por ser incapaz de digeri-lo. Muitas vezes, as enzimas necessárias para permitir o crescimento de um fungo estão sempre presentes e são sempre constitutivas, em outros casos, é necessária a presença do substrato para induzir a síntese ou a atividade da enzima para sua degradação, que são as enzimas induzíveis. Além do mais, os fungos podem produzir enzimas adaptativas na presença de um substrato que, normalmente, não utiliza, ao selecionar por pressão de seleção, um núcleo mutante dentro da população de núcleos, que têm a potencialidade de sintetizar as enzimas necessárias para a utilização do substrato em questão (Galvagno e Forchiassin, 2004).

A degradação da lignina da madeira na natureza é realizada de forma mais eficiente pelos fungos quando comparada com outros micro-organismos, sendo eles então os principais responsáveis pela degradação deste polímero. Os fungos degradam a madeira secretando enzimas celulasas, hemicelulasas e lignases ou ligninolíticas. A madeira é constituída de quatro partes: celulose, hemicelulose, lignina e extrativos. O tipo de degradação resulta em três tipos de podridão: a podridão mole, a podridão marrom e a podridão branca. A podridão branca é a mais eficiente quando se trata de decomposição da madeira, existindo inúmeras espécies de fungos que a fazem, sendo a maioria deles basidiomicetos.

Na degradação da lignina algumas enzimas fenoloxidasas são produzidas, como a lacase, a lignina peroxidase e a manganês peroxidase (Tabela 03).

A degradação microbiana de lignina exerce um papel essencial na ciclagem do carbono e a função dos micro-organismos, que são em sua maioria os fungos, é fundamental para as biotecnologias emergentes tal como a polpagem biomecânica, o branqueamento enzimático de polpas e a degradação de poluentes orgânicos (Whiteley e Lee, 2006; Bajpai et al., 2004; Ramos et al., 2004; Mardones et al., 2006).

Tabela 03 - Enzimas ligninolíticas produzidas por fungos de podridão branca

Enzima	No EC	Reações catalisadas	Fungo
Lacase	1.10.3.2	Oxidação de fenol	<i>Trametes versicolor</i>
Lignina peroxidase	1.11.1.14	Polimerização de fenol	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Manganês peroxidase	1.11.1.13	Oxidação de fenol; Oxida Mn ²⁺ a Mn ³⁺	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Celbiose-quinona oxireductase	1.1.5.1	Redução de quinona; Degradação de celbiose	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Aril álcool oxidase	1.1.3.7	Produção de H ₂ O ₂	<i>Pleurotus saborcaju</i>
Glioxal oxidase	1.2.3.5	Produção de H ₂ O ₂	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Manganês independente de peroxidase	1.11.1.7	Atividade em substratos aromáticos	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
Versátil peroxidase	1.11.1.16	Oxida Mn ²⁺ ; Potencial alto redox em componentes aromáticos	<i>Pleurotus sp.</i>
Celbiose desidrogenase	1.1.99.18	Degradação de lignina; Une o sistema hidrolítico e oxidativo; Dispõe manganês (MnII) para MnP através da redução do precipitado da oxidação do manganês (MnO ₂)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>

Maciel et al., 2010

3.4.1.1. Lignina Peroxidase ou Lignase (LiP)

O mecanismo de secreção de proteínas vem sendo conservado ao longo da evolução, ocorrendo em leveduras e outros eucariontes, assim como em fungos filamentosos. Durante a evolução de fungos degradadores de lignina, LiP pode ter sido formada com função de destoxificação intracelular, promovendo reações de desaminação de produtos de ácidos aminoaromáticos, posteriormente o mecanismo extracelular, com a presença de LiP, possibilitou a degradação da lignina (Rabinovich et al., 1996). LiP foi descoberta em 1984, em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* (Tien e Kirk, 1984). Essas enzimas são os maiores componentes do sistema envolvido na degradação de lignina por este organismo. Desde sua descoberta, LiP tem sido extensamente caracterizada molecular e bioquimicamente (Gold e Alic, 1993; Chivukula et al., 1995; Johjima et al., 1999; Sugiura et al., 2003).

No processo de degradação da lignina, LiP é inicialmente oxidada pelo H_2O_2 e oxida núcleos aromáticos da molécula de lignina (fenólicos e não fenólicos), gerando radicais catiônicos. Estes reagem espontaneamente com nucleófilos (primariamente H_2O) e com oxigênio molecular, gerando uma “combustão enzimática“ onde ligações C-C e C-O são quebradas, despolimerizando a lignina e abrindo os anéis aromáticos. Esta enzima é uma glicoproteína que contém Fe protoporfirínico IX como grupo prostético e é dependente de H_2O_2 para sua atividade (Kirk et al., 1978).

3.4.1.2. Manganês Peroxidase (MnP)

A MnP é uma glicoproteína com Fe protoporfirínico IX como grupo prostético, dependente de H_2O_2 para sua atividade. A oxidação de lignina e outros compostos

xenobióticos por MnP é dependente da disponibilidade de íons de manganês (Brown et al., 2002). Seu ciclo catalítico é semelhante ao de LiP; no entanto, o Mn^{2+} atua como doador de elétrons para gerar o composto II (Hofrichter, 2002).

A atuação de MnP durante a peroxidação lipídica está envolvida na degradação de compostos xenobióticos recalcitrantes. Assim, a avaliação da capacidade de culturas fúngicas para promover a peroxidação lipídica é de grande importância. O estímulo da peroxidação de ácidos graxos insaturados com concomitante produção de radicais lipídicos é reconhecido como atividade pró-oxidante (Kapich et al., 2005).

3.4.1.3. Lacase

Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, lacases fúngicas estão recebendo grande atenção em várias aplicações industriais como deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes, síntese de produtos químicos e medicinais, e remediação de solos e águas contaminadas. Pesquisas recentes têm sido intensas e muito tem sido elucidado sobre a diversidade de lacases e suas utilidades (Schneider et al., 1999; Durán et al., 2002; Mayer e Staples, 2002).

Lacases são proteínas globulares contendo entre 10-25% de carboidrato *N*-ligado e elas podem ter estruturas monoméricas, diméricas ou multiméricas, compreendendo subunidades de 45 à 80 kDa, dependendo da espécie e isoforma. Fungos ligninolíticos freqüentemente expressam múltiplos genes de lacase, codificando isoenzimas com alta similaridade na estrutura primária, mas diferentes características físico-químicas (Brown et al., 2002). Não há dúvidas que as propriedades bioquímicas e físico-químicas de

lacase (atividade, estabilidade, pH e temperatura ótimos, etc.) fornecem muitas informações iniciais importantes para estudos básicos e para a aplicação de lacases na biotecnologia (Mougin et al., 2003, Shleev et al., 2004). Algumas características de lacases como, massa molecular, pH ótimo de atividade e substrato específico são extremamente diversos (Mayer e Staples, 2002).

3.5. Condições físico-químicas e atividade enzimática

3.5.1. Atividade Enzimática e pH

De modo geral, as enzimas fúngicas possuem um pH ótimo. No qual a sua atividade é máxima e valores maiores ou menores que este pH ótimo à produção enzimática é reduzida. Tal fato parece decorrer devido às cadeias laterais de alguns aminoácidos agirem como ácidos ou bases fracas e realizam funções críticas no sítio ativo da enzima. Embora a mudança no estado de ionização dos grupos no sítio ativo seja uma das razões para a variação na atividade, ela não é a única. Outros estudos deverão ser realizados no sentido de elucidar os mecanismos envolvidos na atividade enzimática relacionadas ao pH do meio (Karima, 2008).

3.5.2 Atividade Enzimática e Termoestabilidade

As enzimas ligninolíticas têm sido amplamente utilizadas na indústria, devido ao grande aumento de sua aplicação em diversos processos. As enzimas ligninolíticas têm potencial de uso em biocombustíveis, alimentos, bebidas, cosméticos, indústrias de fabricação de polpa e papel, setor têxtil, biorremediação, entre outros. Esse sistema enzimático também é utilizado em degradação de compostos xenobióticos, tinturas, e

plásticos (Maciel et al., 2010). Desse modo, as indústrias necessitam de cepas fúngicas produtoras de enzimas termoestáveis capazes de resistir ao processo industrial. Para responder a esta exigência, foi consagrado parte deste trabalho a caracterização das enzimas ligninolíticas termoestáveis.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

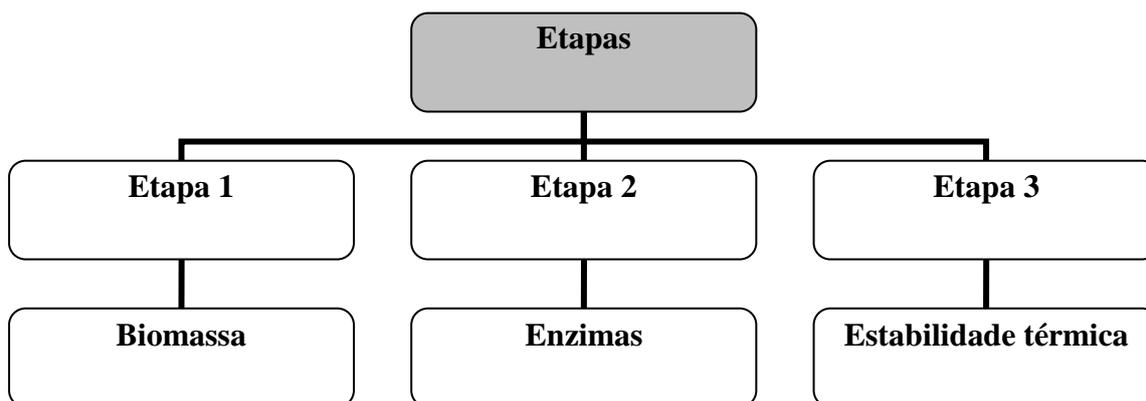


Figura 05 - Etapas do trabalho

O trabalho consistiu em três etapas: produção de biomassa, atividade enzimática e avaliação da estabilidade térmica das enzimas do fungo *H. glabra* (Figura 05).

4.1. Repicagem dos fungos

A cepa do fungo *Hexagonia glabra* (UEA_10201) utilizada foi da micoteca do Laboratório de Biorgânica do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas. A cepa foi mantida a 28 °C em placas de Petri com meio BDA (batata dextrose ágar), e foi repicada em câmara de fluxo laminar para minimizar possível contaminação da cultura e armazenado em estufa incubadora BOD a 28°C por 7 dias, ou até atingir todo o diâmetro da placa (Figura 06).

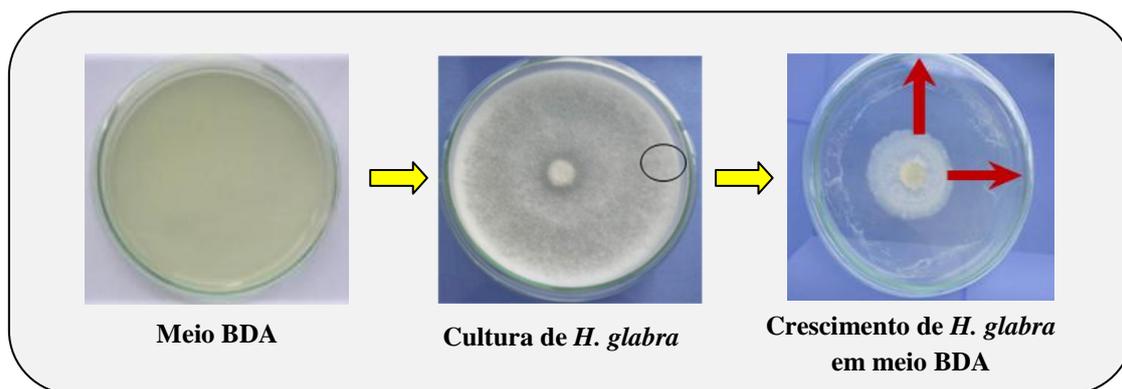


Figura 06 - Crescimento do fungo na placa de Petri

4.2. Meio de cultura líquido

Para a produção de biomassa fúngica foram testados meios de cultura líquidos constituídos de diferentes produtos:

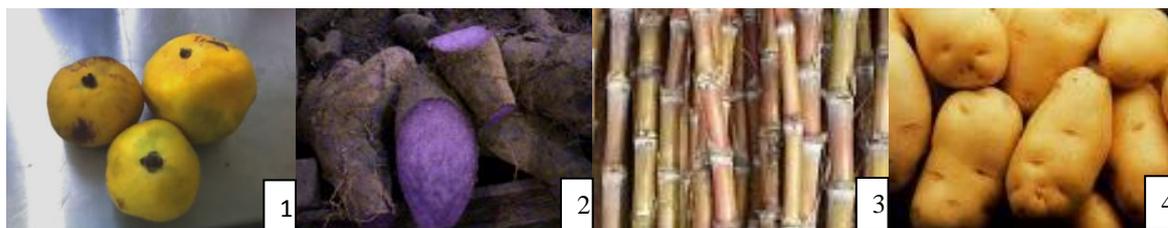


Figura 07 - Matérias-primas dos meios de cultura para *H. glabra*

- Araçá-boi – *Eugenia estipitata*¹
- Cará roxo – *Dioscorea alata*²
- Bagaço de Cana-de-açúcar - *Saccharum spp.*³
- Batata – *Solanum tuberosum*⁴

A batata (*Solanum tuberosum*) foi utilizada como padrão para posterior comparação com os outros meios.

Os meios de cultura líquidos foram obtidos com 200g de matéria-prima, 1000 ml de água destilada e 15 g de glicose e foram colocados em erlenmeyers de 125 ml contendo 100 ml de cada meio. Em seguida, os meios de cultura foram autoclavados durante 15 minutos a 121 °C. Cada meio de cultura foi feito em triplicata.

Os fungos foram inoculados em condições assépticas e o disco de micélio de 10 mm de diâmetro, retirado da região periférica da placa, foi colocado no erlenmeyer contendo o meio de cultura líquido.

Os erlenmeyers com os inóculos do fungo foram mantidos em BOD a 28 °C em condição estacionária por 22 dias. A cada dois dias foi retirado 2 ml de caldo fúngico do meio de cultura líquido para posterior determinação da atividade enzimática em espectrofotômetro de absorbância.

4.4. Variação do pH

Para determinação da influência do pH na produção de enzimas e biomassa fúngica, foram utilizados os meios de cultura líquidos, onde foram variados os pH's com soluções de hidróxido de sódio (NaOH) a 1M e com o ácido clorídrico (HCl) a 1M. O pH foi ajustado para 3, 4, 5, 6 e 7, em cada meio de cultura, sendo realizado em triplicata. Os meios foram autoclavados durante 15 minutos a 121° C.

Os fungos foram inoculados nos erlenmeyers em condições assépticas. Os erlenmeyers foram mantidos em BOD a 28° C por 22 dias, de onde foi retirado caldo fúngico, de dois em dois dias totalizando 11 amostras, para posterior determinação enzimática.

4.7. Avaliação do crescimento micelial

A determinação da biomassa fúngica foi obtida pela filtragem do meio de cultura líquido em papel filtro, com massa previamente estabelecida, e depois a biomassa foi seca em estufa a 50°C até obter peso constante, subtraindo-se a massa do papel, seguindo a fórmula abaixo, sendo obtido o valor da biomassa em porcentagem:

$$\text{MM (\%)} = \frac{\text{Pf} - \text{Pi} \times 100}{\text{Pi}}$$

4.8. Determinação das atividades enzimáticas

Para determinação das atividades das enzimas foi utilizado o aparelho espectrofotômetro de absorvância para leitura das amostras coletadas.

4.8.1. Lignase ou lignina peroxidase (LiP)

Foi utilizada a metodologia de Tien e Kirk (1984), baseada na oxidação do álcool veratrílico. Na atividade de lignina peroxidase foi utilizado 550µl de caldo de cultura filtrado, 200µl de H₂O₂ 2,0 mM e 250µl de solução de álcool veratrílico em tampão tartarato de sódio 0,4 M. O aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorvância a 310nm ($\Sigma=9300\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Uma unidade de lignina peroxidase corresponde à quantidade de enzima que oxida 1µm de álcool veratrílico por minuto.

4.8.2. Lacase

A atividade da enzima lacase foi determinada em um comprimento de onda de 525 nm, específico para reação de oxidação da siringaldazina. A metodologia utilizada

foi segundo Ander e Eriksson (1976). O método consiste na oxidação do substrato enzimático de siringaldazina para sua forma de quinona que apresenta absorção a 525 nm ($\epsilon\Sigma=65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). De acordo com a atividade enzimática, uma unidade ativa de lacase corresponde a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato por minuto. Para a determinação da atividade lacase, utilizou-se 50 μm de caldo de cultivo filtrado, 0,95 ml de substancia tampão de tartarato de sódio em pH 4,5, 1 ml de siringaldazina (solução indutora, estoque, concentração de 5 mg/10 ml de etanol) e 1 ml de água destilada.

4.8.3. Manganês peroxidase (MnP)

A atividade enzimática foi medida pela oxidação do vermelho de fenol acompanhada a 610 nm ($\epsilon=4460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Incubou-se a mistura de reação por 5 min, interrompendo a reação pela adição de 40 μL de NaOH 2M. Uma unidade de manganês peroxidase é definida como a quantidade de enzima que oxida 1,0 μM de vermelho de fenol / litro / minuto.

4.9. Avaliação da estabilidade térmica das enzimas

O estudo da estabilidade térmica foi determinado pela medida da atividade enzimática residual, após incubação do extrato enzimático a diferentes temperaturas (40 °C, 50 °C e 60 °C) por um período de tempo de 30 a 90 minutos.

4.10. Análise estatística

Para análise estatística dos dados coletados foi usado o software Bioestat 5.0 para obter os parâmetros descritivos (média, desvio padrão, variância) e correlação entre as variáveis. Para a inferência sobre a relação entre as variáveis a serem mensuradas foi utilizado o teste ANOVA e para contraste das médias o Teste de Tukey.

5. RESULTADOS

5.1. Produção de Biomassa Fúngica

Nos experimentos realizados com os diferentes meios de cultura houve produção de biomassa para *Hexagonia glabra* (UEA_10201), em todos os pH's testados, no período de vinte e dois dias.

Conforme apresentado na Figura 08, a maior produção de biomassa do fungo *H. glabra* ocorreu no meio de cultura líquido suplementado com cará roxo em pH 6 e a menor produção de biomassa deu-se no meio líquido à base de bagaço de cana-de-açúcar no pH 5.

Observou-se que em todos os meios houve produção de biomassa superior à produção do meio de batata, tido como meio controle, com exceção do meio de bagaço de cana-de-açúcar nos pHs 4, 5 e 7 (Figura 08).

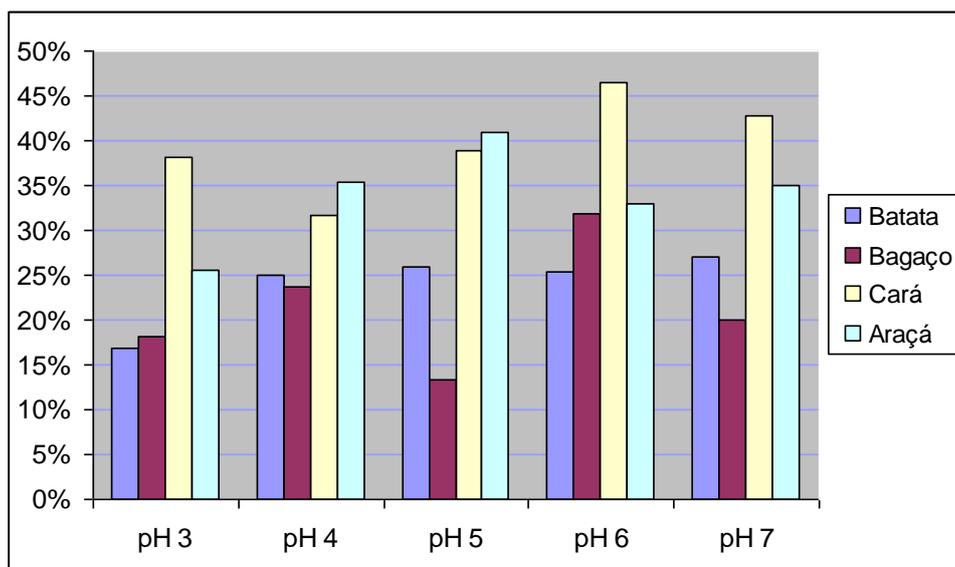


Figura 08 - Produção de Biomassa Fúngica, em 22 dias de crescimento micelial, em cinco pH's diferentes e quatro meios de cultura.

Dentre os meios testados o meio suplementado com cará roxo no pH 6 foi onde se observou a maior produção de biomassa e assim o pH 6 é o pH ótimo para a produção de biomassa para o fungo *H. glabra*, nestas condições realizadas.

De modo geral, para a produção de biomassa do basidiomiceto *H. glabra*, o pH ótimo fica na faixa entre (pH 5 a pH 7) em todos os meios testados. Já quando ocorreu aumento na condição de acidez (pH 3 a pH 4) houve uma redução na produção da biomassa, em todos os meios experimentados, para o *H. glabra* (Tabela 04).

Tabela 04 - Produção de Biomassa Final no período de 22 dias em estado estacionário em pH 3, 4, 5, 6 e 7.

	Produção de Biomassa em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-acúcar	Cará roxo	Araçá boi
Lacase (média U/L)	24,10	21,44	39,59	33,95
Desvio Padrão	4.4385	6.6708	5.5678	5.5045
Variância	19.7	44.5	31	30.3
Coef. Variação %	18.65%	31.77%	14.28%	16.48%

O teste estatístico ANOVA mostrou ao nível de 95% de probabilidade ($p > 0,05$) que houve diferença estatística significativa na produção de biomassa entre os meios cultivados sob condição estacionária nos diferentes pH's (Tabela 05).

Tabela 05 - Análise de variância (ANOVA) da biomassa produzida em diferentes meios de cultura sob condição estacionária em diferentes pH's

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	1050.2	350.067		
				13.3232	0.0006*
Resíduos	12	315.3	26.275		
Total	15				

* Significativo ao nível 95% = 0,05 ($p < 0,05$ significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 06), onde evidenciou-se a diferença estatística para a produção de biomassa entre os meios de BT e CR, entre BG e CR e entre BG e AB, nos diferentes pH's.

Tabela 06 - Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura com pH 3.

	Batata (BT)	Bagaço de cana-de-açúcar (BG)	Cará roxo (CR)	Araçá boi (AB)
BT			** (6.63)	
BG			** (7.85)	** (5.40)
CR				
AB				

** Significativo ao nível 95% = 0,05 ($p < 0,05$ significativo)

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os meios

5.2. Produção Enzimática de Lacase

Nos testes realizados com meios à base de batata, bagaço de cana-de-açúcar, cará roxo e araçá boi em condição estacionária com diferentes pH's ocorreu produção da enzima lacase por *H. glabra*.

5.2.1. Produção enzimática de Lacase em pH 3

Conforme apresentado na Tabela 07, em termos de valores absolutos a maior média de produção de lacase em meios de cultura com pH 3 ocorreu no meio de bagaço de cana-de-açúcar (BG) e a menor produção se deu no meio de Batata (BT) e Cará roxo (CR) igualmente.

De modo geral, os meios de cultura apresentaram percentual médio superior a 1U/L. Observa-se ainda que o meio BG em pH 3 apresentou produção média de lacase superior a 2,5U/L, destacando-se por sua fabricação superior ao dobro dos demais meios de cultura (Tabela 07).

Tabela 07 - Atividade de Lacase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 3

	Meios de cultura com pH 3 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-açúcar	Cará roxo	Araçá boi
Lacase (média U/L)	1,03	2,52	1,03	1,8
Desvio Padrão	0,9	0,98	0,78	1,44
Variância	0,82	0,96	0,61	2,09
Coef. Variação %	88,08%	38,85%	75,93%	80,09%

A análise de variância (ANOVA), mostra que existe diferença estatística significativa entre as médias de produção de lacase em meios de cultura com pH 3 (Tabela 08).

Tabela 08 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase a partir de meios de cultura com pH 3

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	16.6136	5.538		
				5.4228	0.0045*
Resíduos	30	30.636	1.021		
Total	33				

* Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 09), onde mostrou-se a diferença estatística superior entre os meios de BT e BG e entre BG e CR.

Tabela 09 - Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura com pH 3.

	Batata (BT)	Bagaço de cana-de-açúcar (BG)	Cará roxo (CR)	Araçá boi (AB)
BT		** (4.77)		
BG			** (5.07)	
CR				
AB				

** Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os meios

5.2.2. Produção enzimática de Lacase em pH 4

De acordo com a Tabela 10, a maior produção média de lacase em pH 4 se deu com o meio de cultura de Bagaço de cana-de-açúcar, sendo que a menor produção da enzima foi no meio de Cará roxo.

A média da produção enzimática de lacase foi superior a 1U/L para todos os meios, exceto para o meio de Bagaço de cana-de-açúcar que obteve média superior a 2U/L.

Tabela 10 - Atividade de Lacase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 4

	Meios de cultura com pH 4 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-açúcar	Cará roxo	Araçá boi
Lacase (média U/L)	1,82	2,26	1,12	1,5
Desvio Padrão	1.48	0.78	0.78	1.13
Variância	2.21	0.61	0.61	1.29
Coef. Variação %	117.02%	45.52%	108.11%	124.98%

A análise de variância (ANOVA), mostra que não existe diferença estatística significativa entre as médias de produção de lacase em meios de cultura com pH 4 (Tabela 11).

Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase a partir de meios de cultura com pH 4

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamentos	3	6.4318	2.144		
				2.3121	< 0.095*
Resíduos	30	27.818	0.927		
Total	33				

*Não significativo ao nível de 95% de probabilidade ($p > 0,05$)

5.2.3. Produção enzimática de Lacase em pH 5

Conforme a Tabela 12 a atividade média de lacase obtida a partir dos meios de cultura com pH 5 foi maior no meio de Batata, e a menor atividade se deu no meio de

cultura de Cará roxo. Todas as médias de produção de lacase dos meios de cultura foram superiores a 1U/L.

Tabela 12 - Atividade de Lacase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 5

	Meios de cultura com pH 5 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-açúcar	Cará roxo	Araçá boi
Lacase (média U/L)	1,79	1,72	1,32	1,64
Desvio Padrão	1.0090	0.8090	0.8944	1.2505
Variância	1.0182	0.6545	0.8000	1.5636
Coef. Variação %	79.28%	59.33%	89.44%	105.81%

A análise de variância (ANOVA), mostra que não existe diferença estatística significativa entre as médias de produção de lacase em meios de cultura com pH 5 (Tabela 13).

Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase a partir de meios de cultura com pH 5

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	0.7955	0.265	0.2897	< 0.83*
Resíduos	30	27.455	0.915		
Total	33				

*Não significativo ao nível de 95% de probabilidade ($p > 0,05$)

5.2.4. Produção enzimática de Lacase em pH 6

Na Tabela 14 a maior produção média de lacase foi com o meio de cultura de Bagaço de cana-de-açúcar, e a menor média de produção foi no meio de cultura de Batata.

Tabela 14 - Atividade de Lacase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 6

	Meios de cultura com pH 6 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-açúcar	Cará roxo	Araçá boi
Lacase (média U/L)	1.00	2.51	1.71	1.73
Desvio Padrão	0.9487	0.8962	0.8292	1.2463
Variância	0.9001	0.8032	0.6876	1.5532
Coef. Variação %	94.55%	35.67%	48.26%	71.96%

A análise de variância (ANOVA), mostra que há diferença estatística significativa entre as médias de produção de lacase em meios de cultura com pH 6 (Tabela 15).

Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase a partir de meios de cultura com pH 6

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	12.5415	4.181	5.3053	<0.005*
Resíduos	30	23.64	0.788		
Total	33				

* Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 16), onde mostrou a diferença estatística superior entre os meios de BT e BG.

Tabela 16 - Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura com pH 6.

	Batata (BT)	Bagaço de cana-de-açúcar (BG)	Cará roxo (CR)	Araçá boi (AB)
BT		** (5.63)		
BG				
CR				
AB				

** Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)

5.2.5. Produção enzimática de Lacase em pH 7

A produção média de lacase a partir dos meios de cultura com pH 7 foi maior no meio de cultura à base de Bagaço de cana-de-açúcar e a menor foi no meio acrescido de Batata, todos as médias de produção foram superiores a 1U/L, com exceção do meio de Batata que foi inferior a 0,6U/L, sendo portanto a menor média de produção enzimática dentre todos os pH's testados (Tabela 17).

Tabela 17 - Atividade de Lacase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 7

	Meios de cultura com pH 7 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-açúcar	Cará roxo	Araçá boi
Lacase (média U/L)	0,54	1,35	1,34	1,20
Desvio Padrão	0.2414	0.6238	1.1483	0.8574
Variância	0.0583	0.3892	1.3187	0.7351
Coef. Variação %	43.97%	45.93%	85.29%	71.07%

A análise de variância (ANOVA), mostra que há diferença estatística significativa entre as médias de produção de lacase em meios de cultura com pH 7 (Tabela 18).

Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lacase a partir de meios de cultura com pH 7

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	4.8539	1.618	3.9554	0.017*
Resíduos	30	12.272	0.409		
Total	33				

*Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 19), onde mostrou a diferença estatística superior entre os meios de BT e BG.

Tabela 19 - Análise de Tukey para produção de lacase em meios de cultura com pH 7.

	Batata (BT)	Bagaço de cana-de-açúcar (BG)	Cará roxo (CR)	Araçá boi (AB)
BT		** (4.19)	** (4.13)	
BG				
CR				
AB				

** Significativo ao nível 95% = 0,05 ($p < 0,05$ significativo)

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os meios

5.2.6. Produção enzimática de Lacase em meio de Batata

A produção enzimática de Lacase se deu em todos os meios em vinte e dois dias de coleta, apresentando um pico de produção no 18º dia de coleta com o pH 4 com 4,56U/L, já a menor produção da enzima foi no 1º dia de coleta com produção igual de 0,6U/L no pH 5 e no pH 7 (Figura 09).

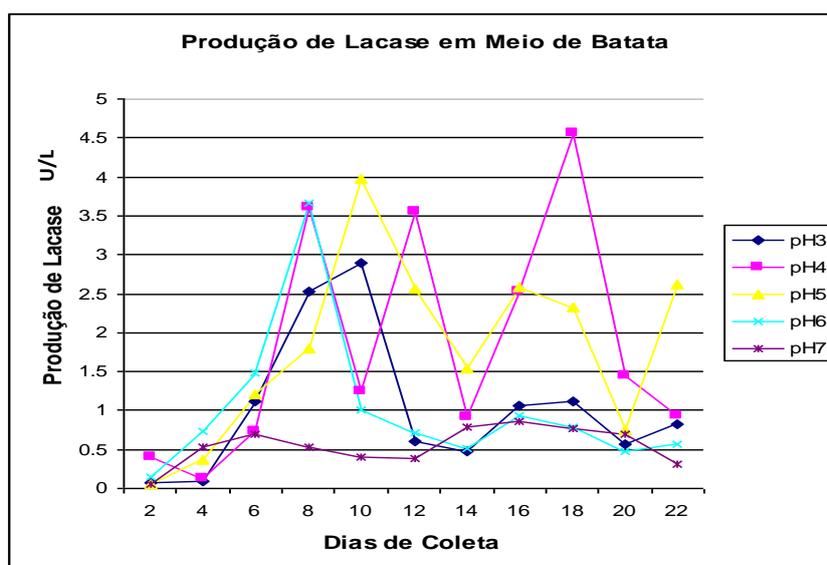


Figura 09 - Produção de Lacase em meio de cultura de Batata

5.2.7. Produção enzimática de Lacase em meio de Bagaço de Cana-de-Açúcar

O pico de produção enzimática de *H. glabra* produzido em meio de cultura de bagaço de cana-de-açúcar foi observado no pH 6 no 22º dia de coleta com 4,26U/L, já a menor produção de lacase foi no meio de cultura com pH 7 no primeiro dia de crescimento com 0,6U/L (Figura 10).

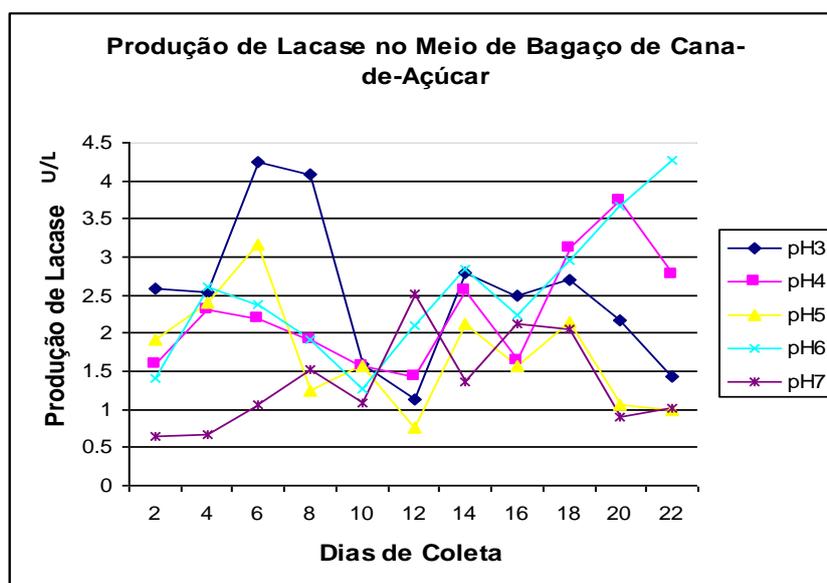


Figura 10 - Produção de Lacase em meio de cultura de Bagaço de Cana-de-açúcar

5.2.8. Produção enzimática de Lacase em meio de Cará roxo

A maior produção de lacase no meio de cultura de cará roxo foi no 18º dia no meio de cultura com pH 5 com 3,5U/L de enzima e no 6º dia de coleta no meio de cultura com pH 3, não foi observada nenhuma produção da enzima (Figura 11).

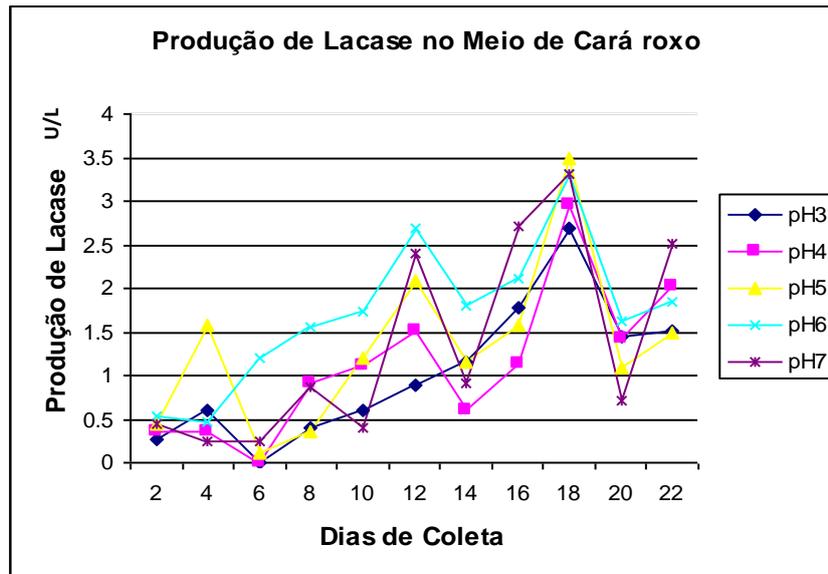


Figura 11 - Produção de Lacase em meio de cultura de cará roxo

5.2.9. Produção enzimática de Lacase em meio de Araçá boi

A produção enzimática de lacase em meio de cultura líquido foi maior no 22º dia de coleta apresentando o resultado de 4,85U/L de lacase, no entanto o menor resultado da coleta foi no 1º dia no meio de cultura com pH 5 com 0,12U/L enzima (Figura 12).

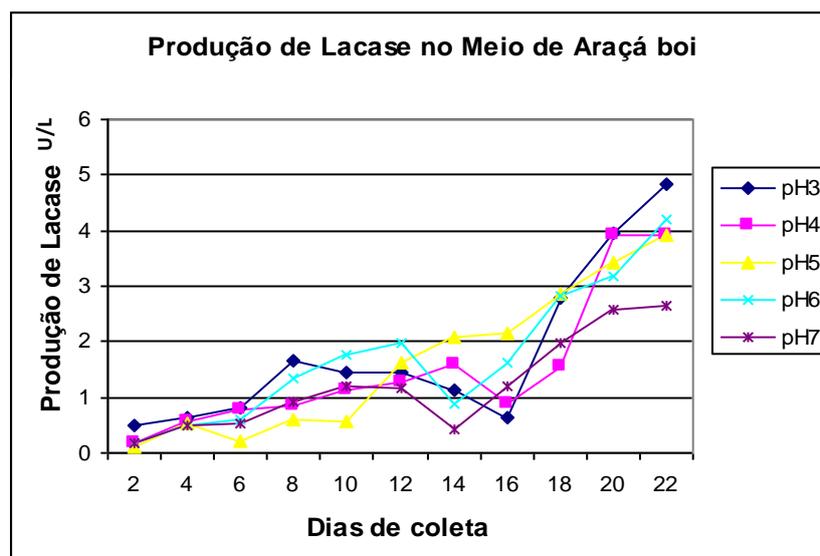


Figura 12 - Produção de Lacase em meio de cultura de Araçá boi

5.3. Produção Enzimática de Lignina Peroxidase

A atividade enzimática para Lignina Peroxidase (LiP) foi determinada nos quatro diferentes meios de cultura e em cinco pH's, sendo observada a sua diferença de acordo com as variantes testadas.

5.3.1. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em pH 3

A média da atividade da enzima Lignina Peroxidase foi maior para o meio de cultura de bagaço de cana-de-açúcar com o pH ajustado para 3, e a menor produção de LiP foi no meio de cará roxo, sendo quase dez vezes menor do que o maior resultado.

Tabela 20 - Atividade de Lignina Peroxidase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 3

	Meios de cultura com pH 3 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-açúcar	Cará roxo	Araçá boi
Lignina Peroxidase (média U/L)	2,04	22,03	2,02	6,09
Desvio Padrão	0.7876	5.5223	0.5152	1.3373
Variância	0.6203	30.4956	0.2655	1.7884
Coef. Variação %	38.61%	25.06%	25.51%	21.96%

A análise de variância (ANOVA), mostra que há diferença estatística significativa entre as médias de produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 3 (Tabela 21).

Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lignina peroxidase a partir de meios de cultura com pH 3

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	2990.511	996.837		
				126.3636	< 0.0001*
Resíduos	30	236.659	7.889		
Total	33				

* **Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)**

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 22), onde mostrou-se a diferença estatística entre os meios.

Tabela 22 - Análise de Tukey para produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 3.

	Batata (BT)	Bagaço de cana-de-açúcar (BG)	Cará roxo (CR)	Araçá boi (AB)
BT		** (23,6)		** (4,78)
BG			** (23,63)	** (18,82)
CR				** (4,8)
AB				

** **Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)**

5.3.2. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em pH 4

A média da produção da enzima lignina peroxidase em pH 4 foi novamente maior no meio de cultura de bagaço de cana-de-açúcar e menor no meio de cará roxo. A produção de LiP em BG foi de 20,51U/L e em CR foi de 2,46U/L (Tabela 23).

Tabela 23 - Atividade de Lignina Peroxidase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 4

	Meios de cultura com pH 4 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-acúcar	Cará roxo	Araçá boi
Lignina Peroxidase (média U/L)	3,68	20,51	2,46	6,95
Desvio Padrão	1.0546	3.9575	0.689	1.1566
Variância	1.1122	15.6617	0.4747	1.3378
Coef. Variação %	28.62%	19.29%	27.90%	16.63%

A análise de variância (ANOVA), mostra que há diferença estatística significativa entre as médias de produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 4 (Tabela 24).

Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lignina peroxidase a partir de meios de cultura com pH 4

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	2267.797	755.932	170.4616	< 0.0001*
Resíduos	30	133.039	4.435		
Total	33				

* Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 25), onde mostrou-se a diferença estatística entre os meios.

Tabela 25 - Análise de Tukey para produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 4.

	Batata (BT)	Bagaço de cana-de-açúcar (BG)	Cará roxo (CR)	Araçá boi (AB)
BT		** (26,49)		** (5,15)
BG			** (28,41)	** (21,34)
CR				** (7,06)
AB				

** Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os meios

5.3.3. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em pH 5

A produção de enzima se deu em todos os meios testados em pH 5, e de acordo com a Tabela 26, a maior produção média de LiP foi no meio de bagaço de cana-de-açúcar, e a menor produção se deu no meio de cultura de cará roxo.

Tabela 26 - Atividade de Lignina Peroxidase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 5

	Meios de cultura com pH 5 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-açúcar	Cará roxo	Araçá boi
Lignina Peroxidase (média U/L)	4,83	19,48	2,37	8,11
Desvio Padrão	1.0789	5.3457	0.7321	1.2873
Variância	1.164	28.5768	0.5359	1.6572
Coef. Variação %	22.30%	27.44%	30.89%	15.87%

A análise de variância (ANOVA), mostra que há diferença estatística significativa entre as médias de produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 5 (Tabela 27).

Tabela 27 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lignina peroxidase a partir de meios de cultura com pH 5

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	1887.834	629.278		
				75.0675	<0.0001*
Resíduos	30	251.485	8.383		
Total	33				

* **Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)**

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 28), onde mostrou-se a diferença estatística entre os meios.

Tabela 28 - Análise de Tukey para produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 5.

	Batata (BT)	Bagaço de cana-de-açúcar (BG)	Cará roxo (CR)	Araçá boi (AB)
BT		** (16,77)		
BG			** (19,06)	** (13,02)
CR				** (6,57)
AB				

** **Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)**

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os meios

5.3.4. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em pH 6

A média de produção de LiP em pH 6 durante 22 dias foi maior em bagaço de cana-de-açúcar com 21,07U/L e menor em cará roxo com 3U/L de enzima (Tabela 29).

Tabela 29 - Atividade de Lignina Peroxidase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 6

	Meios de cultura com pH 6 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-acúcar	Cará roxo	Araçá boi
Lignina Peroxidase (média U/L)	5,06	21,07	3	8,93
Desvio Padrão	1.497	4.5025	0.6655	1.2037
Variância	2.2409	20.2725	0.4429	1.449
Coef. Variação %	29.56%	21.36%	22.18%	13.48%

A análise de variância (ANOVA), mostra que há diferença estatística significativa entre as médias de produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 6 (Tabela 30).

Tabela 30 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lignina peroxidase a partir de meios de cultura com pH 6

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	2158.453	719.484	118.7892	<0.0001*
Resíduos	30	181.704	6.057		
Total	33				

* Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 31), onde mostrou-se a diferença estatística entre os meios.

Tabela 31 - Análise de Tukey para produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 6.

	Batata (BT)	Bagaço de cana-de-açúcar (BG)	Cará roxo (CR)	Araçá boi (AB)
BT		** (21,57)		** (5,21)
BG			** (24,35)	** (16,36)
CR				** (7,99)
AB				

** Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)

5.3.5. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em pH 7

De acordo com a Tabela 32, a melhor produção de LiP em pH 7 se deu no meio de bagaço de cana-de-açúcar e baixa no meio de cará roxo.

Tabela 32 - Atividade de Lignina Peroxidase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 7

	Meios de cultura com pH 7 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-açúcar	Cará roxo	Araçá boi
Lignina Peroxidase (média U/L)	6,01	19,3	2,76	8,92
Desvio Padrão	2.1627	6.9554	1.0731	0.8993
Variância	4.6773	48.377	1.1515	0.8088
Coef. Variação %	35.99%	36.03%	38.84%	10.08%

A análise de variância (ANOVA), mostra que há diferença estatística significativa entre as médias de produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 7 (Tabela 33).

Tabela 33 - Análise de variância (ANOVA) da produção de lignina peroxidase a partir de meios de cultura com pH 7

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	1691.623	563.874		
				38.2249	<0.0001*
Resíduos	30	442.545	14.751		
Total	33				

* **Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)**

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 34), onde mostrou-se a diferença estatística entre os meios de cultura com pH 7.

Tabela 34 - Análise de Tukey para produção de lignina peroxidase em meios de cultura com pH 7.

	Batata (BT)	Bagaço de cana-de-açúcar (BG)	Cará roxo (CR)	Araçá boi (AB)
BT		** (11,48)		
BG			** (14,28)	** (8,96)
CR				** (5,31)
AB				

** **Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)**

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os meios

5.3.6. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em meio de Batata

No meio de cultura de Batata a maior produção de LiP foi no 14° dia de coleta no meio que continha o pH 7 com 9,37 U/L de enzima (Figura 13).

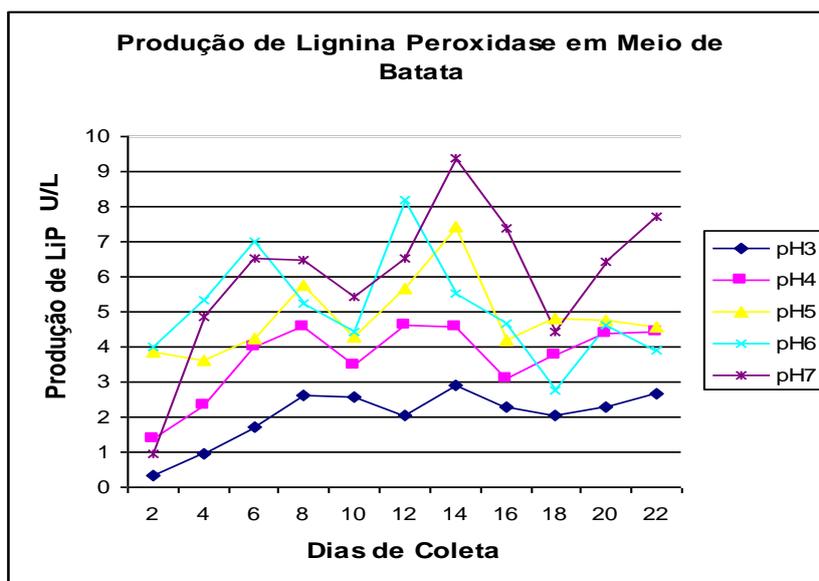


Figura 13 - Produção de Lignina Peroxidase em meio de cultura de batata

5.3.7. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em meio de Bagaço de Cana-de-açúcar

A melhor produção de LiP foi no 6º dia no meio com bagaço de cana com pH 7 e a menor produção de enzima também foi no pH 7, mas no 14º dia de coleta (Figura 14).

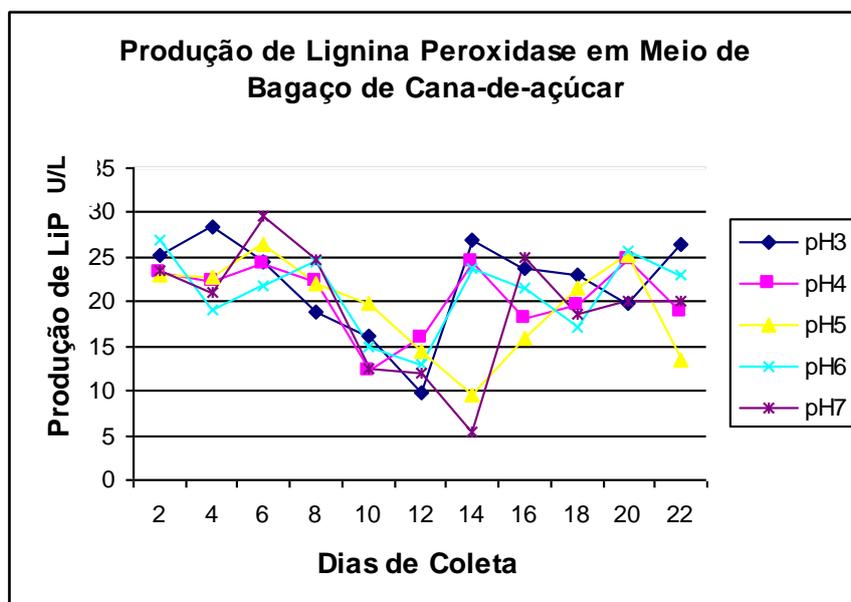


Figura 14 - Produção de Lignina Peroxidase em meio de cultura de bagaço de cana-de-açúcar

5.3.8. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em meio de Cará Roxo

A maior produção da enzima LiP cultivada em meio líquido de cará roxo se deu no pH 7 no 10º dia de coleta, e a menor produção enzimática foi no pH 3 no 2º dia de coleta e no pH 4 no 18º dia de coleta, com valor igual de 1,01U/L (Figura 15).

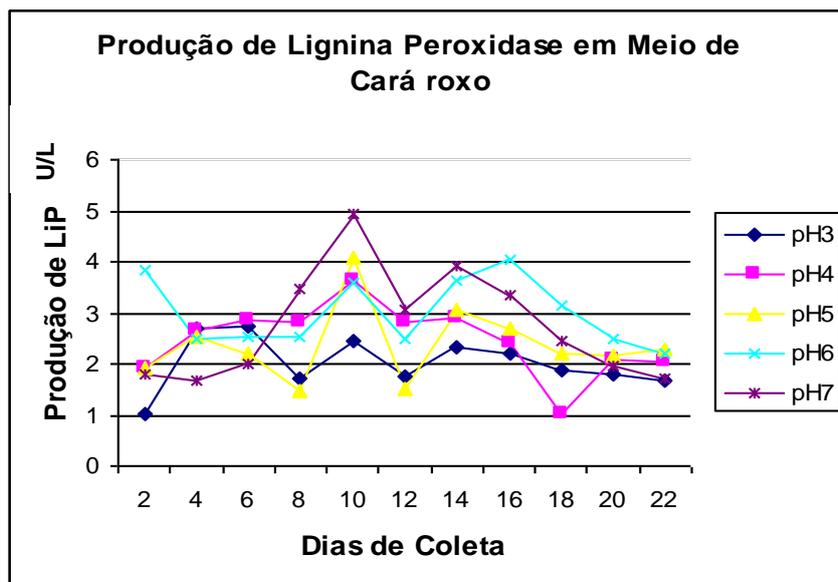


Figura 15 - Produção de Lignina Peroxidase em meio de cultura de cará roxo

5.3.9. Produção enzimática de Lignina Peroxidase em meio de Araçá boi

A maior produção de lignina peroxidase foi no meio líquido que continha o pH 6 no 6º dia de coleta com 11,82 U/L de LiP, enquanto seu menor valor enzimático se deu no meio com pH 3 no 10º dia de coleta com 3,95U/L (Figura 16).

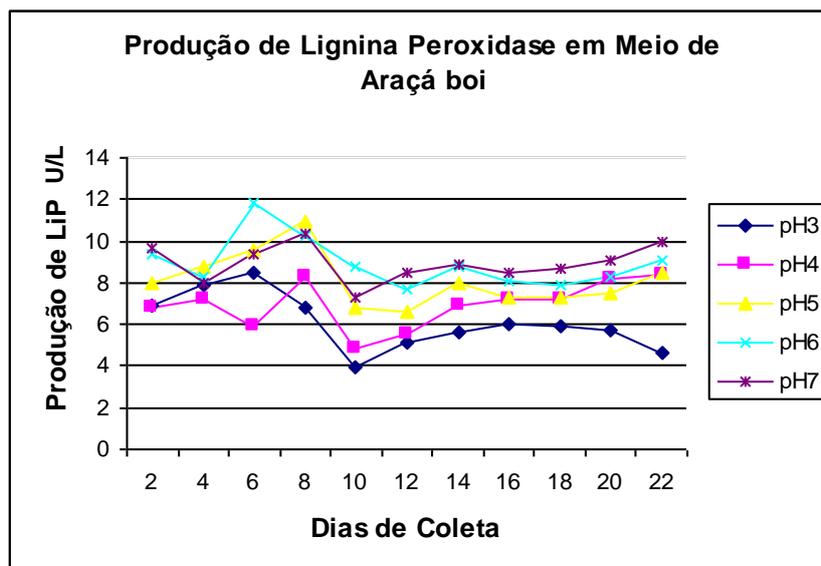


Figura 16 - Produção de Lignina Peroxidase em meio de cultura de araçá boi

5.4. Produção enzimática de Manganês Peroxidase

A enzima Manganês Peroxidase foi observada em todos os meios de cultura testados, bem como em todos os pH's, verificou-se que os valores médios na produção desta enzima foi menor quando comparado com as duas enzimas anteriores.

5.4.1. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em pH 3

O meio de cultura de bagaço de cana-de-açúcar se destacou na secreção da enzima MnP com 13,45U/L, e o meio de batata foi o que apresentou menor quantidade de enzima com 0,23U/L (Tabela 35).

Tabela 35 - Atividade de Manganês Peroxidase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 3

	Meios de cultura com pH 3 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-acúcar	Cará roxo	Araçá boi
Manganês Peroxidase (médiaU/L)	0,23	13,45	0,97	1,82
Desvio Padrão	0.2444	5.6095	0.603	1.5521
Variância	0.0597	31.4668	0.3636	2.4092
Coef. Variação %	103.39%	41.68%	62.17%	84.90%

A análise de variância (ANOVA), mostra que há diferença estatística significativa entre as médias de produção de manganês peroxidase em meios de cultura com pH 3 (Tabela 36).

Tabela 36 - Análise de variância (ANOVA) da produção de manganês peroxidase a partir de meios de cultura com pH 3

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	1292.238	430.746	47.7395	<0.0001*
Resíduos	30	270.685	9.023		
Total	33				

* Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 37), onde mostrou-se a diferença estatística entre os meios de cultura com pH 3.

Tabela 37 - Análise de Tukey para produção de manganês peroxidase em meios de cultura com pH 3.

	Batata (BT)	Bagaço de cana-de-açúcar (BG)	Cará roxo (CR)	Araçá boi (AB)
BT		** (14,59)		
BG			** (13,78)	** (12,84)
CR				
AB				

** Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os meios

5.4.2. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em pH 4

O meio de cultura de bagaço de cana-de-açúcar foi o que mais produziu a enzima manganês peroxidase, e o que menos produziu foi o meio de cultura líquido de batata, ambos contendo o pH 4 (Tabela 38).

Tabela 38 - Atividade de Manganês Peroxidase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 4

	Meios de cultura com pH 4 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-açúcar	Cará roxo	Araçá boi
Manganês Peroxidase (média U/L)	0,31	11,16	1,44	1,25
Desvio Padrão	0.3751	5.0277	0.5805	1.2676
Variância	0.1407	25.2781	0.3369	1.6068
Coef. Variação %	119.2%	45.03%	40.26%	100.97%

A análise de variância (ANOVA), mostra que há diferença estatística significativa entre as médias de produção de manganês peroxidase em meios de cultura com pH 4 (Tabela 39).

Tabela 39 - Análise de variância (ANOVA) da produção de manganês peroxidase a partir de meios de cultura com pH 4

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	859.7457	286.582		
				41.3031	<0.0001*
Resíduos	30	208.155	6.939		
Total	33				

* **Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)**

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 40), onde observou-se a diferença estatística entre os meios de cultura com pH 4.

Tabela 40 - Análise de Tukey para produção de manganês peroxidase em meios de cultura com pH 4.

	Batata (BT)	Bagaço de cana-de-açúcar (BG)	Cará roxo (CR)	Araçá boi (AB)
BT		** (13,66)		
BG			** (12,24)	** (12,47)
CR				
AB				

** **Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)**

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os meios

5.4.3. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em pH 5

Na secreção da enzima MnP com os meios de cultura ajustados para o pH 5, a melhor produção da enzima foi no meio de bagaço de cana-de-açúcar, e a menor foi no meio de batata (Tabela 41).

Tabela 41 - Atividade de Manganês Peroxidase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 5

	Meios de cultura com pH 5 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-açúcar	Cará roxo	Araçá boi
Manganês Peroxidase (média U/L)	0,9	8,85	1,48	1,72
Desvio Padrão	1.0786	1.6306	1.329	1.4739
Variância	1.1633	2.659	1.7662	2.1725
Coef. Variação %	119.3%	18.41%	89.47%	85.29%

A análise de variância (ANOVA), mostra que há diferença estatística significativa entre as médias de produção de manganês peroxidase em meios de cultura com pH 5 (Tabela 42).

Tabela 42 - Análise de variância (ANOVA) da produção de manganês peroxidase a partir de meios de cultura com pH 5

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	466.0272	155.342	109.1872	<0.0001*
Resíduos	30	42.681	1.423		
Total	33				

* Significativo ao nível 95% = 0,05 (p<0,05 significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 43), onde mostrou-se a diferença estatística entre os meios de cultura com pH 5.

Tabela 43 - Análise de Tukey para produção de manganês peroxidase em meios de cultura com pH 5.

	Batata (BT)	Bagaço de cana-de-açúcar (BG)	Cará roxo (CR)	Araçá boi (AB)
BT		** (22,11)		
BG			** (20,49)	** (19,82)
CR				
AB				

** Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)

5.4.4. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em pH 6

No período de 22 dias a produção de manganês peroxidase nos meios com pH 6, foi maior no meio bagaço de cana, e menor no meio batata (Tabela 44).

Tabela 44 - Atividade de Manganês Peroxidase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 6

	Meios de cultura com pH 6 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-acúcar	Cará roxo	Araçá boi
Manganês Peroxidase (média U/L)	0,94	7,91	1,34	2,01
Desvio Padrão	1.215	3.3554	0.9246	1.6034
Variância	1.4763	11.2587	0.8549	2.5709
Coef. Variação %	128.1%	42.41%	68.95%	79.56%

A análise de variância (ANOVA), mostra que há diferença estatística significativa entre as médias de produção de manganês peroxidase em meios de cultura com pH 6 (Tabela 45).

Tabela 45 - Análise de variância (ANOVA) da produção de manganês peroxidase a partir de meios de cultura com pH 6

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	352.4102	117.47	30.5747	<0.0001*
Resíduos	30	115.262	3.842		
Total	33				

* Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)

No teste de Tukey foi realizada a comparação pareada das médias (Tabela 46), onde foi vista a diferença estatística entre os meios de cultura com pH 6.

Tabela 46 - Análise de Tukey para produção de manganês peroxidase em meios de cultura com pH 6.

	Batata (BT)	Bagaço de cana-de-açúcar (BG)	Cará roxo (CR)	Araçá boi (AB)
BT		** (11,78)		
BG			** (11,11)	** (9,97)
CR				
AB				

** Significativo ao nível 99% = 0,05 (p<0,05 significativo)

Valores entre parênteses correspondem a diferença entre os meios

5.4.5. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em pH 7

No pH 7 a produção de manganês peroxidase por *H. glabra* foi elevada em meio de cultura líquido de bagaço de cana, e reduzida em meio líquido de batata (Tabela 47).

Tabela 47 - Atividade de Manganês Peroxidase produzida por *H. glabra* durante 22 dias de crescimento em quatro meios de cultura em pH 7

	Meios de cultura com pH 7 cultivados em estado estacionário			
	Batata	Bagaço de cana-de-açúcar	Cará roxo	Araçá boi
Manganês Peroxidase (média U/L)	0,51	7,99	1,88	2,07
Desvio Padrão	0.6574	16.6398	1.2765	1.5113
Variância	0.4322	276.8843	1.6295	2.2842
Coef. Variação %	127.3%	208.05%	67.80%	72.95%

A análise de variância (ANOVA), mostra que há diferença estatística significativa entre as médias de produção de manganês peroxidase em meios de cultura com pH 7 (Tabela 48).

Tabela 48 - Análise de variância (ANOVA) da produção de manganês peroxidase a partir de meios de cultura com pH 7

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	p
Tratamentos	3	365.2559	121.752		
				1.7112	<0.1847*
Resíduos	30	2134.511	71.15		
Total	33				

*Não significativo ao nível de 95% de probabilidade ($p > 0,05$)

5.4.6. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em meio de Batata

A maior produção de manganês peroxidase se deu no 4º dia no meio de batata que continha o pH 6, mas no 12º dia todos os meios em todos os pH's não secretaram a enzima, voltando a ser produzida apenas no 20º dia, com exceção dos meio com pH 3 e pH 4, que voltaram à atividade enzimática somente no 22º dia (Figura 17).

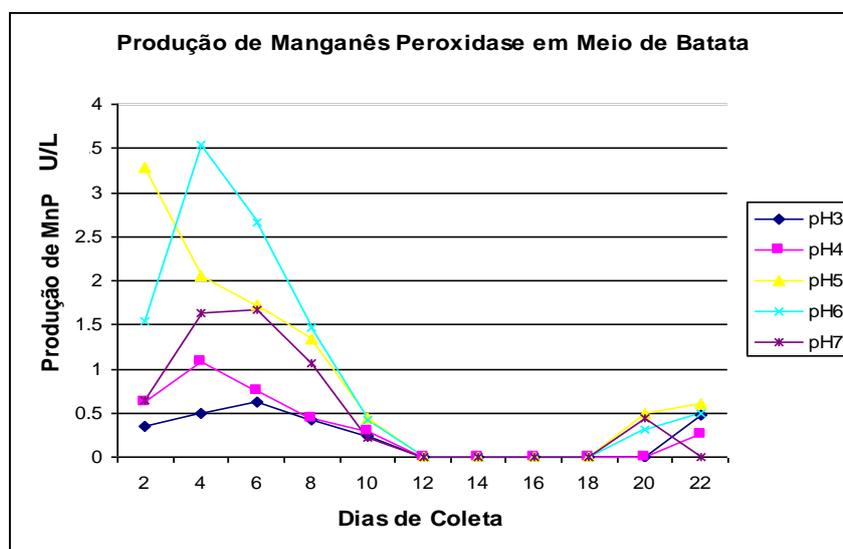


Figura 17 - Produção de Manganês Peroxidase em meio de cultura de batata

5.4.7. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em meio de Bagaço de cana-de-açúcar

O pico de produção de MnP foi no 10º dia com o meio que continha o pH 7, apresentando 58,07U/L de manganês peroxidase, seguido pelo pH 4 com 23,76 U/L, o pH 7 foi o meio que apresentou a menor produção no 6º dia com 1,47U/L de MnP (Figura 18).

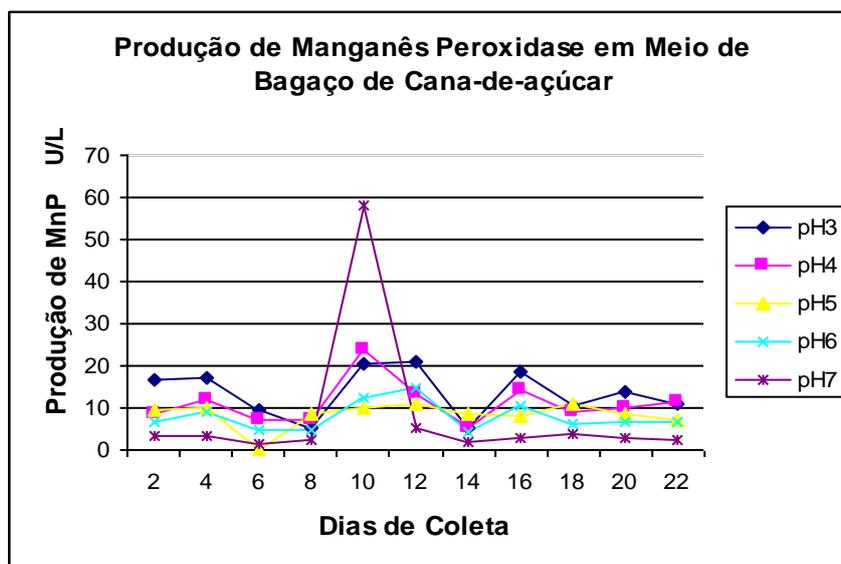


Figura 18 - Produção de Manganês Peroxidase em meio de cultura de bagaço de cana-de-açúcar

5.4.8. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em meio de Cará roxo

No período de 22 dias os dois pH's que se destacaram na secreção de MnP foi o 5 e o 7, no 2º e no 8º dia respectivamente com 5,17U/L de produção, e no 16º dia o meio líquido de cará roxo com pH 3 não apresentou a enzima (Figura 19).

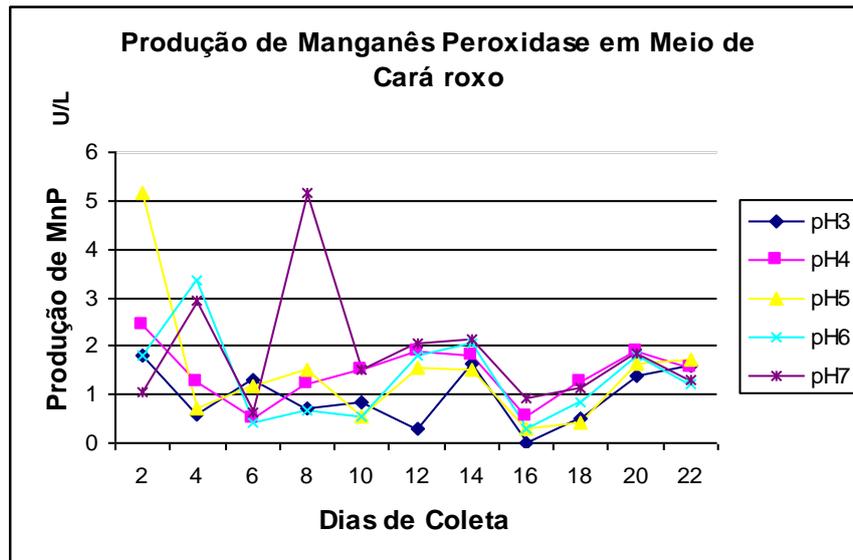


Figura 19 - Produção de Manganês Peroxidase em meio de cultura de cará roxo

5.4.9. Produção enzimática de Manganês Peroxidase em meio de Araçá boi

A produção de MnP foi maior no meio com pH 3 com 5,11U/L no 14° dia, e entre o 16° e o 18° dia o meio líquido com pH 4 não apresentou produção enzimática (Figura 20).

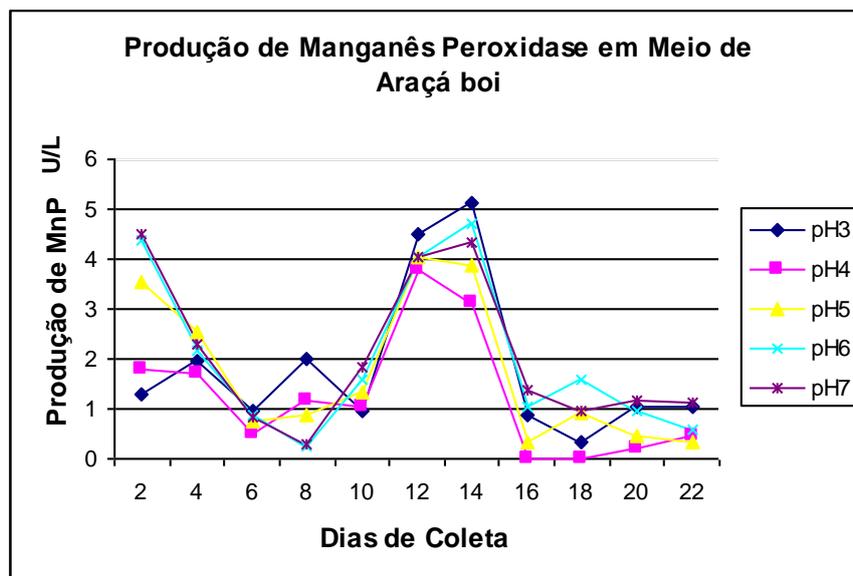


Figura 20 - Produção de Manganês Peroxidase em meio de cultura de araçá boi

5.5. Estabilidade térmica das enzimas ligninolíticas

A termoestabilidade das enzimas foi testada nas temperaturas 40, 50 e 60 °C, com três tempos de exposição para cada uma das temperaturas, sendo elas: 30, 60 e 90 minutos, e dentre estas variáveis o pH também foi testado nos valores: 3, 4, 5, 6 e 7.

5.5.1. Estabilidade térmica no meio de batata

5.5.1.1. Estabilidade térmica de Lacase

Tabela 49 - Estabilidade térmica da enzima Lacase no meio de cultura líquido de Batata

Temperatura (°C)	Tempo de Exposição min	pH	Produção enzimática U/L
40	30	3	1.7
	30	4	3.46
	30	5	2.09
	30	6	0.73
	30	7	0.35
	30	3	2.63
50	30	4	3.35
	30	5	1.19
	30	6	1
	30	7	0.31
	30	3	1.11
	30	4	1.15
60	30	5	1.89
	30	6	0.9
	30	7	0.19
	60	3	2.55
	60	4	4.13
	60	5	2.63
40	60	6	1.07
	60	7	0.22
	60	3	2.18
	60	4	3.08
	60	5	2.5
	60	6	0.81
50	60	7	0.29
	60	3	1.98
	60	4	1.06
	60	5	1.16
	60	6	0.99
	60	7	0.29
40	90	3	3.28
	90	4	2.8
	90	5	1.68
	90	6	0.93
	90	7	0.12
	90	3	1.25
50	90	4	1.71
	90	5	1.36
	90	6	0.78
	90	7	0.17
	90	3	2.71
	90	4	1.2
60	90	5	1.64
	90	6	1.59
	90	7	0.18

A atividade da lacase de *H. glabra* foi mantida mesmo na temperatura de 60°C pelo período de 90 minutos, mostrando-se termoestável nestas condições. A produção da

lacase no meio suplementado com batata, em todas as temperaturas testadas foi melhor em geral em meio ácido (faixa de pH 3 a pH 4) (Tabela 49).

5.5.1.2. Estabilidade térmica de Lignina Peroxidase

Tabela 50 - Estabilidade térmica da enzima Lignina peroxidase no meio de cultura líquido de Batata

Temperatura (°C)	Tempo de Exposição min	pH	Produção enzimática U/L
40	30	3	2.61
	30	4	3.22
	30	5	4.01
	30	6	3.36
	30	7	6.69
50	30	3	2.59
	30	4	2.75
	30	5	4.13
	30	6	3.39
	30	7	7.21
60	30	3	2.49
	30	4	2.56
	30	5	2.81
	30	6	2.34
	30	7	4.68
40	60	3	2.96
	60	4	3.16
	60	5	3.73
	60	6	3.31
	60	7	7.36
50	60	3	2.83
	60	4	2.95
	60	5	3.3
	60	6	2.79
	60	7	5.72
60	60	3	1.98
	60	4	2.89
	60	5	1.69
	60	6	1.6
	60	7	6.17
40	90	3	1.89
	90	4	4.44
	90	5	6.2
	90	6	4.12
	90	7	8.01
50	90	3	3.04
	90	4	2.36
	90	5	3.67
	90	6	3.82
	90	7	7.43
60	90	3	2.2
	90	4	2.52
	90	5	2.77
	90	6	2.65
	90	7	5.77

A enzima Lignina Peroxidase (LiP) produzida pelo fungo *H. glabra* foi capaz de manter sua atividade mesmo na temperatura de 60 °C no período de 90 minutos, no meio suplementado com batata. Ao contrário da lacase, a melhor produção da lignina peroxidase ocorreu no pH neutro (pH 7), em todas as temperaturas e períodos testados, no meio de batata para *H. glabra*. Comparando a produção enzimática da lacase e lignina peroxidase no meio suplementado com batata para o basidiomiceto *H. glabra*, verificou-se que houve maior produção de lignina peroxidase do que lacase nas condições testadas, em todos os experimentos realizados neste meio de cultivo (Tabela 50).

5.5.1.3. Estabilidade térmica de Manganês Peroxidase

Tabela 51 - Estabilidade térmica da enzima Manganês peroxidase no meio de cultura líquido de Batata

Temperatura (°C)	Tempo de Exposição min	pH	Produção enzimática U/L	
40	30	3	0	
	30	4	0	
	30	5	0	
	30	6	0	
	30	7	0	
	30	3	0	
	30	4	0	
50	30	5	0	
	30	6	0	
	30	7	0	
	30	3	0	
	30	4	0	
	30	5	0	
	30	6	0	
60	30	7	0	
	60	3	0	
	60	4	0.31	
	60	5	0.38	
	60	6	0.67	
	60	7	0.58	
	60	3	0	
50	60	4	0	
	60	5	0	
	60	6	0	
	60	7	0	
	60	3	0	
	60	4	0	
	60	5	0	
60	60	6	0	
	60	7	0	
	90	3	0.4	
	40	90	4	0.42
		90	5	0.47
		90	6	0.6
		90	7	0.31
90		3	0	
90		4	0	
90		5	0	
50	90	6	0	
	90	7	0	
	90	3	0	
	60	90	4	0
		90	5	0
		90	6	0
		90	7	0

A enzima manganês peroxidase não teve atividade em todos os experimentos realizados de termoestabilidade do fungo *H. glabra* no meio suplementado com batata.

Para o basidiomiceto *Hexagonia glabra*, no meio suplementado com batata, nos

diferentes pH's e temperaturas e períodos testados, a enzima que mais foi produzida foi a lignina peroxidase em relação as demais secretadas por este micro-organismo (Tabela 51).

5.5.2. Estabilidade térmica no meio de bagaço de cana-de-açúcar

5.5.2.1. Estabilidade térmica de Lacase

Tabela 52 - Estabilidade térmica da enzima Lacase no meio de cultura líquido de Bagaço de cana-de-açúcar

Temperatura (°C)	Tempo de Exposição min	pH	Produção enzimática U/L
40	30	3	1.91
	30	4	1.92
	30	5	1.03
	30	6	2.51
	30	7	0.74
	30	3	2.37
	30	4	2.47
50	30	5	0.93
	30	6	3.06
	30	7	0.97
	30	3	1.8
	30	4	1.74
	30	5	2.78
	30	6	2.95
60	30	7	2.26
	60	3	2.25
	60	4	2.52
	60	5	1.15
	60	6	4.19
	60	7	1.07
	60	3	2.2
50	60	4	2.12
	60	5	3.51
	60	6	3.49
	60	7	1.89
	60	3	2.5
	60	4	2.02
	60	5	3.9
60	60	6	2.67
	60	7	3.92
	90	3	1.72
	90	4	1.67
	90	5	3.12
	90	6	3.95
	90	7	1.7
50	90	3	2.34
	90	4	2.5
	90	5	0.95
	90	6	3.2
	90	7	1.29
	90	3	2.47
	90	4	2.03
60	90	5	3.47
	90	6	2.06
	90	7	3.64

A atividade da lacase foi mantida em todos os experimentos de termoestabilidade no meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar do fungo *H. glabra*. No meio

suplementado com batata, a lacase foi secretada numa faixa mais ácida (pH 3 a pH 4). Já para o meio suplementado com bagaço de cana na faixa de (pH 6 a pH 7) foi secretada a lacase pelo *H. glabra*. Já em relação a secreção da lacase, nos dois meios (batata e bagaço de cana-de-açúcar) ocorreu produção similar desta enzima, em todas as condições testadas para *H. glabra* (Tabela 52).

5.5.2.2. Estabilidade térmica de Lignina Peroxidase

Tabela 53 - Estabilidade térmica da enzima Lignina peroxidase no meio de cultura líquido de Bagaço de cana-de-açúcar

Temperatura (°C)	Tempo de Exposição min	pH	Produção enzimática U/L	
40	30	3	14.62	
	30	4	19.75	
	30	5	17.36	
	30	6	9.15	
	30	7	24.88	
	30	3	31.18	
	30	4	23.65	
50	30	5	19.35	
	30	6	24.73	
	30	7	20.43	
	30	3	15.8	
	30	4	17.15	
	30	5	29.03	
	30	6	20.43	
60	30	7	17.2	
	60	3	19.81	
	60	4	17.43	
	60	5	24.94	
	60	6	15.21	
	60	7	12.62	
	60	3	19.35	
50	60	4	16.12	
	60	5	18.27	
	60	6	15.8	
	60	7	22.58	
	60	3	16.03	
	60	4	22.5	
	60	5	14.98	
60	60	6	17.37	
	60	7	19.24	
	90	3	20.18	
	40	90	4	15.6
		90	5	18.38
		90	6	14.55
		90	7	10.75
90		3	14.61	
90		4	16.5	
90		5	11.77	
50	90	6	15.46	
	90	7	22.97	
	90	3	15.44	
	90	4	16.45	
	60	90	5	21.64
		90	6	12.55
		90	7	18.4

O perfil da termoestabilidade da lignina peroxidase de *H. glabra* foi similar no meio suplementado com batata e no meio suplementado com bagaço de cana. Verificou-se que a lignina peroxidase foi capaz de manter atividade em todas as temperaturas e

períodos testados. Já em relação a quantidade de secreção da enzima lignina peroxidase de *H. glabra*, o meio suplementado com bagaço de cana foi onde ocorreu uma maior produção desta enzima em comparação a do meio suplementado com a batata para este micro-organismo (Tabela 53).

5.5.2.3. Estabilidade térmica de Manganês Peroxidase

Tabela 54 - Estabilidade térmica da enzima Manganês peroxidase no meio de cultura líquido de Bagaço de cana-de-açúcar

Temperatura (°C)	Tempo de Exposição min	pH	Produção enzimática U/L
40	30	3	13.27
	30	4	7.6
	30	5	11.92
	30	6	10.85
	30	7	3.67
	30	3	12.44
50	30	4	6.07
	30	5	4.73
	30	6	3.74
	30	7	1.54
	30	3	13.4
	30	4	7.93
60	30	5	13.11
	30	6	5.42
	30	7	4.12
	60	3	11.68
	60	4	6.65
	60	5	6.18
40	60	6	15.49
	60	7	1.3
	60	3	13.67
	60	4	5.87
	60	5	14.23
	60	6	4.37
50	60	7	3.78
	60	3	11.97
	60	4	7.8
	60	5	4.52
	60	6	5.62
	60	7	1.54
40	90	3	16.54
	90	4	6.9
	90	5	12.33
	90	6	17.55
	90	7	2.24
	90	3	11.3
50	90	4	6.56
	90	5	3.22
	90	6	4.5
	90	7	2.17
	90	3	14.3
	90	4	7.39
60	90	5	10.87
	90	6	4.97
	90	7	3.11

A enzima Manganês peroxidase produzida pelo fungo *Hexagonia glabra* no meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar manteve a sua atividade mesmo na

temperatura elevada de 60 °C no período de 90 minutos, diferentemente da mesma enzima secretada por este fungo no meio suplementado com batata que não produziu nenhuma atividade nem na temperatura de 40 °C em 30 minutos (Tabela 54).

Como no meio suplementado com batata, a enzima ligninolítica mais produzida no meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar foi a Lignina Peroxidase (LiP) para o fungo *Hexagonia glabra*, em todas as temperaturas e períodos testados.

5.5.3. Estabilidade térmica no meio de cultura líquido de Cará roxo

5.5.3.1. Estabilidade térmica de Lacase

Tabela 55 - Estabilidade térmica da enzima Lacase no meio de cultura líquido de Cará roxo

Temperatura (°C)	Tempo de Exposição min	pH	Produção enzimática U/L	
40	30	3	1.23	
	30	4	2.96	
	30	5	0.52	
	30	6	2.88	
	30	7	1	
	30	3	2.49	
50	30	4	2.04	
	30	5	2.5	
	30	6	0.41	
	30	7	0.45	
	30	3	1.08	
	30	4	2.32	
60	30	5	2.38	
	30	6	3.23	
	30	7	1.34	
	40	60	3	2
		60	4	2.86
		60	5	3.15
60		6	1.4	
60		7	0.37	
60		3	3.25	
50	60	4	2.4	
	60	5	1.85	
	60	6	2.6	
	60	7	1.84	
	60	3	0.14	
	60	4	1.71	
60	60	5	1.9	
	60	6	4.63	
	60	7	4.76	
	40	90	3	0
		90	4	0
		90	5	0
90		6	1,6	
90		7	0,6	
90		3	1.59	
50	90	4	2.65	
	90	5	1.16	
	90	6	0.4	
	90	7	0.4	
	90	3	0.58	
	90	4	0.56	
60	90	5	1.38	
	90	6	4.41	
	90	7	5.47	

A lacase secretada pelo fungo *H. glabra* no meio suplementado com cará roxo manteve atividade em todas as temperaturas e períodos testados. Diferentemente da lacase produzida pelo fungo *H. glabra* que no meio suplementado com batata e no meio suplementado com bagaço de cana, nas respectivas temperaturas e períodos, onde ocorreu numa faixa específica de pH, no entanto no meio suplementado com cará roxo houve grande variação do pH na produção desta enzima nestes experimentos (Tabela 55).

5.5.3.2. Estabilidade térmica de Lignina Peroxidase

Tabela 56 - Estabilidade térmica da enzima Lignina Peroxidase no meio de cultura líquido de Cará roxo

Temperatura (°C)	Tempo de Exposição min	pH	Produção enzimática U/L	
40	30	3	0.91	
	30	4	1.3	
	30	5	2	
	30	6	2.92	
	30	7	2.8	
	30	3	0.67	
50	30	4	0.32	
	30	5	1.29	
	30	6	2.43	
	30	7	1.97	
60	30	3	0	
	30	4	0	
	30	5	1.29	
	30	6	1.87	
40	60	7	1.98	
	60	3	0.62	
	60	4	1.12	
	60	5	1.6	
	60	6	2.58	
	60	7	1.93	
	50	60	3	1.13
		60	4	0.53
		60	5	0.49
		60	6	2.18
	60	60	7	2.27
		60	3	0
60		4	0.32	
60		5	1.37	
40	60	6	1.98	
	60	7	0.91	
	90	3	0.32	
	90	4	0.95	
	90	5	1.58	
	90	6	2.2	
	50	90	7	2.26
		90	3	0
		90	4	0.22
		90	5	1.37
	60	90	6	2.17
		90	7	1.95
90		3	0	
90		4	0	
60	90	5	1.45	
	90	6	1.61	
	90	7	1.72	

A Lignina peroxidase (LiP) secretado pelo fungo *Hexagonia glabra* manteve sua atividade em quase todas as temperaturas e períodos testados no meio suplementado com

cará roxo, com exceção da temperatura de 50 °C / 90 min no pH 3, e 60 °C em todos os tempos no pH 3 e no pH 4 (Tabela 56).

5.5.3.3. Estabilidade térmica de Manganês Peroxidase

Tabela 57 - Estabilidade térmica da enzima Manganês peroxidase no meio de cultura líquido de Cará roxo

Temperatura (°C)	Tempo de Exposição min	pH	Produção enzimática U/L
40	30	3	0
	30	4	0
	30	5	0
	30	6	0
	30	7	0
50	30	3	0
	30	4	0
	30	5	0
	30	6	0
	30	7	0
60	30	3	0
	30	4	0
	30	5	0
	30	6	0
	30	7	0,24
40	60	3	0
	60	4	0
	60	5	0
	60	6	0,26
	60	7	0,24
50	60	3	0
	60	4	0
	60	5	0
	60	6	0,65
	60	7	0
60	60	3	0
	60	4	0
	60	5	0
	60	6	1,5
	60	7	1,45
40	90	3	0
	90	4	0
	90	5	0
	90	6	0
	90	7	0
50	90	3	0
	90	4	0
	90	5	0
	90	6	0,31
	90	7	0,53
60	90	3	0,24
	90	4	0
	90	5	0
	90	6	0,51
	90	7	0,35

Como no meio suplementado com batata, o meio suplementado com cará roxo de modo geral não teve produção da enzima Manganês Peroxidase (MnP) em quase todas as temperaturas e períodos testados (Tabela 57).

5.5.4. Estabilidade térmica no meio de cultura líquido de Araçá boi

5.5.4.1. Estabilidade térmica de Lacase

Tabela 58 - Estabilidade térmica da enzima Lacase no meio de cultura líquido de Araçá boi

Temperatura (°C)	Tempo de Exposição min	pH	Produção enzimática U/L
40	30	3	0.58
	30	4	0.48
	30	5	0.34
	30	6	0.39
	30	7	0.55
50	30	3	1.95
	30	4	3.58
	30	5	1
	30	6	1.1
	30	7	1.04
60	30	3	3.58
	30	4	1.1
	30	5	0.55
	30	6	2.55
	30	7	1.13
40	60	3	2.75
	60	4	1.11
	60	5	0.85
	60	6	0.95
	60	7	1.42
50	60	3	1.08
	60	4	1.38
	60	5	0.9
	60	6	0.91
	60	7	1.16
60	60	3	2.24
	60	4	0.37
	60	5	0.4
	60	6	1.62
	60	7	1.22
40	90	3	0.9
	90	4	0.42
	90	5	1.99
	90	6	0.82
	90	7	0.66
50	90	3	1.51
	90	4	0.94
	90	5	1.48
	90	6	1.25
	90	7	0.65
60	90	3	1.69
	90	4	0.05
	90	5	0.38
	90	6	0.37
	90	7	0.24

Em todas as temperaturas, pH's e períodos testados a enzima lacase manteve atividade, apresentando uma maior atividade em pH 3 no período de 60 °C em 30 minutos de exposição (Tabela 58).

5.5.4.2. Estabilidade térmica de Lignina Peroxidase

Tabela 59 - Estabilidade térmica da enzima Lignina Peroxidase no meio de cultura líquido de Araçá boi

Temperatura (°C)	Tempo de Exposição min	pH	Produção enzimática U/L
40	30	3	3.87
	30	4	3.86
	30	5	4.63
	30	6	5.7
	30	7	6.59
	30	3	2.66
50	30	4	3.38
	30	5	0.75
	30	6	3.22
	30	7	4.62
	30	3	6.09
	30	4	3.69
60	30	5	4.37
	30	6	6.54
	30	7	5.04
	60	3	4.49
	60	4	3.88
	60	5	2.98
40	60	6	3.34
	60	7	4.98
	60	3	2.02
	60	4	2.45
	60	5	2.87
	60	6	4.63
50	60	7	4.18
	60	3	5.52
	60	4	5.41
	60	5	4.92
	60	6	4.16
	60	7	5.62
40	90	3	18.37
	90	4	18.01
	90	5	17.08
	90	6	16.98
	90	7	18.17
	90	3	3.12
50	90	4	3.93
	90	5	3.18
	90	6	4.58
	90	7	5.2
	90	3	5.51
	90	4	4.91
60	90	5	3.44
	90	6	7.67
	90	7	7.19
	90	7	7.19

A enzima Lignina Peroxidase (LiP) produzida pelo fungo *Hexagonia glabra* manteve atividade em todas as temperaturas e períodos testados, no meio suplementado com arará-boi. A secreção da Lignina Peroxidase de *H. glabra* foi maior nas temperaturas e períodos utilizados nestes experimentos na faixa de pH 6 a pH7 (Tabela 59).

5.5.4.3. Estabilidade térmica de Manganês Peroxidase

Tabela 60 - Estabilidade térmica da enzima Manganês peroxidase no meio de cultura líquido de Araçá boi

Temperatura (°C)	Tempo de Exposição min	pH	Produção enzimática U/L	
40	30	3	0.96	
	30	4	0.98	
	30	5	1.07	
	30	6	1	
	30	7	1.23	
	30	3	0.15	
50	30	4	0	
	30	5	0	
	30	6	0.26	
	30	7	0.42	
	30	3	0.94	
	30	4	0.65	
60	30	5	0.89	
	30	6	1.25	
	30	7	1.27	
	60	3	0.82	
	60	4	0.47	
	60	5	0.44	
40	60	6	0.62	
	60	7	1.12	
	60	3	1.16	
	60	4	1.41	
	50	60	5	1.27
		60	6	1.36
60		7	1.52	
60		3	0.62	
60		60	4	0.38
		60	5	0.13
	60	6	0	
	60	7	0.4	
	40	90	3	0
		90	4	0
90		5	0	
90		6	0.22	
90		7	5.87	
90		3	0.24	
50	90	4	0.44	
	90	5	0.2	
	90	6	0	
	90	7	0.58	
	60	90	3	1.36
		90	4	0.91
90		5	0.98	
90		6	1.09	
90		7	1.47	

A enzima Manganês Peroxidase secretada pelo fungo *H. glabra*, no meio suplementado com araçá-boi, manteve muito pouca ou nenhuma atividade nos experimentos de termoestabilidade, como já constatado nos outros meios testados.

Verificou-se que para *H. glabra*, a enzima Lignina peroxidase (LiP) é que apresenta maior atividade no meio suplementado com araçá-boi em todos os pH's e todas as temperaturas e períodos testados, em comparação com as demais enzimas ligninolíticas (Tabela 60).

6. DISCUSSÃO

6.1. Efeito de diferentes meios de cultura e diferentes pH's na produção de biomassa do fungo *Hexagonia glabra*

As necessidades nutritivas dos micro-organismos são basicamente as mesmas que as de todos os seres vivos, que, para renovarem seu protoplasma e exercerem suas atividades, exigem fontes de energia e fontes de material.

Para obter os nutrientes necessários para o seu crescimento, os fungos exercem o papel quimiotrófico, onde obtém energia à custa de reações químicas, uma vez que substratos adequados são oxidados.

Nas condições artificiais do laboratório o crescimento dos fungos é conseguido pela sementeira dos mesmos em meios de cultura, e dada à variedade de tipos nutritivos, é fácil compreender que alguns meios de cultura são melhores para uns tipos de fungos, e não tão eficientes para outros fungos. Isso nos mostra que para se obter determinado produto do fungo, deve-se cultivá-lo no meio de cultura que lhe dê os nutrientes necessários para seu crescimento e produção dos metabólitos de interesse.

Fatores físicos como temperatura e pH e fatores químicos como a composição do meio de cultura podem alterar o crescimento de um fungo, bem como a produção enzimática que ele irá desempenhar. Os valores de temperatura e pH ótimos, bem como

o meio de cultura adequado ao fungo devem ser determinados para que o seu potencial produtivo seja aproveitado.

O fungo *Hexagonia glabra*, basidiomiceto, foi cultivado em quatro diferentes meios de cultura (batata, bagaço de cana-de-açúcar, cará roxo e araçá boi), sendo que cada um dos meios teve o pH ajustado em 3, 4, 5, 6 e 7, para que se determinasse o melhor meio de cultura e o melhor pH para produção de biomassa micelial.

A produção de biomassa de *Hexagonia glabra* foi influenciada diretamente pelos meios de cultura e pH's. O fungo *H. glabra* produziu diferentes valores de biomassa micelial nos pH's e meios testados. Os dados mostraram uma grande variação na produção micelial de *H. glabra* resultante da interação do pH e substrato utilizado. A melhor produção de biomassa micelial do *H. glabra* foi verificada no pH 6 no meio suplementado com cará e a menor produção foi obtida no pH 5 no meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar. Esses resultados estão de acordo com o relatado na literatura, que relatam de modo geral que os fungos basidiomicetos realizam suas atividades metabólicas numa ampla faixa de pH, sendo que o pH ótimo do crescimento micelial freqüentemente se situa em pH ácido (Carmo, 2005; Fonseca, 2009; Gbolagade et al., 2006; Moreira Neto et al., 2009).

De acordo com Moreira Neto e colaboradores (2009), os fungos em geral crescem em uma ampla faixa de pH, com o pH ótimo situado próximo ao ácido para a maioria deles. Nestes organismos o pH não somente afeta o crescimento, mas também a produção e atividade dos metabólitos devido ao efeito do pH na permeabilidade da célula e na disponibilidade de certos metais como magnésio, fósforo, ferro, cálcio e zinco. A influência do pH no crescimento micelial e produção de biomassa dos

basidiomicetos tem sido alvo de muitos estudos (Galhaup et al., 2002; Lechner e Pappinut, 2006; Zouari-Mechichi et al., 2006).

6.2. Efeito de diferentes meios de cultura e diferentes pHs na produção de enzimas ligninolíticas do fungo *Hexagonia glabra*.

O fungo *Hexagonia glabra* produziu Lacase, Lignina Peroxidase (LiP) e Manganês Peroxidase (MnP) em todos os meios de cultivo e pH's testados. Neste trabalho, constatou-se que curiosamente a maior produção das três enzimas ligninolíticas (Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase) ocorreu no meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar em todos os pH's experimentados. Já a menor produção variou em função da enzima, do meio de cultivo e do pH. Deste modo, a menor produção da enzima Lignina Peroxidase (LiP) ocorreu no meio suplementado com cará roxo e para a enzima Manganês Peroxidase (MnP) a menor produção se deu no meio suplementado com batata nos diferentes pH's utilizados. E, enfim para a Lacase a menor produção ocorreu no meio suplementado com cará roxo na faixa de pH mais ácido (pH3 a pH 5) e no meio suplementado com batata na faixa de pH menos ácido (pH 6 a pH 7).

A atividade enzimática é diretamente influenciada pelo pH do ensaio, e cada enzima apresenta sua maior atividade em seu pH ótimo (Karima, 2008). O pH ótimo das três enzimas estudadas (Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase) foi o pH 3 em todos os meios de cultivo utilizados para o fungo *Hexagonia glabra*. A atividade da Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase decresceu à medida em que se aumentou o pH do meio, se distanciando do pH ótimo. A análise estatística revelou uma correlação positiva entre a atividade enzimática da Lacase, Lignina Peroxidase e

Manganês Peroxidase e o pH 3. Neste trabalho, o pH ótimo de atividade das peroxidases e lacase situou-se então na faixa ácida. Estes dados estão de acordo com a literatura que menciona que a maioria das enzimas produzidas pelos basidiomicetos tem seu pH ótimo situado na faixa ácida de pH 3 a pH 5,5 (Baldrian, 2006). Segundo Karima (2008), os fungos têm a tendência de colonizar os ambientes ácidos e para que suas atividades metabólicas sejam eficientes estes micro-organismos acidificam ainda mais o meio.

Além do pH, constatou-se que a produção das enzimas ligninolíticas pode ser significativamente afetada pelos nutrientes presentes nos meios de cultivo. Tais resultados estão de acordo com os relatos de Dekker e colaboradores (2007) e de Martins da Silva (2010). Para atender à demanda nutricional do fungo em estudo, os substratos que compõem os meios devem conter fontes de carbono, fontes de nitrogênio, substâncias minerais e fatores de crescimento como vitamina B, aminoácidos, nucleotídeos e ácidos graxos. Contudo, dentre os nutrientes requeridos pelos fungos, os níveis de carbono e de nitrogênio são fatores críticos para a produção das enzimas ligninolíticas secretadas por estes micro-organismos no meio de cultivo (Martins da Silva, 2010; Nepomucena, 2010). Os resultados demonstraram que a produção de Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase foi significativamente aumentada no meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar, provavelmente por possuir alto teor de carbono (49%), essencial para a atividade enzimática do *H. glabra*, nos diferentes pH's testados. Verificou-se assim que a atividade das três enzimas ligninolíticas (Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase) foi diretamente influenciada pela fonte de carbono utilizada. O alto teor de carbono teve um efeito positivo na atividade da Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase para o fungo *Hexagonia glabra*, nos diferentes pH's avaliados. Em concordância com os nossos resultados o fungo *Pycnoporus sanguineus* teve a melhor produção de Lacase (Pointing et al., 2000),

Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase em meios contendo altos níveis de carbono e baixos níveis de nitrogênio (Martins da Silva, 2010). De maneira oposta, a produção das enzimas ligninolíticas por outros fungos foi aumentada em culturas com altos níveis de nitrogênio (Garcia, 2006; Nepomucena, 2010). Segundo Garcia (2006), as quantidades de carbono e nitrogênio apresentam variações conforme a espécie fúngica e o meio estudado. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a composição do meio de cultivo foi fator interferente na produção enzimática do fungo *Hexagonia glabra*.

Outro aspecto importante que deve ser bem considerado é o tempo de cultivo do fungo, que pode alterar até mesmo outras variáveis presentes no meio de cultura, como por exemplo, a umidade, que por sua vez pode afetar significativamente a produção enzimática do micro-organismo em estudo (Karima, 2008). Para o fungo *Hexagonia glabra* verificou-se que houve uma grande variação na produção enzimática em função do tempo de cultivo do fungo. De modo geral, o fungo *H. glabra* demonstrou uma maior produção enzimática conforme se aumentou o tempo de cultivo. Para a maioria dos meios e pH's testados, a maior produção da lacase se deu no décimo oitavo dia. Já a melhor produção da Lignina Peroxidase deu-se entre o sexto e décimo quarto dia de cultivo em todos os meios e pH's avaliados. E, para o Manganês Peroxidase a melhor produção ocorreu entre o quarto e décimo quarto dia de cultivo nos diferentes pH's e meios experimentados. Os resultados demonstraram que o pico máximo de produção é específico para cada enzima secretada por um mesmo fungo, num determinado período de cultivo estudado.

As enzimas Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase excretadas pelos basidiomicetos apresentam grandes aplicações numa grande variedade de setores industriais e biotecnológicos (Maciel et al., 2010) e, desta maneira, é de fundamental

importância que se estude os aspectos fisiológicos e físico-químicos destes organismos, principalmente os da região Amazônica, para elucidar os mecanismos que aumentem a produção destas respectivas enzimas ligninolíticas.

6.3. Estabilidade térmica das enzimas ligninolíticas produzidas pelo fungo

Hexagonia glabra.

O estudo da estabilidade térmica das enzimas ligninolíticas produzido pelo fungo *Hexagonia glabra* foi testado nas diferentes temperaturas (40 °C, 50 °C e 60 °C) por vários períodos de incubação nos distintos meios de cultivos em diferentes pH's.

De modo geral, constatou-se em todos os experimentos de termoestabilidade que a enzima Lignina Peroxidase (LiP) foi a que teve maior manutenção da atividade em comparação com a Lacase e o Manganês Peroxidase (MnP) para o fungo *H. glabra*, nas condições testadas. Verificou-se também que tanto a Lacase como a Lignina Peroxidase produzidas por *H. glabra*, conservaram a atividade em todas as temperaturas e períodos testados, nos diferentes pH's e meios de cultivo utilizados. Já a enzima Manganês Peroxidase secretada por *H. glabra* não apresentou quase nenhuma atividade no meio suplementado com batata e no meio suplementado com cará roxo, mesmo em temperatura baixa como a de 40 °C em trinta minutos de incubação. Os dados nos sugerem que a enzima Manganês Peroxidase (MnP) é muito afetada pelos nutrientes do meio de cultivo, bem mais do que pelo pH, nos experimentos realizados. Contudo, de modo geral verificou-se neste trabalho, que o pH é um fator muito importante na termoestabilidade dos basidiomicetos, visto que numa mesma temperatura e num mesmo período de incubação a preservação da atividade enzimática é alterada pela influencia

direta do pH do meio de cultivo. Igualmente, constatou-se que os nutrientes do meio de cultivo afetam diretamente a termoestabilidade das enzimas ligninolíticas do fungo em estudo. Pode-se sugerir então que a maior ou menor termoestabilidade de uma enzima fúngica é resultante de vários fatores, tais como: substrato, pH, período de incubação a uma determinada temperatura, espécie estudada e origem geográfica do isolado ou cepa testada.

Os resultados obtidos neste trabalho no que se referem à enzima lacase mostraram claramente que a mesma apresenta uma estabilidade térmica superior aos alcançados na literatura para a lacase do basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus* CY788 (Pointing et al., 2000). Enquanto a lacase estudada por Pointing e colaboradores (2000) foi quase totalmente inativada quando incubada por períodos relativamente curtos de tempo em temperaturas acima de 35 °C, quando mantida a 60 °C por um período de 90 minutos a lacase obtida em nossos experimentos foi capaz ainda de conservar alguma atividade. Já os dados alcançados por Lomascolo e colaboradores (2002) estão de acordo com os conseguidos neste trabalho no que se refere a estabilidade térmica da lacase de *Pycnoporus sanguineus* G05 que manteve ainda atividade quando submetida a temperatura de 50 °C por oito horas. Segundo Hasper e colaboradores (2002), as diferenças no comportamento face ao tratamento térmico são devido ao patrimônio genético particular de cada espécie e as diferenças na adaptação fisiológica do micro-organismo ao nicho ecológico no qual ele vive.

De acordo com Vieille e ZeiKus (2001), a termoestabilidade é afetada diretamente por fatores como a presença de certas ligações na estrutura secundária e

terciária das proteínas enzimáticas (ligações de hidrogênio, ligações secundárias, ligações entre metais e pontes de dissulfeto) permitindo consolidar a estrutura da enzima e então sua resistência ao tratamento térmico. De fato, estudos provaram que riqueza em resíduos de cisteína e em glucídios confere a molécula enzimática uma grande integridade estrutural resistente a temperaturas elevadas (Hasper et al., 2002).

A termoestabilidade das enzimas é um fator muito relevante para aplicação em processos industriais. Quanto maior for a manutenção da atividade da enzima em temperaturas elevadas, maior a capacidade de emprego desta enzima nas indústrias (Karima, 2008).

Os resultados confirmam a boa termoestabilidade da Lacase e Lignina Peroxidase (LiP) em estudo, e mostraram que até a temperatura de 60 °C durante uma hora e meia de incubação, estas enzimas preservaram suas atividades, indicando que as mesmas podem ser utilizadas posteriormente em processos industriais.

7. CONCLUSÃO

- Em todos os meios testados (araçá-boi, bagaço de cana-de-açúcar, batata e cará-roxo) ocorreu produção de biomassa micelial e atividade das enzimas ligninolíticas (Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase) do basidiomiceto *Hexagonia glabra*.
- A produção de biomassa do fungo *Hexagonia glabra* foi maior no meio suplementado com cará-roxo no pH 6 e menor naquele acrescido com bagaço de cana-de-açúcar no pH 5.
- A maior produção das enzimas ligninolíticas (Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase) ocorreu no meio suplementado com bagaço de cana-de-açúcar em todos os pH's experimentados.
- A produção enzimática variou em função da enzima, do meio de cultivo e do pH.
- A menor produção da enzima Lignina Peroxidase (LiP) ocorreu no meio suplementado com cará roxo e para a enzima Manganês Peroxidase (MnP) a menor produção se deu no meio suplementado com batata nos diferentes pH's utilizados.

- A menor produção de Lacase ocorreu no meio suplementado com cará roxo na faixa de pH mais ácido (pH 3 a pH 5) e no meio suplementado com batata na faixa de pH menos ácido (pH 6 a pH 7).
- O pH ótimo de atividade das peroxidases e lacase situou-se então na faixa ácida.
- Nos experimentos de termoestabilidade a enzima Lignina Peroxidase (LiP) foi a que teve maior manutenção da atividade em comparação com a Lacase e o Manganês Peroxidase (MnP) para o fungo *H. glabra*.
- A enzima MnP se mostrou mais sensível do que as outras no teste de termoestabilidade, mesmo na temperatura mais baixa.
- Os resultados demonstraram boa termoestabilidade de Lacase e Lignina Peroxidase (LiP) produzidas por *H. glabra* nas variáveis testadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMO, M. A. **Taioba, cará e inhame: o grande potencial inexplorado**. São Paulo: Editora Ícone, 1990. 80 p.

AGUIAR, L. P. J; MARINHO, A. H.; REBÊLO, Y. S.; SHRIMPTON, R. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia. **Acta Amazônica**, vol.10, n.4, p. 755-758, 1996.

ALEXANDRINO, A.N.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M. e PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack: Fr). **Ciências Tecnológicas de Alimentos**, vol. 27, no. 2, p. 364-368, 2007.

ANDER, P. e ERIKSSON, K.E. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Archives of Microbiology**, Berlin, vol. 109, p. 1-8, 1976.

ANDERSON, J.M. Spatiotemporal effects of invertebrates on soil processes. **Biology and fertility of soils**. vol. 6, p. 216-222, 1988.

ANDRADE, J.S.; RIBEIRO, F.C.F.; ARAGÃO, C.G.; FERREIRA, S.A.N. Adequação tecnológica de frutos da Amazônia: Licor de araçá-boi (*Eugenia stiptata*) McVaugh. **Acta Amazônica**, vol. 27, no. 4, p. 273-278, 1997.

ARAÚJO, W.L. **Genética e Melhoramento de Fungos na Biotecnologia**. 2007.

BAJPAI, P.; MISHRA, S.P.; MISHRA, O.P.; KUMAR, S.; BAJPAI, P.K.; SINGH, S. Biochemical pulping of bagasse. **Biotechnology Progress**, vol. 20, no. 4, p.1270-1272, 2004.

BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrences and properties. **FEMS Microbiology Review**, vol.30, p. 215 – 242, 2006.

BERNARDI, E.; DONINI, L.P., MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J.S. Diferentes meios de cultivo e condições de luz no crescimento e massa miceliana de *Agaricus brasiliensis*

S. Wasser et al. **Arquivos. Institute of Biology**, São Paulo, vol. 75, no. 3, p. 375-378, 2008.

BLACK, J.G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4 ed. Rio de Janeiro. 2002.

BOTÃO, S.G. e LACAVA, P.M. Uso de bagaço da cana-de-açúcar para cooperação de energia elétrica, no estado de São Paulo e a comercialização do excedente da energia gerada. **Revista Biociências**, vol.9, n.3, p. 43 – 47, 2003.

BRIENZO, M; SILVA, E. M.; FORGANES, S. M.; MILAGRES, A. M. F. Estudo da cinética de consumo dos componentes do resíduo de eucalipto durante o crescimento de linhagens de *Lentinula edodes*. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. Unicamp, 2005.

BROWN, M.A.; ZHAO, Z.; MAUK, A.G. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. **Inorganica Chimica Acta**. vol. 331, p. 232-238, 2002.

BONATTI, M.; KARNOPP, B.; SOARES, B. M.; FURLAN, S. A. Estudo da composição de cogumelos das espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajorcaju* cultivados em palha de bananeira. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 4, p. 31- 35, 2003.

BOOMINATHAN, K. e REDDY, A. In: **Fungal degradation of lignin: biotechnological applications**. Handbook of Applied Mycology. vol 4. edited by Marcel Dekker Inc, New York 795-798. 1992.

CARMO, C.C. **Atividade Enzimática hidrolítica dos fungos Amazônicos *Pycnoporus sanguineus* (L.F) MURR e *Panus crinitus* (L.esx.FR) SINGER**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, (UEA), 2005, 81p.

CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M.; MAGALHÃES, A.F.; FREIRE, M.A.L.; SILVA, F.F. SILVA, R.R.; CARVALHO, B.M.A. Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol.41, n.1, p. 125 -132, 2006.

CHEN, D.H.; SHION, W.Y.; WANG, K.C.; HUANG, S.Y; SHIE, Y.T.; TSAI, C.M.; SHIE, J.F.; CHEN, K.W. Chemotaxonomy of triterpenoid pattern of HPLC of *Ganoderma capsules* by electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography** , vol. 911, p. 119-126, 2001.

CHIVUKULA, M.; SPADARO, J.T.; RENGANATHAN, V. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. **Biochemistry**. vol. 34, p. 7765- 7772, 1995.

DEMAIN, A.L. Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In: SUTTON, B. **A Century of Mycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 233-254.

DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.; GIESE, E.C.; GODOY, S.D.S.; COVIZZI, L.G. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, vol 28, p. 81 – 88, 2007

DURÁN, N.; ROSA, M.A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: A Review.. **Enzyme and Microbial Technology** vol.31, no. 7, p. 907-931, 2002.

ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Ed. Educs. 2004.

FALANGHE, H. Produção de microrganismos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia: tecnologia das fermentações**. SãoPaulo: E. Blucher, 1975. v.1, p.246-285.

FIDALGO, K.P.N. Typification of the genes *Hexagonia*. **Táxon**, vol. 17, no. 1, p. 37-43. 1968.

FONSECA, M.D.P. **Produção de Enzimas Oxidativas por Fungos Amazônicos Degradadores de Madeira**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 2009, 99p.

GALHAUP, C.; WAGNER, H.; HINTERSTOISSER, B.; HALTRICH, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, 30, 529-536, 2002.

GALVAGNO, M.A. e FORCHIASSIN, F. **Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo**. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Ed. Educs. 2004.

GARCIA, T.A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Nacional de Brasília, 2006, 110p.

GBOLAGADE, J.; SOBOWALE, A.; ADEJOYE, D. Optimization of sub-merged culture conditions for biomass production in *Pleurotus florida* (mont.) Singer, a Nigerian edible fungus. **African Journal of Biotechnology**, vol.5, p.1464-1469, 2006.

GILBERTSON, R.L. e RYVARDEN, L. **North American Polypores**. Vol. I (1). Oslo. Fungiflora, 433 p. *Hexagonia glabra* (P. Beauvois) Ryvarden. 1986.

GOLD, M.H. e ALIC, M. Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiological Reviews**. vol. 57, no. 3, p. 605-622. 1993.

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. Wiley-Lis: New York. Guanabara Koogan, 2 ed. 275-277, 1994.

GUGLIOTTA, A.M. e CAPELARI, M. **Taxonomia de basidiomicetos**. In: Bonomi, V.L.R. Grgl. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas, Instituto de Botânica, São Paulo, 184 p. 1998.

HASPER, A.A.; DEKKER, S.E.; MIL, M.Y.; VAN VONDERVOORT, P.J.I.; GRAAF, L.H. A new endonucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. **Applied of Environmental Microbiology**, vol. 68, n.4, p. 1556 – 1560, 2002.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**. vol. 30, p. 454-466, 2002.

HUDSON, H.J.; WILLIS, A.J.; SLEIGH, M.A. **Fungal Biology**. Edward Arnold Ltd: London, p. 289. 1986.

JOHJIMA, T.; ITOH, N.; KABUTO, M.; TOKIMURA, F.; NAKAGAWA, T.; WARIISHI, H.; TANAKA, H. Direct interaction of lignin and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry**. vol. 96, p. 1989-1994, 1999.

KAMIDA, H.M.; DURRANT, L.R.; MONTEIRO, R.T.R.; ARMAS, E.D. Biodegradação de efluentes têxteis por *Pleurotus sabor-caju*. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n.4, p. 629-632, 2005.

KAPICH, A.N.; PRIOR, B.A.; LUNDELL, T. ; HATAKKA, A. A rapid method to quantify prooxidant activity in cultures of wood-decaying white-rot fungi. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 61, p. 261-271, 2005.

KARIMA, B. **Étude de l'alpha amylase de levures isolées d'un écosystème extreme (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactoserum**. Dissertation presente au Department de Biochimie et Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, France, 2008, 104p.

KIRK, T.K. e FARRELL, R.L. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, vol. 41, p. 465-505, 1987.

KIRK, T.K.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W.J.; LORENZ, L.F.; ZEIKUS, J.G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**. vol. 117, p. 277-285, 1978.

LAURENSE, J. 2005. **Biologia**. Volume Único. 1 ed. São Paulo: Nova Geração.

LECHNER, B.E. e PAPINUTTI, V.L. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. **Process Biochemistry**, 41, 594-598, 2006.

LOMASCOLO, A.; CAYOL, J.L. ; ROCHE, M. ;GUO, L. ; ROBERT, J.L. ; RECORD, E.; LESAGE-MEESSEN, L.; OLIVER, B.; SIGOILLOT, J.C.; ASTHERR, M. Molecular clustering by *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monocaryotic strains for laccase hyperproduction. **Mycology Research**, vol 106, n.10, p.1193-1203, 2002.

LOPES, C.B.; SCHEMBERGER, A. e TRINDADE, J.L.F. Biotecnologia e bioconversão de resíduos agroindustriais – Uma revisão. **VI Semana de Tecnologia em Alimentos**, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *UTFPR*. vol. 02, no. 25, 2008.

MACHADO, G.O. **Preparação e caracterização de CMC e CMC grafitizado**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química de São Carlos, São Paulo, 2000, 101p.

MACIEL, M.J.M.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H.C.T. Industrial and Biotechnological Applications of Ligninolytic Enzymes of the Basidiomycetes. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 13, n. 6, p. 1-13, 2010.

MARDONES, L.; GOMIDE, J.L.; FREER, J.; FERRAZ, A.; RODRIGUEZ, J. Kraft pulping of Eucalyptus nitens wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal Chemistry. Technology. Biotechnology**. vol. 81, p. 608-613, 2006.

MARTINS DA SILVA, N. **Avaliação do Potencial Antimicrobiano, Enzimático e de Crescimento de um Isolado Amazônico do Fungo *Pycnoporus sanguineus***. Dissertação de Mestrado, Pós- Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 2010, 180p.

MATEUS, D.R. e OKINO, L.K. **Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos**. In: VLR BONONI (ed.) *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*. São Paulo. Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, p. 106-139. 1998.

MAYER, A.M. e STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**. vol. 60, no. 6, p. 551-565, 2002.

MORAES, I.O. Produção de microorganismos. In: LIMA, U.A. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 1 ed., vol. 3. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. Cap. 9, p. 199-214.

MORAIS, A.M.L. Fungos: ferramentas na saúde pública. As utilidades de um antigo vilão. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 2003.

MOREIRA NETO, S.L.; MATHEUS, D.R.; MACHADO, K.M.G. Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol.52, p. 1075-1082, 2009.

MOREIRA NETO, S.L. (2006). **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. São Paulo, Instituto de Botânica da Secretaria do Estado do Meio Ambiente. 110 p.

MOUGIN, C.; JOLIVALT, C.; BRIOZZO, P.; MADZAK, C. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. **Environmental Chemistry Letters**. vol.1, p. 145-148, 2003.

NEPOMUCENA, R.M.P. **Avaliação do potencial microbiano de crescimento e secreção de lacase do fungo Amazônico *Lentinus crinitus***. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), 2010, 140p.

PELCZAR, M.J., CHNG, E.C.S., KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Makron Books. Volume II, 2 ed. São Paulo. 1996.

PIERO, D.M.R. **Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (SHIITAKE) e *Agaricus Blazei* (COGUMELO-DO-SOL) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos**. São Paulo: Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2003.

PINTO, S.A.G. **Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Disponível em <http://www.cnpq.br/embrapa.br>, 2007.

POINTING, S.B.; JONES, E.B.G.; VRIJMOED, L.L.P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, vol.12, n.1, p.134 – 144, 2000.

PUTZKE, J. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002, vol. 1 e vol. 2.

PUTZKE, J. e PUTZKE, M.T.L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul. EDUNISC, vol.1, 2 ed. 2004.

RABINOVICH, M.L.; BOLOBOVA, A.V.; VASILCHENKO, L.G. 2004. Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**. vol. 40, no. 1, p. 1-17, 1996.

RAMOS, J.; ROJAS, T.; NAVARRO, F.; DAVALOS, F.; SANJUAN, R.; RUTIAGA, J.; YOUNG, R.A. Enzymatic and fungal treatments on sugarcane bagase for the production of mechanical pulps. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**. vol.52, p. 5057-5062, 2004.

RAVEN, P.H. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2001.

RICHARD, H. **Enzimologia e Biocatálise**. In: Biotecnologia. Org. René Scriban. Editora Manole, p. 180-207, 1985.

SCHNEIDER, P.; CASPERSEN, M.B.; MONDORF, K.; HALKIER, T.; SKOV, L.K.; OSTERGAARD, P.R. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. **Enzyme Microbial Technology**. vol. 25, p. 502-528, 1999.

SHLEEV, S.V.; MOROZOVA, O.V.; NIKITINA, O.V.; GORSHINA, E.S.; RUSINOVA, T.V.; SEREZHENKOV, V.A.; BURBAEV, D.S.; GAZARYAN, I.; YAROLOPOV, A. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**. vol. 86, p. 693-703, 2004.

SILVA, R.R. e COELHO, G.D. **Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Instituto de Botânica. São Paulo. 2006.

SUGIURA, M.; HIRAI, H.; NISHIDA, T. Purification and characterization of a novel lignin peroxidase from white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. **FEMS Microbiology Letters**. vol. 224, p. 285-290, 2003.

TIEN, M. e KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Science**. vol. 81, p. 2280-2284, 1984.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**. vol. 72, p. 169-183, 2000.

VIEILLE, C. e ZEIKUS, J.G. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses and Molecular Mechanisms for Thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol.65, n.1, p.1 – 43, 2001.

VIEIRA, M. C.; HEREDIA Z.N.A.; GRACIANO, J.D.; RIBEIRO, R. Uso de matéria seca de cará e de mandioquinha-salsa substituindo parte do milho na ração para frangos de corte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.17,no.1, p.34-38, 1999.

WHITELEY, C.G. e LEE, D.J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme Microbiology and Technology**. vol. 38, p. 291-316, 2006.

ZOUARI-MECHICHI, H.; MECHICHI, T.; DHOUIB, A.; SAYADI, S.; MARTÍNEZ, A. e MARTÍNEZ, M. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, 39, 141-148, 2006.

ANEXOS