



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS



MARÍLIA LORDÊLO CARDOSO

ESTUDO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE ENZIMAS
LIGNINOCELULOLÍTICAS POR FUNGO BASIDIOMICETO
CULTIVADO SOB FERMENTAÇÃO SÓLIDA DE RESÍDUOS
VEGETAIS

FEIRA DE SANTANA - BA

2009

MARÍLIA LORDÊLO CARDOSO

**ESTUDO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE ENZIMAS
LIGNINOCELULOLÍTICAS POR FUNGO BASIDIOMICETO
CULTIVADO SOB FERMENTAÇÃO SÓLIDA DE
RESÍDUOS VEGETAIS**

Feira de Santana-BA

2009

MARÍLIA LORDÊLO CARDOSO

**ESTUDO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE ENZIMAS
LIGNINOCELULOLÍTICAS POR FUNGO BASIDIOMICETO
CULTIVADO SOB FERMENTAÇÃO SÓLIDA DE
RESÍDUOS VEGETAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Gabriela Bello Koblitz

Feira de Santana-BA

2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélio Mitoshi Kamida

Prof^a. Dr^a. Sandra Aparecida de Assis

Prof^a. Dr^a. Maria Gabriela Bello Koblitz
Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA
2009

Dedico este trabalho aos meus professores, amigos, familiares e ao meu amor pela contribuição durante a realização do mestrado.

AGRADECIMENTOS

Devo agradecer, em primeiro lugar, a Deus, por estar sempre ao meu lado e em meu interior me dando força para enfrentar os meus medos e vencer a minha insegurança, fazendo de mim uma vitoriosa.

Aos meus amigos, familiares e ao meu amor, por entenderem minha ausência e me apoiarem de uma maneira ímpar na realização de mais um sonho.

Às amigas Andréa, Cíntia Luiza e Hilana, e ao amigo Volnei com quem eu pude dividir os mais difíceis e também melhores momentos desta caminhada.

A todos os professores do PPG-RGV pela contribuição com seus conhecimentos.

A minha querida professora orientadora Gabriela, que me fez despertar a paixão pela ciência e que, com sua admirável competência, foi meu braço direito nesta jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

RESUMO

Na tentativa de reduzir os custos da produção de bioprodutos que são obtidos a partir de glicose e/ou celulose, tem sido proposta a utilização de resíduos ligninocelulósicos como fonte de açúcares fermentáveis. Estes resíduos são compostos por celulose e hemicelulose, os quais se encontram fortemente ligados à lignina. A bioconversão de ligninocelulose exige a delignificação para liberar celulose e hemicelulose, que são hidrolisados a açúcares simples (glicose e xilose), possibilitando a posterior fermentação para obtenção de produtos diversos como etanol e outros. Neste processo estão envolvidas diversas enzimas: lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacase, celulase e hemicelulase. Enzimas fúngicas apresentam ótimos resultados para degradação de lignina, permitindo o acesso aos carboidratos na conversão de ligninocelulose. Neste trabalho, 14 fungos basidiomicetos isolados do semi-árido baiano foram avaliados quanto a sua produção enzimática. O fungo *Trametes villosa* apresentou melhor resultado na seleção para enzimas ligninocelulolíticas. Casca de coco, bagaço de cana-de-açúcar e fibra de sisal (resíduos ligninocelulósicos abundantes na região Nordeste do Brasil) foram utilizados como substrato para o crescimento deste fungo. Delineamentos experimentais, incluindo metodologia de superfície de resposta (MSR), foram empregados na otimização das condições de cultivo que favorecem a secreção das enzimas de interesse. Os melhores resultados foram encontrados para manganês peroxidase, cujo pH e temperatura ótimos foram determinados. As condições otimizadas para a secreção desta enzima pelo fungo testado foram: substrato bagaço de cana de açúcar, 80% de umidade, pH 9,38, temperatura de 20°C, e 15 dias de cultivo. A enzima extraída apresentou pH 4,5 como ótimo, não havendo diferença significativa entre as temperaturas testadas na faixa de 20 a 90°C.

Palavras Chaves: ligninocelulose, basidiomicetos, enzimas ligninocelulolíticas, açúcares

ABSTRACT

(Study of *in vitro* production of lignocellulolytic enzymes by basidiomycete fungus in solid substrate fermentation of plant wastes). Lignocellulosic residues has been used as a source of fermentable sugars in an attempt to reduce the costs of producing bioproducts which are obtained from glucose and/or cellulose. These wastes are composed of cellulose and hemicellulose, which are strongly linked to lignin. Bioconversion of ligninocelulosic requires delignification to liberate cellulose and hemicellulose from their complex with lignin. So, they can be hydrolyzed to simple free sugars (glucose and xylose), enabling the subsequent fermentation to obtain various products such as ethanol and others. Several enzymes are involved in this process: lignin peroxidase, manganese peroxidase, laccase, cellulase and hemicellulase. Fungal enzymes show good results for degradation of lignin, allowing enzyme's access to carbohydrates in the ligninocellulose conversion. In this work, 14 basidiomycetes from semi-arid of Bahia were evaluated for enzyme production. The fungus *Trametes villosa* showed the best results in that screening. Coconut shell, bagasse of sugarcane and sisal fiber (lignocellulosic materials abundant in the Northeast of Brazil) were used as substrate for the fungal growth. Experimental designs, including response surface methodology (RSM), were used in the optimization of culture conditions that favor the production of interesting enzymes. The best results were found for manganese peroxidase, whose optimum pH and temperature were determined. The optimized conditions for the secretion of this enzyme by the tested fungus were: bagasse of sugarcane, 80% moisture, pH 9.38, temperature of 20°C and 15 days of cultivation. The enzyme presented pH 4.5 as optimum whitouth differences among tested temperatures from 20 to 90° C.

Keywords: lignocellulose, basidiomycetes, lignocellulolytic enzymes, free sugars

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO -----	1
2 REVISÃO DE LITERATURA -----	3
2.1 MATERIAIS LIGNINOCELULÓSICOS -----	3
2.1.1 Lignina -----	3
2.1.2 Celulose -----	5
2.1.3 Hemicelulose -----	5
2.1.4 Casca de coco -----	5
2.1.5 Bagaço de cana-de-açúcar -----	6
2.1.6 Fibra de sisal -----	7
2.2 CONVERSÃO BIOLÓGICA DE BIOMASSA LIGNINOCELULÓSICA -----	7
2.2.1 Delignificação por fungos basidiomicetos -----	8
2.2.1.1 Lignina peroxidase (LiP) -----	11
2.2.1.2 Manganês peroxidase (MnP) -----	12
2.2.1.3 Lacases -----	13
2.3 HIDRÓLISE DOS POLÍMEROS DE CARBOIDRATOS -----	14
2.3.1 Celulases -----	15
2.3.1.1 Endo-1,4-β-D-glicanases (EC 3.2.1.4) -----	15
2.3.1.2. Exo-1,4-β-D-glicanases (EC 3.2.1.91) -----	15
2.3.1.3 β-glicosidases (EC 3.2.1.21) -----	16
2.3.1.4 Glico-hidrolases (EC 3.2.1.74) -----	16
2.3.2 Hemicelulases -----	16
2.4 CULTIVO SOBRE SUBSTRATO SÓLIDO (CSS) NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS -----	16
2.5 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS NA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS -----	17
2.5.1 Planejamento fatorial em dois níveis ($2^{(k-p)}$) -----	18
2.5.2 Planejamento composto central e superfície de reposta não-fatorial -----	19
3 MATERIAL E MÉTODOS -----	20
3.1 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DOS FUNGOS -----	20
3.2 SELEÇÃO DOS FUNGOS SECRETORES DAS ENZIMAS DE INTERESSE	20
3.2.1 Ligninases -----	20

3.2.2 Celulase	21
3.3 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO POR PLANEJAMENTO MULTIVARIÁVEL	23
3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE INTERESSE	24
3.4.1 Atividade de lignina peroxidase	25
3.4.2 Atividade de manganês peroxidase	25
3.4.3 Atividade de lacase	25
3.4.4 Atividade de celulase	26
3.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE LACASE E MANGANÊS PEROXIDASE	26
3.5.1 Otimização para lacase	27
3.5.2 Otimização para manganês peroxidase	28
3.6 CÁLCULO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA	29
3.7 TIME COURSE PARA MANGANÊS PEROXIDASE	29
3.8 DETERMINAÇÃO DO VALOR DE PH ÓTIMO	29
3.9 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA	30
3.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS OBTIDOS	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 SELEÇÃO DOS FUNGOS SECRETORES DAS ENZIMAS DE INTERESSE	31
4.1.1 Ligninases	31
4.1.2 Celulases	32
4.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO POR PLANEJAMENTO MULTIVARIÁVEL	33
4.2.1 Análise estatística para atividade de lignina peroxidase	34
4.2.2 Análise estatística para atividade de manganês peroxidase	36
4.2.3 Análise estatística para atividade de lacase	37
4.2.4 Análise estatística para atividade de celulase	39
4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE LACASE E MANGANÊS PEROXIDASE	40
4.3.1 Análise estatística da otimização de lacase	40
4.3.2 Análise estatística da otimização de manganês peroxidase	43
4.4 TIME COURSE PARA MANGANÊS PEROXIDASE	46
4.5 DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO	48

4.6 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA -----	49
5 CONCLUSÃO-----	51
REFERÊNCIAS-----	52
ANEXOS-----	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural esquemática para a lignina.....	4
Figura 2: Fórmula estrutural da celulose.	5
Figura 3: Ilustração de alguns fungos basidiomicetos.	9
Figura 4: Biodegradação da lignina por fungos basidiomicetos de decomposição branca.	10
Figura 5: Estrutura tridimensional de LiP de basidiomiceto.....	12
Figura 6: Oxidação de álcool veratrílico por LiP.	12
Figura 7: Estrutura tridimensional de manganês peroxidase de basidiomiceto. ...	13
Figura 8: Estrutura cristalina de lacase ativa com os três cobres catalíticos.	14
Figura 9: Esquema da incubação em meio contendo RBBR.....	21
Figura 10: Representação esquemática da caracterização.....	22
Figura 11: Seleção em RBBR.	32
Figura 12: Seleção em CMC.	33
Figura 13: Cultivo sobre substrato sólido de <i>Trametes villosa</i>	33
Figura 14: Diagrama de Pareto para atividade de lignina peroxidase.	35
Figura 15: Diagrama de Pareto para atividade de manganês peroxidase.....	37
Figura 16: Diagrama de Pareto para atividade de lacase.....	38
Figura 17: Valores de atividade de lacase determinados experimentalmente (observados) versus valores preditos pelo modelo da Equação V.	39
Figura 18: Efeito bidimensional das variáveis substrato x tempo (a) e substrato x pH (b) sobre a atividade de lacase (escala das variáveis independentes em valores codificados).....	39
Figura 19: Diagrama de Pareto para atividade de lacase na otimização.....	42
Figura 20: Efeito bi (a) e tridimensional (b) das variáveis temperatura e umidade sobre a atividade de lacase (escala das variáveis independentes em valores codificados).	43
Figura 21: Diagrama de Pareto para atividade específica de MnP na otimização.	45
Figura 22: Valores de atividade de lacase determinados experimentalmente (observados) versus valores preditos pelo modelo da Equação VII.....	45

Figura 23: Efeito bi (a) e tridimensional (b) das variáveis temperatura e umidade sobre a atividade específica de MnP (escala das variáveis independentes em valores codificados).....	46
Figura 24: Efeito bi (a) e tridimensional (b) das variáveis temperatura e pH sobre a atividade específica de MnP (escala das variáveis independentes em valores codificados).	46
Figura 25: <i>Time course</i> para atividade específica de MnP nas condições de cultivo otimizadas.	47
Figura 26: Variação da atividade específica de MnP com o pH reacional.....	49
Figura 27: Variação da atividade específica de MnP com a temperatura reacional.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis independentes e seus níveis.	23
Tabela 2. Ensaio para análise exploratória das condições de cultivo.....	23
Tabela 3: Variáveis independentes e seus níveis para otimização da produção de lacase.....	27
Tabela 4: Ensaio para otimização da produção de lacase	27
Tabela 5: Variáveis independentes e seus níveis para otimização da produção de manganês peroxidase	28
Tabela 6: Ensaio para otimização da produção de manganês peroxidase.....	28
Tabela 7: Resultado da seleção em RBBR.	31
Tabela 8: Resultado da seleção em CMC.	32
Tabela 9: Resultado da atividade enzimática na análise exploratória	34
Tabela 10: Tabela ANOVA para atividade de lignina peroxidase.....	34
Tabela 11: Tabela ANOVA para atividade de manganês peroxidase.	36
Tabela 12: Tabela ANOVA para atividade de lacase.	38
Tabela 13: Tabela ANOVA para atividade de celulase.....	40
Tabela 14: Resultado da atividade de lacase na otimização.....	41
Tabela 15: Tabela ANOVA para otimização da atividade de lacase.	41
Tabela 16: Resultado da atividade de manganês peroxidase na otimização	43
Tabela 17: Tabela ANOVA para atividade específica de manganês peroxidase na otimização	44
Tabela 18: Atividade específica no <i>time course</i> de manganês peroxidase	47
Tabela 19: Atividade de MnP a diferentes valores de pH do meio reacional.....	48
Tabela 20: Atividade de MnP a diferentes temperaturas de reação.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância

ABTS – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ANOVA – Análise de variância

CCMB – Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia

Cel – Celulase

CMC – Carboximetilcelulose

C_{Sm} – Cultura submersa

CSS – Cultivo sobre substrato sólido

DIC – Delineamento inteiramente casualizado

DNS – Ácido-3,5-dinitrosalicílico

EC – Enzyme commission

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO – Food and Agriculture Organization

Lac – Lacase

LAMOL – Laboratório de Biologia Molecular

LAPEM – Laboratório de Pesquisa em Microbiologia

LiP – Lignina peroxidase

MnP – Manganês peroxidase

RBBR – Remazol Brilliant Blue R

U – Unidades de atividade enzimática

UEFS – Universidade Estadual de Feira de Santana

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar

1 INTRODUÇÃO

A celulose é o biopolímero mais abundante na natureza e, junto com hemicelulose e lignina, forma uma complexa estrutura conhecida como ligninocelulose. A lignina, por ser um polímero recalcitrante, protege a celulose contra a biodegradação. Em diversos segmentos da indústria, celulose tem sido utilizada para a obtenção de produtos com alto valor comercial. O processo consiste no uso de glicose como substrato básico para o crescimento e transformação microbiana via fermentação. É o caso de ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas, enzimas e etanol.

O ponto chave da conversão de ligninocelulose a produtos como etanol é a remoção da lignina para possibilitar o acesso à celulose. Isto pode ser alcançado pelo emprego de agentes químicos (ácidos e álcalis), que embora levem a um bom rendimento, podem promover a poluição ambiental por gerar resíduos poluentes, muitas vezes tóxicos. O uso de microorganismo para remover lignina constitui uma alternativa para esta questão.

A biodegradação de lignina pode ser alcançada, principalmente por fungos basidiomicetos de decomposição branca, que secretam três enzimas essenciais para que o processo ocorra: lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase. Essas enzimas são de natureza oxidativa e agem sobre as unidades fenólicas e/ou não-fenólicas da lignina. O uso de enzimas ligninolíticas não está limitado à degradação de lignina e, por serem enzimas não específicas, podem ser empregadas, por exemplo, no tratamento de efluentes têxteis e solos contaminados com organopoluentes.

Como alternativa para reduzir os custos da produção de bioprodutos, principalmente de etanol, surge a substituição dos substratos convencionais por resíduos ligninocelulósicos. O tratamento com fungos basidiomicetos ou suas enzimas ligninolíticas, permite que lignina seja removida e, assim, os polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose) podem ser hidrolisados por celulasas e hemicelulasas, respectivamente. O resultado da hidrólise é a liberação de monossacarídeos fermentáveis, como glicose e xilose.

Este trabalho teve como objetivos selecionar fungos produtores de enzimas

ligninocelulolíticas e otimizar as condições de cultivo sob substrato sólido (casca de coco, bagaço de cana-de-açúcar e fibra de sisal) pra aumentar a secreção das enzimas de interesse.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MATERIAIS LIGNINOCELULÓSICOS

A ligninocelulose é uma estrutura composta de lignina, celulose e hemicelulose, que é depositada na parede dos vegetais e compõe cerca de 60% da biomassa da Terra, além de representar o recurso orgânico renovável mais abundante no solo. A sua biodegradação constitui um dos mais importantes ciclos de carbono na natureza. Nesta estrutura, os polímeros de carboidratos são fortemente ligados à lignina, principalmente por ligações de hidrogênio, mas também por algumas ligações covalentes (LEE, 1997; PÉREZ et al, 2002; TENGARDY & SZAKACS, 2003).

Anualmente são geradas grandes quantidades de resíduos ligninocelulósicos pela agroindústria, que poderiam estar sendo empregados como substratos para conversão microbiana em produtos de valor agregado: enzimas, biocombustíveis e outros produtos bioquímicos. Os bioprodutos obtidos da fermentação de glicose, utilizada como substrato básico para o crescimento microbiano, podem ser teoricamente, obtidos de resíduos ligninocelulósicos, desde que haja a devida conversão dos mesmos a açúcares fermentáveis. Palha de milho, trigo e soja; cascas de tangerina e banana foram utilizadas para produção de enzimas ligninolíticas por fungos (VIKINESWARY et al, 2006; LOPEZ et al, 2007; SONGULASHVILI et al, 2007; SÁNCHEZ, 2009).

2.1.1 Lignina

Lignina é um complexo biopolímero aromático tridimensional, constituído por unidades de *p*-hidroxifenilpropanóides conectadas por ligações carbono – carbono (C–C) e éter (C–O–C), que não são hidrolisáveis sob condições biológicas. O acoplamento dessas unidades não ocorre de maneira regular e

2.1.2 Celulose

Celulose é um polímero linear altamente ordenado, formado por inúmeras unidades de celobiose (dímero composto de unidades de glicose ligadas entre si por ligações glicosídicas β 1-4) que compõe cerca de 50% dos materiais ligninocelulósicos (Figura 2). As cadeias de celobiose podem estar unidas por ligações de hidrogênio formando as regiões cristalinas. As regiões onde as cadeias de celobiose não estão ligadas entre si são conhecidas como amorfas e constituem cerca de 15% do total do polímero (LEE, 1997; FERRAZ, 2004; KOBLITZ, 2008). O acoplamento de cadeias adjacentes de celulose por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals resulta em um alinhamento paralelo e uma estrutura cristalina com fibras estáveis, retas, de grande força tensoativa e baixa acessibilidade (DEMAIN et al, 2005).

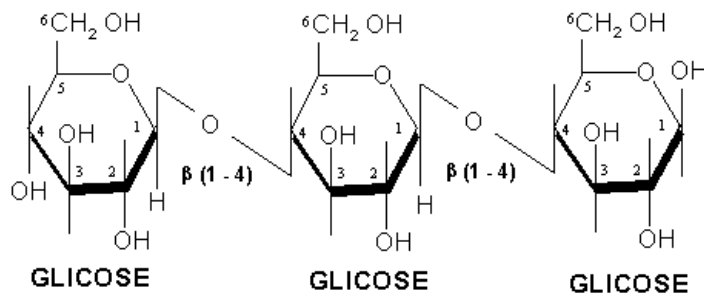


Figura 2: Fórmula estrutural da celulose.

Fonte: <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Launchpad/9071/celulose.gif>

2.1.3 Hemicelulose

Hemicelulose é um polissacarídeo de menor peso molecular que a celulose, formado basicamente de unidades de xilose (por isso também conhecida como xilana) ligadas entre si por ligações β 1-4, contendo ainda os açúcares manose, galactose, glicose, arabinose, e os ácidos 4-O-metil glicurônico, galacturônico e glicurônico (MARTÍNEZ et al, 2005; KOBLITZ, 2008; SÁNCHEZ, 2009).

2.1.4 Casca de coco

A casca de coco (*Cocos nucifera*) constitui um resíduo abundante no Brasil, principalmente na região costeira. O cultivo do coqueiro é uma atividade de grande importância em mais de 86 países. O Brasil produz cerca de 1,5 bilhões de cocos por ano, tendo como principal produtor a região Nordeste, com uma área cultivada de 273.810 ha. Grandes quantidades de água e outros produtos, alimentícios ou não, obtidos do coco são processados e consumidos no Brasil. Este mercado está aumentando e o volume de cascas de coco em algumas áreas do litoral brasileiro corresponde a 60% do volume do lixo doméstico (RODRIGUES & PINTO, 2007; TOMCZAK et al, 2007).

No coco maduro, a carne branca (28%) é protegida por uma concha dura (12%) e uma casca espessa (35%). Essa casca grosseira é tradicionalmente extraída por descascamento e maceração e empregada na produção de cordas, fios, pincéis e estofamento de colchão. Contudo, a produtividade estimada em 700.000 ton. por ano corresponde apenas a uma fração das 20 milhões de toneladas de casca provenientes de 50 milhões de toneladas de coco produzidos anualmente em todo o mundo (van DAM, 2004). Uma vez que boa parte da casca disponível não está sendo utilizada, é interessante que novas alternativas para o aproveitamento deste material sejam propostas e empregadas.

A composição da casca do coco é de 21,22 a 24,04 % de celulose; 8,10 a 17,28% de hemicelulose e 43,11 a 49,89 % de lignina (BILBA et al, 2007).

2.1.5 Bagaço de cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) superando a marca de 387 milhões de toneladas por ano. A cana é plantada no Centro-Sul e no Norte-Nordeste em períodos alternados, o que possibilita a produção de açúcar, álcool anidro (aditivo para gasolina) e álcool hidratado, durante todo o ano, para os mercados interno e externo, com diferentes preços e demandas (UNICA, 2007).

Na produção de álcool a partir de cana-de-açúcar o bagaço é usado como combustível da fornalha nas usinas, mas cerca de 20% do bagaço não é

aproveitado. Sua composição gira em torno de 19-24% de lignina, 27-32% de hemicelulose e 32-44% de celulose, a qual pode ser utilizada na produção de mais álcool (UNICA, 2007; SÁNCHEZ, 2009). Anualmente são gerados 317-380 x 10⁶ ton. de bagaço de cana provenientes de diferentes fontes agrícolas (PORTAL AGRARIO, 2005).

2.1.6 Fibra de sisal

A cultura do sisal (*Agave sisalana*) é de grande importância para a economia do setor agrícola nordestino, principalmente porque gera renda e emprego para mais de 800 mil pessoas. A Bahia é o maior produtor de sisal detendo 95% da produção da fibra nacional. Apesar disso, nos últimos anos tem havido um declínio da área plantada, sobretudo por causa do baixo aproveitamento da planta: cerca de 3 a 4%, referentes à porção da fibra. Ainda assim, é uma das poucas opções econômicas e um dos principais agentes de fixação do homem à região semi-árida, sendo imprescindível garantir a sua continuidade, realizar estudos capazes de estimular a produção e promover o progresso tecnológico (EMBRAPA, 2006).

A cada ano, são geradas 77.000 a 930.000 ton. de resíduos fibrosos de sisal (FAO-esc, 2008). A fibra é empregada na produção de fios, barbantes, cordas, tapetes, sacos, bolsas, chapéus e artesanato, porém as fibras mais curtas não têm aproveitamento na fabricação desses produtos (EMBRAPA, 2006). A composição da fibra de sisal é de 7-9% de lignina, 21-24%, hemicelulose e 43-56% de celulose, constituindo um potencial substrato para a obtenção de bioprodutos de celulose (STEWART et al, 1997).

2.2 CONVERSÃO BIOLÓGICA DE BIOMASSA LIGNINOCELULÓSICA

O processo biológico para a conversão de resíduos ligninocelulósicos a produtos de alto valor requer: (1) pré-tratamento de delignificação (mecânico, químico ou biológico) para liberar celulose e hemicelulose do seu complexo com a lignina, (2) despolimerização ou hidrólise dos polímeros de carboidratos para produzir moléculas metabolizáveis (açúcares livres como pentoses e hexoses), (3) uso dessas moléculas para sustentar o crescimento microbiano ou obter produtos químicos e (4) separação e purificação, como é feito, por exemplo, na produção de enzimas. O processo de delignificação da matéria-prima ligninocelulósica é considerado o mais difícil a ser resolvido, sendo o limitante da conversão (LEE, 1997; MIETTINEN-ORINONEN & SUOMINEN, 2002; SUN & CHENG, 2005; VALÁŠKOVÁ et al, 2007; VARGAS-GARCÍA et al, 2007).

2.2.1 Delignificação por fungos basidiomicetos

A delignificação consiste em remover a lignina do complexo para disponibilizar os polímeros de carboidratos, o que pode ser alcançado por método químico, físico ou biológico. O processo biológico, que apresenta a vantagem de produzir subprodutos potencialmente úteis e gerar resíduos mínimos, é realizado principalmente por certos fungos filamentosos: os basidiomicetos (ZIMBARDI et al, 1999; SUN & CHENG, 2005; HAMMEL & CULLEN, 2008).

Os fungos basidiomicetos são um amplo grupo com mais de 30.000 espécies, que inclui cogumelos comestíveis e venenosos e orelhas de pau (Figura 3). Muitos deles são saprófitos e estão envolvidos na degradação da madeira (ex: *Trametes villosa*, *Ganoderma australe* e *Phellinus gilvus*), desempenhando um papel vital na reciclagem de nutrientes (LOGUERCIO-LEITE, 2004; WEBSTER & WEBER, 2007). O grupo inclui fungos de decomposição marrom/parda e os de decomposição branca, os quais são os únicos micro-organismos capazes de degradar eficientemente e mineralizar a lignina a CO₂ e água. Esta habilidade está associada com o crescimento micelial, que permite ao fungo transportar nutrientes escassos como nitrogênio e ferro dentro do substrato ligninocelulósico (pobre em nutrientes) usado como fonte de carbono (TENGERDY & SZAKACS,

2003; FERRAZ, 2004; EICHLEROVÁ et al, 2005; HAKALA et al, 2005; KAPICH et al, 2005a; SÁNCHEZ, 2009).



Figura 3: Ilustração de alguns fungos basidiomicetos.
 a) *Trametes villosa*; b) *Pycnoporus sanguineus*; c) *Polyporus virgatus*; d) *Stiptophyllum erubescens*; e) *Lentinus crinitus* e f) *Rigdoporus ulmarius*
 Fonte: <http://www.ccb.ufsc.br/bot/micologia/fotos.htm>

Devido à natureza e tamanho da molécula de lignina, as enzimas responsáveis pelo ataque inicial devem ser extracelulares e não específicas. Os basidiomicetos de decomposição branca têm dois sistemas enzimáticos extracelulares: hidrolítico, responsável pela hidrólise de polissacarídeos, e sistema oxidativo, que promove a degradação de lignina (TUOMELLA et al, 2000; JÖRGENSEN et al, 2003). Estes fungos produzem todas ou algumas das principais enzimas extracelulares, que compõem o sistema oxidativo: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase. Estas enzimas possuem forte atividade oxidativa e baixa especificidade de substrato, motivo pelo qual são capazes de degradar uma variedade de poluentes ambientais como corantes azos e detoxificar compostos xenobióticos (BABOROVÁ et al, 2006; XIAOBIN et al, 2007). Os mecanismos de ação dessas enzimas têm sido estabelecidos de forma consideravelmente precisa (MARTÍNEZ, 2002; KAPICH et al, 2004; PALMIERI et al, 2005; ELISASHIVILI et al, 2007). A Figura 4 representa o processo de biodegradação da lignina por fungos basidiomicetos de decomposição branca.

2006); *Schizophyllum* sp. (XIAOBIN et al, 2007), *Trametes villosa* (BUKH et al, 2006; AHNA et al, 2007), *Pleurotus sajor-caju* (REDDY et al 2003; KAMIDA et al, 2005), *Ganoderma* spp. (SILVA et al, 2005), *Pycnoporus sanguineus* (VIKINESWARY et al, 2006), *Pycnoporus cinnabarinus* (MEZA et al, 2005), *Quercus petraea* (VALÁŠKOVÁ et al, 2007); *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinatum* e *Pleurotus calyptratus* (EICHLEROVÁ et al, 2005).

Os sistemas ligninolíticos têm sido extensivamente estudados nos últimos anos e os pesquisadores concordam que o tipo e a composição do substrato parecem determinar a quantidade de enzimas produzidas pelos basidiomicetos (MOREDO et al, 2003; SUN et al, 2004; CHRISTIAN et al, 2005; SILVA, et al 2005). Além disso, temperatura, pH, fonte de carbono e nitrogênio afetam o crescimento do fungo, sendo o baixo conteúdo de nitrogênio freqüentemente considerado um pré-requisito para a degradação de lignina, pois em condições deficientes de nutrientes, a atividade ligninolítica aparece como forma de metabolismo secundário (TUOMELA et al, 2000; SONGULASHVILI et al, 2007).

Segundo Songulashvili (2007), é necessário explorar mais micro-organismos e substratos ligninocelulósicos com diferentes composições para avaliar o verdadeiro potencial da produção de enzimas ligninolíticas por fungos.

2.2.1.1 Lignina peroxidase (LiP)

A LiP (EC 1.11.1.14) é uma glicoproteína extracelular com massa molar de 38 a 43 KDa que possui um grupo prostético heme. A estrutura tridimensional de uma LiP aparece na Figura 5. Esta enzima foi identificada primeiramente em *Phanerochaete chrysosporium* (GLENN et al, 1983; TIEN & KIRK, 1983; KUWAHARA et al, 1984). A LiP é capaz de degradar unidades fenólicas e não fenólicas da lignina (mais de 90% do polímero). Reações da LiP com H₂O₂ geram um radical cátion com alto potencial redox que pode extrair um elétron do anel aromático na lignina para gerar radicais catiônicos aromáticos. Este mecanismo leva à oxidação de alcoóis benzílicos; quebra de cadeias aromáticas laterais C α -C β ; rearranjos intramoleculares, entre outros. Na presença de peróxido de

A MnP (EC 1.11.1.13) é uma glicoproteína extracelular que contém um grupo prostético heme e cujo peso molecular varia de 45 a 47 KDa, cuja estrutura tridimensional é mostrada na Figura 7. O ciclo catalítico de MnP depende da presença de H_2O_2 e Mn^{+2} , que é oxidado a Mn^{+3} . Para estabilizar a formação de Mn^{+3} , é necessário um quelante orgânico, como lactato, malato, oxalato ou malonato, formando um complexo oxidante ativo. O propósito desta reação é evidentemente transferir o poder oxidante de MnP para um mediador de baixo peso molecular que pode se difundir dentro da parede celular lignificada e atacar a partir dela. Essa é uma característica interessante da ação de MnP, já que a ligninocelulose intacta possui permeabilidade muito baixa. Por oxidar não especificamente uma variedade de substâncias fenólicas e não fenólicas, além de lignina, a MnP pode degradar também diversos poluentes tóxicos. Atualmente, a MnP é considerada a enzima chave na degradação de lignina e é produzida pela maioria dos fungos, mais freqüentemente que LiP, e sua produção por esses organismos depende de fatores ambientais, sendo fortemente regulada pelos nutrientes. (CASTILLO et al, 1993; GOLD et al, 2000; HOFRICHTER et al, 2001; DÚRAN, 2004; HAKALA et al, 2005; KAPICH et al, 2005a; ROGALSKI et al, 2006; XIAOBIN et al, 2007; HAMMEL & CULLEN, 2008). Hofrichter et al (2001) encontram uma MnP produzida por *Phlebia radiata* que foi capaz de mineralizar lignina sintética a CO_2 e causar a fragmentação de madeira macia moída na presença de ácidos orgânicos e lipídios insaturados.

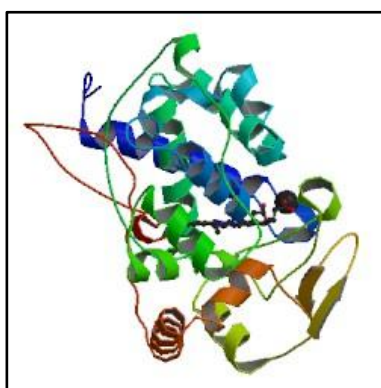


Figura 7: Estrutura tridimensional de manganes peroxidase de basidiomiceto.
Fonte: http://www.px.nsls.bnl.gov/mailin/images//2icv_bio_r_250.jpg

2.2.1.3 Lacases

Lacases (EC 1.10.3.3) são fenoloxidasas com massa molar na faixa de 60 a 100 KDa, que contém três átomos de cobre no seu sítio ativo (Figura 8). Devido ao seu baixo potencial redox realizam a oxidação direta apenas de unidades fenólicas da lignina, as quais freqüentemente compõem menos de 10% do polímero total, contudo, na presença de mediadores de baixo peso molecular, como hidroxibenzotriazol, pode também degradar unidades não fenólicas. Essas enzimas catalisam a oxidação um elétron de quatro moléculas, seja de um portador redox ou do próprio substrato final, reduzindo quatro oxigênio molecular (O_2) a água (H_2O). O papel preciso das lacases na degradação de lignina ainda não foi completamente esclarecido, contudo se deduz ser importante, pois é produzida por quase todos os fungos de decomposição branca e em alguns deles, como *Pycnoporus cinnabarinus*, é a única enzima ligninolítica presente. As lacases apresentam atividade de p-difenol-oxirredutases, cujo resultado das reações são quinonas, as quais, por serem altamente reativas, combinam-se entre si gerando produtos de condensação de alto peso molecular e cor escura, as chamadas melaninas (SILVA et al, 2004; HAKALA et al, 2005; MARTÍNEZ et al, 2005; BUKH et al, 2006; AHNA et al, 2007; WEBSTER & WEBER, 2007; ALENCAR & KOBLITZ, 2008; SÁNCHEZ, 2009).

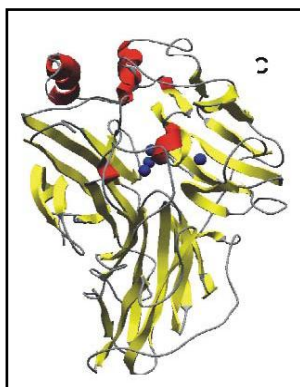


Figura 8: Estrutura cristalina de lacase ativa com os três cobres catalíticos.
Fonte: MARTÍNEZ et al, 2005

2.3 HIDRÓLISE DOS POLÍMEROS DE CARBOIDRATOS

A presença da barreira de lignina nas células vegetais dificulta o acesso das enzimas às fibras de celulose, mas, uma vez que a lignina é degradada, os

carboidratos podem ser despolimerizados. Quatro enzimas estão envolvidas na degradação completa de celulose a glicose: endoglicanases (carboximetilcelulases), celobiohidrolases (exoglicanases), celobiasas (β -glicosidase) e glico-hidrolases. A biodegradação de hemicelulose envolve mais enzimas que a da celulose, devido à maior heterogeneidade. As principais enzimas envolvidas são: endo-1,4- β -xilanaase e xilana 1,4- β -xilosidase. Para a hidrólise eficiente de hemicelulose, outras enzimas agem sinergicamente: xilana esterases, ferúlico e p-cumaril esterase, α -1,4-arabinofuranosidases e α -4-O-metil glicuronosidases (RABINOVICH et al, 2002; RUEGGER & TAUKE-TORNISIELO, 2003; NIRANJANE et al, 2007). Na natureza, uma série de micro-organismos é capaz de produzir essas enzimas, incluindo fungos basidiomicetos de decomposição branca: *Fomitopsis palustris*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* e *Trametes versicolor* (AGUIAR, 2001; DUMONCEAUX et al, 2001; MARNYYE et al, 2002; MÁRQUEZ et al, 2007).

2.3.1 Celulases

2.3.1.1 Endo-1,4- β -D-glicanases (EC 3.2.1.4)

Estas enzimas iniciam o ataque randomicamente em múltiplos locais internos em regiões amorfas da fibra de celulose, que libera oligossacarídeos β -1,4 e abre locais para o subsequente ataque por celobiohidrolases. Glicanases capazes de atacar celulose cristalina são raras e apresentam ação muito lenta (VALÁŠKOVÁ et al, 2007; KOBLITZ, 2008;).

2.3.1.2. Exo-1,4- β -D-glicanases (EC 3.2.1.91)

É o principal componente do sistema celulolítico dos fungos (cerca de 40 a 70% das proteínas com atividade celulolítica) e pode hidrolisar celulose altamente cristalina, a partir da extremidade, liberando dímeros (celobiose) e monômeros (glicose) (RABINOVICH et al, 2002; VALÁŠKOVÁ et al, 2007; KOBLITZ, 2008).

2.3.1.3 β -glicosidases (EC 3.2.1.21)

Estas enzimas hidrolisam a celobiose e em alguns casos oligossacarídeos β -1,4 a glicose (RABINOVICH et al, 2002; VALÁŠKOVÁ et al, 2007; KOBLITZ, 2008).

2.3.1.4 Glico-hidrolases (EC 3.2.1.74)

Removem unidades de glicose da extremidade de polímeros e oligômeros de alto peso molecular (KOBLITZ, 2008).

2.3.2 Hemicelulases

Hemicelulases ou xilanases são enzimas hidrolíticas capazes de romper a ligação β 1-4 entre as unidades de xilose. As endoxilanases agem de forma desordenada liberando xilano-oligossacarídeos e as exo-xilanases rompem as ligações a partir da extremidade gerando unidades de xilose (VALÁŠKOVÁ et al, 2007; KOBLITZ, 2008).

2.4 CULTIVO SOBRE SUBSTRATO SÓLIDO (CSS) NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Cultivo sobre substrato sólido (CSS) é geralmente definido como o crescimento de micro-organismos sobre substrato sólido na ausência ou quase ausência de água livre, onde o sólido atua tanto como suporte físico quanto como fonte de nutrientes. Essa forma apresenta inúmeras vantagens em relação ao cultivo submerso (CSm) na produção de enzimas: é um processo estático sem a necessidade de consumo de energia mecânica; tem melhor circulação de oxigênio, podem ser utilizados meios de baixo custo, a tecnologia é simples e permite a reprodução do habitat natural dos micro-organismos, além de apresentar maior produtividade (COUTO & SANROMÁN, 2006; WINQUIST et al, 2008). Recentemente, dos Santos et al (2004) apontaram que o CSS é o melhor sistema para a produção de enzimas. Fujian et al (2001) observaram que a atividade de MnP em *Phanerochaete chrysosporium* cultivado sobre palha tratada por explosão a vapor, foi muito maior em cultura sólida do que em cultura submersa. Elisashvili et al (2007) encontram que o CSS favoreceu a produção de MnP, enquanto o CSm diminuiu ou inibiu a secreção desta enzima por *Lentinus edodes* e várias espécies de *Pleurotus*.

O cultivo em estado sólido de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phanerochaete chrysosporium* sobre madeira apresentou uma composição de isoformas de LiP e MnP, diferente da que foi encontrada anteriormente em cultura líquida. Uma vez que muitas isoformas são claramente expressas apenas sob estado sólido, é importante estudar a produção enzimática nessas condições, a fim de elucidar o papel das enzimas ligninolíticas durante a degradação seletiva de lignina (LOBOS et al, 1994; HAKALA et al, 2005).

2.5 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS NA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS

A otimização dos parâmetros físico-químicos é fundamental em qualquer processo de fermentação. Delineamentos estatísticos experimentais constituem uma poderosa ferramenta para uma avaliação rápida dos fatores-chave num sistema multivariável e são vastamente utilizados na biotecnologia para

otimização da composição de meios, fermentações e processamento de alimentos (GRIZOTTO et al, 2005; NILADEVI et al, 2009; TAVARES et al, 2009). Num planejamento fatorial em dois níveis é possível verificar quais fatores exercem efeitos estatisticamente significativos sobre um dado processo, e estes podem ser posteriormente otimizados utilizando-se uma metodologia de superfície de resposta.

2.5.1 Planejamento fatorial em dois níveis ($2^{(k-p)}$)

Em muitos casos é suficiente considerar os fatores que afetam um processo de produção em dois níveis. Por exemplo, a temperatura de um processo químico pode ser fixada a um nível mais baixo ou mais alto que o usual. Para determinar se alguma dessas alterações afeta os resultados, uma técnica intuitiva é variar os fatores de interesse num planejamento fatorial completo, que consiste em testar todas as combinações possíveis, variando-se os níveis de uma variável independente, enquanto as outras variáveis são fixadas a um dado nível. Embora possibilite conclusões amplas sobre os fatores, o número necessário de observações experimentais (ensaios) aumentará de forma geométrica. Por exemplo, para avaliar os efeitos de sete fatores, o número de ensaios será $2^7=128$. Para estudar 10 fatores o número aumenta para 1.024 (2^{10}). Como cada ensaio exige tempo e custo, é freqüentemente inviável utilizar muitos ensaios diferentes num experimento. Além disso, a análise estatística se torna muito trabalhosa. Nessas condições, fatoriais incompletos são usados com perda de efeitos das interações, porém os efeitos principais podem ser corretamente calculados (BOX et al, 1978).

Experimentos fatoriais de dois níveis implicam assumir que o efeito desses fatores sobre a variável dependente de interesse seja linear. Não sendo possível neste caso, avaliar se existe um componente não linear (por exemplo, quadrático) na relação entre um fator e a variável dependente.

Se existe uma suspeita de que a relação entre os fatores vai além de uma curva linear, então se deve incluir um ou mais ensaios, onde todos os fatores são

fixados a um ponto médio, sendo chamados pontos centrais, cujo valor é a média dos valores alto e baixo.

A simplicidade desses experimentos é sua principal falha, pois na maioria dos casos a relação entre as variáveis tem caráter não-linear. A inclusão de pontos centrais pode detectar este tipo de comportamento, porém ainda assim, não é possível ajustar modelos não lineares explícitos com experimentos $2^{(k-p)}$. Para tanto, é utilizado planejamento composto central.

2.5.2 Planejamento composto central e superfície de resposta não-fatorial

O planejamento $2^{(k-p)}$ requer que os fatores sejam fixados em dois níveis. Em muitos casos, ele não é viável porque, por exemplo, algumas combinações de fatores são restringidas de algum modo (ex. fatores A e B não podem ser fixados em seus altos níveis simultaneamente). Além disso, é freqüentemente desejado explorar regiões experimentais de interesse em pontos particulares que não podem ser representados pelo experimento fatorial. O planejamento composto central gera uma estimativa de superfície de resposta, seguindo a seguinte equação geral:

$$y = \beta_0 + \beta_1 * x_1 + \dots + \beta_k * x_k + \beta_{12} * x_1 * x_2 + \beta_{13} * x_1 * x_3 + \dots + \beta_{k-1,k} * x_{k-1} * x_k + \beta_{11} * x_1^2 + \dots + \beta_{kk} * x_k^2$$

Equação I

Este é o modelo ajustado para os valores observados da variável independente y , que inclui: os efeitos principais dos fatores (x_1, \dots, x_k); suas interações ($x_1 * x_2, x_1 * x_3, \dots, x_{k-1} * x_k$); e seus componentes quadráticos (x_1^2, \dots, x_k^2).

A forma da superfície de resposta global pode ser melhor resumida em gráficos. É possível plotar gráficos de contorno (curvas de nível) ou superfície de resposta (KHURI & CORNELL, 1987).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DOS FUNGOS

Um total de catorze fungos isolados da região do semi-árido baiano, pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB), localizada no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), foi utilizado para o teste de atividade enzimática. Os fungos, que tratam de basidiomicetos de decomposição branca, foram ativados em meio Ágar-Extrato de Malte e Levedura (ANEXO I). O inóculo por placa consistiu de três grãos de trigo contendo micélio. As placas foram incubadas em estufa tipo B.O.D a 28°C por sete dias. Após esse período, foi observado o crescimento dos fungos, posteriormente conservados a 4°C. Os repiques foram feitos a cada três meses em duplicata.

3.2 SELEÇÃO DOS FUNGOS SECRETORES DAS ENZIMAS DE INTERESSE

A seleção foi realizada para atividade de ligninases e celulases.

3.2.1 Ligninases

Para identificação da produção de ligninases, *plugs* (8 mm) dos fungos com sete dias de crescimento foram inoculados em placas de Petri contendo meio estéril composto por ágar-ágar e corante Azul Brilhante de Remazol R (RBBR) a 0,02% (ANEXO I) e incubados em estufa B.O.D a 28°C por 168 h. A atividade enzimática foi evidenciada pelo desaparecimento da cor azul concomitante ao crescimento micelial. O halo de descoloração foi medido em centímetros com

régua comum e os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott no programa estatístico Sisvar (5.0) para identificar a existência de diferenças significativas entre as médias, utilizando três replicatas para cada fungo. Os procedimentos de incubação descritos neste trabalho foram feitos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) para que todos os tratamentos tivessem a mesma probabilidade de serem designados a qualquer uma das parcelas experimentais. A Figura 9 ilustra um esquema da seleção em RBBR.

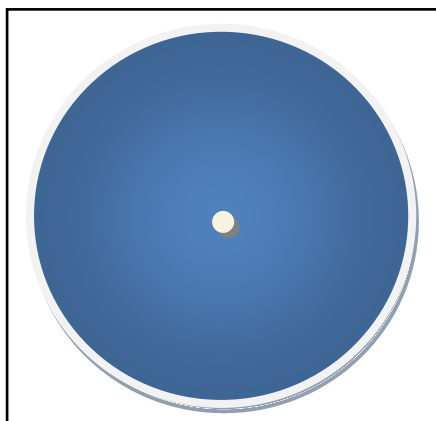


Figura 9: Esquema da incubação em meio contendo RBBR

3.2.2 Celulase

A seleção dos produtores de celulase constitui de duas etapas: 1) indução em meio líquido e 2) caracterização da atividade enzimática em meio sólido utilizando a metodologia *Cup plate* (modificada de DINGLE et al, 1953).

Os fungos foram induzidos em meio líquido constituído de 0,7% de fosfato de amônio, 0,15% de fosfato dibásico de potássio, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,03 % de cloreto de cálcio, 0,25 % de solução de traços de sais (sulfato ferroso 0,1%; cloreto manganoso 0,1%; sulfato de zinco 0,1% em água destilada) e 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) em água destilada. O pH foi ajustado para 7,0, usando solução de hidróxido de sódio 0,1M (NaOH) e o meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Três *plugs* (8 mm) foram transferidos para frascos de 250mL, contendo 25mL do meio líquido de indução estéril. A indução ocorreu por sete dias em estufa B.O.D. a 28°C. Os ensaios foram realizados em triplicata e um controle sem fungo também foi testado.

Após o período de indução, os fungos foram caracterizados em meio sólido constituído de 1,0% de CMC, 2,0% de ágar-ágar e água destilada, tendo o pH ajustado para 7,0-7,4, com NaOH 0,1 M. O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e depois de solidificado, foram feitos poços nas placas (*cups*), usando ponteiros com diâmetro de 8 mm. Cada placa possuía nove furos, divididos em três seções, com três furos cada, permitindo trabalhar com triplicatas de cada uma das replicatas do meio de indução (Figura 10). Um volume de 150µL do meio líquido, onde o micro-organismo foi induzido, foi transferido para o poço da placa de caracterização, usando pipeta automática com ponteiros estéreis. As placas foram então incubadas por 24 horas em estufa a 37°C. Para a revelação do halo de descoloração, solução de vermelho congo a 0,025% em tampão fosfato pH 8,0 foi adicionada a cada placa, as quais foram lavadas com solução de cloreto de sódio 0,5 M no mesmo pH. A atividade enzimática foi evidenciada pelo surgimento de halo ao redor do ponto de aplicação, medido em centímetros com uma régua comum. Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott no programa estatístico Sisvar (5.0) para identificar a existência de diferenças significativas entre as médias.

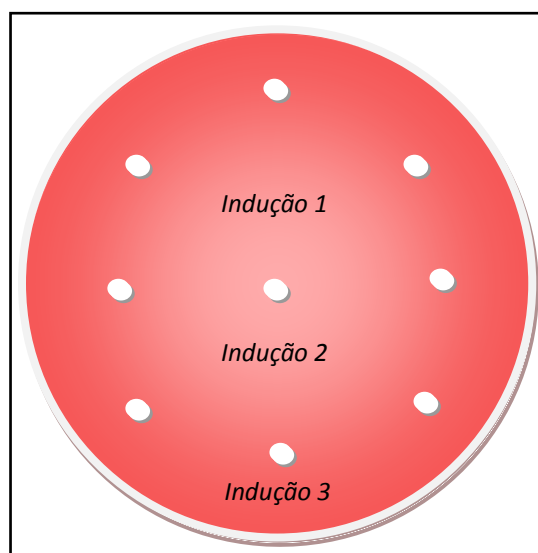


Figura 10: Representação esquemática da caracterização.
Cada seção é a triplicata de uma replicata da indução.

3.3 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO POR PLANEJAMENTO MULTIVARIÁVEL

A partir da seleção realizada entre os catorze fungos, aquele que apresentou melhor resultado para as duas classes de enzimas foi utilizado nas análises subseqüentes.

Para determinação das condições de cultivo que melhor favorecem a secreção de lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacase e celulase, pelo micro-organismo selecionado, foi utilizado um delineamento fatorial completo 2^3 . As três variáveis independentes foram avaliadas em dois níveis com adição de três pontos centrais. A Tabela 1 apresenta as variáveis independentes e seus níveis. Na Tabela 2 pode ser vista a planilha de ensaios gerada pelo software Statistica (6.0). As variáveis dependentes (respostas) foram: atividade de lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacase e celulase expressas em U.

Tabela 1. Variáveis independentes e seus níveis.

Variável	+1	0	-1
Substrato	Coco	Cana	Sisal
Tempo (dias)	21	14	7
pH	10,0	7,0	4,0

Tabela 2. Ensaios para análise exploratória das condições de cultivo.

Ensaio	Substrato	tempo	pH
1	Coco	21	10,0
2	Coco	21	4,0
3	Coco	7	10,0
4	Coco	7	4,0
5	Sisal	21	10,0
6	Sisal	21	4,0
7	Sisal	7	10,0
8	Sisal	7	4,0
9 (C)*	Cana	14	7,0
10 (C)	Cana	14	7,0
11 (C)	Cana	14	7,0

*C representa os pontos centrais

As condições fixas utilizadas foram frascos *Erlenmeyer* (250 mL) contendo 20 g de substrato com 80% de umidade, inóculo de cinco grãos de trigo contendo

micélio com sete dias de crescimento e temperatura de incubação de 28°C. A umidade dos substratos foi determinada pelo método gravimétrico em estufa a 105°C e ajustada para o valor desejado com tampão no pH correspondente ao indicado na planilha para cada ensaio. O meio sólido foi autoclavado a 121°C por 15 minutos antes de ser inoculado.

Após o tempo de cultivo, definido pela planilha, os ensaios foram retirados para extração aquosa das enzimas. O método consistiu da adição de 50 mL de água gelada ao meio, que permaneceu em banho de gelo por uma hora, com a agitação ocasional (maceração). O conteúdo foi, então, filtrado em gaze e os extratos obtidos foram separados em alíquotas e congelados para posterior determinação da atividade enzimática.

3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE INTERESSE

Para determinação da atividade de ligninases, o extrato bruto enzimático foi centrifugado a 4°C e 5000 g por 10 minutos. O branco consistiu de extrato fervido antes da centrifugação. A atividade de cada enzima foi determinada e os resultados foram tratados no software Statistica (6.0).

A atividade de ligninases $\left(\frac{U}{L}\right)$ foi calculada por:

$$\frac{\Delta (Abs) \times 10^6}{\varepsilon \times R \times t}$$

Equação II

Onde:

ΔAbs é a diferença entre a absorbância dos extratos fervido e não fervido (branco e teste) nos tempos 0 e 5 minutos;

ε é o coeficiente de extinção $\left(\frac{L}{m \times cm}\right)$: LiP= 9300, MnP= 4460 e lacase= 65000;

R é alíquota de sobrenadante (do extrato bruto centrifugado) (μL); e

t é o tempo de reação (min).

3.4.1 Atividade de lignina peroxidase

A atividade de lignina peroxidase foi determinada pela peroxidação de álcool veratrílico em presença de peróxido de hidrogênio, segundo Tien & Kirk, (1983). O meio reacional foi composto de: 600 µL de sobrenadante do extrato centrifugado, 200 µL de álcool veratrílico (2,0 mM) em tampão tartarato de sódio (0,4 M; pH 3,0) e 200 µL de peróxido de hidrogênio (2,0 mM). A formação de aldeído veratrílico foi acompanhada pela leitura da absorbância a 310 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50 Varian) por cinco minutos, sendo registrada a cada 10 segundos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.2 Atividade de manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidase foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol na presença de peróxido de hidrogênio, segundo metodologia modificada de Kuwahara et al (1984). O meio reacional foi composto de: 500 µL de sobrenadante do extrato centrifugado, 50 µL de sulfato de manganês (2,0 mM), 200 µL de albumina bovina (0,5%), 50 µL de peróxido de hidrogênio (2mM) em tampão succinato de sódio (0,2 M; pH 4,5), 100 µL de lactato de sódio (0,25 M), 100 µL de vermelho de fenol (0,01%). A reação foi acompanhada pela leitura da absorbância a 610 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50 Varian), registrada a cada 10 segundos num tempo total de cinco minutos, e paralisada com 40 µL solução de hidróxido de sódio (2,0 M). Após a paralisação, a absorbância foi acompanhada por mais um minuto. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.3 Atividade de lacase

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação de siringaldazina,

segundo metodologia modificada de Szklarz (1989). O meio reacional foi composto de: 600 μ L de sobrenadante do extrato centrifugado, 200 μ L de tampão citrato-fosfato (0,05 M; pH 5,0), 100 μ L de água destilada e 100 μ L de siringaldazina (2mM) em etanol (0,1%). A formação do produto de reação foi acompanhada pela leitura da absorbância a 525 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Cary 50 Varian) por cinco minutos, sendo registrada a cada 10 segundos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.4 Atividade de celulase

A atividade de celulase foi determinada pela hidrólise de carboximetilcelulose e a quantificação da glicose liberada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), segundo metodologia modificada de LOPEZ et al, 2007. O meio reacional constitui-se de: 4,5 mL de solução de CMC (0,5%) em tampão acetato (0,05 M; pH 5,0) e 0,5 mL do extrato enzimático. A reação foi conduzida em banho de agitação a 40°C, por 30 minutos. Para o branco, o extrato enzimático foi adicionado após o tempo de reação e deixado em ebulição por 5 minutos. Alíquotas de 1,5 mL deste meio reacional foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos. Para quantificar a glicose liberada, 0,5 mL de DNS e 0,5 mL do sobrenadante reagiram a 100°C em banho de ebulição por 5 minutos em tubos de ensaio. A cada tubo foram adicionados 5 mL de água destilada, procedendo-se a homogeneização. A glicose (açúcar redutor) reduz o DNS a ácido 3,5 amino-nitrosalicílico, cuja formação foi verificada a 540 nm em espectrofotômetro UV-Vis. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose, por unidade de tempo, nas condições de reação. A concentração de glicose foi determinada por curva padrão (ANEXO I). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE LACASE E MANGANÊS PEROXIDASE

Após a análise exploratória, com base nos resultados apresentados pelo *software* Statistica (6.0), foram montados dois novos experimentos para otimizar a produção de lacase e manganês peroxidase.

3.5.1 Otimização para lacase

Na otimização das condições de cultivo para a produção de lacase, foi montado um experimento composto central tendo como variáveis independentes a temperatura e a umidade em cinco níveis (Tabela 3), de acordo com planilha de ensaios gerada pelo *software* Statistica (6.0) (Tabela 4). As condições fixas utilizadas foram frascos *Erlenmeyer* (250 mL) contendo 20 g de casca de coco; inóculo de cinco grãos de trigo contendo micélio com sete dias de crescimento pH 7,0 e tempo de cultivo de 7 dias. A obtenção do extrato bruto e determinação da atividade enzimática foram realizadas conforme descrito nos itens 3.3. e 3.4.3, respectivamente.

Tabela 3: Variáveis independentes e seus níveis para otimização da produção de lacase

Variável	$-\alpha (-1,41)^*$	-1	0	+1	$+\alpha (+1,41)$
Temperatura (°C)	20	22,5	28	33,5	36
Umidade (%)	70	73	80	87	90

*valor de α para experimentos com duas variáveis independentes

Tabela 4: Ensaios para otimização da produção de lacase

Ensaio	Temperatura (°C)	Umidade (%)
1	22,5	73
2	22,5	87
3	33,5	73
4	33,5	87
5	20,0	80
6	36,0	80
7	28,0	70
8	28,0	90
9 (C)*	28,0	80
10 (C)	28,0	80
11 (C)	28,0	80
12 (C)	28,0	80

*C representa os pontos centrais

3.5.2 Otimização para manganês peroxidase

Na otimização das condições de cultivo para a produção de manganês peroxidase, foi montado um experimento composto central tendo como variáveis independentes temperatura, umidade e pH em cinco níveis (Tabela 5), de acordo com planilha de ensaios gerada pelo *software* Statistica (6.0) (Tabela 6).

Tabela 5: Variáveis independentes e seus níveis para otimização da produção de manganês peroxidase

Variável	$-\alpha(-1,68)^*$	-1	0	+1	$+\alpha(+1,68)$
Temperatura (°C)	20	23	28	33	36
Umidade (%)	70	74	80	86	90
pH	3,0	4,62	7,0	9,38	11,0

*valor de α para experimentos com duas variáveis independentes

Tabela 6: Ensaios para otimização da produção de manganês peroxidase

Ensaio	Temperatura (°C)	Umidade (%)	pH
1	23	74	4,6
2	23	74	9,4
3	23	86	4,6
4	23	86	9,4
5	33	74	4,6
6	33	74	9,4
7	33	86	4,6
8	33	86	9,4
9	20	80	7,0
10	36	80	7,0
11	28	70	7,0
12	28	90	7,0
13	28	80	3,0
14	28	80	11,0
15 (C)*	28	80	7,0
16 (C)	28	80	7,0
17 (C)	28	80	7,0
18 (C)	28	80	7,0

*C representa os pontos centrais

As condições fixas utilizadas foram frascos *Erlenmeyer* (250 ml) contendo 20 g de bagaço de cana, inóculo de cinco grãos de trigo contendo micélio com sete dias de crescimento e tempo de cultivo de 14 dias. A obtenção do extrato bruto e determinação da atividade enzimática foram realizadas conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4.2, respectivamente.

3.6 CÁLCULO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA

O teor de proteína bruta das amostras obtidas nos experimentos de otimização para manganês peroxidase foi determinado pelo método de Lowry. O método consistiu na reação de 500 μL do extrato bruto enzimático com 5 mL do reagente de Lowry por 10 minutos. Então, 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteu foram adicionados e, após 10 minutos, procedeu-se à leitura da absorbância a 660 nm, em espectrofotômetro (UV-Vis). A atividade específica foi calculada pelo quociente da atividade enzimática pelo teor de proteína bruta do extrato. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.7 TIME COURSE PARA MANGANÊS PEROXIDASE

De acordo com os resultados obtidos após avaliação estatística dos experimentos de otimização, foi montado um experimento designado *time course* com a finalidade de verificar a influência do tempo de cultivo, nas condições otimizadas, sobre a secreção das enzimas de interesse. A atividade enzimática foi determinada a 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de crescimento do fungo em frascos de *Erlenmeyer* (250 mL) contendo 20 g de bagaço de cana com 80% de umidade e pH 9,38 incubados a 20°C em estufa tipo B.O.D.. O cultivo foi realizado em duplicata e a atividade enzimática em triplicata. A atividade específica foi determinada pela metodologia descrita na seção 3.6.

3.8 DETERMINAÇÃO DO VALOR DE PH ÓTIMO

O pH ótimo foi avaliado pela variação do pH do meio reacional de 3,0 a 11,0, com intervalo de 1,0, incluindo o pH 4,5 utilizado na metodologia de detecção. A atividade enzimática e específica foi determinada conforme

apresentado nas seções 3.4.2 e 3.6, respectivamente. A análise de variância, com teste de Tukey, foi realizada no software Sisvar (5.0) para comparação entre as médias.

3.9 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA

O efeito da temperatura foi avaliado variando-se a temperatura de reação entre 20 e 90°C, com intervalo de 10°C. A atividade enzimática e específica foi determinada conforme apresentado nas seções 3.4.2 e 3.6, respectivamente. A análise de variância, com teste de Tukey, foi realizada no *software* Sisvar (5.0) para comparação entre as médias.

3.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS OBTIDOS

Neste trabalho, foi utilizado o *software* Sisvar (5.0) para análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias Scott-Knott para a seção 3.2 e Tukey para as seções 3.7 – 3.9). O Statistica (6.0) foi empregado para construção de tabela ANOVA, gráficos de superfície de resposta, gráficos em curva de nível e diagramas de Pareto para os experimentos delineados neste *software* (seções 3.3 e 3.5). Com estes recursos, foi possível identificar diferenças significativas entre tratamentos e efeito dos fatores sobre a produção de enzimas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DOS FUNGOS SECRETORES DAS ENZIMAS DE INTERESSE

A seleção realizada para os catorze isolados levou à escolha de um único fungo denominado 01 B, que apresentou a melhor média para as duas classes de enzimas (ligninases: $7,20 \pm 0,10$ cm e celulases: $2,21 \pm 0,14$), como é detalhado a seguir. Em virtude disso, foi dada continuidade ao trabalho com utilização apenas deste isolado, que foi identificado pelos pesquisadores do LAPEM, como *Trametes villosa*.

4.1.1 Ligninases

A Tabela 7 apresenta a medida dos halos de descoloração para os catorze isolados e a Figura 11 (a – c) mostra as imagens da seleção em RBBR.

Tabela 7: Resultado da seleção em RBBR.

Fungo	R ₁ (cm) *	R ₂ (cm)	R ₃ (cm)	Média ± desvio (cm)
01 B	6,90	7,20	7,10	$7,00 \pm 0,10^c$
5.1 A	3,90	6,30	6,70	$5,63 \pm 0,54^c$
3.3 A	8,20	0,00	7,70	$5,30 \pm 3,94^c$
4.2 A	4,60	4,70	4,50	$4,60 \pm 0,10^b$
14.3 A	4,30	4,20	4,20	$4,23 \pm 0,02^b$
17.2 A	3,70	4,00	3,30	$3,67 \pm 0,35^b$
21.2 B	3,20	3,30	3,80	$3,43 \pm 0,26^b$
7.2 B	2,20	4,20	2,20	$2,87 \pm 1,02^b$
182 A	2,40	3,90	2,20	$2,83 \pm 0,95^b$
13.1 B	0,00	3,40	3,40	$2,30 \pm 1,96^a$
6.1 A	0,00	0,00	3,20	$1,07 \pm 1,84^a$
20.2 B	0,00	0,00	0,00	$0,00 \pm 0,00^a$
2.1 B	0,00	0,00	0,00	$0,00 \pm 0,00^a$
8.2 A	0,00	0,00	0,00	$0,00 \pm 0,00^a$

*R₁, R₂ e R₃ são cada uma das replicatas. Médias com letras iguais não diferem entre si, segundo o teste Scott-Knott.

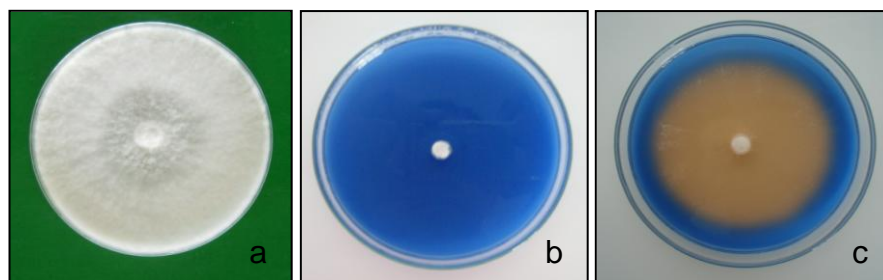


Figura 11: Seleção em RBBR.

a) fungo com 7 dias de crescimento; b) plug inoculado em RRBR; c) halo de descoloração após 7 dias.

Os isolados 01 B, 5.1 A e 3.3 A, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para a descoloração de RBBR.

4.1.2 Celulases

A Tabela 8 apresenta a medida dos halos de descoloração para os catorze isolados e a Figura 12 (a – d) mostra as imagens da seleção em CMC.

Tabela 8: Resultado da seleção em CMC.

Fungo	R ₁ (cm)	R ₂ (cm)	R ₃ (cm)	Média ± desvio (cm)
01 B	2,10	2,37	2,17	2,21 ± 0,14 ^b
14.3 A	2,23	2,17	2,03	2,14 ± 0,10 ^b
20.2 B	1,97	2,00	1,97	1,98 ± 0,02 ^b
17.2 A	2,00	1,93	1,90	1,94 ± 0,05 ^b
7.2 B	1,93	2,00	1,90	1,94 ± 0,05 ^b
4.2 A	1,90	2,00	1,90	1,93 ± 0,06 ^b
6.1 A	1,87	1,93	1,93	1,91 ± 0,03 ^b
5.1 A	1,93	1,83	1,93	1,90 ± 0,06 ^b
3.3 A	2,03	1,67	1,70	1,80 ± 0,20 ^b
182 A	1,70	1,80	1,87	1,79 ± 0,09 ^b
13.1 B	0,80	1,97	1,97	1,58 ± 0,68 ^b
8.2 A	1,07	1,07	0,98	1,04 ± 0,05 ^a
2.1 B	0,80	1,07	1,17	1,01 ± 0,19 ^a
21.2 A	0,80	0,80	0,80	0,80 ± 0,00 ^a
Controle	0,80	0,80	0,80	0,80 ± 0,00 ^a

*R₁, R₂ e R₃ são cada uma das replicatas. Médias com letras iguais não diferem entre si, segundo o teste Scott-Knott.

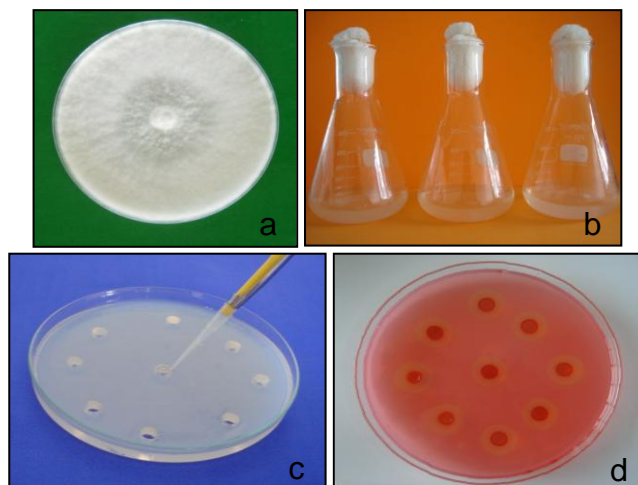


Figura 12: Seleção em CMC.

a) fungo com 7 dias de crescimento; b) fungo com 7 dias de indução; c) placa de caracterização (*cups*); d) halos de descoloração após 24 h.

Observando-se a Tabela 8, vê-se que não houve diferença significativa entre onze dos isolados, tendo o fungo 01 B apresentado a maior média.

4.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO POR PLANEJAMENTO MULTIVARIÁVEL

O experimento de seleção indicou a capacidade do fungo de produzir as enzimas de interesse. Contudo, foi necessário explorar as condições de cultivo para avaliar quais enzimas são produzidas, em que quantidades e o que favorece sua secreção.

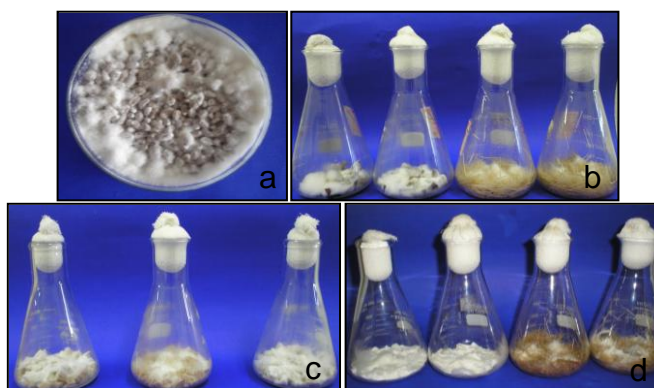


Figura 13: Cultivo sobre substrato sólido de *Trametes villosa*.

a) em grãos de trigo com 7 dias; b) em casca de coco e fibra de sisal com 7 dias; c) em bagaço de cana com 14 dias; d) em casca de coco e fibra de sisal com 21 dias de cultivo.

A Figura 13 mostra o resultado para o crescimento do fungo *Trametes villosa* em grãos de trigo, casca de coco, fibra de sisal e bagaço de cana durante os ensaios da análise exploratória.

A Tabela 9 traz o resultado da atividade enzimática de lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), lacase (Lac) e celulase (Cel) para os ensaios da análise exploratória.

Tabela 9: Resultado da atividade enzimática na análise exploratória

Ensaio	Substrato	Tempo (dias)	pH	LiP (U/L)	MnP (U/L)	Lac (U/L)	Cel (U/mL)
1	Coco	21	10	0,000	0,000	0,152	0,000
2	Coco	21	4	0,000	5,151	0,224	0,003
3	Coco	7	10	0,000	15,274	0,131	0,254
4	Coco	7	4	0,000	2,299	0,063	0,016
5	Sisal	21	10	0,000	41,303	0,421	0,044
6	Sisal	21	4	0,000	16,637	0,418	0,026
7	Sisal	7	10	0,000	5,022	0,102	0,002
8	Sisal	7	4	5,267	4,299	0,126	0,106
9 (C)*	Cana	14	7	10,493	74,505	0,245	0,000
10 (C)	Cana	14	7	0,000	76,302	0,190	0,000
11 (C)	Cana	14	7	0,000	73,683	0,314	0,000

*C representa os pontos centrais. Os valores de atividade são as médias das triplicatas.

4.2.1 Análise estatística para atividade de lignina peroxidase

Os resultados da análise estatística são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Tabela ANOVA para atividade de lignina peroxidase

	SQ*	GL*	QM*	F*	p*	R ² *
Substrato (1)	3,467	1	3,467	0,094	0,788ns	0,1805
Tempo (2)	3,467	1	3,467	0,094	0,788ns	
pH (3)	3,467	1	3,467	0,094	0,788ns	
1 x 2	3,467	1	3,467	0,094	0,788ns	
1 x 3	3,467	1	3,467	0,094	0,788ns	
2 x 3	3,467	1	3,467	0,094	0,788ns	
Falta de ajuste	21,058	2	10,529	0,286	0,777ns	
Regressão	20,804	6	3,467	0,1468		
Resíduo	94,465	4	23,616			
Erro puro	73,407	2	36,703			
Total SS	115,270	10				

Alguns valores foram arredondados para a terceira casa decimal, contudo, os cálculos de F foram feitos com seis ou mais casas decimais.

*SQ= soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; F= valor de F calculado; p= probabilidade; R^2 = coeficiente de regressão.
ns= não significativo ao nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

Em 82% dos ensaios, a atividade de LiP não foi detectada. Dentre os três ensaios do ponto central (replicatas) apenas um apresentou atividade, o que pode ser considerado um erro experimental.

Pela análise de variância, nenhum fator ou suas interações demonstraram exercer efeito significativo na produção de lignina peroxidase pelo *Trametes villosa*. No Diagrama de Pareto (Figura 14) isto é confirmado, pois todas as barras estão à esquerda do valor p.

O valor de F calculado para a regressão (0,1468) foi menor que os valores tabelados a 1, 5 e 10% de probabilidade ($F_{tab} (1\%) = 15,21$; $F_{tab} (5\%) = 6,16$; $F_{tab} (10\%) = 4,01$), indicando que o experimento não foi significativo .

A equação linear preditiva para a atividade de lignina peroxidase foi:

$$Lip = 0,216 + 0,062 S - 0,099 t + 0,003 pH - 0,053 S * t + 0,002 S * pH - 0,014 t * pH + 0$$

Equação III

Contudo, o valor de R^2 foi muito baixo (0,181) indicando que não há boa correlação entre as respostas observadas e previstas. Dessa forma, este modelo não pode ser utilizado para calcular atividade de lignina peroxidase em condições diferentes daquelas testadas nos 11 ensaios.

Devido à baixa produção de lignina peroxidase pelo fungo *Trametes villosa*, os trabalhos de otimização para esta enzima não foram realizados.

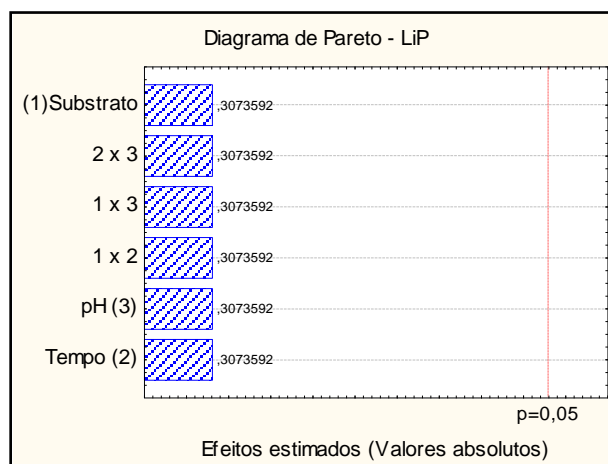


Figura 14: Diagrama de Pareto para atividade de lignina peroxidase.

4.2.2 Análise estatística para atividade de manganês peroxidase

O resultado da análise de variância, apresentado na Tabela 11, demonstrou que a atividade de manganês peroxidase é dependente dos três fatores avaliados e das interações substrato-tempo (1 x 2) e substrato-pH (1 x 3). A interação tempo-pH (2 x 3) não foi estatisticamente significativa. Estes efeitos podem ser vistos no Diagrama de Pareto (Figura 15) onde apenas a barra correspondente à interação tempo-pH, está posicionada à esquerda de p.

Tabela 11: Tabela ANOVA para atividade de manganês peroxidase.

	SQ*	GL*	QM*	F*	p*	R²*
Substrato (1)	247,955	1	247,955	138,238	0,007**	0,1047
Tempo (2)	163,780	1	163,780	91,309	0,011**	
pH (3)	137,892	1	137,892	76,876	0,013**	
1 x 2	465,739	1	465,739	259,655	0,004**	
1 x 3	38,572	1	38,572	21,504	0,043**	
2 x 3	4,230	1	4,230	2,358	0,264ns	
Falta de ajuste	9041,574	2	4520,787	2520,394	0,000**	
Regressão	1058,171	6	176,362	0,0780		
Resíduo	9045,162	4	2261,291			
Erro puro	3,587	2	1,794			
Total	10103,333	10				

Alguns valores foram arredondados para a terceira casa decimal, contudo, os cálculos de F foram feitos com seis ou mais casas decimais.

*SQ= soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; F= valor de F calculado; p= probabilidade; R²= coeficiente de regressão. ns = não significativo e ** significativo ao nível de 95% de confiança (p≤0,05).

A falta de ajuste no experimento foi significativa. Isso ocorreu porque a variabilidade residual, que inclui toda variabilidade remanescente não contabilizada pelos fatores e suas interações, foi significativamente maior do que o erro puro, o qual corresponde a não confiabilidade nas medidas da variável dependente. O erro puro foi estimado a partir da variabilidade das replicatas idênticas (aqui representadas pelos pontos centrais). A falta de ajuste indica que ainda existe variabilidade estatisticamente significativa atribuída às diferenças entre os fatores.

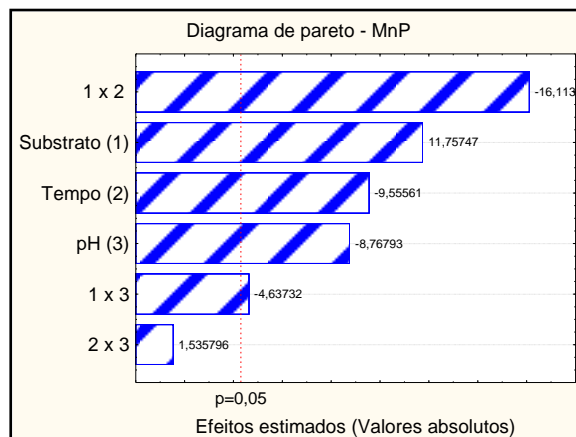


Figura 15: Diagrama de Pareto para atividade de manganês peroxidase.

Assim, o modelo preditivo (Equação IV) não pode ser utilizado para prever a atividade de manganês peroxidase. Isso é corroborado pelo baixo valor de R^2 (0,1047) e pelo F calculado (0,0780), o qual foi menor que os tabelados a 1, 5 e 10% de probabilidade (F_{tab} (1%) = 15,21; F_{tab} (5%) = 6,16; F_{tab} (10%) = 4,01).

$$MnP = 28,589 + 5,567 S - 4,525 t - 4,152 pH - 7,630 S * t - 2,196 S * pH + 0,727 t * pH + 0$$

Equação IV

O experimento de análise exploratória pra produção de MnP por *Trametes villosa* indicou que sua secreção é fortemente influenciada pelas condições de cultivo e que, dentre as enzimas testadas, os maiores índices de atividade foram encontrados para esta enzima. Quase 55% do total de ensaios apresentou atividade de MnP entre 15,274 e 76,302 U/L. Este resultado é superior ao de alguns autores. Silva et al (2004) encontraram atividade máxima de 0,035 U/L em cultura líquida de *Ganoderma* spp.

Esses achados justificaram a continuidade dos experimentos com manganês peroxidase.

4.2.3 Análise estatística para atividade de lacase

Pelo exposto na Tabela 12 e Figura 16, apenas o fator tempo foi significativo para atividade de lacase. A Equação V apresenta o modelo preditivo, cujo valor de R^2 foi 0,8955, indicando uma boa correlação entre as respostas preditas e observadas. A boa correlação é ilustrada na Figura 17 em que os pontos (valores observados) apresentam-se bem próximos da linha diagonal (valores preditos). Comparando-se o valor de F calculado com os valores tabelados ($F_{tab} (1\%) = 15,21$; $F_{tab} (5\%) = 6,16$; $F_{tab} (10\%) = 4,01$), percebe-se que o experimento foi significativamente preditivo.

$$Lac = 0,217 + 0,062 S - 0,099 t + 0,003 pH + 0,054 S * t + 0,002 S * pH - 0,014 pH * t$$

Equação V

Tabela 12: Tabela ANOVA para atividade de lacase.

	SQ*	GL*	QM*	F*	p*	R ² *
Substrato (1)	0,031	1	0,031	7,967	0,106ns	0,8955
Tempo (2)	0,079	1	0,079	20,307	0,046**	
pH (3)	0,000	1	0,000	0,022	0,895ns	
1 x 2	0,023	1	0,023	5,914	0,135ns	
1 x 3	0,000	1	0,000	0,009	0,931ns	
2 x 3	0,002	1	0,002	0,414	0,587ns	
Falta de ajuste	0,008	2	0,004	1,022	0,495ns	
Regressão	0,134	6	0,022	5,711		
Resíduo	0,016	4	0,004			
Erro puro	0,008	2	0,004			
Total	0,150	10				

Alguns valores foram arredondados para a terceira casa decimal, contudo, os cálculos de F foram feitos com seis ou mais casas decimais.

*SQ= soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; F= valor de F calculado; p= probabilidade; R²= coeficiente de regressão.

ns = não significativo e ** significativo ao nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

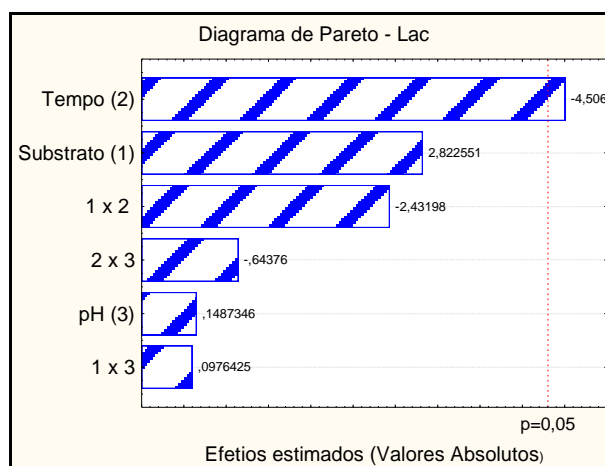


Figura 16: Diagrama de Pareto para atividade de lacase

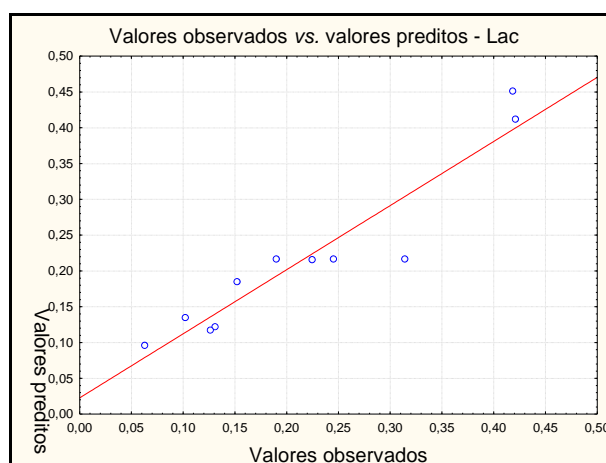


Figura 17: Valores de atividade de lacase determinados experimentalmente (observados) versus valores preditos pelo modelo da Equação V.

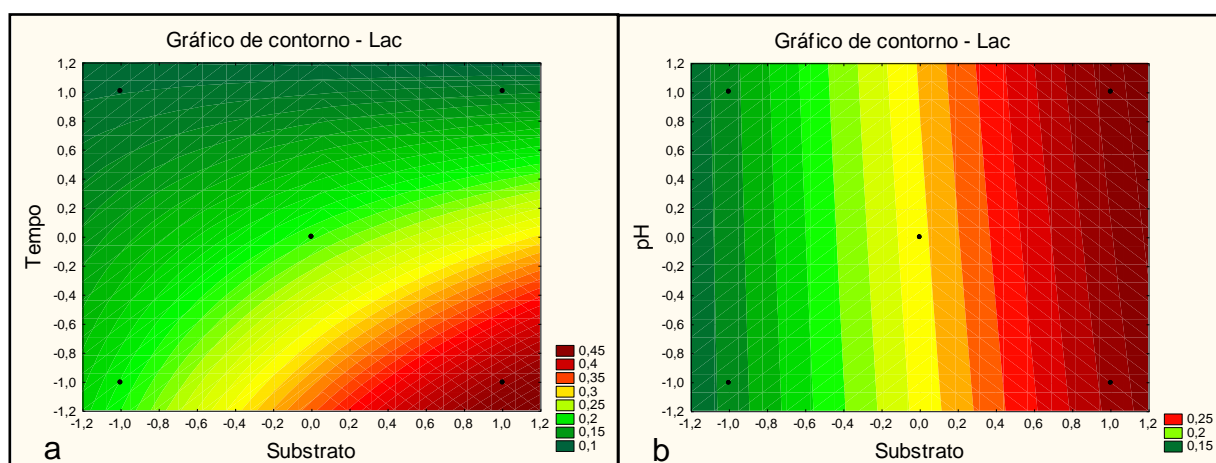


Figura 18: Efeito bidimensional das variáveis substrato x tempo (a) e substrato x pH (b) sobre a atividade de lacase (escala das variáveis independentes em valores codificados).

A Figura 18 mostra a representação bidimensional da relação entre a variável resposta (atividade enzimática) e as variáveis independentes codificadas: substrato, tempo e pH. Observa-se que os melhores resultados para atividade de lacase, representados pela zona vermelho escuro, ocorreram quando se utilizou coco (+1) como substrato a pH 10 (+1) por 7 dias de cultivo (-1). Essas informações foram utilizadas para montar o experimento de otimização para secreção de lacase.

4.2.4 Análise estatística para atividade de celulase

A Tabela 13 apresenta os resultados da análise de variância para a atividade de celulase. Os valores de F e p não puderam ser calculados pelo software, pois como não houve atividade em nenhum dos pontos centrais o erro puro foi nulo, não sendo possível avaliar a influência dos fatores ou suas interações sobre a atividade desta enzima. Da mesma maneira, os efeitos estimados padronizados não puderam ser computados, por isso, não foi apresentado o Diagrama de Pareto. Contudo, a expressão de celulase por *Trametes villosa* foi muito baixa, justificando a não continuidade dos trabalhos com esta enzima.

Tabela 13: Tabela ANOVA para atividade de celulase

	SQ*	GL*	QM*	F*	p*	R ² *
Substrato (1)	0,001	1	0,001			0,6111
Tempo (2)	0,012	1	0,012			
pH (3)	0,003	1	0,003			
1 x 2	0,007	1	0,007			
1 x 3	0,013	1	0,013			
2 x 3	0,002	1	0,002			
Falta de ajuste	0,023	2	0,012			
Erro puro	0,000	2	0,000			
Total	0,060	10				

*SQ= soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; F= valor de F calculado; p= probabilidade; R²= coeficiente de regressão.

4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE LACASE E MANGANÊS PEROXIDASE

Conforme discutido nas seções anteriores, foram montados dois experimentos de otimização: um para lacase e outro para manganês peroxidase, cujos resultados são apresentados e discutidos a seguir.

4.3.1 Análise estatística da otimização de lacase

A Tabela 14 apresenta os resultados da atividade de lacase obtidos para os experimentos de otimização, que foram rodados no Statistica (6.0) para análise de variância (Tabela 15) e construção do Diagrama de Pareto (Figura 19), superfície de resposta (efeito tridimensional) e gráfico de contorno (efeito bidimensional) (Figura 20). A Equação VI apresenta o modelo preditivo para atividade de lacase.

Tabela 14: Resultado da atividade de lacase na otimização

Ensaio	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Lac (U/L)
1	22,5	73	0,0130
2	22,5	87	0,0757
3	33,5	73	0,0311
4	33,5	87	0,0742
5	20	80	0,0682
6	36	80	0,0000
7	28	70	0,0000
8	28	90	0,0000
9 (C)*	28	80	0,0000
10 (C)	28	80	0,0185
11 (C)	28	80	0,0000
12 (C)	28	80	0,0000

*C representa os pontos centrais. Os valores de atividade são as médias das triplicatas.

Tabela 15: Tabela ANOVA para otimização da atividade de lacase.

	SQ*	GL*	QM*	F*	p*	R ² *
Temperatura L ^a (1)	0,001	1	0,001	9,340	0,055ns	0,5158
Temperatura Q ^b (1)	0,003	1	0,003	38,387	0,008**	
Umidade L (2)	0,001	1	0,001	16,425	0,027**	
Umidade Q (2)	0,000	1	0,000	2,318	0,225ns	
1L X 2L	0,000	1	0,000	1,133	0,365ns	
Falta de ajuste	0,005	3	0,002	19,464	0,018**	
Regressão	0,006	5	0,001	1,278		
Resíduo	0,005	6	0,009			
Erro puro	0,000	3	0,000			
Total	0,011	11				

Alguns valores foram arredondados para a terceira casa decimal, contudo, os cálculos de F foram feitos com seis ou mais casas decimais.

^a efeito linear; ^b efeito quadrático

*SQ= soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; F= valor de F calculado; p= probabilidade; R²= coeficiente de regressão.

ns = não significativo e ** significativo ao nível de 95% de confiança (p≤0,05).

De acordo com a tabela ANOVA e Diagrama de Pareto, os efeitos significativos foram temperatura quadrática e umidade linear. O valor de F

calculado para a regressão (1,278) foi inferior aos valores de F tabelado a 1, 5 e 10% de probabilidade ($F_{tab}(1\%) = 5,32$; $F_{tab}(5\%) = 3,2$; $F_{tab}(10\%) = 2,45$). O valor de R^2 (0,5158) foi inferior ao experimento de análise exploratória ($R^2=0,8955$), isso indica que foi encontrado um modelo com menor correlação do que o modelo anterior.

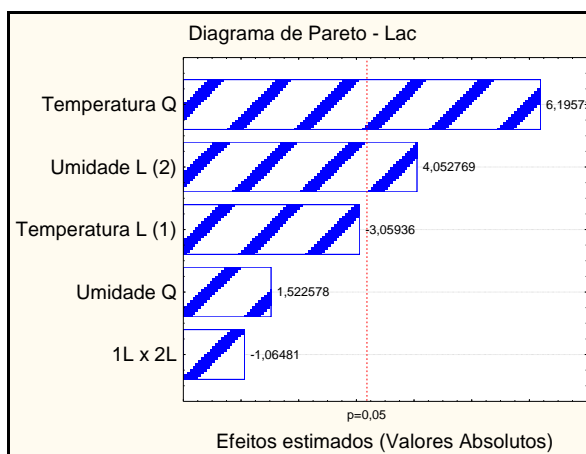


Figura 19: Diagrama de Pareto para atividade de lacase na otimização.

$$Lac = 0,005 - 0,010 T + 0,023 T^2 + 0,013 U + 0,006 U^2 - 0,005 T * U$$

Equação VI

Os resultados de otimização foram completamente inesperados, tendo havido uma redução na expressão de lacase pelo fungo. Entre os doze ensaios testados, 50% apresentaram atividade nula e para os outros 50% a atividade foi inferior a 0,076 U/L. No experimento de análise exploratória os valores estiveram entre 0,063 e 0,224 U/L. O fungo *Trametes villosa* é conhecido pela produção de lacase, que tem sido relatada por alguns autores. Yamanaka et al, (2008) encontraram atividade de lacase variando de 0,05 a 6 U/L com diferentes concentrações de glicose na cultura líquida, utilizando 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) como substrato para determinar a atividade enzimática. Songulashvili et al (2007) estudando linhagens de *Trametes versicolor* em fermentação submersa de cascas de tangerina e grãos de trigo encontraram altas atividade de lacase detectadas com ABTS (490 a 20360 U/L). Kamida et al (2005) encontraram atividade de 14 U/L em *Pleurotus sajor-caju* cultivados por 9 dias em bagaço de cana contendo efluente têxtil, utilizando

siringaldazina para detecção de lacase.

Admitindo-se a existência de problemas com a metodologia de detecção da atividade, que não puderam ser resolvidos, os trabalhos com lacase encerram-se nesta seção.

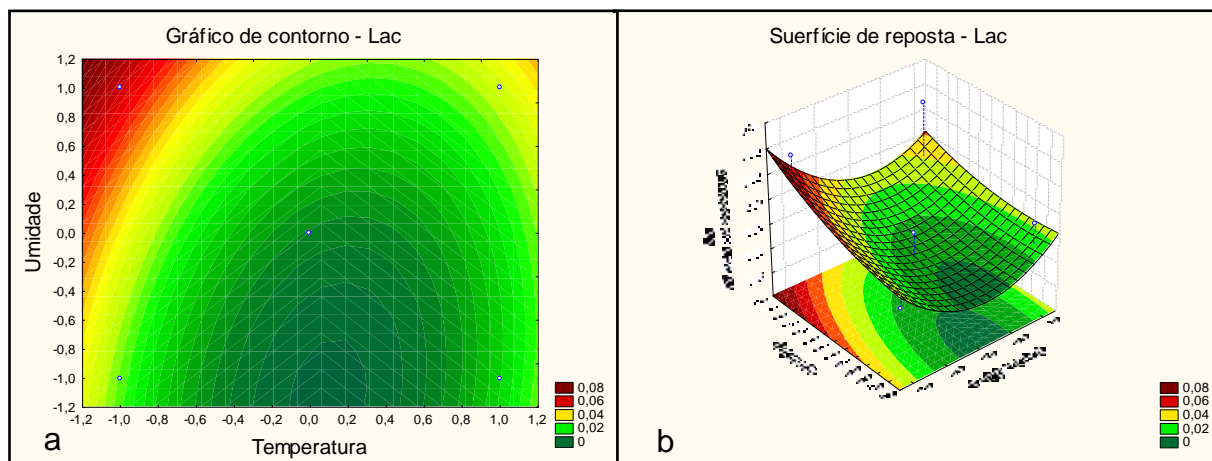


Figura 20: Efeito bi (a) e tridimensional (b) das variáveis temperatura e umidade sobre a atividade de lacase (escala das variáveis independentes em valores codificados).

4.3.2 Análise estatística da otimização de manganês peroxidase

A atividade específica (Tabela 16) foi avaliada como resposta para a otimização de manganês peroxidase no Statistica (6.0). Considerando a atividade bruta, houve um aumento de aproximadamente 1,5 vezes entre o máximo encontrado na análise exploratória (76,302 U/L) e na otimização (117,327 U/L). A Tabela 17 mostra os resultados da análise de variância para o experimento.

Tabela 16: Resultado da atividade de manganês peroxidase na otimização

Ensaio	Temperatura (°C)	Umidade (%)	pH	MnP (U/L)	Ptn** (mg/L)	Ativ. Esp.** (U/mg)
1	23	74	4,6	75,089	3825,276	0,020
2	23	74	9,4	112,700	865,140	0,130
3	23	86	4,6	0,000	2422,957	0,000
4	23	86	9,4	89,495	534,351	0,167
5	33	74	4,6	0,000	4100,933	0,000
6	33	74	9,4	71,683	1413,627	0,051

7	33	86	4,6	0,000	2921,968	0,000
8	33	86	9,4	31,961	638,960	0,050
9	20	80	7,0	117,327	825,558	0,142
10	36	80	7,0	0,075	1761,380	0,000
11	28	70	7,0	66,998	3303,647	0,020
12	28	90	7,0	0,000	404,297	0,000
13	28	80	3,0	0,000	3812,553	0,000
14	28	80	11,0	1,934	1526,718	0,001
15 (C)*	28	80	7,0	87,282	747,809	0,117
16 (C)	28	80	7,0	71,910	770,427	0,093
17 (C)	28	80	7,0	82,302	675,714	0,122
18 (C)	28	80	7,0	81,184	722,364	0,112

*C representa os pontos centrais

**Ptn: conteúdo de proteína determinado pelo método de Lowry, Ativ. Esp.: atividade específica. Os valores de atividade são as médias das triplicatas.

Tabela 17: Tabela ANOVA para atividade específica de manganês peroxidase na otimização

	SQ*	GL*	QM*	F*	p*	R ² *
Temperatura L ^a (1)	0,015	1	0,015	94,274	0,002**	0,8058
Temperatura Q ^b (1)	0,001	1	0,001	4,559	0,122ns	
Umidade L (2)	0,000	1	0,000	0,142	0,732ns	
Umidade Q (2)	0,011	1	0,011	67,021	0,004**	
pH L (3)	0,011	1	0,011	65,700	0,004**	
pH Q (3)	0,013	1	0,013	83,340	0,003**	
1L x 2L	0,000	1	0,000	0,252	0,650ns	
1L x 3L	0,004	1	0,004	24,100	0,016**	
2L x 3L	0,000	1	0,000	2,440	0,216ns	
Falta de ajuste	0,012	5	0,002	14,448	0,026**	
Regressão	0,050	9	0,006	3,71		
Resíduo	0,012	8	0,002			
Erro puro	0,000	3	0,000			
Total	0,062	17				

^a efeito linear

^b efeito quadrático

Alguns valores foram arredondados para a terceira casa decimal, contudo, os cálculos de F foram feitos com seis ou mais casas decimais.

*SQ= soma dos quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; F= valor de F calculado; p= probabilidade; R²= coeficiente de regressão
ns= não significativo e ** significativo ao nível de 95% de confiança (p≤0,05)

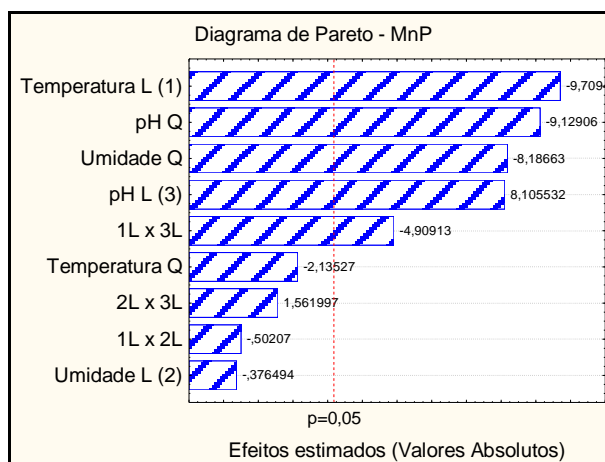


Figura 21: Diagrama de Pareto para atividade específica de MnP na otimização.

Com base na Tabela 17 e Figura 21, tem-se que os fatores que exerceram efeitos significativos sobre a produção de MnP foram temperatura e pH lineares, umidade e pH quadráticos e interação temperatura x pH lineares. O valor de F calculado (3,71) para a regressão foi significativo ao nível de 5% de probabilidade ($F_{5\%} = 3,68$). O coeficiente R^2 (0,8058) indicou que existe uma boa correlação entre os valores de atividade determinados experimentalmente e os valores preditos pelo modelo (Equação VII), sendo 80,58 % dos pontos ajustados adequadamente por ele. No gráfico da Figura 22 estão plotados os valores determinados experimentalmente contra os preditos pelo modelo. A distribuição dos pontos nas proximidades da linha demonstra haver uma boa concordância.

$$MnP = 0,110 - 0,033 T - 0,001 U + 0,028 pH - 0,008 T^2 - 0,029 U^2 - 0,032 pH^2 - 0,002 T * U - 0,022 T * pH + 0,007 U * pH$$

Equação VII

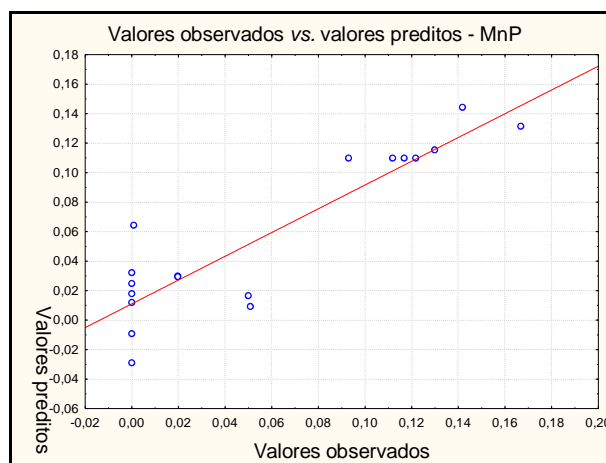


Figura 22: Valores de atividade de lacase determinados experimentalmente (observados) versus valores preditos pelo modelo da Equação VII.

As Figuras 23 e 24 representam as relações bi e tridimensional existentes entre as variáveis dependentes e a atividade específica de MnP.

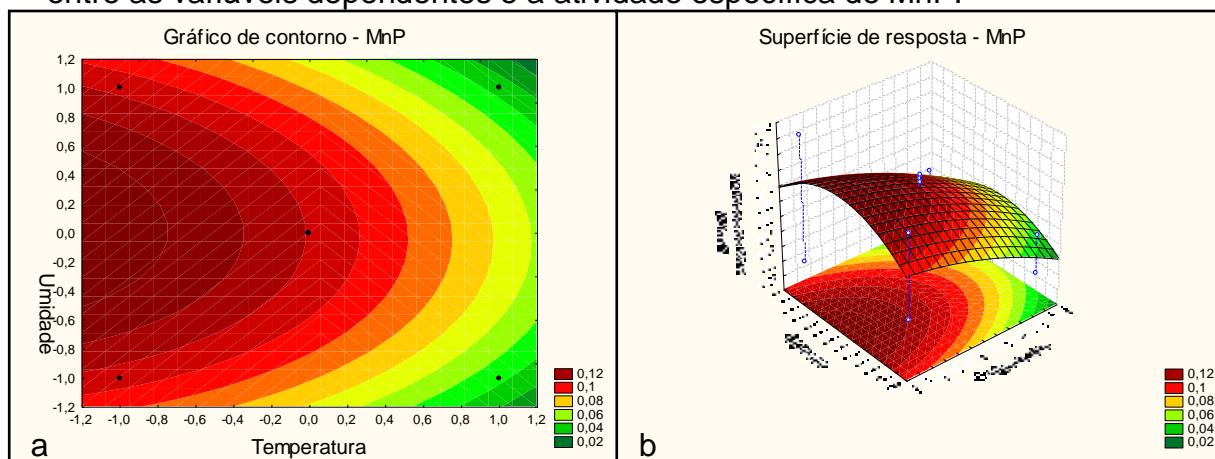


Figura 23: Efeito bi (a) e tridimensional (b) das variáveis temperatura e umidade sobre a atividade específica de MnP (escala das variáveis independentes em valores codificados).

O gráfico de contorno da Figura 23a demonstra que a diminuição da temperatura causou um efeito positivo na produção de MnP, tendo a atividade específica alcançado o maior valor quando a umidade esteve no ponto central (80%) e a temperatura no mínimo (20°C). A tendência vista no gráfico é que temperaturas menores poderiam apresentar resultados ainda melhores, porém foi impossível reduzir mais a temperatura porque o fungo não cresce a menos de 20°C.

Na Figura 24a pode ser visto que os maiores índices de atividade de MnP foram atingidos na faixa de pH entre 7,0 (0) e 11 (+ α), com o máximo no pH 9,38 (+1).

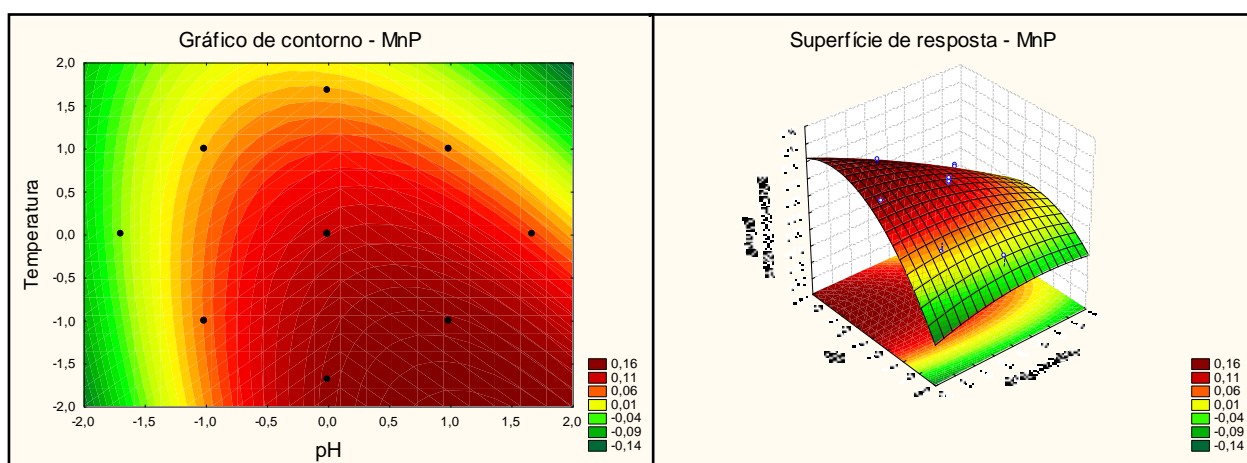


Figura 24: Efeito bi (a) e tridimensional (b) das variáveis temperatura e pH sobre a atividade específica de MnP (escala das variáveis independentes em valores codificados).

A Tabela 18 apresenta os resultados para atividade específica de manganês peroxidase para os ensaios de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de incubação. Na Figura 25 tem-se o gráfico da atividade específica pelo tempo de crescimento do fungo (*time course*).

Tabela 18: Atividade específica no *time course* de manganês peroxidase

Ensaio	Tempo (dias)	Ativ. Esp.)** (U/mg) (média ± desvio)
1	5	0,011 ± 0,008 ^a
2	10	0,193 ± 0,054 ^b
3	15	0,236 ± 0,039 ^c
4	20	0,195 ± 0,020 ^b
5	25	0,037 ± 0,001 ^a
6	30	0,027 ± 0,008 ^a

**Ativ. Esp.: atividade específica.

Os valores de atividade são as médias das triplicatas. Médias com letras iguais não diferem entre si, segundo o teste de Tukey

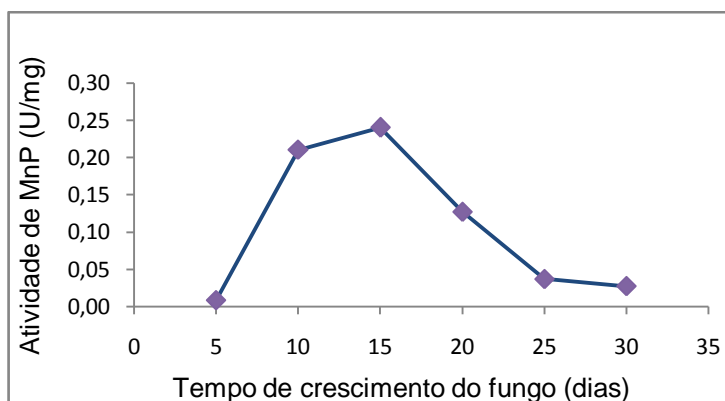


Figura 25: *Time course* para atividade específica de MnP nas condições de cultivo otimizadas.

A atividade específica aumentou até o 15º dias, após o qual foi decrescente aproximando-se do zero no 30º dia. A análise de variância com teste de Tukey para comparação de médias foi aplicada para os tempos de 10 e 15 dias, havendo diferença significativa. Portanto, 15 dias foi considerado o melhor tempo para secreção de MnP nas condições de cultivo otimizadas para *Tramettes villosa*.

Em cultura submersa de *P. chrysosporium*, a máxima atividade de MnP purificada foi alcançada em 64 h (0,5U/mL), quando começou a diminuir (KAPICH et al, 2005a). Em cultura líquida de *S. coronilla* foi encontrado atividade de 0,77 U/mL com 45 dias de cultivo (KAPICH et al, 2005b). Lopez et al (2007)

encontraram atividade máxima de 0,22 U/mL em *Coniochaeta ligniaria* com 10 dias de cultivo sob fermentação sólida de resíduos de pimenteira. Em *Trametes villosa* sob fermentação líquida com suplementação de glicose, a atividade de MnP atingiu o máximo de 6 U/L em 27 dias (YAMANAKA et al, 2008).

A máxima atividade de MnP encontrada é da mesma grandeza relatada para muitos basidiomicetos. MnP foi a enzima dominante produzida por *Irpex lacteus*, com atividade média de 270 U/L (BABOROVÁ et al, 2006).

A produção de MnP por *Trametes villosa* é pouco descrita na literatura. Contudo, os resultados encontrados neste trabalho são muito superiores ao de três linhagens estudadas por Machado et al (2005), que encontram máxima atividade de MnP entre 1,2 e 6,64 U/L sob cultivo submerso em meio suplementado contendo bagaço de cana.

4.5 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO

A Tabela 19 apresenta o resultado da atividade de MnP determinada a diferentes valores de pH, para o extrato bruto obtido nas condições de cultivo otimizadas (umidade 80%, temperatura 20°C, pH 9,38 e 15 dias). Cada ponto representa a média de três replicatas. Os dados foram tratados no SISVAR e pela análise de variância, houve diferença significativa, tendo o valor máximo no pH 4,5, o qual foi considerado, então, o pH ótimo para a atividade de MnP de *Trametes villosa*. A Figura 26 mostra o gráfico da atividade específica de MnP versus pH, com o pico em 4,5.

Tabela 19: Atividade de MnP a diferentes valores de pH do meio reacional.

pH	MnP (U/L) (média ± desvio)
3,0	132,030 ± 20,001 ^a
4,0	81,253 ± 11,379 ^b
4,5	170,724 ± 1,022 ^c
5,0	63,961 ± 11,402 ^b
6,0	2,870 ± 0,495 ^d
7,0	3,423 ± 1,430 ^d
8,0	31,148 ± 23,212 ^d
9,0	19,277 ± 2,252 ^d
10,0	7,857 ± 0,255 ^d

11,0	18,299 ± 7,358 ^d
------	-----------------------------

Médias com letras iguais não diferem entre si, segundo o teste de Tukey

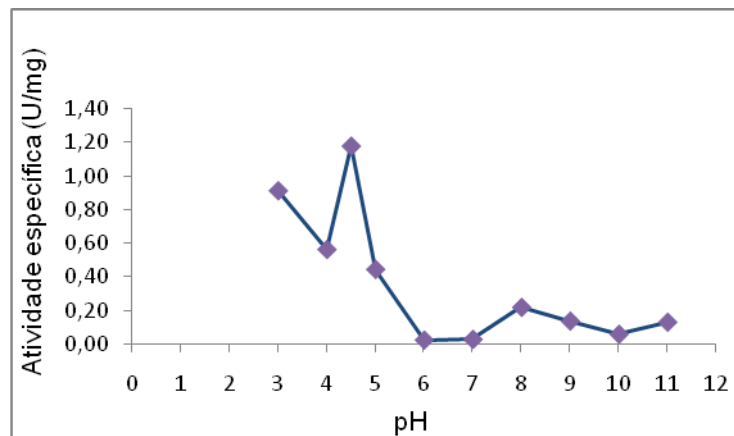


Figura 26: Variação da atividade específica de MnP com o pH reacional.

O valor de pH ótimo encontrado para MnP de *T. villosa* está de acordo com o encontrado por Kuwahara et al (1984) para MnP de *P. chrysosporium*.

O pico que aparece no pH 8,0 poderia indicar a presença de isoenzimas que é muito comum em extratos brutos de MnP, contudo não houve diferença significativa entre a faixa de pH testada de 6,0 a 11,0.

4.6 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA

A Tabela 20 apresenta o resultado da atividade de MnP a diferentes temperaturas de reação, para o extrato bruto obtido nas condições de cultivo otimizadas (umidade 80%, temperatura 20°C, pH 9,38 e 15 dias). Cada ponto representa a média de três replicatas. Os dados foram tratados no SISVAR e pela análise de variância, não houve diferença significativa. A Figura 27 mostra o gráfico da atividade específica de MnP *versus* temperatura, cujos pontos ligados formam quase uma linha reta.

Tabela 20: Atividade de MnP a diferentes temperaturas de reação.

Temperatura (°C)	MnP (U/L) (média ± desvio)
20	186,330 ± 4,540 ^a
30	189,000 ± 2,405 ^a
40	189,667 ± 4,174 ^a
50	185,333 ± 2,860 ^a
60	186,667 ± 1,219 ^a
70	190,667 ± 13,515 ^a
80	170,667 ± 11,472 ^a
90	176,000 ± 5,508 ^a

Médias com letras iguais não diferem entre si, segundo o teste de Tukey.

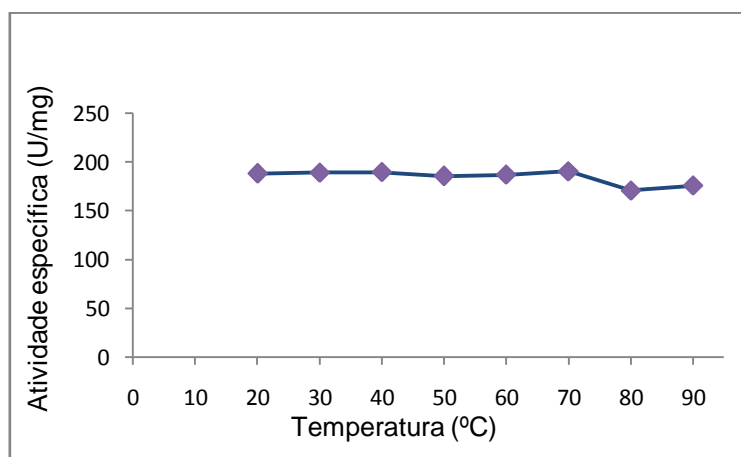


Figura 27: Variação da atividade específica de MnP com a temperatura reacional.

O resultado da determinação de atividade ótima não esteve de acordo com o esperado, já que normalmente as enzimas apresentam um pico de atividade a uma dada temperatura. Uma vez que o tempo de reação é curto (apenas cinco minutos), a alta estabilidade do extrato bruto a diferentes temperaturas pode ter contribuído para este resultado. Xiaobin et al (2007) relataram que MnP de *Schizophyllum* sp apresentou atividade máxima a 35°C e não tolerou temperaturas superiores a 40°C. Em *I. lacteus* a temperatura ótima de MnP foi observada a 50-60 °C e a enzima não foi ativa a temperatura acima de 70 °C.

5 CONCLUSÃO

Os experimentos realizados possibilitaram o estudo da produção de lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacase e celulase, além da otimização das condições de cultivo sob substrato sólido para secreção de manganês peroxidase.

Dentre os 14 isolados, 9 apresentaram atividade para descoloração de RBBR, indicando atividade de ligninases e 11 para atividade de celulase. Os maiores halos foram observados pelo fungo identificado como *Trametes villosa*, sendo $7,00 \pm 0,10$ cm em RBBR e $2,21 \pm 0,14$ cm em CMC.

Não foi possível detectar atividade de celulase e lignina peroxidase nos experimentos de análise exploratória e a otimização só foi realizada para lacase e manganês peroxidase. O níveis de lacase detectados reduziram com a otimização, o que acarretou no insucesso deste experimento, atribuído a problemas com a metodologia de detecção.

A otimização da secreção de manganês peroxidase apresentou um resultado positivo, com aumento de 1,5 vezes na atividade em relação à análise exploratória. A máxima atividade de MnP foi 117,327 U/L, a qual é cerca de 20 vezes superior ao relatado por Machado et al (2005) pra três linhagens de *Trametes villosa* cultivadas sob fermentação submersa em meio contendo bagaço de cana como substrato. As condições ótimas para produção da enzima foram bagaço de cana com 80% de umidade a pH 9,38 incubados a 20°C por 15 dias. O pH ótimo para a atividade foi 4,5 e não houve diferença significativa entre as temperaturas testadas na faixa de 20 a 90°C. Utilizando esses parâmetros é possível produzir extrato com alta atividade de MnP, que tem potencial de aplicação na delignificação de materiais ligninocelulósicos.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. L. Biodegradación de celulosa de bagazo de caña de azúcar por hongos celulíticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 3, p. 117–121, 2001.

AHNA, M.; ZIMMERMANB, A. R.; MARTÍNEZ, C. E.; ARCHIBALD, D. D; BOLLAG, J.; DEC, J. Characteristics of *Trametes villosa* laccase adsorbed on aluminum hydroxide. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 41, p. 141–148, 2007.

ALENCAR, S. M.; KOBLITZ, M. G. B. Oxidorredutases. In: KOBLITZ, M. G. B. (coord.). **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 127-130.

BABOROVÁ, P.; MÖDER, M.; BALDRIAN, P. CAJTHAMLOVÁ, K.; CAJTHAML, T. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. **Research in Microbiology**. v. 157, p. 248–253, 2006.

BILBA, K., ARSENE, M., OUENSANGA, A. Study of banana and coconut fibers: botanical composition, thermal degradation and textural observations. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 58-68, 2007.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, S. J. **Statistics for experimenters: An introduction to design, data analysis, and model building**. New York: John Wiley Co, 1978. P. 306-351, 501-539.

BUKH, C.; LUND, M.; BJERRUM, M. J. Kinetic studies on the reaction between *Trametes villosa* laccase and dioxygen. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 100, p. 1547–1557, 2006.

CASTILLO, M. P.; STENSTRÖM, J.; ANDER, P. Determination of Manganese Peroxidase Activity whit 3-Methyl-2-benzothiazoline Hydrazne and 3-(Dimethylamonio)benzoic Acid. **Analytical Biochemistry**. v. 218, p. 399-404 1994.

CHRISTIAN, V.; SHRIVASTAVA, R.; SHUKLA, D. MODI, H.; VYAS, B. R. M. Mediator role of veratryl alcohol in the lignin peroxidase-catalyzed oxidative decolorization of Remazol brilliant blue R. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 36, p. 426–431, 2005.

COUTO, S. R.; A,B, SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry: A review. **Journal of Food Engineering**. v. 76, p. 291–302, 2006.

DEMAIN, A. L.; NEWCOMB, M.; Wu, J. H. D. Cellulase, clostridia, and ethanol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 69, p. 124-154, 2005.

DINGLE, J.; REID, W. W.; SOLOMONS, G.L. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II. Application of the "cup-plate" assay to the estimation of enzymes. **Journal for the Science of Food and Agriculture**. v. 4, p.149-155, 1953.

DUMONCEAUX, T.; BARTHOLOMEW, K.; VALEANU, L.; CHARLES, T.; ARCHIBALD, F. Cellobiose dehydrogenase is essential for wood invasion by nonessential for Kraft pulp delignification and *Trametes versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 29, p. 478–89, 2001.

DÚRAN, N. Enzimas ligninolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (org.). **Fungos: uma introdução a Biologia, bioquímica e Biotecnologia**. Caixas do Sul: Educs, 2004. p. 245-260.

EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; LISÁ, L.; NERUD, F. Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinosa* and *Pleurotus calyciptratus*. **Chemosphere**. v. 60, p. 398-404, 2005.

ELISASHVILI V.; PENNINCKX M.; KACHLISHVILI E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**. 2007.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; 2006. **Cultivo do Sisal**. Disponível em:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br> >. Acesso em: 14. Dez. 2007.

FAO-esc. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación; 2008. **Comercio y Mercados** (www.fao.org/es/ESC/es/15/320/highlight_326.html).

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (org.). **Fungos: uma introdução a Biologia, bioquímica e Biotecnologia**. Caixas do Sul: Educs, 2004. p. 215-242.

FUJIAN, X.; HONGZHANG, C.; ZUOHU, L. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. **Bioresource Technology**. v. 80, p. 149–151, 2001.

GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; MAYFIELD, M. B.; KUWAHARA, M.; GOLD, M. H. An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 114, p. 1077-1083, 1983.

GOLD, M. H.; YOUNGS, H. L.; GELPKE, M. D. Manganese peroxidase. **Metal Ions in Biological System**. v. 37, p. 559–86, 2000.

GRIZOTO, R. K.; BRUS, R. E.; AGUIRRE, J. M.; BATISTA, G. Otimização via metodologia de superfície de resposta dos parâmetros tecnológicos para produção de fruta estruturada e desidratada a partir de polpa concentrada de mamão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, p. 158-164, 2005.

HAKALA, T. K.; LUNDELL, T.; GALKINA, S.; MAIJALAA, P.; KALKKINEN, N.; HATAKKA, A. Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 36, p. 461–468, 2005.

HAMMEL, K. E.; CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 11, p. 349–355, 2008.

HOFRICHTER, M.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A. Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 4588–4593, 2001.

JÖRGENSEN, H.; ERRIKSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F.; OLSSON, L. Purification and characterisation of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 32, p. 851–861, 2003.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. S. T.; ARMAS, E. D. BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE TÊXTIL POR *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**. v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KAPICH, A. N.; PRIOR, B. A.; BOTHA, A.; GALKIN, S.; LUNDELL, T.; HATAKKA, A. Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 34, p. 187-195, 2004.

KAPICH, A. N.; STEFFEN, K.; HOFRICHTER, M.; HATAKKA, A. Involvement of lipid peroxidation in the degradation of a non-phenolic lignin model compound by manganese peroxidase of the litter-decomposing fungus *Stropharia coronilla*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 330, p. 371–377, 2005.

KARIMINIAAE-HAMEDAANI, H.; SAKURAI, A.; SAKAKIBARA, M. Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus. **Dyes and Pigments**. v. 72, p. 157-162, 2007.

KHURI, A. I.; CORNELL, J. A. **Response surfaces: Designs and analyses**. New York: Marcel Dekker, Inc, 1987.

KOBLITZ, M. G. B. Carboidratos. In: KOBLITZ, M. G. B. (coord.). **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 45-47.

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. N.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Lett** 1984;169:247–50.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**. v. 56, p.1-24, 1997.

LEE, K.; MOON, S. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. **Journal of Biotechnology**. v. 102, p. 261-268, 2003.

LOBOS, S.; LARRAÍN, J.; CULLEN, D.; VICUÑA, R. Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Microbiology**. v. 140, p. 2691–2698, 1994.

LOPEZ, M. J.; VARGAS-GARCÍA, M. C.; SUÁREZ-ESTRELLA, F.; NICHOLS N. N.; DIEN, B. S.; MORENO, J. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 794-800, 2007.

MARNYYE, A.; VELÁSQUEZ, C.; MATA, G.; MICHEL, S.J. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 18, p. 201–207, 2002.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS R. D.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 36, p. 246-252, 2005.

MÁRQUEZ, A. T. A.; MENDOZA, M. G. D.; GONZÁLEZ, M. S. S. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp.* EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus Níger* AD96.4 em fermentación sólida. **Interciencia** v. 32, p.780–785, 2007.

MARTÍNEZ, A. T., Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 30, p. 425-444, 2002.

MARTÍNEZ, A. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A.; del RÍO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**. v. 8, p. 195-204, 2005.

MECHICHI, T.; MHIRI, N.; SAYADI, S. Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes troglia*. **Chemosphere**. v. 64, p. 998–1005, 2006.

MEZA, J. C.; LOMASCOLO, A.; CASALOT, L.; SIGOILLOT, J.; AURIA, R. Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: Influence of ethanol vapours as inducer. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 3365-3371, 2005.

MIETTINEN-ORINONEN, A.; SUOMINEN, P. Enhanced production of *Trichoderma reesei* endoglucanases and use of the new cellulase preparations in

producing the stonewashed effect on Denim fabric. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p. 3956–3964, 2002.

MOREDO, N.; LORENZO, M.; DOMINGUEZ, A.; MOLDES, D.; CAMESELLE, C.; SANROMNÁ, M. A. Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 19, p. 665–669, 2003.

NILADEVI, K. N.; SUKUMARAN, R. K.; JACOB, N.; ANISHA, G. S.; PREMA, P. Optimization of laccase production from a novel strain-*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. **Microbiological Research**. v. 164, p. 105–113, 2009.

NIRANJANE, A. P.; MADHOU, P.; STEVENSON, T. W. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 1464–1468, 2007.

PALMIERI, G., GENNAMO, G., SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 36, p. 17–24, 2005.

PATEL, D. S.; AITHAL, R. K.; KRISHNA, G.; LVOV, Y. M.; TIEN, M.; KUILA, D. Nano-assembly of manganese peroxidase and lignin peroxidase from *P. chrysosporium* for biocatalysis in aqueous and non-aqueous media. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 43, p. 13–19, 2005.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE-LA-RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**. v. 5, p. 53–63, 2002.

PORTAL AGRARIO. **Cultivos de Importancia Nacional; 2005**. Disponível em: <www.minag.gob.pe/agricola/azucar_produccion.shtml>. Acesso em: 25 out 2009.

RABINOVICH, M. L.; MELNIK, M. S.; BOLOBOVA, A. V. Microbial cellulases: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 38, p. 305–321, 2002.

REDDY, G. V.; BABU, P. R.; KOMARAIHAH, P.; ROY, K. R. R. M.; KOTHARI, I. L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**. v. 38, p. 1457–1462, 2003.

ROBERTSON, S. A.; MASON, S. L.; HACK, E.; ABBOTT, G. D. A comparison of lignin oxidation, enzymatic activity and fungal growth during white-rot decay of wheat straw. **Organic Geochemistry**. v. 39, p. 945–951, 2008.

RODRIGUES, S.; PINTO, G. A. S. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. **Journal of Food Engineering**. v. 80, p. 869–872, 2007.

ROGALSKI, J.; SZCZODRAK, J.; JANUSZ, G. Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii*. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 469–476, 2006.

RUEGGER, M. J. S.; TAUK-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. v.27, n. 2, p. 205-211, 2004.

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

SILVA, C. M. M. S.; MELO I. S.; OLIVEIRA, P. R. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 37, p. 324–329, 2005.

SILVA, C. M. M. S.; MELO I. S.; OLIVEIRA, P. R. Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Meio Ambiente**. v 18, p. 1-16, 2004.

SONGULASHVILI, G. ELISASHVILI, V.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; HADAR, Y. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 41, p. 57-61, 2007.

STEWART, D.; AZZINI, A.; HALL, A.; MORRISON, I. Sisal fibers and their constituent non-cellulosic polymers. **Industrial Crops Production**. v. 6, p. 17–26, 1997.

SUN, X.; ZHANG, R.; ZHANG, Y. Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamide gels. **Journal of Basic Microbiology**. v. 44, p. 220–31, 2004.

SUN, Y.; CHENG, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and Bermuda grass for ethanol production. **Bioresource Technology**. v. 96, p. 1599–1606, 2005.

SZKLARZ, G. D.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. E. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**. v. 81, p. 234–240, 1989.

TAVARES, A. P. M.; CRISTÓVÃO, R. O.; LOUREIRO, J. M.; BOAVENTURA, R. A. R.; MACEDO, E. A. Application of statistical experimental methodology to optimize reactive dye decolourization by commercial laccase. **Journal of Hazardous Materials**. v. 162, p. 1255-1260.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 169-179, 2003.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Burds. Science**. v. 3, p. 221-661, 1983.

TOMCZAK, F., SYNDENSTRICKER, T. H. D., SATYANARAYAN, K. G. Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part II: Morphology and properties of Brazilian coconut fibers. **Composites: Part A**. v. 38, p. 1710-1721, 2007.

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

UNICA. União da Indústria de Cana de Açúcar; 2007. **Memória - cana de açúcar**. Disponível em: <http://www.portalunica.com.br/portalunica>> Acesso em: 14. Dez. 2007

VALÁŠKOVÁ, V.; ŠNAJDRA, J.; BITTNERB, B.; CAJTHAMLA, T.; MERHAUTOVÁ, V.; HOFRICHTERB, M.; BALDRAN, P. Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 39, p. 2651-2660, 2007.

van DAM, J. E.G.; van den OEVER, M. J. A.; TEUNISSEN, W.; KEIJSERS, E. R. P., PERALTA, A. G. Process for production of high density/high performance binderless boards from whole coconut husk Part 1: Lignin as intrinsic thermosetting binder resin. **Industrial Crops and Products**. v. 19, p. 207-216, 2004.

VARGAS-GARCÍA, M. C.; SUÁREZ-ESTRELLA, F.; LÓPEZ, M. J.; MORENO, J. In vitro Studies on lignocellulose degradation by microbial strains isolated from composting processes. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 59, p. 322-328, 2007.

VIKINESWARY, S.; ABDULLAH, N.; RENUVATHANI, M.; SEKARAN, M.; PANDEY, A.; JONES, E.B.G. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 171-177, 2006.

WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. Homobasidiomycetes. In: WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. **Introduction to fungi**. 3. ed. New York: Cambridge University Press, 2007. p. 527-532.

WINQUIST, E.; MOILANENA, U.; METTÄLÄ, A.; LEISOLA, M.; HATAKKA, A. Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. **Biochemical Engineering Journal**. v. 42, p. 128-132, 2008.

XIAOBIN C., RONG J.; PINGSHENG, L.; SHIQIAN, T.; QIN, Z.; WENZHONG, T.; XUDONG, L. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 41, p. 258-264, 2007.

YAMANAKA, R. SOARES, C. F.; MATHEUS, D. R.; MACHAD, K. M. G. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, p. 78-84, 2008.

ZIMBARDI, F.; VIGGIANO, D.; NANNA, F.; DEMICHELE, M.; CUNA, D.;
CARDINALE, G. Steam explosion of straw in batch and continuous systems.
Applied Biochemistry and Biotechnology. v. 77, p. 117–125, 1999.

ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO E SOLUÇÕES

1.1 Meio de cultivo ágar-extrato de malte e levedura

2 g de ágar
2 g de extrato de malte
0,2 g de extrato de levedura
100 mL de água destilada

1.2 Meio ágar-azul brilhante de remazol R (RBBR)

1,75 g de ágar
0,02 g de RBBR
100 mL de água destilada

1.3 Meio líquido de indução em carboximetilcelulose (CMC)

0,7 g de fosfato de amônio
0,15 g de fosfato dibásico de potássio
0,05 g de sulfato de magnésio
0,03 g de cloreto de cálcio
0,5 g de carboximetilcelulose (CMC)
0,25 g de solução de traços de sais (sulfato ferroso 0,1%; cloreto manganoso 0,1%; sulfato de zinco 0,1% em água destilada)
100 mL de água destilada

1.4 Meio de caracterização em carboximetilcelulose (CMC)

1,0 g de CMC
2,0 g de ágar
100 mL de água destilada

1.5 Soluções tampão

1.5.1 Tampão tartarato de sódio 0,4 M pH 3,0

9,2 g de tartarato de sódio
Dissolver e completar para o volume para 100 mL com água destilada

Ajustar o pH com HCl

1.5.2 Tampão citrato-fosfato pH 3,0; 4,0; 4,62; 5,0; 6,0 e 7,0

Solução A: 1,921 g de ácido cítrico em 100 mL de solução (água destilada como solvente)

Solução B: 5,365 g de fosfato dibásico de sódio em 100 mL de solução (água destilada como solvente)

Misturar as soluções A e B, conforme tabela 1 e diluir para 100 mL

Tabela 1: Alíquotas das soluções para tampão citrato-fosfato.

pH	Vol. de A (mL)	Vol. de B (mL)
3,0	39,8	10,2
4,0	30,7	19,3
4,62	26,7	23,3
5,0	24,3	25,7
6,0	17,9	32,1
7,0	6,5	43,6

1.5.3 Tampão acetato pH 5,0

Solução A: 1,16 mL de ácido acético em 100 mL de solução (água destilada como solvente)

Solução B: 16,4 g de acetato de sódio em 100 mL de solução (água destilada como solvente)

Misturar 14,8 mL da solução A com 35,2 mL da solução B e diluir para 100 mL

1.5.4 Tampão fosfato pH 8,0

Solução A: 2,78 g de fosfato monobásico de sódio em 100 mL de solução (água destilada como solvente)

Solução B: 7,17 g de fosfato dibásico do sódio dodecahidratado em 100 mL de solução (água destilada como solvente)

Misturar 5,3 mL da solução A com 94,7 mL da solução B e diluir para 100 mL

1.5.5 Tampão succinato de sódio pH 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10 e 11.

5,4032 g de succinato de sódio

Dissolver e completar para 100 mL com água destilada

Ajustar o pH com HCl ou NaOH

1.5.6 Tampão carbonato-bicarbonato pH 9,38; 10 e 11

Solução A: 2,12 g de carbonato de sódio anidro em 100 mL de solução (água destilada como solvente)

Solução B: 1,68 g bicarbonato de sódio em 100 mL de solução (água destilada como solvente)

Tabela 2: Alíquotas das soluções para tampão carbonato-bicarbonato.

pH	Vol. de A (mL)	Vol. de B (mL)
9,38	9,5	40,5
10	27,5	22,5
11	45	5

1.6 Solução de vermelho congo em tampão pH 8,0

0,05 g de vermelho congo

Dissolver e completar para o volume para 100 mL com tampão fosfato pH 8,0

1.7 Solução de cloreto de sódio 0,5 M em tampão pH 8,0

2,9224 g de cloreto de sódio

Dissolver e completar o volume para 100 mL com tampão fosfato pH 8,0

1.8 Álcool veratrílico 2,0 mM em tampão tartarato de sódio 0,4 M pH 3,0

30 µL de álcool veratrílico

Diluir e completar o volume para 100 mL com tampão tartarato de sódio pH 3,0

1.9 Peróxido de hidrogênio 2,0 mM

20 μ L de peróxido de hidrogênio 30%

Diluir e completar o volume para 100 mL com o solvente desejado.

1.10 Sulfato de manganês 2,0 mM

0,0302 g de sulfato de manganês

Dissolver e completar o volume para 100 mL com água destilada

1.11 Albumina bovina 0,5%

0,5 g de albumina bovina

Dissolver e completar o volume para 100 mL com água destilada

1.12 Lactato de sódio 0,25 M

2,1888 mL de lactato de sódio

Diluir e completar o volume para 100 mL com água destilada

1.13 Vermelho de fenol 0,01%

0,01 g de vermelho de fenol

Dissolver e completar o volume para 100 mL com água destilada

1.14 Solução de hidróxido de sódio 2 M

8 g de hidróxido de sódio

Dissolver e completar o volume para 100 mL com água destilada

1.15 Siringaldazina 2mM em etanol 0,1%

1.15.1 Solução de etanol 0,1%

0,1 mL de etanol em 100 mL de solução (água destilada como solvente)

1.15.2 Siringaldazina 2mM em etanol 0,1%

0,0721 g de siringaldazina

Dissolver e completar o volume para 100 mL com solução de etanol 0,1%

1.16 Solução de CMC em tampão acetato 0,05 M pH 5,0

0,5 g de CMC

Dissolver e completar o volume para 100 mL com tampão acetato pH 5,0

1.17 Solução de ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS)

1.17.1 Solução de NaOH 1 M

4 g de hidróxido de sódio

Dissolver e completar o volume para 100 mL com água destilada

1.17.2 Solução de DNS

1 g de DNS

40 mL de NaOH 1 M

Dissolver sob aquecimento e agitação moderados, adicionando aos poucos 30 g de tartarato de sódio e potássio

Completar o volume para 100 mL com água destilada

1.18 Curva padrão de glicose

Reagir a solução de glicose com DNS e construir o gráfico com os valores de absorvância registrados para obtenção da equação da reta.

Tabela 3: Dados de absorvância registrados para uma das curvas padrão de glicose.

[] glicose (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	média
2	1,014	1,007	1,021	1,014
1,6	0,813	0,814	0,811	0,813
1,2	0,609	0,606	0,611	0,609
1	0,504	0,507	0,506	0,506
0,8	0,408	0,410	0,400	0,406
0,4	0,210	0,207	0,200	0,206
0,2	0,092	0,097	0,085	0,091

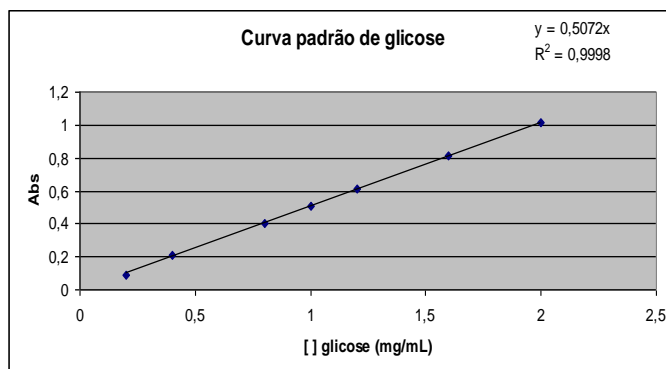


Figura 1: Exemplo de curva padrão de glicose apresentando a equação da reta.

1.19 Reagente de Lowry

Reagente A:

20 g de carbonato de sódio anidro

4 g de hidróxido de sódio

Dissolver e completar o volume para 1000 mL com água destilada

Reagente B:

2 g de sulfato de cobre

Dissolver e completar o volume para 100 mL com água destilada

Reagente C:

4 g de tartarato de sódio

Dissolver e completar o volume para 100 mL com água destilada

Usar a mistura na seguinte proporção: 100:1:1 (A:B:C)

1.20 Reagente de Folin Ciocalteu

Diluir uma parte do reagente em três partes de água

1.21 Curva padrão de Albumina

Tabela 4: Dados de absorbância registrados para uma das curvas padrão de albumina.

[] albumina (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	média
1,50	0,384	0,368	0,359	0,370
1,25	0,340	0,334	0,325	0,333

1,00	0,267	0,258	0,257	0,261
0,75	0,227	0,227	0,225	0,226
0,50	0,178	0,177	0,171	0,175
0,25	0,090	0,093	0,093	0,092
0,10	0,036	0,037	0,032	0,035

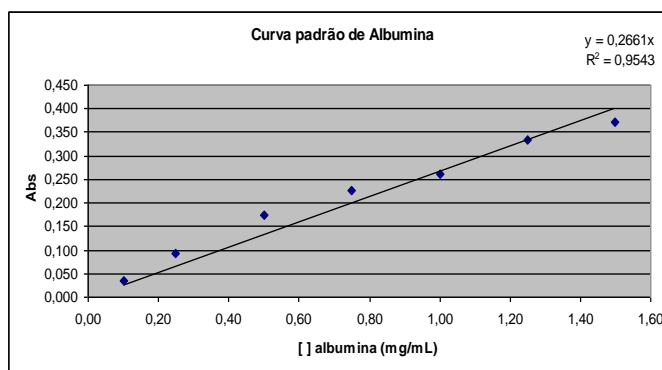


Figura 2: Exemplo de curva padrão de albumina apresentando a equação da reta.

ANEXO II – Valores de absorvência obtidos na determinação das atividades enzimáticas

1.1 Análise exploratória das condições de cultivo

1.1.1 Lignina peroxidase

ENSAIO		FERVIDO			NÃO FERVIDO		
		1	2	3	1	2	3
1	t ₁	0,1630	0,1393	0,1679	0,7049	0,6706	0,6736
	t ₅	0,1736	0,1256	0,1269	0,7021	0,6725	0,6745
2	t ₁	0,5880	0,5927	0,5875	0,5934	0,5830	0,5841
	t ₅	0,5857	0,5912	0,5882	0,5852	0,5846	0,5835
3	t ₁	1,0110	1,0125	1,0305	0,8896	0,8897	0,9099
	t ₅	1,0088	1,0119	1,0289	0,8859	0,8890	0,9080
4	t ₁	0,8179	0,8042	0,8209	0,7389	0,6304	0,7412
	t ₅	0,8161	0,8022	0,8202	0,7356	0,6298	0,7386
5	t ₁	0,5378	0,5227	0,5439	0,5143	0,5136	0,5156
	t ₅	0,5363	0,5215	0,5422	0,5095	0,5125	0,5158
6	t ₁	0,4826	0,4878	0,4891	0,4823	0,4827	0,4794
	t ₅	0,4856	0,4896	0,4910	0,4772	0,4779	0,4728
7	t ₁	0,8268	0,8345	0,8418	0,6769	0,6827	0,6771
	t ₅	0,8258	0,8343	0,8426	0,6697	0,6778	0,6714
8	t ₁	0,6292	0,6347	0,6117	0,6403	0,6330	0,6251
	t ₅	0,6279	0,6359	0,6104	0,6335	0,6302	0,6230
9	t ₁	0,4891	0,4898	0,4903	0,5501	0,5344	0,5517
	t ₅	0,4855	0,4873	0,4889	0,5799	0,5551	0,5804
10	t ₁	0,4451	0,4496	0,4472	0,5141	0,5410	0,5094
	t ₅	0,4454	0,4501	0,4475	0,5091	0,5427	0,5013
11	t ₁	0,4931	0,4965	0,5014	0,4802	0,4866	0,4878
	t ₅	0,4933	0,4977	0,5029	0,4782	0,4825	0,4827

1.1.2 Manganês peroxidase

ENSAIO		FERVIDO			NÃO FERVIDO		
		1	2	3	1	2	3
1	t ₁	0,1922	0,1062	0,1180	0,0797	0,0847	0,0803
	t ₅	0,2316	0,2255	0,2248	0,2205	0,2169	0,2166
2	t ₁	0,0877	0,0859	0,0915	0,0851	0,0865	0,0900
	t ₅	0,1829	0,2110	0,2078	0,2621	0,2443	0,2598
3	t ₁	0,1808	0,1784	0,1785	0,1644	0,1517	0,1599
	t ₅	0,3365	0,3265	0,3266	0,4914	0,4803	0,5127
4	t ₁	0,1813	0,1817	0,1823	0,1559	0,1539	0,1595

	t ₅	0,3366	0,3266	0,3398	0,7877	0,7582	0,7627
5	t ₁	0,0764	0,0778	0,0738	0,0764	0,0731	0,0779
	t ₅	0,1873	0,1851	0,1683	0,1858	0,2120	0,2192
6	t ₁	0,0931	0,0842	0,0816	0,0737	0,0615	0,0628
	t ₅	0,2230	0,1890	0,1853	0,3701	0,3266	0,3506
7	t ₁	0,1952	0,2025	0,2076	0,1791	0,1799	0,1755
	t ₅	0,2984	0,3227	0,3226	0,3184	0,3657	0,3611
8	t ₁	0,2025	0,2127	0,1569	0,1628	0,1771	0,1506
	t ₅	0,3420	0,3446	0,3580	0,2953	0,3098	0,3144
9	t ₁	0,1067	0,1036	0,0918	0,1559	0,1018	0,1424
	t ₅	0,1804	0,1799	0,1965	1,0507	1,0466	1,0497
10	t ₁	0,1914	0,1657	0,1716	0,1891	0,1624	0,1508
	t ₅	0,2838	0,2812	0,2809	1,2920	1,0434	1,0364
11	t ₁	0,1828	0,1671	0,1706	0,1892	0,1661	0,1418
	t ₅	0,2819	0,2656	0,2731	1,2624	0,9736	1,0259

1.1.3 Lacase

ENSAIO		FERVIDO			NÃO FERVIDO		
		1	2	3	1	2	3
1	t ₁	0,1922	0,1393	0,1679	0,1630	0,1426	0,1419
	t ₅	0,1289	0,1256	0,1269	0,1736	0,1722	0,1755
2	t ₁	0,1198	0,1212	0,1336	0,1567	0,1347	0,1193
	t ₅	0,1079	0,1130	0,1149	0,1751	0,1539	0,1413
3	t ₁	0,2058	0,1980	0,1935	0,1368	0,1573	0,1532
	t ₅	0,1870	0,1850	0,1841	0,2265	0,2315	0,2340
4	t ₁	0,2148	0,2135	0,2158	0,1490	0,1447	0,1397
	t ₅	0,1967	0,1953	0,1967	0,2251	0,2287	0,2258
5	t ₁	0,1163	0,1082	0,1054	0,1506	0,1307	0,1316
	t ₅	0,1058	0,1028	0,1001	0,1520	0,1485	0,1492
6	t ₁	0,1251	0,1203	0,1158	0,1111	0,1107	0,1183
	t ₅	0,1192	0,1134	0,1163	0,1389	0,1377	0,1400
7	t ₁	0,2381	0,2171	0,2317	0,1790	0,1701	0,1659
	t ₅	0,2225	0,2072	0,2218	0,2150	0,2177	0,2136
8	t ₁	0,1090	0,1160	0,1103	0,1287	0,1235	0,1269
	t ₅	0,1109	0,1246	0,1048	0,1586	0,1537	0,1557
9	t ₁	0,2180	0,1817	0,1742	0,2145	0,1817	0,1775
	t ₅	0,1486	0,2356	0,1371	0,2417	0,2356	0,2398
10	t ₁	0,2184	0,2145	0,1914	0,1693	0,1377	0,1350
	t ₅	0,1339	0,1415	0,1411	0,1941	0,1842	0,1748
11	t ₁	0,1715	0,2196	0,1824	0,1697	0,1622	0,1539
	t ₅	0,1279	0,1486	0,1306	0,2176	0,2349	0,2171

1.1.4 Celulase

ENSAIO	NÃO FERVIDO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,0710	0,0730	0,0700	0,0700	0,0690	0,0680	0,0760	0,0700
2	0,0250	0,0230	0,0260	0,0250	0,0170	0,0170	0,0150	0,0160
3	0,4420	0,4470	0,4420	0,4500	0,4570	0,4700	0,4410	0,4650
4	0,3390	0,3470	0,3470	0,3550	0,3280	0,3310	0,3170	0,3330
5	0,0210	0,0200	0,0210	0,0200	0,0200	0,0200	0,0210	0,0190
6	0,0770	0,0780	0,0750	0,0770	0,0810	0,0810	0,0810	0,0760
7	0,0340	0,0350	0,0320	0,0330	0,0350	0,0340	0,0330	0,0380
8	0,0570	0,0560	0,0540	0,0570	0,0550	0,0560	0,0510	0,0580
9	0,0290	0,0290	0,0280	0,0280	0,0290	0,0300	0,0290	0,0290
10	0,0320	0,0320	0,0300	0,0290	0,0270	0,0270	0,0290	0,0290
11	0,0330	0,0320	0,0320	0,0320	0,0310	0,0310	0,0300	0,0320

ENSAIO	FERVIDO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,0380	0,0400	0,0390	0,0400	0,0430	0,0450	0,0460	0,0440
2	0,0100	0,0100	0,0090	0,0100	0,0100	0,0100	0,0900	0,0100
3	0,4560	0,4690	0,4570	0,4770	0,4430	0,4600	0,4490	0,4600
4	0,3320	0,3400	0,3290	0,3310	0,2920	0,2960	0,3350	0,3460
5	0,0160	0,0170	0,0160	0,0160	0,0160	0,0140	0,0150	0,0160
6	0,0090	0,0110	0,0090	0,0100	0,0090	0,0080	0,0070	0,0070
7	0,0320	0,0330	0,0330	0,0350	0,0340	0,0330	0,0320	0,0350
8	0,0570	0,0560	0,0530	0,0520	0,0560	0,0580	0,0540	0,0580
9	0,0300	0,0300	0,0300	0,0300	0,0280	0,0310	0,0320	0,0280
10	0,0320	0,0330	0,0390	0,0350	0,0360	0,0360	0,0360	0,0330
11	0,0270	0,0290	0,0280	0,0330	0,0250	0,0240	0,0260	0,0270

1.2 Otimização das condições de cultivo para a produção de lacase e manganês peroxidase

1.2.1 Lacase

ENSAIO		FERVIDO			NÃO FERVIDO		
		1	2	3	1	2	3
1	t ₁	0,2959	0,2719	0,2914	0,3712	0,3550	0,3573
	t ₅	0,2658	0,2660	0,2718	0,3660	0,3650	0,3601
2	t ₁	0,2996	0,2938	0,3103	0,3212	0,2931	0,2886
	t ₅	0,2914	0,2820	0,2904	0,3354	0,3158	0,2960
3	t ₁	0,2196	0,2116	0,2119	0,2337	0,2337	0,2408
	t ₅	0,2051	0,2007	0,2049	0,2412	0,2421	0,2431
4	t ₁	0,2212	0,2187	0,2170	0,2229	0,2281	0,2139
	t ₅	0,1999	0,2028	0,2085	0,2289	0,2382	0,2412
5	t ₁	0,3014	0,2847	0,2947	0,3354	0,3413	0,3378
	t ₅	0,2780	0,2733	0,2811	0,3536	0,3529	0,3479
6	t ₁	0,3400	0,3504	0,3262	0,3986	0,3701	0,3577
	t ₅	0,3208	0,3199	0,3159	0,3517	0,3502	0,3487

7	t ₁	0,2478	0,2526	0,2540	0,2860	0,2969	0,2852
	t ₅	0,2345	0,2389	0,2379	0,2763	0,2732	0,2706
8	t ₁	0,6006	0,6248	0,6484	0,6205	0,5990	0,5590
	t ₅	0,5941	0,6020	0,6178	0,6015	0,5563	0,5514
9	t ₁	0,2124	0,2352	0,2127	0,2120	0,2106	0,1988
	t ₅	0,2032	0,1991	0,1973	0,2112	0,2008	0,2060
10	t ₁	0,2445	0,2351	0,2350	0,2117	0,2109	0,2021
	t ₅	0,2211	0,2193	0,2205	0,2104	0,2117	0,2134
11	t ₁	0,2370	0,2145	0,2230	0,2159	0,2123	0,2225
	t ₅	0,2069	0,2075	0,2134	0,2100	0,2102	0,2163
12	t ₁	0,2662	0,2523	0,2472	0,2323	0,2075	0,2246
	t ₅	0,2412	0,2282	0,2278	0,2159	0,2155	0,2180

1.2.2 Manganês peroxidase

ENSAIO		FERVIDO			NÃO FERVIDO		
		1	2	3	1	2	3
1	t ₁	0,0579	0,0640	0,0607	0,0615	0,0831	0,0677
	t ₅	0,1620	0,1824	0,1780	1,0807	0,8854	1,0977
2	t ₁	0,0852	0,0932	0,0888	0,0772	0,0917	0,0523
	t ₅	0,1979	0,1888	0,1806	1,4478	1,3757	1,4676
3	t ₁	0,0915	0,0773	0,0876	0,0945	0,0860	0,0923
	t ₅	0,2055	0,2031	0,1923	0,1932	0,1722	0,1944
4	t ₁	0,0932	0,0684	0,0849	0,0551	0,0534	0,0529
	t ₅	0,2143	0,1786	0,1988	1,1942	1,1060	1,2000
5	t ₁	0,1090	0,0763	0,0843	0,1370	0,1386	0,1260
	t ₅	0,2358	0,1982	0,2121	0,2497	0,2560	0,2249
6	t ₁	0,0496	0,0492	0,0489	0,0510	0,0490	0,0486
	t ₅	0,1728	0,1806	0,1860	1,0010	0,9854	0,9517
7	t ₁	0,0834	0,0935	0,0833	0,1338	0,1287	0,1268
	t ₅	0,1995	0,2142	0,1950	0,2058	0,1951	0,1959
8	t ₁	0,0570	0,0602	0,0605	0,0589	0,0664	0,0817
	t ₅	0,1791	0,1767	0,1825	0,1731	1,2341	0,2295
9	t ₁	0,0722	0,0802	0,0715	0,0664	0,0817	0,0601
	t ₅	0,1550	0,1635	0,1731	1,2341	1,9298	1,2366
10	t ₁	0,1712	0,1583	0,1358	0,1266	0,1219	0,1291
	t ₅	0,2573	0,2391	0,2137	0,2051	0,2051	0,2147
11	t ₁	0,0740	0,0738	0,0658	0,0587	0,0777	0,0911
	t ₅	0,1693	0,1755	0,1654	0,7315	1,0084	1,0253
12	t ₉	0,0738	0,0642	0,0629	0,0728	0,0577	0,0435
	t ₁₃	0,1949	0,1792	0,1686	0,1579	0,1697	0,1550
13	t ₁₇	0,0437	0,0421	0,0445	0,0458	0,0450	0,0454
	t ₂₁	0,1649	0,1634	0,1617	0,1552	0,1521	0,1526

14	t ₂₅	0,0738	0,0687	0,0673	0,0552	0,0616	0,0744
	t ₂₉	0,1891	0,1835	0,1642	0,1727	0,2195	0,1907
15	t ₃₃	0,0729	0,0729	0,0615	0,0630	0,0614	0,0622
	t ₃₇	0,1808	0,1762	0,1774	1,0826	1,2044	1,1463
16	t ₄₁	0,0854	0,0579	0,0498	0,0590	0,0585	0,0479
	t ₄₅	0,1813	0,1879	0,1458	0,9495	0,9981	0,9451
17	t ₄₉	0,0724	0,0769	0,0632	0,0890	0,0655	0,0719
	t ₅₃	0,1693	0,1811	0,1759	1,1491	1,0827	1,0614
18	t ₅₇	0,0617	0,0575	0,0742	0,0517	0,0735	0,0654
	t ₆₁	0,1705	0,1577	0,1667	1,0343	1,0887	1,0847

1.3 Time course para manganês peroxidase

ENSAIO		FERVIDO			NÃO FERVIDO		
		1	2	3	1	2	3
1	t ₁	0,1714	0,1735	0,1571	0,1866	0,1457	0,1735
	t ₅	0,2267	0,2243	0,2246	0,9311	0,6066	1,3139
2	t ₁	0,1031	0,1124	0,1162	0,0819	.0784	0,0877
	t ₅	0,1969	0,1966	0,2164	1,5151	1,3224	1,4060
3	t ₁	0,1676	0,1195	0,1043	0,1107	0,0886	0,0764
	t ₅	0,5118	0,1990	0,1860	1,9124	1,3843	1,2045
4	t ₁	0,0930	0,0827	0,0857	0,0646	0,0738	0,0652
	t ₅	0,0972	0,1085	0,1004	0,8591	0,9015	0,9189
5	t ₁	0,0825	0,0636	0,0621	0,0588	0,0600	0,0586
	t ₅	0,0888	0,0840	0,0839	0,7777	0,7077	0,7970
6	t ₁	0,0671	0,0585	0,0652	0,0666	0,0690	0,0597
	t ₅	0,0936	0,0898	0,1180	0,6804	0,7049	0,7397
7	t ₁	0,0545	0,0410	0,0360	0,0545	0,0551	0,0465
	t ₅	0,1096	0,1043	0,0968	0,4947	0,4788	0,4357
8	t ₁	0,0292	0,0285	0,0292	0,0411	0,0298	0,0302
	t ₅	0,0935	0,0934	0,0942	0,5971	0,5083	0,6031