

Universidade do Estado do Amazonas-UEA
Programa de Pós-graduação Mestrado em Biotecnologia e
Recursos Naturais da Amazônia.

M^a Dolores Pinheiro Fonseca

Produção de Enzimas Oxidativas por Fungos Amazônicos
Degradadores de Madeira

Manaus-Amazonas

2009

M^a Dolores Pinheiro Fonseca

Produção de Enzimas Oxidativas por Fungos Amazônicos Degradadores de Madeira.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Ademir Castro e Silva

Manaus-Amazonas
2009

M^a Dolores Pinheiro Fonseca

Produção de Enzimas Oxidativas por Fungos Amazônicos
Degradadores de Madeira

Dissertação de mestrado

Comissão examinadora:

Dr. Ademir Castro e Silva
Orientador

Dra. Claudete Catanhede do Nascimento

Dra. Helena Camarão Telles Ribeiro

Manaus-Amazonas

2009

*A Deus que me deu forças, coragem e perseverança para
vencer todos os obstáculos para chegar até aqui.
À minha família pelo apoio incondicional e ao meu
amado Otaviano pelo incentivo e admiração sempre.*

Dedico.

Agradecimentos

A Deus presente em todos os momentos, concedendo oportunidade do aprendizado, revelando seu poder e sua glória a cada instante da minha vida.

Os meus familiares que sempre acreditaram em mim, sempre estiveram presentes em todos os momentos, que me deram a oportunidade de estar realizando mais um sonho, àqueles que eu amo muito, e que sem eles eu nada seria, meus pais José Fonseca e Aldenora, aos meus irmãos Kaly, Gorete, Marilene e Socorro, as minhas sobrinhas Jamille e Geovana.

Ao meu amado Otaviano pelo companheirismo, incentivo, amor a mim dedicado e sempre me apoiar na minha vida profissional.

À coordenação do curso de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais-MBT, a Universidade do Estado do Amazonas-UEA e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas-FAPEAM pela bolsa de estudo concedida.

Ao professor Dr. Ademir Castro e Silva, pelas primeiras lições na pesquisa científica, pelo incentivo, apoio, amizade e valiosa orientação o meu muito obrigada.

À todos os colegas do laboratório de Biorgânica do MBT, pelo apoio para realização deste trabalho e os momentos de descontração.

Aos meus amigos do mestrado Jucileuza Santos, pela amizade, companheirismo em todos os congressos, cursos e viagens e pela força na realização deste trabalho. Rosilane Graça, Tamara Santos, Celina de Jesus, João Paulo, Natalia Martins, Rafaelle Paz, pelas ajudas na realização deste trabalho.

A professora Dra. Sandra Zanotto e Professor Dr. José Carlos pelo apoio e confiança em mim depositada para dar seqüência ao meu trabalho.

Aos professores do curso de mestrado em Biotecnologia, pelo aprendizado, paciência e troca de experiência.

E todos aqueles que me ajudaram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1 OBJETIVOS.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Características dos fungos.....	17
2.2. Importância dos fungos na Biotecnologia.....	21
2.3 Crescimento e nutrição dos fungos.....	24
2.4 Basidiomicetos	25
2.5 Ascomicetos	29
2.6 Fungos deterioradores de biopolímero (madeira)	31
2.7 Ultra estrutura da madeira e composição química.....	32
2.7.1 Celulose.....	32
2.7.2 Hemicelulose	33
2.7.3 Lignina.....	34
2.8 Enzimas ligninolíticas	36
2.8.1 Lignina – Peroxidase (LiP)	37
2.8.2 Manganês–Peroxidase (Mn–P)	38
2.8.3 Lacase	39
2.8.4 Peroxidase	41
3. MATERIAL E MÉTODO	43
3.1. Fungos.....	43
3.2 Meios de cultura	43
3.2.1 Meio sólido para avaliação do crescimento micelial.....	44
3.2.2 Meio líquido para avaliação da atividade enzimática	45
3.3 Avaliação do crescimento micelial	46
3.4. Condições de crescimento.....	46
3.4.1 Meios de cultura	46
3.4.2 Avaliação da temperatura.....	47
3.4.3 Taxa de crescimento do fungo e massa micelial.....	47
3.6 Meio de cultura para cultivo da determinação das atividades enzimáticas.	48
3.7. Determinação das atividades enzimáticas.....	48
3.7.1 Fenoloxidase total.	48
3.7.2 Lacase	49
3.7.3 Peroxidase.....	49
3.7.4 Análise estatística	49

4 RESULTADO	50
4.1 Crescimento micelial	50
4. 1.1 Crescimento em pH 4	50
4. 1.2 Crescimento em pH 5	51
4. 1.3 Crescimento em pH 6	53
4. 1.4 Crescimento em pH 7	54
4. 1.5 Crescimento em pH 8	55
4.2.1 Crescimento diário	57
4.2.1.1 <i>Lentinus crinitus</i>	57
4.2.1.2 <i>Trametes lactinea</i>	60
4.2.1.3 <i>Datronia brunneoleuca</i>	62
4.2.1.4 <i>Xylaria</i> SP.....	64
4.3 Atividade enzimática.....	78
4.3.1 Padrão da atividade enzimática.....	79
4.4 Produção da massa micelial82	
5 DISCUSSÃO	84
CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de fungos.....	19
Tabela 2. Divisão dos fungos e seus filos.....	20
Tabela 3. Microrganismos que degradam a lignina da madeira.....	27
Tabela 4. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 4 e 28 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.....	51
Tabela 5. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 4 e 30 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.....	52
Tabela 6. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 5 e 28 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.....	52
Tabela 7. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 5 e 30 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.....	52
Tabela 8. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 6 e 28 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.....	54
Tabela 9. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 6 e 30 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.....	54
Tabela 10. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 7 e 28 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.....	56
Tabela 11. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 7 e 30 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.....	56
Tabela 12. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 8 e 28 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.....	57
Tabela 13. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 8 e 30 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.....	57
Tabela 14. Análise de variância do crescimento micelial do fungo <i>Lentinus crinitus</i> em diferentes meios de cultura (pH7 e T=28 °C).....	67

Tabela 15. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo do fungo <i>Lentinus crinitus</i> pH 7.0 28° C. Valores entre parênteses significam média.....	68
Tabela16. Análise de variância do crescimento micelial do fungo <i>Lentinus crinitus</i> em diferentes meios de cultura (pH7 e T=30 °C).....	68.
Tabela 17. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 99% para os diferentes meios de cultivo pH 7.0 30° C fungo <i>Lentinus crinitus</i> . Valores entre parênteses significam média.....	68
Tabela 18. Análise de variância do crescimento micelial do fungo <i>Trametes lactinea</i> em diferentes meios de cultura (pH4 e T=30 °C).....	71
Tabela 19. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 4.0 30° C do fungo <i>Trametes lactinea</i> . Valores entre parênteses significam média.....	72
Tabela 20. Análise de variância do crescimento micelial do fungo <i>Trametes lactinea</i> em diferentes meios de cultura (pH8 e T=30 °C.).....	72
Tabela 21. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 8.0 30° C do fungo <i>Trametes lactinea</i> . Valores entre parênteses significam a media.....	72
Tabela 22. Análise de variância do crescimento micelial do fungo <i>Xylaria sp</i> em diferentes meios de cultura (pH4 e T=30 °C).....	74
Tabela 23. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 4.0 30° C fungo <i>Xylaria sp</i> . Valores entre parênteses significam a média.....	74
Tabela 24. Análise de variância do crescimento micelial do fungo <i>Xylaria sp</i> em diferentes meios de cultura (pH7 e T=28 °C).....	75
Tabela 25. A resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 7.0 28° C do fungo <i>Xylaria sp</i> . Valores entre parênteses significam a média.....	75
Tabela 26. Análise de variância do crescimento micelial do fungo <i>Xylaria sp</i> em diferentes meios de cultura (pH7 e T=30 °C).....	76
Tabela 27. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 7.0 30° C do fungo <i>Xylaria sp</i> .Valores entre parênteses significam a média.....	76
Tabela 28. Análise de variância do crescimento micelial do fungo <i>Xylaria sp</i> em diferentes meios de cultura (pH8 e T=28 °C).....	76.

Tabela 29. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 8.0 28° C fungo <i>Xylaria</i> sp valores entre parênteses significam a média.....	77
Tabela 30. Análise de variância do crescimento micelial do fungo <i>Xylaria</i> sp em diferentes meios de cultura (pH8 e T=30 °C).....	77.
Tabela 31. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 8.0 30° fungo <i>Xylaria</i> sp valores entre parênteses significam a media.....	77
Tabela 32. Parâmetros descritivos das atividades enzimáticas dos fungos degradadores de madeira testados em meio de cultivo líquido de extrato jerimum em temperatura 28° C, sem luz e sob condição estacionária.....	78
Tabela 33. Parâmetros descritivos da massa micelial dos fungos testados no período de 30 dias.....	82
Tabela 34. Variação do pH do meio durante o crescimento em meio líquido (1= início, 2= final).....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de colonização da madeira pelos fungos.....	31
Figura 2. Estrutura de um fragmento de celulose.....	33
Figura 3. Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose.....	34
Figura 4. Estrutura de um fragmento de lignina.....	35
Figura 5. Ciclo catalítico simplificado da lignina peroxidase.....	38
Figura 6. Mn (II) é oxidada a Mn (III) por uma peroxidase dependente de Mn.....	39
Figura 7. Mecanismo de ação da lacase.....	40
Figura 8. Inter-relação entre estados de redução de uma peroxidase típica (HRP).....	42
Figura 9. Progressão da fronteira micelial de <i>Lentinus crinitus</i> em pH 4 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	58
Figura 10. Progressão da fronteira micelial de <i>Lentinus crinitus</i> em pH 5 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	58
Figura 11. Progressão da fronteira micelial de <i>Lentinus crinitus</i> em pH 6 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	59
Figura 12. Progressão da fronteira micelial de <i>Lentinus crinitus</i> em pH 7 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	59
Figura 13. Progressão da fronteira micelial de <i>Lentinus crinitus</i> em pH8 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	59
Figura 14. Progressão da fronteira micelial de <i>Trametes lactinea</i> em pH 4 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	60
Figura 15. Progressão da fronteira micelial de <i>Trametes lactinea</i> em pH 5 crescido em diferentes meios de cultura sólido.....	61
Figura 16. Progressão da fronteira micelial de <i>Trametes lactinea</i> em pH 6 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	61

Figura 17. Progressão da fronteira micelial de <i>Trametes lactinea</i> em pH 7 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	61
Figura 18. Progressão da fronteira micelial de <i>Trametes lactinea</i> em pH 8 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	62
Figura 19. Progressão da fronteira micelial de <i>Datronia brunneoleuca</i> em pH 4 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	63
Figura 20. Progressão da fronteira micelial de <i>Datronia brunneoleuca</i> em pH 5 crescidos em diferentes meios de cultivos sólido.....	63
Figura 21. Progressão da fronteira micelial de <i>Datronia brunneoleuca</i> em pH 6 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	63
Figura 22. Progressão da fronteira micelial de <i>Datronia brunneoleuca</i> em pH 7 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	
Figura 23. Progressão da fronteira micelial de <i>Datronia brunneoleuca</i> em pH 8 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	64
Figura 24. Progressão da fronteira micelial de <i>Xylaria sp</i> em pH 4 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	65
Figura 25. Progressão da fronteira micelial de <i>Xylaria sp</i> em pH 5 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	65
Figura 26. Progressão da fronteira micelial de <i>Xylaria sp</i> em pH 6 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.	66
Figura 27. Progressão da fronteira micelial de <i>Xylaria sp</i> em pH 7 crescido em diferentes meios de cultivo.....	66
Figura 28. Progressão da fronteira micelial de <i>Xylaria sp</i> em pH 8 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.....	66
Figura 29. Padrão de variação da atividade enzimática de lacase dos fungos degradadores de madeira testados.....	80
Figura 30. Padrão de variação na atividade enzimática de fenoloxidase dos fungos degradadores de madeira testados.....	81
Figura 31. Padrão de variação na atividade enzimática de peroxidase dos fungos testados.....	81

RESUMO

Os fungos amazônicos degradadores de madeira *Datronia brunneoleuca*, *Lentinus crinitus*, *Trametes lactinea* e *Xylaria sp* foram avaliados em cinco meios de cultura sólido sendo eles: extrato de jerimum, bagaço de cana, farinha de peixe, extrato de malte e BDA, nos pHs 4, 5, 6, 7 e 8 e temperaturas 28° e 30° C. As medidas do crescimento micelial foram tomadas em duas direções perpendiculares a cada 24 horas até que completasse o diâmetro da placa. Dos meios industriais testados (Malte e BDA), as cepas Amazônicas de *Datronia brunneoleuca*, *Trametes lactinea* e *Lentinus crinitus* apresentaram melhor resposta ao crescimento médio em meio sintético de extrato de malte na temperatura de 30°C muito embora os outros meios tenham contribuído para o crescimento dos fungos, confirmando que cada fungo tem suas exigências nutricionais específicas. O melhor resultado para crescimento radial dos fungos testados em meio sintético foi extrato de malte e a temperatura de 30 °C é onde se obteve o maior valor absoluto de crescimento para *Datronia brunneoleuca*, *Trametes lactinea* e *Lentinus crinitus*. Enquanto o melhor pH para crescimento dos fungos esta na faixa de 4-5. Para determinação da massa micelial foi utilizado o crescimento em meio líquido extrato de jerimum e após 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias a massa micelial foi calculada pela diferença em relação ao peso seco (em estufa 70°C). A porcentagem de massa micelial produzida foi determinada no final do experimento e a cada cinco dias de incubação. Em termos de valores absolutos a maior produção ocorreu para *Datronia brunneoleuca* e a menor para *Xylaria sp*. De modo geral, com exceção para *Xylaria sp*, os fungos apresentaram percentual de produção de massa micelial muito próximo com uma diferença em torno de 63% entre eles. Para determinação das atividades lacase, fenoloxidase total e peroxidase, em temperatura 28° C, sem luz, em condição estacionária. Os fungos foram cultivados em meio líquido extrato de jerimum contendo 3% de Tween 80 e 3% de sulfato de magnésio. Os basidiomicetos produzem enzimas ligninolíticas de forma constitutiva, porém elas podem ser induzidas pelas condições de cultivo. Os resultados da presente pesquisa mostraram que fungos amazônicos utilizados com a adição de Tween-80 contribui para o aumento da secreção de lacase e peroxidase. De modo geral, não houve diferença estatística na atividade fenoloxidase e peroxidase entre os fungos testados, com exceção para *Xylaria sp* que mostrou diferença apenas em relação a *Lentinus crinitus* . Pode-se concluir que o meio líquido de jerimum acrescido de surfactante, dextrose e sulfato de magnésio é adequado para obtenção de grande densidade micelial para os fungos *Datronia brunneoleuca*, *Trametes lactinea* e *Lentinus crinitus* e a utilização de Tween-80 no meio líquido contribui para o aumento da secreção de lacase pelos fungos testados. Há uma relação positiva entre a atividade enzimática e produção de massa micelial nos fungos aqui estudados.

Palavras – chave: Fungos amazônicos, fenoloxidases total, lacase e peroxidase.

ABSTRACT

The degrading Amazonian fungi wood *Datronia brunneoleuca*, *Lentinus crinitus*, *Trametes lactinea* and *Xylaria* sp were evaluated in five ways of solid culture being them: extract of jerimum, sugarcane bagasse, fish meal, extract of malte and BDA, in pHs 4, 5, 6, 7 and 8 and temperatures 28° and 30°C. The measures of the micelial growth had been taken in two perpendicular directions for each 24 hours until it completed the diameter Petri dishes. Medium tested industrials (Malte and BDA), cepas Amazonian of *Datronia brunneoleuca*, *Trametes lactinea* and *Lentinus crinitus* presented good answer to the average growth in synthetic way of extract of malte in the temperature of 30°C however, the other ways had contributed to the growth of the fungi, confirming that each fungu has its specific nutritional requirements. The best result for radial growth of the fungi tested in synthetic way was extract of malte and temperature 30° C where it got the great absolute value of growth for *Datronia brunneoleuca*, *Trametes lactinea* and *Lentinus crinitus*. While the best pH for growth of the fungi is in the range of 4-5. For determination of the micelial mass, it was used the growth in liquid medium extract of jerimum and after 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days the micelial mass were calculated by the difference in relation to the dry weight (in greenhouse 70°C). The percentage of micelial mass produced was determined in the end of the experiment and to each five days of incubation. In terms of absolute values the great production occurred for *Datronia brunneoleuca* and the minor for *Xylaria* sp. In general, with exception to *Xylaria* sp, the fungus had presented percentage of production of micelial mass very near with a difference around 63% between them. For determination of the activities of lacase, fenoloxidasel and peroxidase, in temperature 28° C, without light, in stationary condition. The fungi had been cultivated in liquid medium extract of jerimum contend 3% of Tween 80 and 3% of magnesium sulphate. The basidiomycetes produce enzymes ligninolític of constituent form; however they can be induced for the culture conditions. The results of the present research showed that Amazonian fungi used with the addition of Tween-80 contributes to the increase of the secretion of lacase and peroxidase. In general, it did not have statistics difference in fenoloxidase activity and peroxidase between the tested fungi, with exception for *Xylaria* sp that showed difference only in relation the *Lentinus crinitus*. It can be concluded that the liquid medium of jerimum added of surfactante, dextrose and sulphate of magnesium is adjusted for attainment of great micelial density for the fungi *Datronia brunneoleuca*, *Trametes lactinea* and *Lentinus crinitus* and the use of Tween-80 in the liquid medium contributes for the increase of the secretion of lacase for the tested fungus. There is a positive relation between the enzymatic activity and production of micelial mass in the fungi studied here.

Key words : Amazonian fung, fenoloxidasel, lacases and peroxidase.

INTRODUÇÃO

O potencial biotecnológico de microrganismos, especialmente aqueles da biodiversidade amazônica, tem despertado grande interesse de pesquisadores de todo o mundo em função do potencial industrial que suas enzimas podem apresentar. O avanço dos estudos na área da biotecnologia tem contribuído para esse interesse e vêm contribuindo com produtos e processos de importância industrial.

Nesse contexto, encontram-se os estudos da atividade enzimática de fungos degradadores de madeira notadamente aqueles pertencentes a classe dos basidiomicetos com capacidade de degradar a lignina e inúmeros substratos de natureza fenólica, pesticida, corantes entre outros. Estes estudos estão voltados principalmente para aquelas enzimas de interesse comercial, de emprego em várias áreas da atividade industrial. O mercado mundial dessas enzimas tem um faturamento anual estimado em cerca de U\$ 1,5 bilhões, com um aumento de/ ano de 12% na quantidade de enzimas produzidas (CASTRO E SILVA, SILVA E CAVALCANTE, 2002).

Por outro lado, a região Amazônica, apesar de sua grade biodiversidade microbiana, ainda encontra-se com grande percentual de sua área geográfica desconhecida nesse sentido, e conseqüentemente sem quase nenhuma participação no mercado de enzimas mundial.

Urge, portanto a necessidade de se conhecer o potencial enzimáticos desses fungos com vasto aproveitamento biotecnológico. Também se faz, necessário, o estudo sobre as variáveis que possam exercer influência sobre a atividade enzimática.

1. Objetivos

1.1 Geral

Avaliar a fisiologia e atividade ligninolítica dos fungos amazônicos *Datronia brunneoleuca* (Cooke) Ryvarden, *Trametes lactinea* (Berk.) Sacc., *Lentinus crinitus* (L.) Fr.

1.2. Específicos

- ❖ Avaliar o crescimento micelial e produção/dia da atividade enzimática;
- ❖ Determinar a atividade ligninolítica (fenoxidase, lacase e lignina peroxidase) dos fungos;
- ❖ Estudar a influência de diferentes fontes de carbono e pH na atividade de crescimento dos fungos;

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Características dos fungos.

Os fungos constituem o grupo mais diverso de eucariontes em ambiente terrestre depois dos insetos, devido à sua ampla distribuição e associação com substratos inorgânicos e orgânicos (GEWIN, 2002; HOLF et al., 2004). Fries, em 1825, estimou em 140 mil as espécies de fungos; no entanto, a partir de 1990, as estimativas variam de 1,5 a 13,5 milhões (LODGE et al. 1995, LODGE & CANTRELL 1995, LODGE 2001). A mais aceitável por micólogos e em trabalhos de biodiversidade global é de 1,5 milhão de espécies. Proposta por HAWKSWORTH (2001), desta estimativa menos de 7% das espécies estão descritas e identificadas.

Os fungos são geralmente considerados como uma classe de organismos altamente especializados. Estes seres, igualmente aos animais, não são capazes de sintetizar açúcar e amido a partir de dióxido de carbono presente na atmosfera, conseqüentemente, devem buscar outras matérias orgânicas para alimentarem-se. Praticamente, qualquer material orgânico obtido de plantas ou animais pode sustentar algumas espécies de fungos

(FIDLAY, 1967). Na sua grande maioria os fungos são filamentosos e multicelulares. Possuem o corpo formado por um emaranhado de filamentos, denominados hifas, e o seu conjunto recebe o nome de micélio. As hifas variam no diâmetro, espessura da parede, localização do pigmento, etc. (PUTZKE, 2004).

O crescimento é em geral apical, mas normalmente qualquer fragmento hifálico pode dar origem a outra formação micelial quando destacado e colocado em meio apropriado. As estruturas reprodutivas são diferenciadas das vegetais, o que constitui a base sistemática dos fungos (PUTZKE e PUTZKE, 1998). A variação morfológica é muito grande, existindo espécies macro e microscópicas o que contribui para existência de muitos sistemas de classificação (Tabela 1) que ainda hoje sofrem adições e alterações (PUTZKE, 2004).

Tabela 1. Classificação de fungos.

Alexopoulos et al (1996)	Hawksworth et al (1995)	Hawksworth et al (1983)
<p>Reino Stramenopila</p> <p>Filo Oomycota</p> <p>Filo Hyphochytridiomycota</p> <p>Filo Labyrinthulomycota</p> <p>Reino Protistas</p> <p>Filo Dictyosteliomycota</p> <p>Filo Acrasiomycota</p> <p>Filo Myxomycota</p> <p>Filo Plasmodiophoromycota</p> <p>Reino Fungi</p> <p>Filo Chytridiomycota</p> <p>Filo Zygomycota</p> <p>Filo Ascomycota</p> <p>Filo Basidiomycota</p>	<p>Reino Chromista</p> <p>Filo Hyphochytridiomycota</p> <p>Filo Labyrinthulomycota</p> <p>Filo Oomicota</p> <p>Reino Protozoa</p> <p>Filo Acrasiomycota</p> <p>Filo Dictyosteliomycota</p> <p>Filo Myxomycota</p> <p>Filo Plasmodiophoromycota</p> <p>Reino Fungi</p> <p>Filo Chytridiomycota</p> <p>Filo Zygomycota</p> <p>Filo Ascomycota</p> <p>Filo Basidiomycota</p>	<p>Reino Fungi</p> <p>Divisão Myxomycota</p> <p>Divisão Eumycota</p> <p>Subdivisões:</p> <p>Mastigomycotina</p> <p>Zygomycotina</p> <p>Ascomycotina</p> <p>Basidiomycotina</p> <p>Deuteromycotina</p>

Fonte: Modificado de PUTZKE (2004)

Geralmente a reprodução dos fungos se processa através de corpos microscópicos chamados esporos, equivalentes as sementes nas plantas, só que em dimensões muito menores e, usualmente, reproduzidas em grande número. Em condições adequadas de umidade, o esporo germina dando origem a uma hifa, que em conjunto, formam uma malha de tecidos conhecido como micélio. Uma vez que o fungo tenha desenvolvido suficiente micélio,

forma corpos frutíferos (esporóforos) em que se produzem novos esporos, para assim completar o ciclo. Os fungos apresentam-se como cosmopolitas, ou seja, encontram-se distribuídos em todas as regiões do planeta, porém de maior incidência em ambientes de clima tropical, quente e úmido. Podem ser encontrados no solo, águas, sobre animais e vegetais, em alimentos naturais e industrializados (TEIXEIRA et al., 2001; BONONI,1999)

A classificação dos fungos está baseada nas diversas formas de corpos frutíferos, que geralmente se desenvolvem na superfície externa do substrato de onde o fungo cresce. O reino fungi está dividido em cinco filos que estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Divisão dos fungos e seus filos.

Tipos de fungos	Filos
Fungos aquáticos	Oomycota
Fungos terrestres	Zygomycota
Trufas, bolores verdes, amarelos e vermelhos	Ascomycota
Cogumelos, ferrugens e carvões	Basidiomycota
Fungos do tipo Penicillium	Deuteromycota

Fonte: Modificado de FIDLAY 1967.

De acordo com a nutrição, os fungos são classificados em duas categorias: saprófitas(ou sapróbios) e parasitas. Os saprófitas se alimentam de matéria orgânica animal ou vegetal morta e os parasitas vivem dentro ou sobre organismos vivos (animais ou vegetais), deles retirando seus alimentos, absorvem nutriente em vez de ingeri-los, secretando enzimas digestivas no

substrato onde se desenvolvem. Essas enzimas catalisam a quebra de moléculas grandes em moléculas suficientemente menores para serem absorvidas pela célula fúngica. Por essa razão, os fungos crescem dentro ou sobre os alimentos (RAVEM, 2001).

Muitos fungos já eram empregados desde a mais longínqua antiguidade, quando o homem descobriu a metodologia e técnica de preparo do pão, do queijo e das bebidas. Na época, ignorando o que provocava a fermentação, pelo menos o pão e as bebidas alcoólicas surgiram praticamente em todos os cantos do planeta independentemente. Durante centenas de anos, várias tribos indígenas aprenderam com a natureza que determinadas espécies de fungos eram comestíveis, e de excelente valor nutritivo. Europeus e asiáticos ainda hoje mantêm cogumelos em suas dietas, especialmente porque a ciência tem descoberto qualidades ignoradas por tanto tempo e que existem na maioria dos demais alimentos tais como: baixam o nível de colesterol no sangue, têm substâncias anticancerígenas, são fontes de aminoácidos (essenciais e não essenciais), contêm minerais como o cálcio, potássio, iodo e fósforo, contêm várias vitaminas, nutrem e não engordam (PUTZKE, 2004).

2.2. Importância dos fungos na Biotecnologia

Os fungos juntamente com as bactérias heterotróficas são os principais decompositores de materiais lignocelulósicos da biosfera. Vários fungos estão associados a degradar dejetos e detritos de esgotos até um grau em que possam ser considerados adubo ou substância equivalente. Ecologicamente

podem ser considerados os lixeiros do mundo, por degradarem todo tipo de restos orgânicos, independente da origem, transformando-os em elementos assimiláveis pelas plantas (NEUFELD, 1997; PUTZKE, 2002, 2004).

Dentro da biotecnologia moderna, uma das maiores contribuições para a questão do tratamento de resíduos é representada pelo desenvolvimento de processos fundamentados em fungos, principalmente os de decomposição branca. Trata-se de uma família de fungos que apresenta elevada eficiência para degradação de lignina e de inúmeros substratos de natureza fenólica similar (DITTMANN, 2002).

Fungos como *Phenerochaete chrysosporium*, *Trametes villosa* e *Trametes versicolor*, têm sido utilizados com sucesso na degradação de inúmeros substratos de relevância ambiental como lignina, fenol, fenóis clorados, pesticidas, corantes entre outros. Estas espécies de fungos, em meios limitados de carbono e nitrogênio, produzem enzimas extracelulares, principalmente responsáveis pela enorme capacidade degradativa dos fungos. Assim, enzima como lacase, lignina e manganês peroxidase tem sido utilizadas com sucesso em inúmeros estudos de degradação. Neste caso, a necessidade de desenvolver sistemas imobilizadores tem se tornado uma prioridade, principalmente para garantir o reaproveitamento das enzimas (XIA et al., 2003; PERALTA-ZAMORA et al., 2003).

Várias espécies de fungos são usadas em diversos tipos de indústrias (alimentícia, farmacêutica, etc). Os cogumelos das espécies *Agaricus*

campestris, *Morchella hortensis*, *Clavaria fava*, *Pleurotis* sp. *Boletus* sp. e as trufas do gênero *Tuber* sp., são os mais freqüentemente utilizados como alimentos. As espécies de *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti* e *Penicillium gordonzola* podem ser utilizados no preparo de queijos. Dentre as leveduras de maior importância industrial destacam-se as linhagens fermentativas de *Saccharomyces*, empregadas na indústria de panificação, e bebidas alcoólicas: Cerveja (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbetgensis*), rum, vinho (*Saccharomyces ellipsoideus*), saquê e produção industrial do etanol a partir da cana de açúcar (NEUFELD, 1997).

Outro aspecto de interesse biotecnológico dos fungos é a produção de moléculas com atividade farmacológica, uma área explorada em biotecnologia, por empresas de países industrializados. Os antibióticos são os produtos microbianos tradicionalmente mais explorados nesta área; entretanto, atualmente novos compostos têm sido investigados em escala de screenig farmacológico industrial, como agentes antitumorais e anti-câncer, inibidores enzimáticos e agentes cardiovasculares. A aplicação de microrganismos na produção de fármacos teve um desenvolvimento acelerado a partir da descoberta dos antibióticos, na década de 30. A produção de penicilina de *Penicillium notatum* ou o *Penicillium chrysogenum*, revolucionou toda a terapêutica antimicrobiana, possibilitando a descoberta de outras drogas desse tipo, algumas com especificidade para fungos, bactérias, protozoários, etc. (LACAZ, 2002).

Incontestavelmente, a biotecnologia em geral, e as enzimas em particular, ganham um lugar importante na tecnologia da produção de celulose, branqueamento de polpas, na reciclagem de papel e, se utilizadas de maneira ágil e fundamental, muito deverão contribuir para a indústria papeleira em nosso país.

2.3 Crescimento e nutrição dos fungos

Os fungos devem absorver os nutrientes necessários para seu crescimento em um substrato disponível. Em geral, os nutrientes compõem a solução que rodeia a célula e devem possuir um tamanho adequado para que possa atravessar as camadas celulares.

Existe um grande número de estudos acerca de transportes em fungos, esses estudos envolvem técnicas de biologia molecular para identificação dos genes envolvidos nos processos de transporte (GARRIL, 1995).

Os fungos, como todos os organismos vivos, podem modificar seu ambiente e utilizar os compostos químicos presentes no meio como 'tijolos básicos' para seu crescimento e reprodução.

Os elementos essenciais são indispensáveis requerimento contidos nos meios nutricionais sem os quais os fungos não poderiam crescer, que em geral se encontram na solução aquosa do meio que rodeia o fungo.

Alguns compostos (monossacarídeos, alguns dissacarídeos, aminoácidos, vitaminas etc. entram na célula sem modificações, porém outros (por exemplo alguns di- e trissacarídeos, polissacarídeos, peptídeos e proteínas), devem ser hidrolizados (digeridos) extracelularmente, a um tamanho tal que o fungo possa absorver.

Os macroelementos são necessários em maior concentração nos meios de cultivo, ao contrário dos microelementos que são aqueles requeridos na faixa mili ou micromolar. Além desses existem elementos traços e fatores de crescimento necessários em uma concentração micromolar ou menor ainda.

O carbono como macroelemento participa na composição elementar da biomassa de todos os seres vivos. Os fungos são heterotróficos e requerem uma fonte hexógena de carbono. Alguns fungos utilizam compostos complexos que contém carbono, porém outros são mais seletivos em seus requisitos.

2.4 Basidiomicetos

O grupo dos basidiomicetos inclui os fungos que produzem esporos (basidiósporos) de origem sexuada em uma estrutura especializada denominada de basídio e popularmente chamados de cogumelos e orelhas-de-pau. A fase vegetativa dos basidiomicetos é denominada micélio, que por sua vez é formado por muitos filamentos septados chamados hifas. O septo das

hifas pode ser simples ou possuir ansas, que é uma estrutura característica do grupo e são conhecidos como septo dolipórico em função da estrutura complexa que apresentam. Os basidiomicetos também são caracterizados por possuírem dois tipos básicos de basidiósporos. Os denominados balistosporos, que são liberados violentamente dos basídios e os denominados estatismosporos, que são liberados passivamente (GUGLIOTTA & CAPELARI 1998).

Os basidiomicetos ligninolíticos secretam enzimas que convertem os polímeros externos em moléculas menores, que são assimiladas e utilizadas como nutrientes. A secreção de proteínas parece ocorrer durante o crescimento apical das hifas, sendo liberadas pela parede celular recém sintetizada (WESSELS 1994). Neste grupo estão bem caracterizados os fungos decompositores da madeira que podem ser classificados em grupos ecofisiológicos: causadores de podridão branca, de podridão parda e de podridão mole.(Tabela 3). Ao lado de outros microrganismos, os basidiomicetos ligninolíticos atuam na decomposição da matéria orgânica, dinamizando a ciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres (TUOMELA et al. 2000). Os organismos ligninolíticos parecem ser os únicos capazes de mineralizar a molécula de lignina presente na madeira (KIRK & FARRELL 1987, LEONOWICZ et al. 1999, SHAN & NERUD 2002).

Tabela 3. Microrganismos que degradam a lignina da madeira. (TUOMELA et al. 2000).

Microrganismo	Filo	Degradação	Ambiente	Gênero
Fungos de podridão branca	Basidiomycota (Ascomycota)	Mineralização da lignina, deslignificação seletiva ou não seletiva.	Principalmente madeira dura seletiva	<i>Phanerochaete</i> , <i>Phlebia</i> , <i>Trametes</i>
Fungos de podridão parda	Basidiomycota	Modificação da lignina	Principalmente madeira mole	<i>Poria</i> , <i>Polyporus</i>
Fungos de podridão mole	Ascomycota ou fungos anamorfos	Limitada degradação da lignina	Ambientes aquáticos, madeira com umidade elevada, serapilheira	<i>Chaetomium</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Fusarium</i>
Bactérias	Actinomycetes ou Mixobactéria	Limitada degradação da lignina	<i>Sapwood</i> , madeira saturada de água, madeira em estágio avançado de decomposição serrapilheira	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i>

Durante a biodegradação da madeira os fungos da podridão parda degradam extensamente celuloses e hemiceluloses, mas a degradação da lignina é limitada. A lignina é quimicamente modificada por desmetilação de suas unidades fenólicas e não fenólicas e também pode ocorrer limitada hidroxilação do anel aromático da lignina. Estes resíduos produzidos pela modificação da lignina contribuem para formação do húmus. Os fungos da podridão parda são capazes de mineralizar grupos metoxil da lignina, mas a mineralização de outras partes é muito menor quando comparado aos fungos da podridão branca. Outros organismos, como os fungos da podridão mole da madeira e alguns actinomicetos e mixomicetos, fazem parte do processo de sucessão da decomposição da madeira em ecossistemas florestais, embora a taxa de degradação dos constituintes da madeira seja relativamente menor. Os fungos da podridão mole são ascomicetos e fungos anamorfos que participam da degradação da madeira na natureza. Todos os componentes da madeira são degradados, mas as taxas de degradação são mínimas quando comparadas aos fungos da podridão branca e parda. Este grupo de fungos

está associado em parte à decomposição da serapilheira em ecossistemas florestais, geralmente em ambientes mais úmidos. Fenóis e ácido vanílico são rapidamente degradados por fungos da podridão mole. (KIRK & FARRELL 1987, ÖNNERUD, et al. 2002).

Os fungos basidiomicetos causadores da podridão branca ou basidiomicetos ligninolíticos, atacam a madeira folhosa (hardwood) ou madeira de conífera (softwood), enquanto os ascomicetos provavelmente degradam unicamente madeira folhosa. A degradação da lignina por basidiomicetos ligninolíticos é mais rápida que quaisquer outros organismos e eles são responsáveis pela maior parte da degradação da lignina na natureza. Entretanto, o substrato de crescimento não é unicamente lignina, mas também hemiceluloses e celulose (KIRK & FARRELL 1987, BLANCHETTE 1995). Os basidiomicetos ligninolíticos podem causar deslignificação seletiva ou não seletiva da madeira. Na deslignificação seletiva, a lignina é removida sem qualquer perda distinta de celulose e na deslignificação não seletiva, todos os componentes da parede celular são degradados (BLANCHETTE 1995). A lignina sabidamente não funciona como fonte primária de carbono e energia para os fungos basidiomicetos. Para sua degradação há necessidade de uma fonte de carbono adicional que funciona como um co-substrato. E este mecanismo de degradação é regulado pelo balanço entre as reações produtoras e consumidoras de energia (KIRK & SHIMADA 1985). A fonte de carbono utilizada pelo fungo também pode interferir na sua atividade ligninolítica. Monossacarídeos e polissacarídeos estimularam a atividade

ligninolítica de alguns basidiomicetos (LEATHAN & KIRK 1983, LEATHAN1986).

Devido à baixa especificidade e elevado potencial de oxidação do sistema enzimático, os basidiomicetos ligninolíticos são também capazes de degradar uma variedade de compostos recalcitrantes (FRAGOEIRO & MAGAN 2005).

2.5 Ascomycetos

Os Ascomycetes são considerados como o maior grupo de fungos, compreendendo aproximadamente 32.000 espécies (HAWKSWORTH et al. 1995).

Dentre as principais características apresentadas pelos Ascomycetes, é possível citar o micélio septado, com paredes celulares contendo quitina e glucanas, e a produção de um tipo especial de esporângio denominado asco. Embora os ascomycetes possam se diferenciar macroscopicamente de fungos pertencentes a outras divisões, suas estruturas microscópicas, como exemplificado pela presença de ascos, são diagnósticas do grupo. Os ascos apresentam a forma de um saco ou clava, sendo este responsável pela formação dos ascósporos, que, em geral, são em número de oito, sendo estes expelidos forçosamente dos ascos quando maduros. As estruturas multicelulares produtoras de ascos são chamadas de ascomas ou ascocarpo, e esses corpos de frutificação se apresentam em quatro formas principais,

conhecidas como: apotécio (pode liberar muitos ascos ao mesmo tempo), cleistotécio (não tem abertura, apresentando diferente estratégia para dispersão), peritécio (permite a liberação de um asco de cada vez), e pseudotécio ou ascostroma (estrutura estromática na qual uma ou mais cavidades são formadas pelos ascos em desenvolvimento), (BARR, 1976).

Os ascomycetes são, na sua grande maioria terrestres, embora alguns possam ocorrer em águas marinhas ou continentais. Em geral, são importantes em processos de decomposição, devido a sua capacidade de degradar celulose e outros polímeros vegetais. Os ascomycetes em geral colonizam uma vasta gama de substratos, incluindo solo (*Chaetomium*), detritos vegetais (*Xylaria*), e fezes de animais (*Ascobolus*, *Sordaria*). Algumas espécies encontram-se associadas às raízes de diversas plantas superiores, formando micorrizas. Outras vivem em associação mutualística com microorganismos fototróficos, sendo conhecidos como líquens. Várias espécies são consideradas fitopatogênicas, como, por exemplo, *Elsinoë*, *Glomerella*, *Guignardia* e *Sclerotinia*, podendo causar danos em plantas frutíferas, comercialmente importantes em regiões tropicais (WHITESIDE et al. 1988). Algumas espécies são patogênicas ao homem, como os dermatófitos (*Arthroderma* e *Nannizzia*), por exemplo. Dentre os ascomycetes com maior diversidade ecológica em regiões tropicais podemos citar os pertencentes a Hypocreales, Xylariales e Discomycetes. Dentre os gêneros tropicais mais abundantes podemos citar *Xylaria*, *Hypoxyton* e *Camillea*. Os Discomycetes, fungos caracterizados pela produção de ascoma ou ascocarpo do tipo apotécio, também estão dentre os grupos de fungos com grande ocorrência em regiões tropicais (KORF, 1997),

exemplificados pela família Sarcoscyphaceae (Cookeina e Phillipsia), tipicamente encontrados em madeira.

2.6 Fungos deterioradores de biopolímero (madeira).

As primeiras vias de colonização da madeira por todos os tipos de fungos são usualmente as células dos raios que são vias anatômicas de mais acesso e menor resistência (Figura 1). Através das células do raio as hifas têm acesso aos nutrientes de reserva não estruturais de fácil assimilação contidos nas células parenquimáticas (não lignificadas). Por meio da ação do complexo enzimático produzido por essas hifas dá-se o processo de decomposição da madeira (KIRK E CULLEN, 1998).

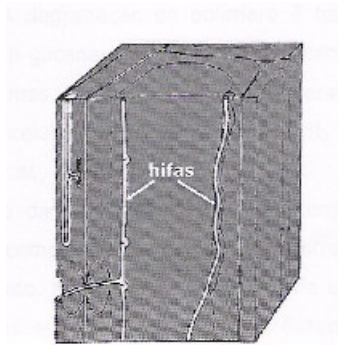


Figura 1. Vias de colonização da madeira pelos fungos.

Dessa forma, assume-se que o processo de biodegradação de um substrato lignocelulósico, como a madeira, ocorre pela ação combinada de uma variedade de sistemas enzimáticos e alguns agentes não enzimáticos de baixa massa molar como ácido oxálico, álcool veratrílico, ácido graxo insaturados e agentes redutores de ferro, que são produzidos extracelularmente pelos fungos. Através destes sistemas lignocelulósicos, os fungos degradam os

componentes insolúveis da madeira, transformando-os em componentes menores e solúveis. (FENGEL e WEGENER, 1989; MESSNER et al., 2003).

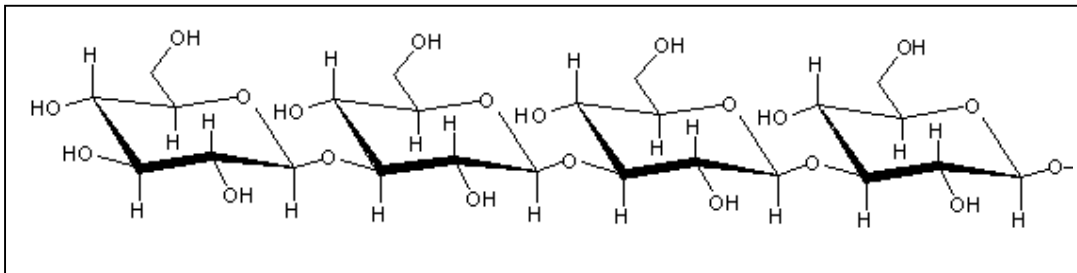
2.7 Ultra estrutura da madeira e composição química.

A madeira é um biopolímero constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. A parede celular vegetal é, por sua vez, composta de uma parede celular primária e secundária são responsáveis pelo comportamento da maioria das propriedades tecnológicas da madeira (PRESTON 1974 apud CASTRO E SILVA 1996). As características anatômicas e microestruturas da madeira variam entre as diferentes espécies, sendo que as madeiras das coníferas tendem a ter uma estrutura mais simples quando comparadas às madeiras folhosas (DANIEL, 2003). As madeiras de folhosas e coníferas diferem quanto à proporção de seus componentes a estrutura química da lignina e das polioses, ao arranjo e tipos de células e, quanto à susceptibilidade à biodegradação. Em termos estruturais, as madeiras coníferas se caracterizam por apresentar de 90 a 95% de traqueídeos, 5 a 10% de células de raio e 0,5 a 10% de canais de resina (BIERMANN, 1996; DANIEL, 2003).

2.7.1 Celulose

A celulose é o principal polímero do tecido xilemático. Trata-se de um polímero linear de anidro-glicose ligado por ligações β -(1-4)-glicosídicas

(FENGEL E WEGENER 1989). Essa estrutura é polímero homogêneo não ramificado, cuja cadeia é constituída de centenas de unidades monossacarídicas.(Figura 2).



Fonte: DONALD VOET & JUDITH VOET
Figura 2: Estrutura de um fragmento de celulose.

Na madeira as moléculas de celulose compõem as microfibrilas, as quais são organizadas em um arranjo paralelo, formando fibrilas que se entrelaçam, originando então as fibras de celulose. (FENGEL E WEGENER 1989). As propriedades físicas das fibras de celulose, tais como resistência à tração mecânica, alongamento e capacidade de sovatação, dependem do grau de organização (grau de cristalinidade) (D'ALMEIDA, 1982).

2.7.2 Hemicelulose

A hemicelulose é formada por um grupo de substâncias poliméricas compostas de unidades monossacarídicas diferentes (Figura 3). São polissacarídeos heterogêneos contendo nas suas estruturas tanto hexoses, quanto pentoses. Possuem cadeia ramificada e de baixa massa molecular.

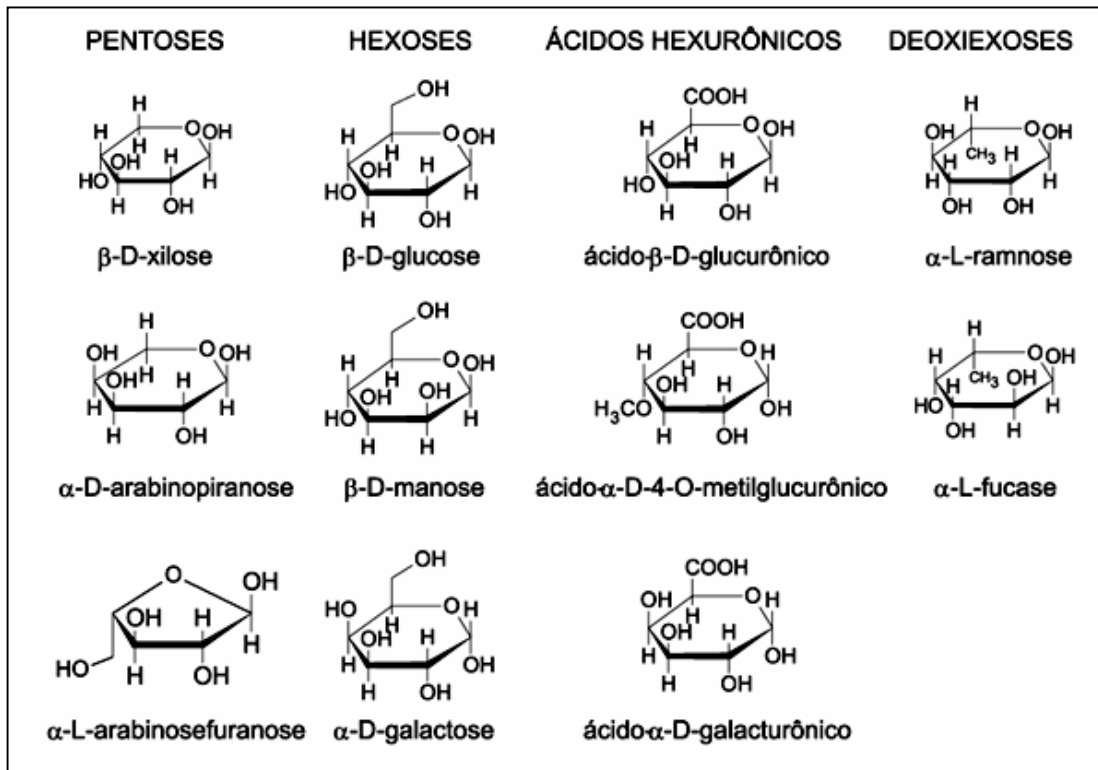


Figura 3: Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose.

As hemiceluloses são divididas em endo-hemicelulases, exo-hemicelulases, xilosidases e, como as celulases, atuam de forma cooperativa provocando a hidrólise completa das hemiceluloses até seu monômeros (HIGUCHI, 1985; ERIKSSON et al., 1990).

2.7.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula complexa com estrutura tridimensional amorfa composta por unidades de fenilpropano (guaiacil, siringil e *p*-hidroxifenil). (Figura 4).

A lignina tem um papel significante na proteção natural da madeira, pois grandes quantidades de lignina e a presença de lignina guaiacil promovem uma maior proteção natural do que baixos níveis de lignina e lignina siringil (DANIEL, 2003).

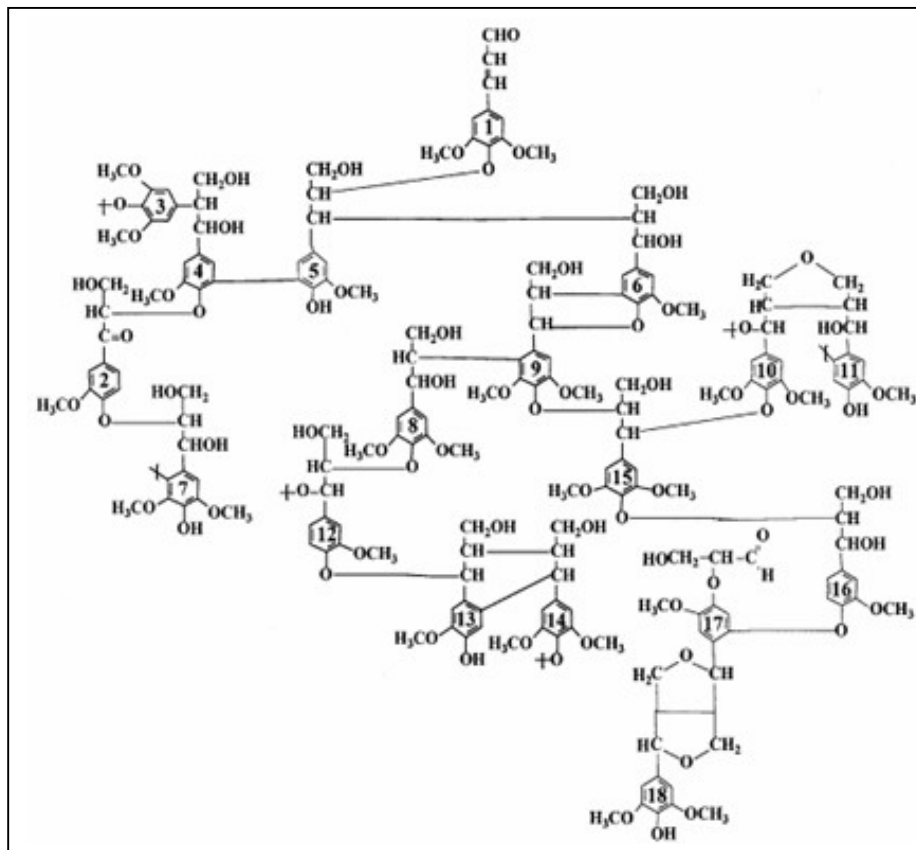


Figura 4: Estrutura de um fragmento de lignina.
 Fonte: American Chemical Society, 2000

Na madeira, a lignina pode ser encontrada nas paredes primárias e secundárias, as quais detêm a maior fração da quantidade total de lignina (70 - 90%). Nas paredes celulares, a lignina aparece ligada a hemicelulose, formando uma espécie de “cimento” no qual as fibras de celulose estão embebidas. (FENGEL E WEGENER, 1989; ESAU, 1965). Na lamela média, forma uma espécie de retículo com cadeias paralelas e inter cruzadas,

conferindo propriedades adesivas que mantêm as várias células do tecido vegetal agregados. O papel da lignina nos tecidos vegetais é o de conferir força e resistência mecânica, porém com elasticidade (SOARES, 1998).

2.8 Enzimas ligninolíticas

A velocidade o qual os lignocelulósicos são decompostos na natureza é bastante variável e depende das condições de umidade e temperatura as quais estão expostos bem como da biodiversidade fúngica existente no local. (FERRAZ, 2004). Assim, a decomposição completa de um fragmento de um material lignocelulósico pode demorar meses ou vários anos sendo que em condições frias e secas os lignocelulósicos podem permanecer décadas antes de serem decomposto.

As principais enzimas envolvidas na degradação da lignina são lignina-peroxidase (Li-P), manganês-peroxidase (Mn-P) e as lacases (LEONOWICZ et al. (2001).

Vários trabalhos têm demonstrado que enzimas ligninolíticas não penetram na parede celular intacta (GOODELL, et al., 1997). As enzimas responsáveis pela decomposição dos componentes da madeira não podem penetrar na parede celular vegetal, somente um processo de “escamação” da parede celular pode ser efetivo na biodegradação. Estudos sobre a biodegradação da lignina têm sido conduzidos principalmente usando-se fungos de podridão branca, os quais produzem enzimas extracelulares modificadoras de lignina.

Para depolimerizar e mineralizar a lignina, esses fungos possuem um sistema oxidativo não específico, que inclui várias oxidoreduções extracelulares e metabólicas de baixo peso molecular (SAPPARAT et al., 2002). Enzimas extracelulares envolvidas na degradação da lignina e xenobióticos por fungos de podridão branca incluem vários tipos de lacases, peroxidases e oxidases produtoras de H_2O_2 (CAMARERO et al., 1999; VOLC et al., 1996; THURSTON, 1994).

As enzimas ligninolíticas apresentam um grande potencial na biotransformação de ligninas e seus derivados como também nos aspectos ambientais (biorremediação). Essas enzimas têm um papel importante na descontaminação de efluentes papaleiros e têxteis. Atualmente são utilizadas em biossensores para detectar fenóis em ambiente contaminado (DURAN & ESPOSITO, 2000).

2.8.1 Lignina – Peroxidase (LiP)

As ligninases são proteínas N-monoméricas e O-glicosiladas com quatro ligações dissulfeto, dois íons de cálcio e um de ferro protoporfirina IX como grupo prostético.

As enzimas que produzem peróxido são acessórios 'as peroxidases, e atuam *in situ*. Essas enzimas geram peróxido de hidrogênio *in situ* e possibilitam que as peroxidases atuem (FERRAZ 2004).

A lignina peroxidase exibe o ciclo comum de peroxidase catalítica, baseado em reações de oxidação sucessivas (Figura 5), produzindo a oxidação do substrato (AKHTAR et al., 1997).

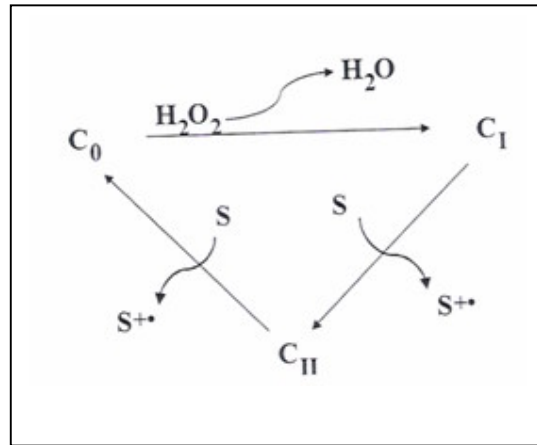


Figura 5. Ciclo catalítico simplificado da lignina peroxidase. Fonte FERRAZ, 2004

A lignina peroxidase possui um peso molecular de 38 a 43 kDa e contém protoporfirina IX como grupo prostético (MESSNER, 1998). Esta enzima oxida o núcleo aromático (fenólico) pela remoção de um elétron, gerando radicais fenoxi e radicais cátions. Por último, reage espontaneamente com nucleotídeos (principalmente água) e oxigênio molecular. O resultado é uma “combustão enzimática” nas quais as ligações C-C e C-O são divididas, despolimerizando a molécula e abrindo os anéis aromáticos, formando, com isso, abundantes produtos aromáticos e alifáticos.

2.8.2 Manganês-Peroxidase (Mn-P)

As manganês-peroxidases são glicoproteínas com peso molecular entre 43 – 49 kDa e ponto isoelétrico entre 4,2 e 4,9, contendo um mol de ferro porfirínico IX / mol de enzima (GLENN & GOLD, 1985). Essas enzimas identificam-se em torno de 57% com as LiP (SUNDARAMOORTHY et al., 1994). Em contraste com as LiP, Mn-P contém um “loop” extra próximo ao sítio ativo e um único sítio é o sítio de ligação do substrato proposto (MnII) mostrado na Figura 6.



Figura 6: Mn (II) é oxidada a Mn (III) por uma peroxidase dependente de Mn.
Fonte:FERRAZ, 2004

O produto principal da reação Mn(II) o qual é oxidado pela MnPI e MnPII para Mn(III). Mn (III) é estabilizado formando complexos com ácidos orgânicos, por exemplo, lactato ou oxalato e então oxida um substrato aromático gerando radicais fenox ou radicais cátion aril. Tanto lignina peroxidase com manganês peroxidase, são importantes na descoloração de efluente Kraft (MICHEL et al., 1991).

2.8.3 Lacase

Lacases são principalmente glicoproteínas extracelulares ligadas ao cobre bivalente, o qual é reduzido durante a oxidação de fenóis (Figura 7) e

subseqüentemente oxidado novamente ao estágio bivalente pelo oxigênio (FORSS et al., 1989). Lacases são enzimas monoméricas, diméricas ou tetraméricas com pesos molecular entre 60 e 80 kDa e com teor de carboidrato entre 15 e 20% (THURSTON,1994).

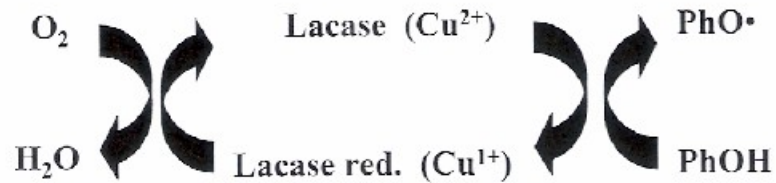


Figura 7. Mecanismo de ação da lacase.
Fonte Ferraz 2004.

Lacases são membros da família de proteínas multi-cobre, que incluem ascorbalto oxidase, ceruloplasmina e bilirrubina oxidases. Conseqüentemente, em diferentes fungos, a produção desta enzima pode ser acentuada sob condições de cultura apropriadas (KLONOWSKA et al., 2002; MAYER & STAPLES 2002; CLAUS, 2004).

Vários estudos têm demonstrado a participação da lacase em eventos ligninolíticos significativos que incluem a oxidação de unidades não-fenólicas da lignina, a geração de H_2O_2 requerida tanto para as atividades peroxidases como para a formação de radical oxídrico (OH), e a produção de Mn^{3+} a partir de Mn^{2+} presente nos lignocelulósicos.

As lacases atuam diretamente sobre estruturas fenólicas através de Cu^{2+} a Cu^+ , que por sua vez, reduz O_2 a H_2O , permitindo que a enzima atue de forma cíclica. No ciclo catalítico da lacase, o grupo fenoxi (PhOH) representa um substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve 4 Cu^{2+} (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias protéicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e uma molécula de O_2 (FERRAZ, 2004).

Por muitos anos, a participação de lacase na degradação da lignina foi considerada limitada à oxidação de unidades fenólicas, que compreendem unicamente 10 a 20% do polímero. Entretanto, durante as últimas décadas tem sido demonstrado que lacase também pode oxidar unidades não fenólicas de lignina na presença de certos compostos, conhecidos como mediadores, que incluem substratos artificiais (BOURBONNAIS & PAICE, 1990; CALL & MUCKE, 1997) e metabólitos fúngicos (EGGERT ET AL., 1996).

2.8.4 Peroxidase

As peroxidases são sensíveis a excessivas concentrações de H_2O_2 , podendo, sob determinadas condições, transformar a enzima em um composto mais ativo, denominado de Composto III (Figura 8).

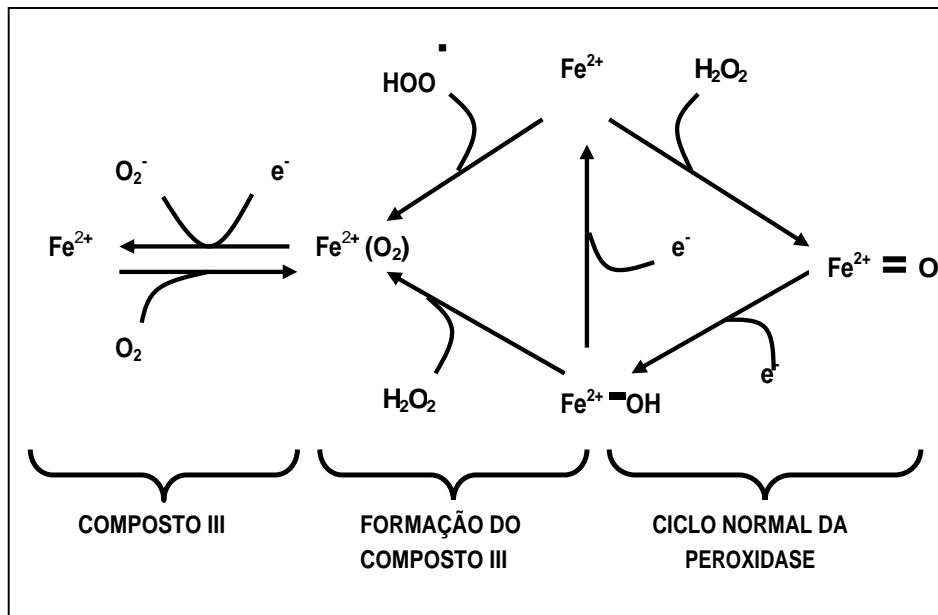


Figura 8. Inter-relação entre estados de redução de uma peroxidase típica (HRP).
 Fonte: PALMERI et al. (1997).

Tanto a lacase como a peroxidase oxidam compostos fenólicos. Os produtos resultantes da oxidação polimerizam espontaneamente, formando complexos insolúveis, os quais podem ser removidos por precipitação, filtração ou centrifugação (DAVIS & BURNS, 1978).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Fungos

Cepas fúngicas de *Datronia brunneoleuca* (Cooke) Ryvarden, *Trametes lactinea* (Berk.) Sacc., *Lentinus crinitus* (L.) Fr. foram utilizadas da micoteca do Laboratório de Biorgânica do programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Estas foram mantidas a temperatura de 3.8 °C em placa de petri e posteriormente feito todo processo de repicagem e inoculação em câmara de fluxo laminar para minimizar possível contaminação da cultura e armazenado em estufa incubadora B.O.D por 8 dias.

3.2 Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura:

- ✓ Agar extrato de malte (I);
- ✓ BDA (potato dextrose ágar) (II);
- ✓ Agar jerimum (III);
- ✓ Agar farinha de peixe (IV);
- ✓ Agar bagaço de cana (V);

3.2.1 Meio sólido para avaliação do crescimento micelial

(I) Agar extrato de malte:

20g extrato de malte;

15g ágar;

1000mL H₂O destilada.

(II) BDA (potato dextrose ágar):

39g de (BDA);

1000mL H₂O destilada.

(III) Agar jerimum:

200g de jerimum;

15g ágar;

10g de glicose;

1000mL H₂O destilada.

(IV) Agar farinha de peixe:

20g de farinha de peixe;

15g ágar;

10g de glicose;

1000mL H₂O destilada.

(V) Agar bagaço de cana:

20g de bagaço de cana;

15g ágar;

10g de glicose;

1000mL H₂O destilada.

Os meios de cultura foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.2.2 Meio líquido para avaliação da atividade enzimática

Para determinação das enzimas utilizou-se o meio contendo extrato de jerimum na seguinte composição:

- Extrato de jerimum:
 - 200g de jerimum;
 - 1000mL de água destilada;
 - 3g de dextrose;
 - Tween 80 a 3% ;
 - Sulfato de magnésio a 3 %;

O meio de cultivo foi previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.3 Avaliação do crescimento micelial

O crescimento micelial foi avaliado através do teste da placa de Petri inoculado com pequenos fragmentos do fungo nos meios testados. O crescimento foi mensurado através da progressão linear da fronteira micelial, sendo as medidas tomadas em duas direções perpendiculares a cada 24 horas até que atingisse todo o diâmetro da placa. A mensuração do raio da colônia permitiu avaliar o crescimento micelial, o qual ocorre pela extensão da ponta da hifa.

3.4. Condições de crescimento

3.4.1 Meios de cultura

Foi testado o crescimento micelial nos meios ágar extrato de malte, BDA, ágar jerimum; ágar farinha de peixe; ágar bagaço de cana; conforme descrito no item 3.2.1. Os cultivos determinados no item anterior foram testados nas temperaturas 28°, 30°C e pH 4, 5, 6, 7, 8 avaliando se, portanto, 3 níveis para cada variável obtendo-se 9 tratamentos (3 x 3).

3.4.2 Avaliação da temperatura

A avaliação da influência da temperatura no crescimento micelial foi testada em placa de Petri inoculada com pequenos fragmentos da cultura do fungo nas

quais contendo os meios de cultura ágar extrato de malte, BDA, ágar jerimum; ágar farinha de peixe; ágar bagaço de cana. A cultura foi incubada em estufa B.O.D e foram testadas as temperaturas 28°, 30°C.

3.4.3 Taxa de crescimento do fungo e massa micelial

A taxa de crescimento dos fungos foi definida como a razão entre a média da progressão da fronteira micelial e o número de dias de crescimento do fungo. Para determinação da massa micelial foi utilizado o crescimento em meio líquido. Após 5, 10, 15, 20, 25, 30 dias de crescimento, 100ml do meio foi filtrado em filtro de papel Watmann n.1 e lavado com 50ml de água destilada. A massa micelial foi calculada pela diferença em relação ao peso seco em estufa (70°C) através da seguinte equação:

$$M_M (\%) = \frac{P_f - P_i}{P_i} \times 100, \text{ onde;}$$

P_i = peso seco do papel filtro

P_f = peso seco do papel filtro após filtragem

M_M = massa micelial em porcentagem em relação ao peso seco da amostra.

3.6 Meio de cultura para cultivo da determinação das atividades enzimáticas.

O meio de cultura líquido utilizado para determinação enzimática foi extrato de jerimum, o qual foi previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar foi adicionado em erlenmayer 100ml de meio de cultivo. Posteriormente foi feita a inoculação dos fungos utilizando 3 pequenos fragmentos do micélio do fungo por erlenmayer e incubados por 30 dias, o qual foi retirado da região periférica da placa de petri. O experimento foi realizado em triplicata. Os erlenmeyers foram mantidos em posição estacionária, em incubadora B.O.D a temperatura 28°C. Após 5, 10, 15, 20, 25, 30 dias do cultivo dos fungos, foi realizada a determinação da atividade enzimática.

3.7. Determinação das atividades enzimáticas.

3.7.1 Fenoloxidase total.

A metodologia utilizada foi segundo SZKLARZ et al.(1989) modificada, a oxidação do substrato enzimático seringaldazina apresenta absorção a 525 nm ($\epsilon_{\Sigma} = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para a determinação da atividade fenoloxidase, utilizou-se 1000µL de caldo de cultivo filtrado, 60 µL de substância tampão de citrato fosfato em pH= 5.0, 20 µL de seringaldazina (solução indutora, estoque, concentração de 5 mg\ 10ml de etanol), 20 µL de peróxido de hidrogênio.

3.7.2 Lacase

A atividade da enzima lacase foi determinada em um comprimento de onda de 525nm, específico para reação de oxidação da seringaldazina. A metodologia utilizada foi segundo SZKLARZ et al.1989 modificada. O método consiste na oxidação do substrato enzimático de seringaldazina para sua forma de quinona. De acordo com a atividade enzimática, uma unidade ativa de lacase corresponde a quantidade de enzimas necessárias para oxidar 1 μ mol de substrato por minuto. Para a determinação da atividade lacase, utilizou-se 1000 μ L de caldo de cultivo filtrado, 60 μ L de substância tampão de citrato fosfato em pH= 5.0, 20 μ L de seringaldazina (solução indutora, estoque, concentração de 5 mg\ 10ml de etanol), 20 μ L de água destilada.

3.7.3 Peroxidase

Para determinação da enzima peroxidase foi realizado a diferença da Fenoloxidase menos a Lacase.

3.7.4 Análise estatística

Para realizar a análise estatística dos dados foi utilizado o software BioEstat 5.0, foram obtido os parâmetros descritivos (média, desvio padrão, variância) dos dados, teste de correlação entre as variáveis o teste ANOVA e de Tukey para contrastes das médias.

4.RESULTADO

4.1 Crescimento micelial

4. 1.1 Crescimento em pH 4

Em relação ao crescimento nos diferentes meios de cultura acrescidos de componentes regionais, *Lentinus crinitus* foi o que apresentou maior crescimento em pH 4 tanto na temperatura de 28 °C como na de 30 °C (Tabelas 4 e 5). Neste caso os meios de farinha de peixe e o de bagaço de cana foi onde ocorreu o maior valor de crescimento. Os demais fungos apresentaram crescimento similar nos diferentes meios testados. *Lentinus crinitus* apresentou valor de crescimento micelial em relação aos outros fungos cerca de 40%, 36,6 % e 24,8 % maior para os meios de farinha de peixe, bagaço de cana e jerimum respectivamente. No uso de meios industriais *Lentinus crinitus* também apresentou melhor crescimento micelial para meio malte. Interessantemente os fungos *Datronia brunneoleuca* e *Xylaria* sp não apresentaram crescimento micelial no período de oito dias para o meio malte. *Trametes lactinea* que apresentou menor crescimento no meio nutricional acrescido de farinha de peixe.

Dentre os meios industriais, os fungos *Datronia brunneoleuca*, *Trametes lactinea* e *Lentinus crinitus* apresentaram maior crescimento médio em meio malte.

Ao contrario do que ocorreu com a temperatura de 28 °C onde não teve crescimento dos fungos *Datronia brunneoleuca* e *Xylaria sp*, no meio malte, temperatura de 30 °C e pH 4 apresentaram crescimento nessas condições .

4. 1.2 Crescimento em pH 5

No pH 5 e temperatura 28 °C *Lentinus crinitus* também apresentou melhor crescimento micelial nos meios regionais acrescidos de jerimum e bagaço de cana. Os outros fungos testados não apresentaram grande diferença na média de crescimento nos diferentes meios regionais. Nos meios industriais o maior valor médio de crescimento foi obtido para *Lentinus crinitus* em meio BDA (Tabela 6). Para *Datronia brunneoleuca* o meio malte foi que apresentou maior valor médio absoluto de crescimento, enquanto que para *Trametes lactinea* ocorreu crescimento similar nos dois meios.

Lentinus crinitus apresentou crescimento 20% maior no meio BDA em relação ao meio bagaço de cana e jerimum em pH 5 e temperatura 28 °C.

Tabela 4. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 4 e 28 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.

Meio	<i>Datronia brunneoleuca</i>	<i>Lentinus crinitus</i>	<i>Trametes lactinea</i>	<i>Xylaria sp</i>
FPeixe	0.50 (0.26)	0.71 (0.26)	0.4 (0.25)	0.5 (0.14)
BCana	0.44 (0.20)	0.7 (0.31)	0.40 (0.19)	0.4 (0.20)
Jerimum	0.50 (0.27)	0.50 (0.26)	0.38 (0.25)	0.42 (0.30)
Malte	0.70 (0.41)	0.73 (0.24)	0.59 (0.38)	0.02 (0.17)
BDA	0.43 (0.19)	0.59 (0.32)	0.43 (0.26)	0.43 (0.18)

Tabela 5. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 4 e 30 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.

Meio	<i>Datronia brunneoleuca</i>	<i>Lentinus crinitus</i>	<i>Trametes lactinea</i>	<i>Xylaria sp</i>
FPeixe	0.5 (0.26)	0.7 (0.26)	0.38 (0.20)	0.59 (0.10)
BCana	0.43 (0.22)	0.7 (0.30)	0.43 (0.18)	0.5 (0.24)
Jerimum	0.43 (0.18)	0.58 (0.32)	0.59 (0.38)	0.5 (0.28)
Malte	0.7 (0.41)	0.7 (0.40)	0.72 (0.43)	0.38 (0.17)
BDA	0.44 (0.22)	0.59 (0.52)	0.58 (0.34)	0.30 (0.18)

Tabela 6. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 5 e 28 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.

Meio	<i>Datronia brunneoleuca</i>	<i>Lentinus crinitus</i>	<i>Trametes lactinea</i>	<i>Xylaria sp</i>
FPeixe	0.44 (0.21)	0.50 (0.15)	0.50 (0.25)	0.43 (0.24)
BCana	0.50 (0.26)	0.7 (0.48)	0.5 (0.24)	0.44 (0.18)
Jerimum	0.43 (0.18)	0.7 (0.41)	0.5 (0.23)	0.42 (0.24)
Malte	0.69 (0.39)	0.71 (0.38)	0.5 (0.29)	0.43 (0.20)
BDA	0.59 (0.37)	0.87 (0.58)	0.5 (0.24)	0.32 (0.16)

Tabela 7. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 5 e 30 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.

Meio	<i>Datronia brunneoleuca</i>	<i>Lentinus crinitus</i>	<i>Trametes lactinea</i>	<i>Xylaria sp</i>
FPeixe	0.43 (0.21)	0.50 (0.19)	0.50 (0.26)	0.43 (0.19)
BCana	0.50 (0.27)	0.7 (0.46)	0.50 (0.28)	0.43 (0.19)
Jerimum	0.7 (0.39)	0.93 (0.61)	0.50 (0.25)	0.5 (0.29)
Malte	0.7 (0.41)	0.88 (0.57)	0.59 (0.38)	0.43 (0.26)
BDA	0.59 (0.33)	0.87 (0.62)	0.5 (0.25)	0.36 (0.18)

Em relação à temperatura 30 °C nesse mesmo pH *Lentinus crinitus* apresentou maior valor médio dentre todos os fungos testados para o crescimento micelial no meio regional acrescido de jerimum (Tabela 7). Segundo maior crescimento de *L. crinitus* ocorreu nos meios industriais BDA e

malte. *Datronia brunneoleuca* apresentou valores similar nos meios acrescidos de jerimum comparado com meio industrial malte. *Trametes lactinea* apresentou valores bastante similar em todos os meios nutricionais testados. *Xylaria* sp obteve a menor média de crescimento micelial no meio industrial BDA.

4. 1.3 Crescimento em pH 6

No pH 6 e temperatura 28 °C *Xylaria* sp apresentou menor valor médio de crescimento micelial nos meios testados. Nestas condições *Lentinus crinitus* apresentou maior crescimento micelial no meio bagaço de cana. Ressalta-se tanto na temperatura de 28° como na de 30 °C *Lentinus crinitus* apresentou melhores valores médios de crescimento, no meio bagaço de cana. Nessas condições de crescimento e no meio nutricional de jerimum *Lentinus crinitus* apresentou valor médio similar aquele de *Datronia brunneoleuca* ambos crescidos em meio nutricional de jerimum.

Para meios industriais, *Lentinus crinitus*, *Datronia brunneoleuca* e *Trametes lactinea* obtiveram os maiores valores médios de crescimento em malte(Tabela 8).

Datronia brunneoleuca e *Trametes lactinea* nestas condições de pH e temperatura apresentaram, maior crescimento médio no meio industria malte. Ressalta-se que *Trametes lactinea* obteve crescimento similar no meio bagaço de cana independente da temperatura (Tabela 9).

Para os meios regionais, *Trametes lactinea* teve crescimento 37,1% maior no meio bagaço de cana em relação àquele de farinha de peixe, e 28,5 % maior em relação àquele de jerimum. Da mesma maneira *Lentinus crinitus* apresentou crescimento em bagaço de cana 50% maior do que em farinha de peixe, e 18.3% maior em relação ao meio de jerimum.

Tabela 8. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 6 e 28 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.

Meio	<i>Datronia brunneoleuca</i>	<i>Lentinus crinitus</i>	<i>Trametes lactinea</i>	<i>Xylaria sp</i>
FPeixe	0.41 (0.43)	0.43 (0.14)	0.45 (0.20)	0.38 (0.18)
BCana	0.51 (0.25)	0.87 (0.27)	0.69 (0.38)	0.39 (0.17)
Jerimum	0.7 (0.64)	0.7 (0.61)	0.50 (0.28)	0.4 (0.20)
Malte	0.71 (0.77)	0.88 (0.49)	0.50 (0.31)	0.36 (0.17)
BDA	0.59 (0.34)	0.7 (0.40)	0.59 (0.30)	0.39 (0.18)

Tabela 9. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 6 e 30 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.

Meio	<i>Datronia brunneoleuca</i>	<i>Lentinus crinitus</i>	<i>Trametes lactinea</i>	<i>Xylaria sp</i>
FPeixe	0.43 (0.20)	0.43 (0.17)	0.44 (0.21)	0.38 (0.22)
BCana	0.5 (0.24)	0.87 (0.30)	0.7 (0.38)	0.40 (0.18)
Jerimum	0.59 (0.46)	0.71 (0.62)	0.5 (0.26)	0.39 (0.18)
Malte	0.7 (0.78)	0.71 (0.40)	0.7 (0.38)	0.38 (0.19)
BDA	0.59 (0.35)	0.7 (0.41)	0.5 (0.33)	0.38 (0.16)

4. 1.4 Crescimento em pH 7

Nestas condições de pH e temperatura, o crescimento de *Lentinus crinitus* foi maior nos meios com componentes regionais testados do que nos meios

industriais, com exceção a *Xylaria sp* para temperatura de 30° C e meio malte, onde apresentou uma média de crescimento menor, enquanto que *Datronia brunneoleuca* apresentou maior valor médio de crescimento micelial.

Entre os meios regionais, tanto na temperatura 30 °C como em 28 °C, *Lentinus crinitus* apresentou o maior crescimento em meio bagaço de cana. Ressalta-se, entretanto, que no meio industrial malte na temperatura 30 °C este fungo apresentou crescimento 36.9% maior do que aquele no meio bagaço de cana (Tabelas 10 e 11). *Datronia brunneoleuca* obteve resultados de crescimento similares independentemente da temperatura. Para *Xylaria sp* os menores crescimentos ocorreram nos meios de cultura farinha de peixe, bagaço de cana e jerimum.

De modo geral, neste pH o maior crescimento ocorreu no meio malte em ambas temperaturas testadas. Teste de Tukey mostrou que para *Lentinus crinitus* ao nível de 95% de probabilidade, não existe diferença estatística na média do crescimento entre os meios farinha de peixe, bagaço de cana, jerimum e BDA.(Tabela 10).

4. 1.5 Crescimento em pH 8

Assim como ocorreu para as outras condições de crescimento *Lentinus crinitus* também obteve maior média de crescimento micelial nos meios de cultura acrescidos de componentes regionais. O mesmo padrão ocorreu para os meios industriais, sendo que nesse caso de temperatura 30 °C e pH 8 o

maior valor médio de crescimento ocorreu no meio BDA. Ressalta-se que entre os meios industriais testados (BDA e malte) o fungo *Lentinus crinitus* apresentou crescimento 18.3% maior no meio malte do que no meio BDA na temperatura de 30 °C e pH 7. (Tabelas 12 e 13). Os demais fungos apresentaram crescimento similar nos diferentes meios testados.

Tabela 10. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 7 e 28 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.

Meio	<i>Datronia brunneoleuca</i>	<i>Lentinus crinitus</i>	<i>Trametes lactinea</i>	<i>Xylaria sp</i>
FPeixe	0.43 (0.21)	0.44 (0.28)	0.41 (0.23)	0.26 (0.24)
BCana	0.44 (0.21)	0.7 (0.25)	0.50 (0.26)	0.29 (0.08)
Jerimum	0.50 (0.27)	0.50 (0.37)	0.46 (0.38)	0.44 (0.27)
Malte	0.7 (0.41)	1.2 (0.61)	0.45 (0.33)	0.13 (0.10)
BDA	0.43 (0.19)	0.59 (0.32)	0.46 (0.23)	0.43 (0.20)

Tabela 11. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 7 e 30 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.

Meio	<i>Datronia brunneoleuca</i>	<i>Lentinus crinitus</i>	<i>Trametes lactinea</i>	<i>Xylaria sp</i>
FPeixe	0.5 (0.26)	0.43 (0.29)	0.39 (0.24)	0.38 (0.10)
BCana	0.43 (0.22)	0.7 (0.24)	0.5 (0.23)	0.34 (0.19)
Jerimum	0.43 (0.18)	0.5 (0.61)	0.39 (0.29)	0.3 (0.08)
Malte	0.7 (0.41)	1.11 (0.57)	0.47 (0.31)	0.15 (0.20)
BDA	0.44 (0.22)	0.57 (0.34)	0.4 (0.19)	0.30 (0.16)

Tabela 12. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 8 e 28 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.

Meio	<i>Datronia brunneoleuca</i>	<i>Lentinus crinitus</i>	<i>Trametes lactinea</i>	<i>Xylaria sp</i>
FPeixe	0.43 (0.21)	0.43 (0.26)	0.39 (0.24)	0.26 (0.26)
BCana	0.56 (0.20)	0.71 (0.34)	0.58 (0.32)	0.3 (0.15)
Jerimum	0.44 (0.20)	0.46 (0.40)	0.39 (0.24)	0.28 (0.16)
Malte	0.58 (0.30)	0.7 (0.30)	0.43 (0.21)	0.18 (0.10)
BDA	0.43 (0.17)	0.7 (0.30)	0.30 (0.18)	0.43 (0.18)

Tabela 13. Crescimento micelial (cm) em diferentes meios de cultura em pH 8 e 30 °C. Valor em parênteses significa o desvio padrão.

Meio	<i>Datronia brunneoleuca</i>	<i>Lentinus crinitus</i>	<i>Trametes lactinea</i>	<i>Xylaria sp</i>
FPeixe	0.44 (0.21)	0.50 (0.15)	0.50 (0.25)	0.43 (0.24)
BCana	0.50 (0.26)	0.7 (0.48)	0.5 (0.24)	0.44 (0.18)
Jerimum	0.43 (0.18)	0.7 (0.41)	0.5 (0.23)	0.42 (0.24)
Malte	0.69 (0.39)	0.71 (0.38)	0.5 (0.29)	0.43 (0.20)
BDA	0.59 (0.37)	0.87 (0.58)	0.5 (0.24)	0.32 (0.16)

4.2.1 Crescimento diário

4.2.1.1 *Lentinus crinitus*

O pico de maior valor absoluto de crescimento ocorreu nas condições de pH 5 e 30° C nos meios farinha de peixe e jerimum, (ambos 1,5 cm) e o menor (0,58cm) neste último meio de cultura e temperatura 28° C (Figura 9). Em termos de velocidade de crescimento inferida pelo tempo e que a placa de Petri foi preenchida pelo crescimento linear do micélio, nos meios de jerimum, malte e BDA ocorreu no quarto dia. Ressalta-se, entretanto, que nestes meios a média de crescimento foi menor do que no meio jerimum. O crescimento mais lento com preenchimento da placa de Petri somente ocorreu no oitavo dia em meio de farinha de peixe para todos os pHs, com exceção ao pH4 (em ambas as temperaturas testadas) e pH 5 na temperatura 30° C, e para o meio de jerimum em pH 5 e 28° C.

Interessantemente, o crescimento no meio farinha de peixe na temperatura de 28° C, tanto para pH 6 como para pH 7, *Lentinus crinitus* apresentou crescimento mínimo (quase nulo) no quarto e quinto dia respectivamente, retomando o crescimento posteriormente de maneira lenta até preenchimento da placa de Petri no oitavo dia de atividade.

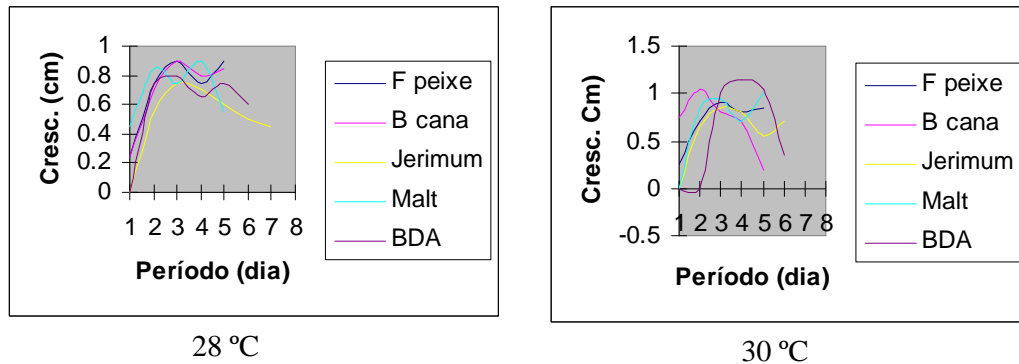


Figura 9. Progressão da fronteira micelial de *Lentinus crinitus* em pH 4 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

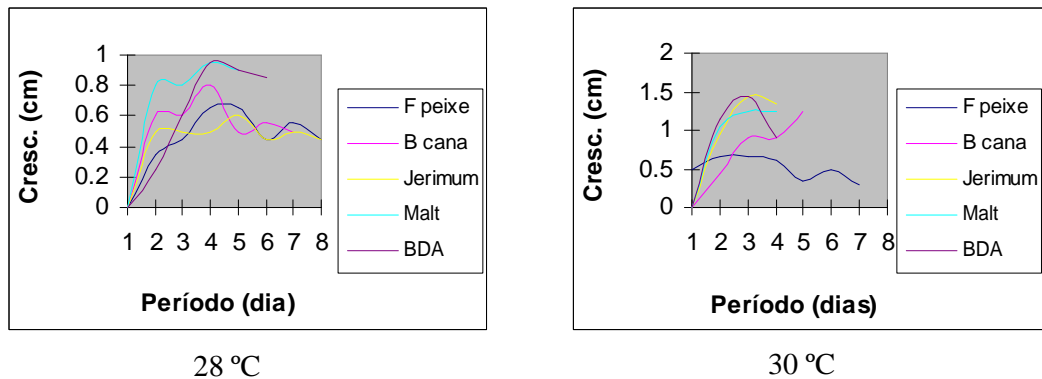


Figura 10. Progressão da fronteira micelial de *Lentinus crinitus* em pH 5 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

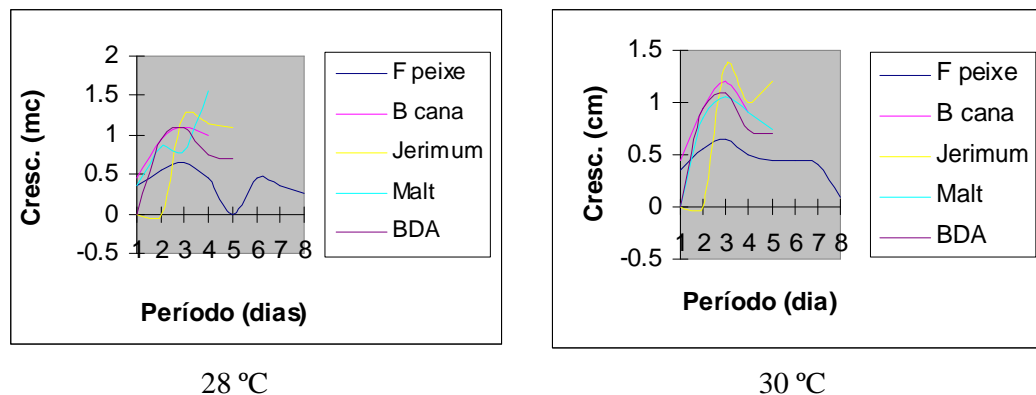


Figura 11. Progressão da fronteira micelial de *Lentinus crinitus* em pH 6 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

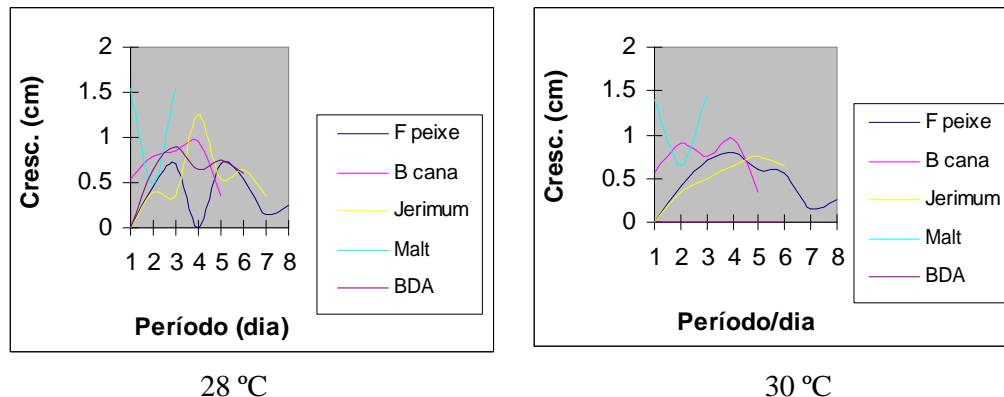


Figura 12. Progressão da fronteira micelial de *Lentinus crinitus* em pH 7 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

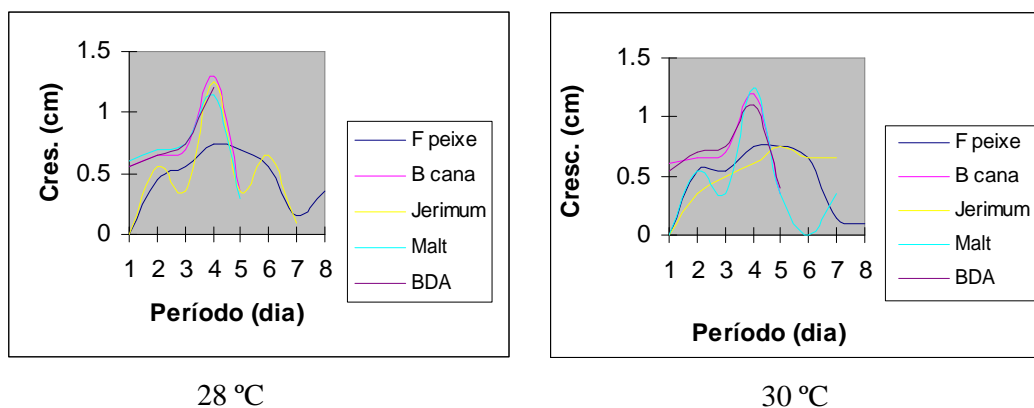


Figura 13. Progressão da fronteira micelial de *Lentinus crinitus* em pH8 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

4.2.1.2 *Trametes lactinea*

Em termos de valores absolutos o pico máximo de crescimento alcançado para *Trametes lactinea* foi menor para todos os pHs e meios testados quando comparado com àqueles de *Lentinus crinitus* em termo de velocidade de crescimento, alcançou padrão similar àqueles de *Lentinus crinitus* em pH 4 e temperatura de 28° C ao alcançar valor máximo de

crescimento no quarto dia em meio de jerimum. Entretanto, em termos de valores absolutos o maior valor de crescimento linear do micélio ocorreu em pH 7 e temperatura de 28° C neste mesmo meio.

De modo geral o crescimento foi lento para todas as condições de pH e temperatura testadas. O pH parece ter influenciado determinantemente no crescimento deste fungo.

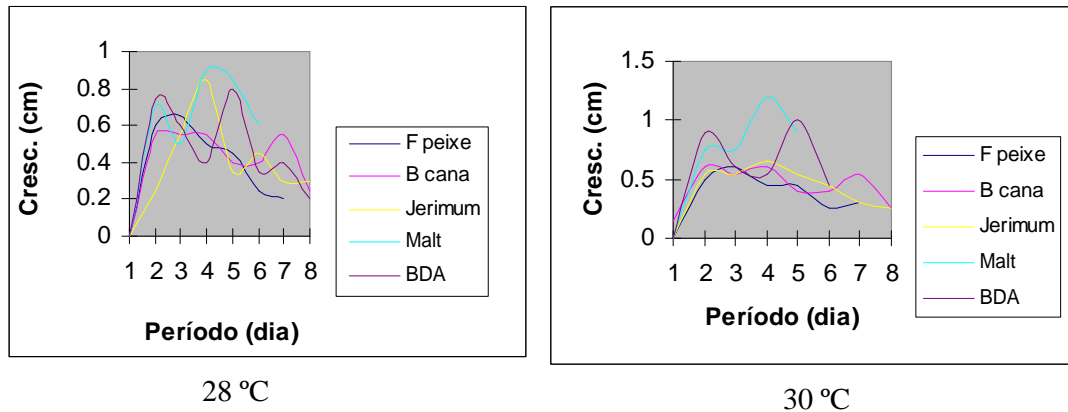


Figura 14. Progressão da fronteira micelial de *Trametes lactinea* em pH 4 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

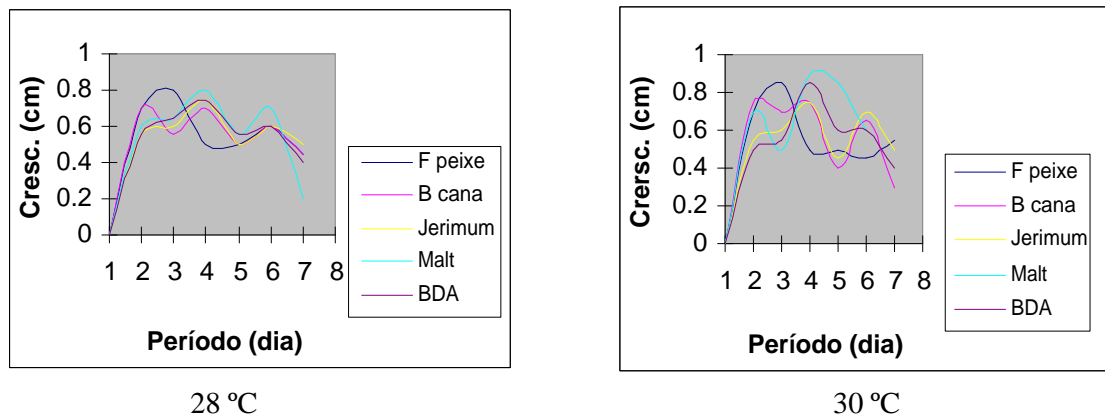
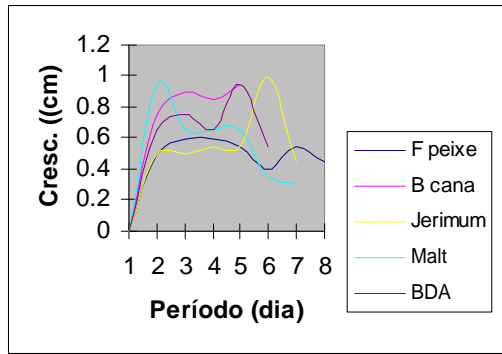
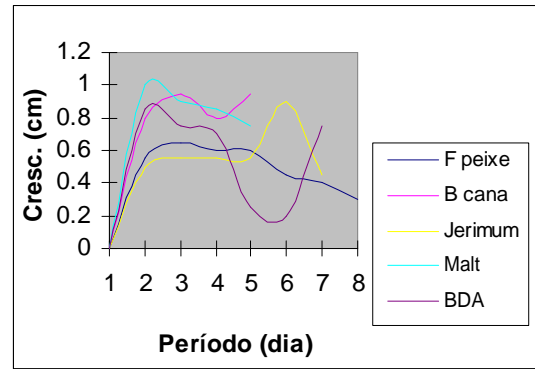


Figura 15. Progressão da fronteira micelial de *Trametes lactinea* em pH 5 crescido em diferentes meios de cultura sólido.

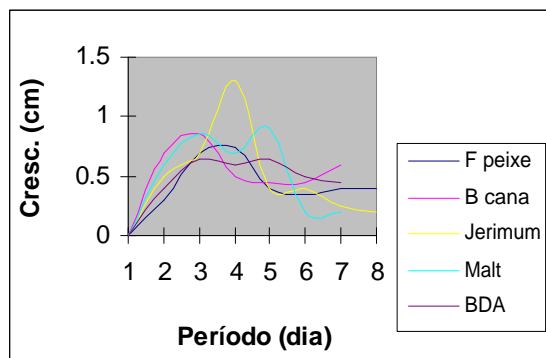


28 °C

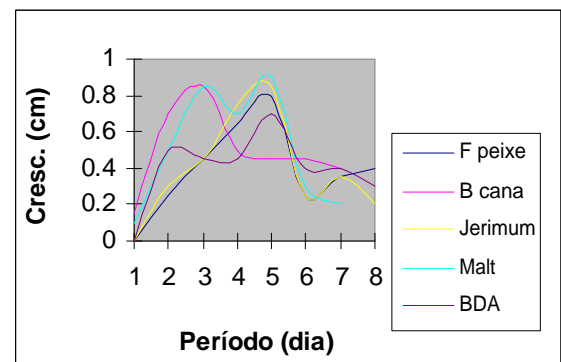


30 °C

Figura 16. Progressão da fronteira micelial de *Trametes lactinea* em pH 6 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

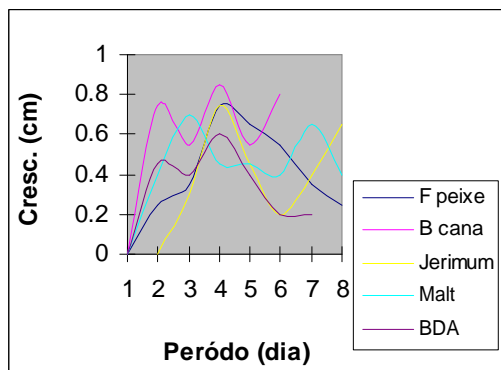


28 °C

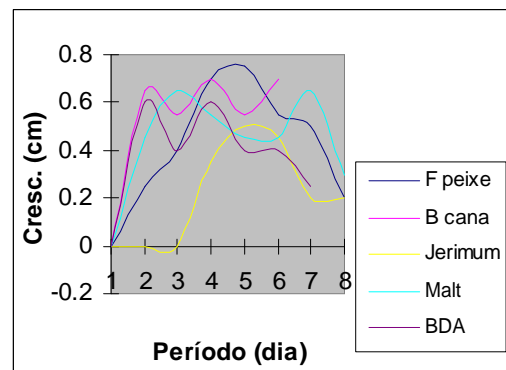


30 °C

Figura 17. Progressão da fronteira micelial de *Trametes lactinea* em pH 7 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.



28 °C



30 °C

Figura 18. Progressão da fronteira micelial de *Trametes lactinea* em pH 8 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

4.2.1.3 *Datronia brunneoleuca*

De todos os fungos testados *D. brunneoleuca* foi o que apresentou maior valor de crescimento máximo (Figura 19) ocorrido no pH 4 e temperatura de 30° C no meio de farinha de peixe. Nos outros tratamentos de pH e temperatura apresentou comportamento similar aos outros fungos testados. Interessantemente, o valor máximo de crescimento já aconteceu em 48 horas após a inoculação, quando a partir de então decresceu apresentando um crescimento lento, com o preenchimento da placa somente no sétimo dia de crescimento.

De modo geral, o crescimento foi lento, ocorrendo o preenchimento total da placa geralmente após o quinto dia após inoculação.

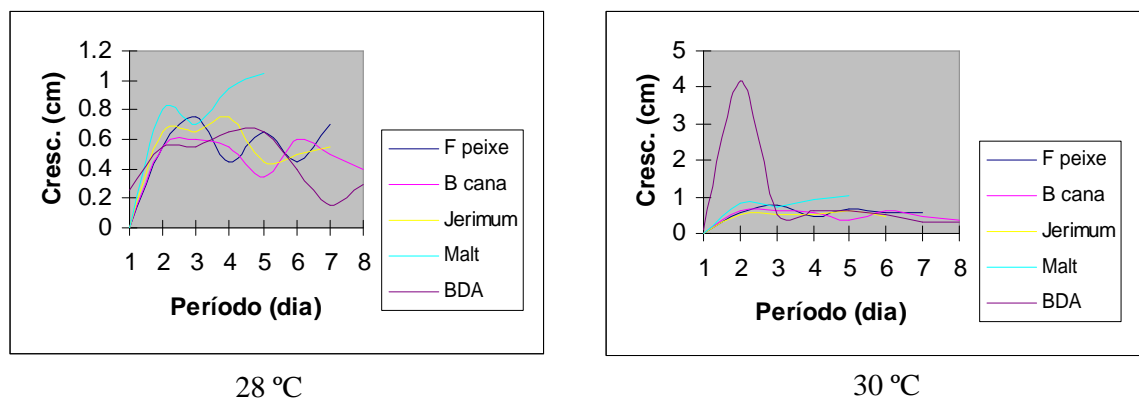
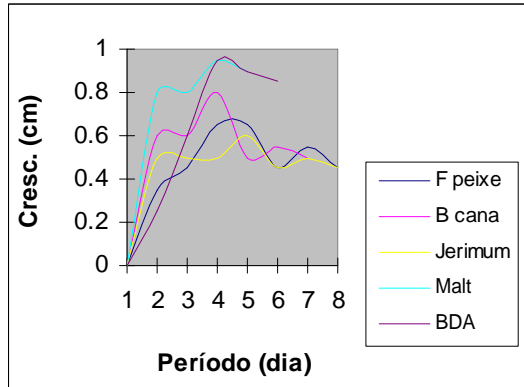
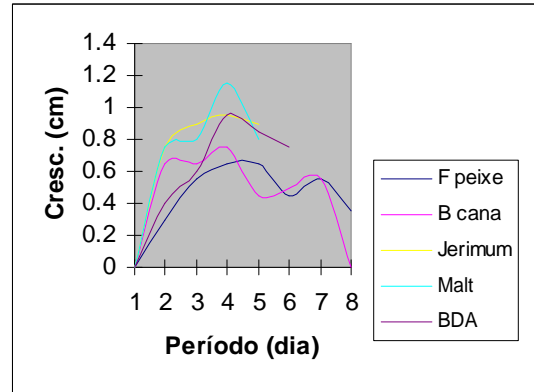


Figura 19. Progressão da fronteira micelial de *Datronia brunneoleuca* em pH 4 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

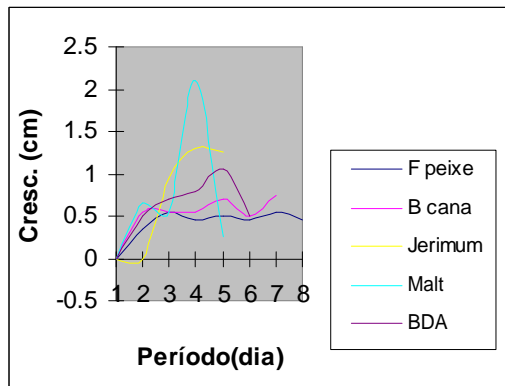


28 °C

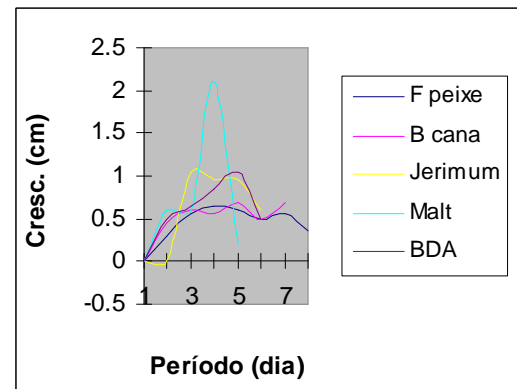


30 °C

Figura 20. Progressão da fronteira micelial de *Datronia brunneoleuca* em pH 5 crescidos em diferentes meios de cultivos sólido.

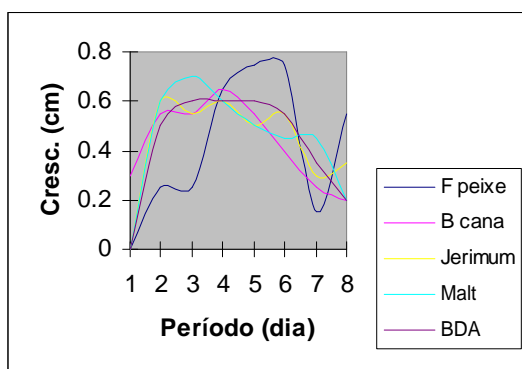


28 °C

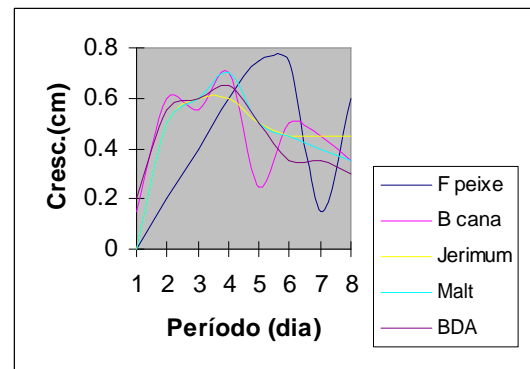


30 °C

Figura 21. Progressão da fronteira micelial de *Datronia brunneoleuca* em pH 6 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.



28 °C



30 °C

Figura 23. Progressão da fronteira micelial de *Datronia brunneoleuca* em pH 8 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

4.2.1.4 *Xylaria* sp

No meio de jerimum, temperatura de 28° C e pH 4 foi onde ocorreu melhor crescimento independente do pH. Os maiores valores absolutos máximos alcançados foram no meio jerimum e temperatura 28° C em pH 4 e pH 7. Ressalta-se, entretanto, que esses valores absolutos de pico máximo de crescimento foram cerca de 14 % menores do que àqueles alcançados para os outros fungos testados. O meio contendo farinha de peixe e pH 5 foi onde aconteceu o segundo maior crescimento, tanto para a temperatura de 28° C como para 30° C. O crescimento é menor para todos os meios testados acima em pH 5. No meio BDA, por exemplo, o valor máximo de crescimento foi em pH 8 é aproximadamente 2,3% menor do que àquele valor máximo observado no pH 4.

De modo geral, *Xylaria* sp foi o fungo que apresentou, em relação aos outros fungos testados o menor valor médio absoluto de crescimento para todos os tratamentos.

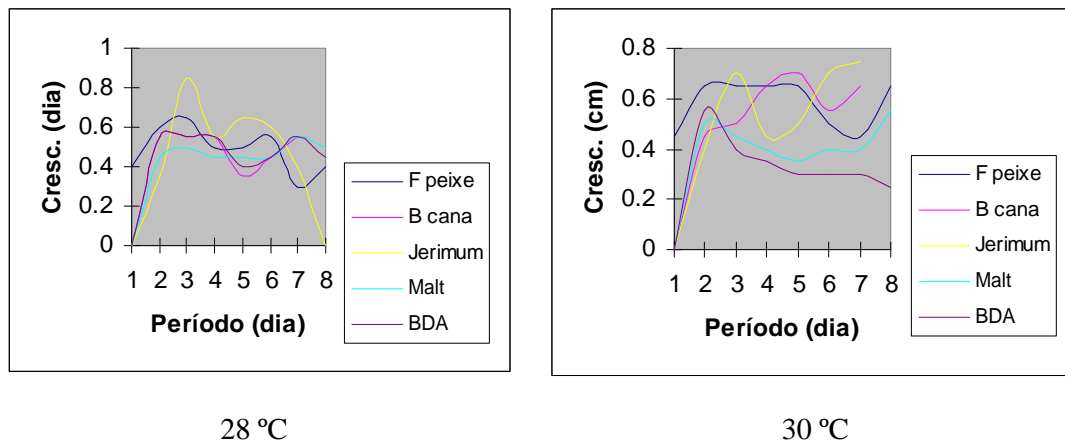


Figura 24. Progressão da fronteira micelial de *Xylaria* sp em pH 4 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

Assim como ocorreu para *Datronia brunneoleuca*, o meio de jerimum com

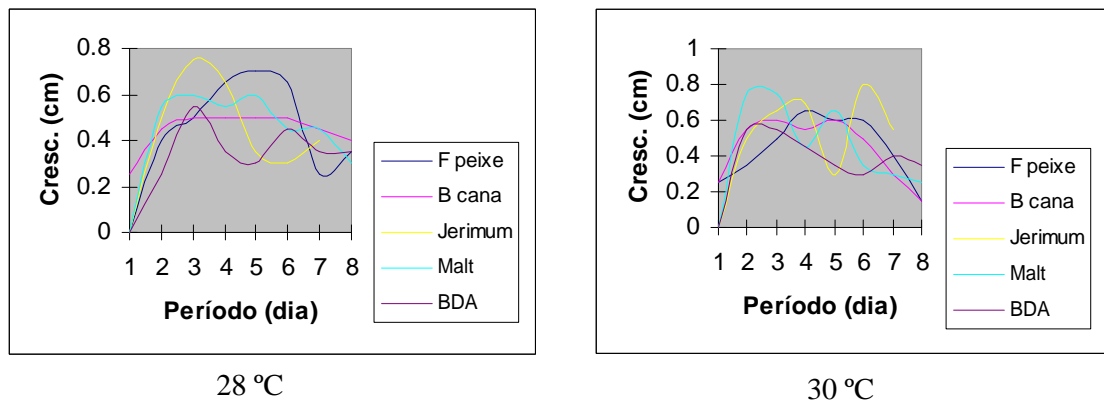


Figura 25. Progressão da fronteira micelial de *Xylaria sp* em pH 5 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

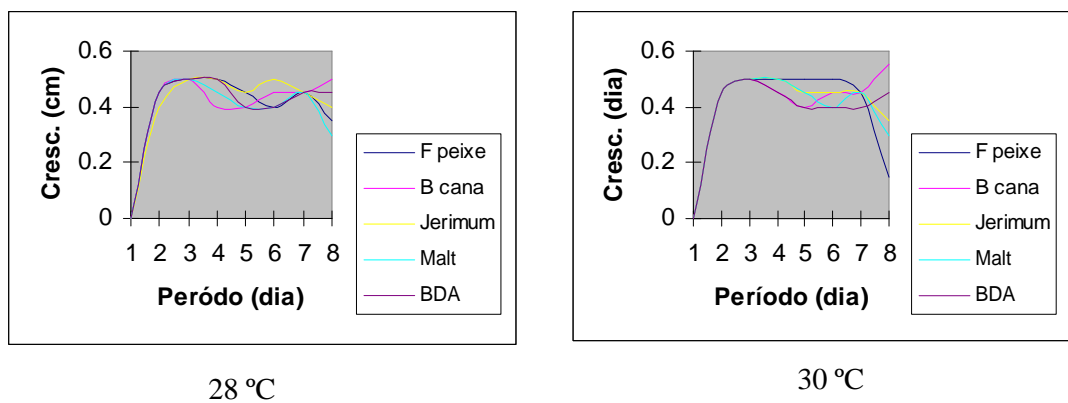


Figura 26. Progressão da fronteira micelial de *Xylaria sp* em pH 6 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

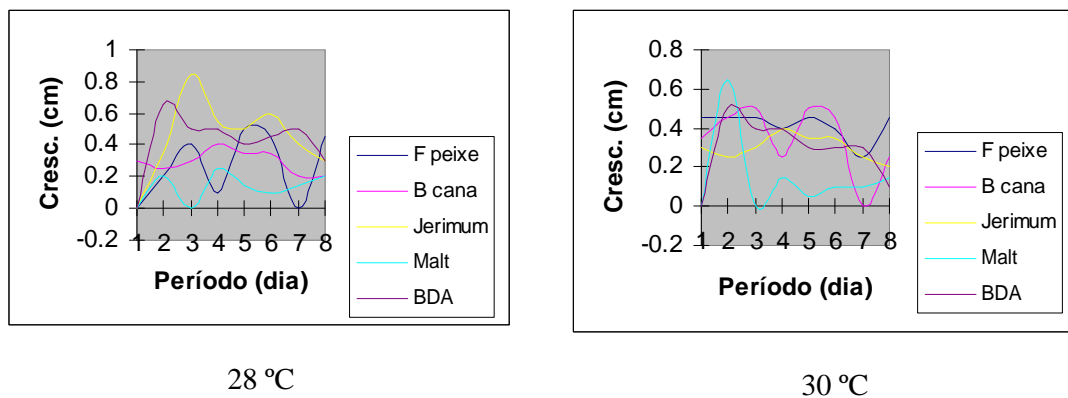


Figura 27. Progressão da fronteira micelial de *Xylaria sp* em pH 7 crescido em diferentes meios de cultivo.

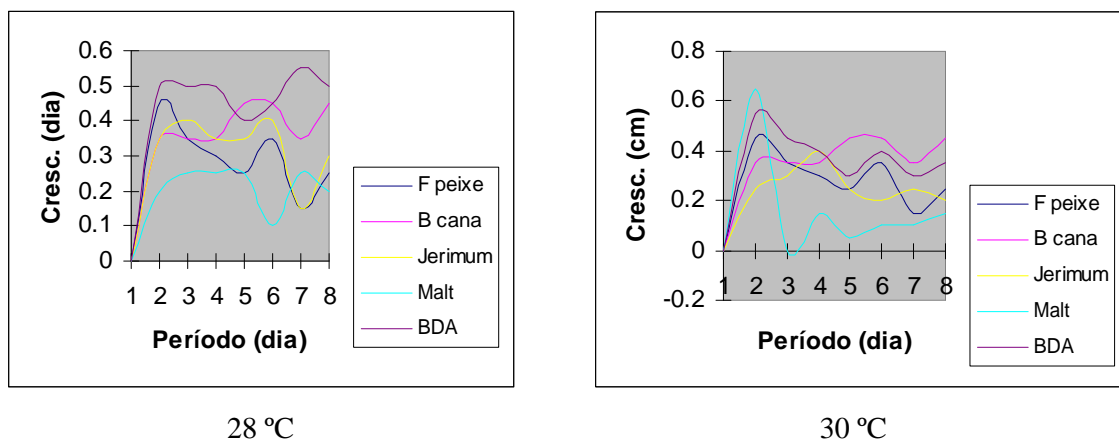


Figura 28. Progressão da fronteira micelial de *Xylaria sp* em pH 8 crescido em diferentes meios de cultivo sólido.

O teste estatístico ANOVA foi feito para verificar se existe diferença entre os tratamentos para *Lentinus crinitus*, mostrou que ao nível de 95% de probabilidade existe diferença entre si. Teste para verificar diferença mínima significativa (Tukey) mostra que esta diferença ocorre entre os meios de cultura farinha de peixe, malte e BDA. Evidencia que o melhor crescimento foi no meio malte mostrando diferença significativa de 99% entre os meios farinha de peixe e BDA. (Tabelas 14 e 15).

Análise estatística para crescimento micelial mostrou que há diferença estatística no crescimento micelial de *Lentinus crinitus* nos meios testados em pH 7 e temperatura de 30 °C. Teste de diferença mínima significativa (Tukey) mostra que esta diferença ocorre entre os meios de cultura farinha de peixe, malte e BDA o mesmo ocorreu para 28 °C no mesmo pH. Evidencia que o melhor crescimento ocorreu no meio malte mostrando diferença significativa de 99% entre os meios de cultura farinha de peixe e BDA (Tabelas 16 e 17)

Tabela 14. Análise de variância do crescimento micelial do fungo *Lentinus crinitus* em diferentes meios de cultura (pH7 e T=28 °C).

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	4	2,764	0,691		
				5,4511	0.0012*
Resíduo	53	6,718	0,127		
Total	57	9,482			

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

Tabela 15. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo do fungo *Lentinus crinitus* pH 7.0 28° C. Valores entre parênteses significam média.

	Fpeixe	Bcana	Jerimum	Malte	BDA
	(0.44)	(0.70)	(0.50)	(1.20)	(0.59)
Fpeixe				***	
Bcana					
Jerimum				***	
Malte	***		***		***
BDA				***	

Tabela16. Análise de variância do crescimento micelial do fungo *Lentinus crinitus* em diferentes meios de cultura (pH7 e T=30 °C).

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento		2,63	0,657		
				6,211	0.0006*
Resíduo	53	5,61	0,106		
Total	57	8,24			

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

Tabela 17. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 99% para os diferentes meios de cultivo pH 7.0 30° C fungo *Lentinus crinitus*. Valores entre parênteses significam média.

	Fpeixe	Bcana	Jerimum	Malte	BDA
	(0.43)	(0.70)	(0.50)	(1.16)	(0.57)
Fpeixe				***	
Bcana					
Jerimum				***	
Malte	***		***		***
BDA				***	

A ANOVA para crescimento micelial de *Trametes lactinea* mostrou que há diferença estatística no crescimento micelial nos meios testados em pH 4 e temperatura de 30 °C. Teste de diferença mínima significativa (Tukey) mostra que esta diferença ocorre entre os meios de cultura malte e farinha de peixe. Evidencia que o melhor crescimento ocorreu no meio industrial malte mostrando diferença significativa de 95% com o meio regional farinha de peixe. (Tabelas 18 e 19).

Análise de variância para crescimento micelial de *Trametes lactinea* mostrou que há diferença estatística no crescimento micelial nos meios testados em pH 8 e temperatura 30 °C. Teste de diferença mínima significativa (Tukey) mostra que esta diferença ocorre entre os meios acrescidos de bagaço de cana e jerimum. Evidencia que o melhor crescimento foi no meio regional bagaço de cana que mostrou diferença significativa de 95% em relação ao meio de cultura jerimum. (Tabela 20 e 21).

Tabela 18. Análise de variância do crescimento micelial do fungo *Trametes lactinea* em diferentes meios de cultura (pH4 e T=30 °C).

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	4	0,961	0,24		
				3,2174	0.0178*
Resíduo	65	4,852	0,075		
Total	69	5,813			

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

Tabela 19. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 4.0 30° C do fungo *Trametes lactinea*. Valores entre parênteses significam média.

	Fpeixe	Bcana	Jerimum	Malte	BDA
	(0.38)	(0.43)	(0.41)	(0.72)	(0.58)
Fpeixe				***	
Bcana					
Jerimum					
Malte	***				
BDA					

Tabela 20. Análise de variância do crescimento micelial do fungo *Trametes lactinea* em diferentes meios de cultura (pH8 e T=30 °C.)

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	4	0,782	0,195		
				3,730	0.0084*
Resíduo	71	3,719	0,052		
Total	75	4,501			

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

Tabela 21. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 8.0 30° C do fungo *Trametes lactinea*. Valores entre parênteses significam a media.

	Fpeixe (0.41)	Bcana (0.52)	Jerimum (0.21)	Malte (0.43)	BDA (0.36)
Fpeixe					
Bcana			***	***	
Jerimum		***			
Malte		***			
BDA					

Análise de variância para crescimento micelial de *Xylaria sp* mostrou que há diferença estatística no crescimento micelial nos meios testados em pH 4 e temperatura 30 °C. Teste de diferença mínima significativa (Tukey) mostra que esta diferença ocorre entre os meios acrescidos de jerimum, malte e BDA. Evidencia que o melhor crescimento foi no meio regional jerimum mostrou diferença significativa de 95% em relação ao meio de cultura malte . (Tabelas 22 e 23).

A ANOVA para crescimento micelial de *Xylaria sp* mostrou que há diferença estatística no crescimento micelial nos meios testados em pH 7 e temperatura de 28 °C. Teste de diferença mínima significativa (Tukey) mostra que esta diferença ocorre entre os meios de cultura jerimum, malte e BDA. Evidencia que o melhor crescimento ocorreu em meio de cultura jerimum mostrando diferença significativa de 99% entre os meios industriais malte e BDA. (Tabela 24 e 25).

ANOVA para crescimento micelial de *Xylaria sp* mostrou que há diferença estatística no crescimento micelial nos meios testados em pH 7 e

temperatura de 30 °C. Teste de diferença mínima significativa (Tukey) mostra que esta diferença ocorre entre os meios de cultura bagaço de cana, farinha de peixe e malte. Evidencia que o melhor crescimento foi no meio regional farinha de peixe mostrando diferença significativa de 95% entre os meios bagaço de cana e malte. (Tabela 26 e 27).

Tabela 22. Análise de variância do crescimento micelial do fungo *Xylaria sp em diferentes meiosde cultura (pH4 e T=30 °C)*

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	4	0,716	0,179		
				4,1021	0.0052*
Resíduo	67	2,923	0,044		
Total	71	3,639			

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

Tabela 23.. Resultado para o teste de Tukey ao nivel de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 4.0 30° C fungo *Xylaria sp*. Valores entre parênteses significam a média.

	Jerimu				
	Fpeixe	Bcana	m	Malte	BDA
	(0.26)	(0.29)	(0.44)	(0.13)	(0.43)
Fpeixe					
Bcana					
Jerimum				***	
Malte			***		****
BDA				***	

Análise de variância para crescimento micelial de *Xylaria* sp mostrou que há diferença estatística no crescimento micelial nos meios testados em pH 8 e temperatura de 28 °C. Teste de diferença mínima significativa (Tukey) mostra que esta diferença ocorre entre os meios de cultura BDA, farinha de peixe e malte. Evidencia que o melhor crescimento foi no meio industrial BDA mostrando diferença significativa de 95% entre os meios malte e farinha de peixe (Tabelas 28 e 29).

ANOVA para crescimento micelial de *Xylaria* sp mostrou que há diferença estatística no crescimento micelial nos meios testados em pH 8 e temperatura de 30 °C. Teste de diferença mínima significativa (Tukey) mostra que esta diferença ocorre entre os meios de cultura malte, bagaço de cana e BDA. Evidencia que o melhor crescimento foi no meio BDA mostrando diferença significativa de 95% entre os meios malte e bagaço de cana. (Tabelas 30 e 31).

Tabela 24. Análise de variância do crescimento micelial do fungo *Xylaria* sp em diferentes meios de cultura (pH7 e T=28 °C)

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	4	1,097	0,274		
				6,999	0.0002*
Resíduo	75	2,938	0,039		
Total	79	4,035			

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

Tabela 25. A resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 7.0 28° C do fungo *Xylaria sp.* Valores entre parênteses significam a média.

	Fpeixe (0.26)	Bcana (0.29)	Jerimum (0.44)	Malte (0.13)	BDA (0.43)
Fpeixe					
Bcana					
Jerimum				***	
Malte			***		***
BDA				***	

Tabela 26. Análise de variância do crescimento micelial do fungo *Xylaria sp em diferentes meios de cultura (pH7 e T=30 °C)*

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	4	0,513	0,128		
				4,8943	0.0018*
Resíduo	75	1,966	0,026		
Total	79	2,479			

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

Tabela 27. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 7.0 30° C do fungo *Xylaria sp.*Valores entre parênteses significam a média.

	Fpeixe (0.38)	Bcana (0.34)	Jerimum (0.30)	Malte (0.15)	BDA (0.30)
Fpeixe				***	
Bcana				***	
Jerimum					
Malte	***	***			
BDA					

Tabela 28. Análise de variância do crescimento micelial do fungo *Xylaria sp em diferentes meios de cultura (pH8 e T=28 °C)*

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	4	0,528	0,132		
				5,1832	0.0013*
Resíduo	75	1,91	0,025		
Total	79	2,438			

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

Tabela 29. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 8.0 28° C fungo *Xylaria sp* valores entre parênteses significam a media

	Fpeixe	Bcana	Jerimum	Malte	BDA
	(0.26)	(0.30)	(0.28)	(0.18)	(0.43)
Fpeixe					***
Bcana					
Jerimum					
m					
Malt	***				***
BDA	***				

Tabela 30. Análise de variância do crescimento micelial do fungo *Xylaria sp em diferentes meios de cultura (pH8 e T=30 °C)*

Causas de variação	G.L	S.Q	Q.M.	F	(p)
Tratamento	4	0,374	0,094		
				3,3808	0.0134*
Resíduo	75	2,076	0,028		
Total	79	2,45			

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

Tabela 31. Resultado para o teste de Tukey ao nível de 95% para os diferentes meios de cultivo pH 8.0 30° fungo *Xylaria* sp valores entre parênteses significam a media

	Fpeixe (0.26)	Bcana (0.31)	Jerimum (0.23)	Malte (0.15)	BDA (0.34)
Fpeixe					
Bcana				***	
Jerimum					
Malt		***			***
BDA				***	

4.3 Atividade enzimática

A atividade enzimática para peroxidase, lacase e fenoloxidase foi determinada em meio de cultura líquido extrato de jerimum com 3g de dextrose, 3% de Tween 80 e 3% de sulfato de magnésio incubado em B.O.D temperatura 28°C estado estacionário.

Trametes lactinea foi o que apresentou maior valor para lacase e menor valor para atividade de peroxidase. (Tabela 32)

Tabela 32. Parâmetros descritivos das atividades enzimáticas dos fungos degradadores de madeira testados em meio de cultivo líquido de extrato jerimum em temperatura 28° C, sem luz e sob condição estacionária.

	<i>Lentinus crinitus</i>			<i>Trametes lactinea</i>			<i>Datronia brunneoleuca</i>			<i>Xylaria sp</i>		
	Lacase	Fenoloxidase	Peroxidase	Lacase	Fenoloxidase	Peroxidase	Lacase	Fenoloxidase	Peroxidase	Lacase	Fenoloxidase	Peroxidase
Media	19,06	15,29	2,23	19,79	14,16	3,30	17,89	14,37	6,81	7,31	6,26	2,24
Desvio Padrão	10,11	11,61	12,9	8,79	11,70	15,31	9,48	10,56	25,34	7,26	2,96	7,19

Trametes lactinea apresentou em média uma atividade de lacase 9,6 % maior que *Datronia brunneoleuca* e somente 3,6% maior do que *L. crinitus*. *Xylaria* sp foi o que apresentou a menor atividade para lacase. Teste de Tukey evidenciou que não há diferença significativa ao nível de 95% de probabilidade na produção enzimática da lacase pelos fungos testados com exceção para *Xylaria* sp cuja atividade enzimática mostrou-se significativa nesse nível de confiança, evidenciando sua menor atividade de lacase.

De modo geral, não houve diferença estatística na atividade fenoxidase e peroxidase entre os fungos testados, com exceção para *Xylaria* sp que mostrou diferença apenas em relação a *Lentinus crinitus*. *Xylaria* sp mostrou menos atividade enzimática.

4.3.1 Padrão da atividade enzimática

O padrão da atividade de lacase no período de trinta dias de crescimento mostrou-se similar para todos os fungos. Todos alcançaram atividade enzimática máxima no décimo dia de crescimento (Figura 29), diminuindo cerca de 60 - 65 % a produção de lacase no décimo quinto dia. Interessantemente, após cinco dias desse período de crescimento a atividade enzimática de lacase voltou a aumentar para todos os fungos. *Datronia brunneoleuca* apresentou uma atividade 79% maior do que aquela obtida no quinto dia de crescimento. *Trametes lactinea* apresentou o menor valor de

atividade de lacase detectada no último dia de fermentação, cerca de 77 % menor em relação aos outros fungos no mesmo período.

Xylaria sp mostrou não ser um potencial secretor de lacase, após, a produção desta enzima foi bem menor do que aquela dos outros fungos testados. A maior produção enzimática de lacase para *Xylaria* sp ocorreu no décimo quinto dia de atividade, padrão diferente dos outros fungos onde a atividade de lacase foi menor nesse período (Figura 29).

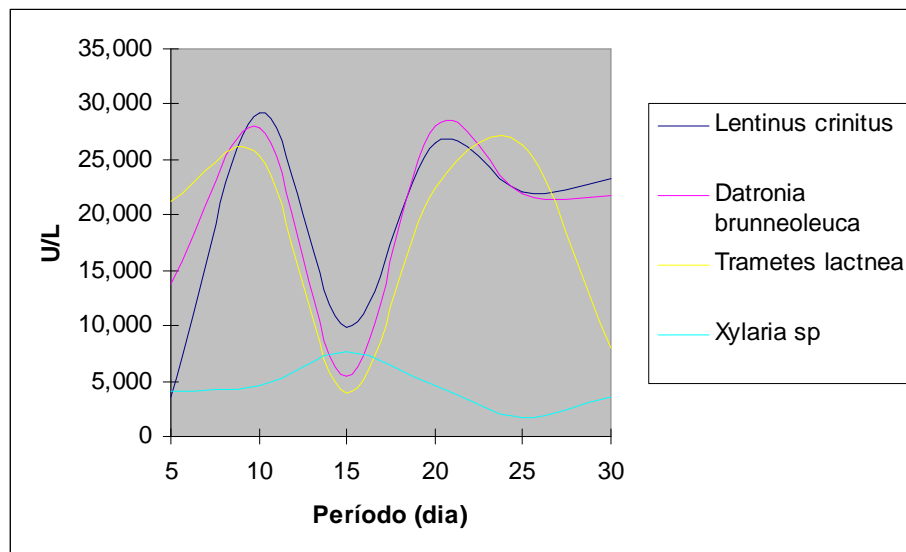


Figura 29. Padrão de variação da atividade enzimática de lacase dos fungos degradadores de madeira testados.

Diferente da lacase, para a fenoloxidase a máxima atividade enzimática ocorreu após trinta dias de crescimento para todos os fungos (Figura 30). Ressalta-se que houve atividade inicial até um valor máximo para fenoxidase após quinze dias de crescimento. Após esse período a atividade enzimática

diminuiu cerca de 60-72% em cinco dias para todos os alcançando valor máximo novamente no trigésimo dia de crescimento.

A atividade de peroxidase somente foi detectada após dez dias de crescimento para os fungos *Lentinus crinitus*, *Trametes lactinea* e *Datronia brunneoleuca*, apresentando máxima atividade no décimo quinto dia de crescimento.

A atividade máxima de peroxidase obtida pelo fungo *Trametes lactinea* foi 51% maior do que *Datronia brunneoleuca* e 67 % maior do que *Lentinus crinitus* (Figura 31).

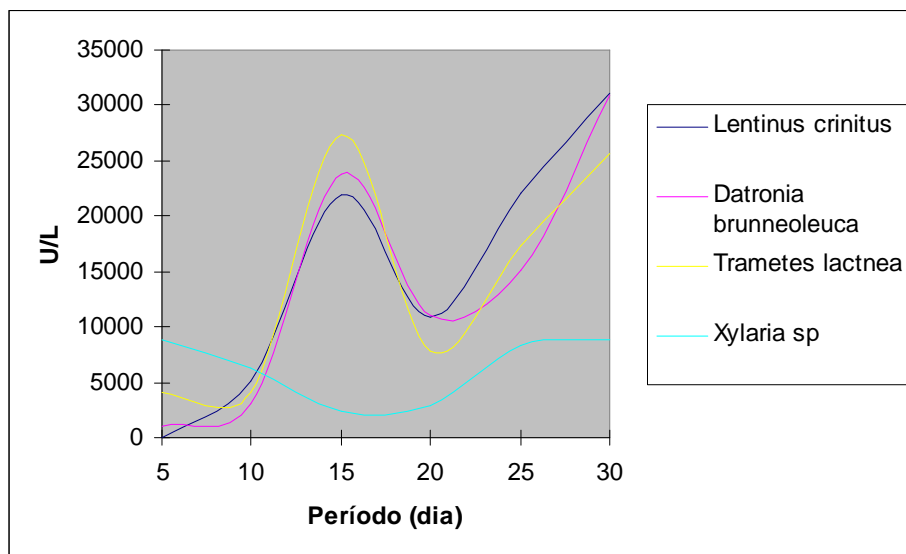


Figura 30. Padrão de variação na atividade enzimática de fenoxidase dos fungos degradadores de madeira testados.

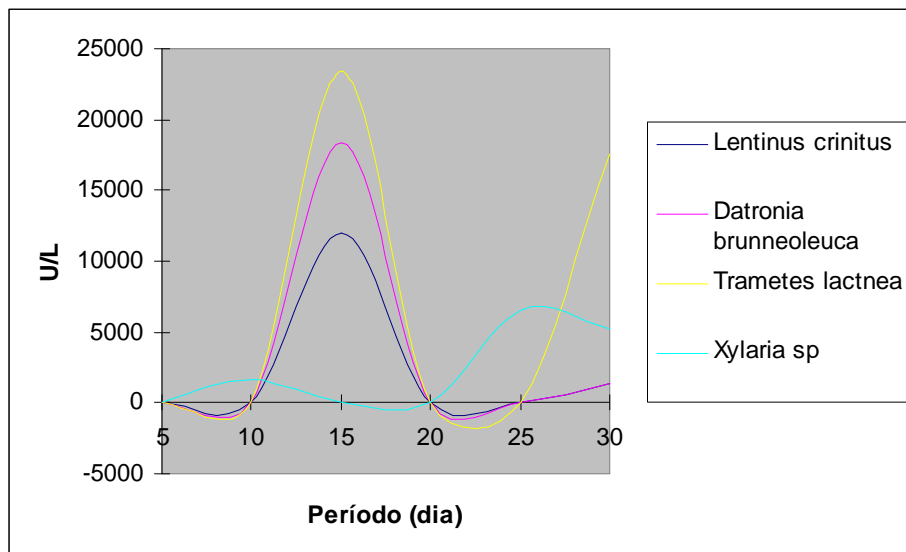


Figura 31. Padrão de variação na atividade enzimática de peroxidase dos fungos testados.

4.4 Produção da massa micelial

A porcentagem de massa micelial produzida foi determinada no final do experimento e a cada cinco dias de incubação. Em termos de Valores absolutos a maior produção ocorreu para *Datronia brunneoleuca* e a menor para *Xylaria* sp. (Tabela 33). De modo geral, com exceção para *Xylaria* sp, os fungos apresentaram percentual de produção de massa micelial muito próximo com uma diferença em torno de 63% entre eles.

Tabela 33. Parâmetros descritivos da massa micelial dos fungos testados no período de 30 dias.

Fungo	Média	Desvio padrão	Variância	Coef. de Variação (%)
<i>Datronia brunneoleuca</i>	20,8	11,7	138,5	56,41%
<i>Trametes lactinea</i>	17,6	9,3	87,2	52,81%
<i>Lentinus crinitus</i>	19,4	9,8	97,5	50,71%
<i>Xylaria sp</i>	13,8	4,3	18,5	31,10%

Com o objetivo de verificar se houve mudança de pH no período de crescimento micelial foi mensurado no início e fim de crescimento dos fungos . (Tabela 34) Para *Lentinus crinitus* não houve variação do pH no final do experimento, enquanto que para os outros fungos testados o pH do meio tornou-se mais ácido no final do experimento, com diminuição do valor do pH. Com exceção ocorreu para *Xylaria sp* que embora o meio continuasse na faixa ácida ocorreu ligeiro aumento no valor do pH, mensurado no final do experimento.

Tabela 34. Variação do pH do meio durante o crescimento em meio líquido (1= início, 2= final).

<i>Datronia brunneoleuca</i>		<i>Trametes lactinea</i>		<i>Lentinus crinitus</i>		<i>Xylaria sp</i>	
1	2	1	2	1	2	1	2
5.5	4.81	5.5	4.7	5.51	5.5	5.5	5.77
(12%)		(14%)		(0,1%)		(4,6%)	

5 DISCUSSÃO

Todos os organismos precisam encontrar em seu ambiente, unidades estruturais bem como fontes de energia para a construção e manutenção de sua estrutura e organização. Alguns elementos são essenciais para o crescimento dos fungos. Cerca da metade do peso das células fúngicas consiste em carbono. (MOORE – LANDEEKER, 1982), o que nos dá uma indicação da importância do papel de compostos de carbono dentro da célula. Carbono e Nitrogênio são elementos dominantes na fermentação porque estão diretamente ligados à produção de biomassa e dos metabólitos. As quantidades de carbono e nitrogênio necessárias mostram variações conforme a espécie estudada, e o implemento de biomassa ou metabólito (KIM et. al. 2002; WU et. al, 2004).

No caso específico dos fungos objetos da presente pesquisa, os meios nutricionais mostram-se eficientes para o crescimento, com a presença ou limitação de macroelementos. Dos meios industriais testados (MALTE E BDA), as cepas Amazônicas de *Datronia brunneoleuca*, *Trametes lactinea* e *Lentinus crinitus* apresentaram melhor resposta ao crescimento médio em meio sintético de extrato de malte na temperatura de 30°C muito embora os outros meios tenham contribuindo para o crescimento dos fungos, confirmando que cada

fungo tem suas exigências nutricionais específicas, e que as diferenças observadas no crescimento e comportamento dos fungos aqui estudados nos diferentes substratos, provavelmente se devam a composição química dos mesmos e às diferenças fisiológicas dos isolados. FERREIRA (2005), também encontrou o meio composto de extrato de malte como melhor parte para crescimento de fungos Amazônicos. MATA et. al. (2001) também encontraram melhores resultados para o crescimento de *Lentinula edodes* e *Lentinula bonyana* em meio acrescido de malte. Na realidade o fator mais determinante no crescimento radial dos fungos testados foi o pH e a temperatura.

A limitação de nitrogênio ou a sua presença parece não afeta o crescimento, por exemplo, de *Lentinus crinitus*, mas sim o pH do meio. O ótimo pH para crescimento foi a faixa ácida, sendo que alguns fungos apresentaram melhor crescimento radial na escala mais baixa de acidez. (pH 4 - 5)

Ressalta-se, entretanto, que pH ótimo é variável em função do objetivo a ser alcançado e da espécie fúngica estudando. De acordo com KIM e colaboradores (2002) o pH ótimo para o crescimento micelial e produção de exopolissacarídeos por *Paecilomyces sinclairii* é pH6. Por outro, FERREIRA (2005) cita a faixa de pH 4 – 5 como ótima para crescimento radial do fungo *Pycnoporus sanguineus*, enquanto que SMÂNIA e colaboradores (2007) de cinabarina, um antibacteriano sintetizado por esse fungo.

Embora no nosso estudo, não medimos a variação do pH no crescimento meio sólido, a constatação de que o crescimento radial é melhor

em meio ácido foi confirmado com a produção de massa micelial, mensurando em meio líquido, onde não ocorrem mudanças drástica de pH final, permanecendo o mesmo na faixa ácida. De certa forma, esse resultado contraria a afirmação de MOORE-LANDECKER (1982) de que invariavelmente os fungos alteram o pH do meio onde crescem. Segundo este autor, a conversão de um componente neutro para metabólico ácido ou alcalino pode ser responsável pela mudança de pH no meio.

Os fungos basidiomicetos apresentaram melhor crescimento radial na faixa baixa do pH (pH4) testado e no meio malte, neste caso, a temperatura não influenciou no crescimento, indicando que a faixa testada, pode ser considerado a ótima para esses fungos basidiomicetos. No caso do ascomiceto *Xylaria* sp, o seu melhor crescimento radial acontece em pH alcalino (pH8) tendo a faixa de temperatura testado com a ótima. Por outro lado, temperaturas ótimas para produção de substancias bioativas são geralmente mais baixas de que aquelas para o crescimento micelial, mas podem variar consideravelmente (BARBEREL & WALKER, 2000).

Ressalta-se, entretanto, que o meio líquido de jerimum para produção de enzimas e determinação da massa micelial estava acrescido de dextrose, surfactante Tween 80 e sulfato de magnésio. PANDA e colaboradores (1984) afirmam que o carbono tem influencia na formação de biomassa. Entretanto, uma mistura de fontes de carbono pode suportar maior crescimento do que uma simples fonte de carbono (BURNETT, 1976). No nosso estudo, o uso de Tween 80, um surfactante não-iônico, constituído por ésteres de ácido graxos

de polioxietileno sorbitol, aumenta a permeabilidade da célula, fazendo com que a membrana protoplasmática torne-se saturada com íons de hidrogênio de modo que a passagem de cátion seja limitada, tornando a membrana com mais fluidez, e assim aumentando a secreção de enzimas no meio de crescimento. (VASCONCELOS, et. al., 2000).

Conforme comentado anteriormente, os fungos aqui estudados foram crescidos em meio líquido de jerimum com 3% de Tween 80 e 3% de sulfato de magnésio. Os basidiomicetos produzem enzimas ligninolíticas de forma constitutiva, porém elas podem ser induzidas pelas condições de cultivo. Diversas substâncias, incluindo compostos aromáticos e fenólicos têm sido utilizadas como indutores enzimáticos com o objetivo de aumentar a produção de enzimas ligninolíticas. Têm se avaliado o tipo, a concentração e o tempo de adição dos indutores para estimular a produção destas enzimas. Produtos formados durante a decomposição da madeira por fungos, tais como ácidos p-hidroxicinâmico, ácido p-cumárico, ácidos ferrúlicos, catecol, guaiacol, p-hidroxibenzaldeído, p-hidroxibenzoato, vanilina e ácido vanílico podem atuar como precursores do álcool veratrílico e de outros indutores aromáticos endógenos, estimulando a síntese de enzimas ligninolíticas (GALHAUP ET AL. 2002, RABINOVICH ET AL. 2004, PAZARLOGLU ET AL. 2005). TERRON ET AL. (2004) observaram aumento da produção de lacase por *Trametes* sp. I-62 com a adição de diversos compostos fenólicos (ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, guaiacol, siringol, pmetoxifenol, pirocatecol, ácido 3,5-dihidroxibenzóico e siringaldazina). Os resultados deste estudo demonstraram que estes compostos aromáticos parecem ter efeitos diferentes tanto na

atividade de lacase quanto na expressão de genes desta enzima por *Trametes* sp. Muitos isômeros de xilidinas (dimetilanilinas, utilizadas como corantes na indústria) e pentaclorofenol atuam como indutores de lacases (LUTAREK ET AL. 1997, JUNG ET AL. 2002, KOLLMANN ET AL. 2005).

Várias pesquisas têm mostrado que a produção de lacase também pode ser estimulada pela adição de surfactantes não-iônicos, (que aumenta a viabilidade das reações entre as enzimas e seus respectivos substratos) (POINTING et. al. 2000; POZDNYAKOVA et. al, 2004)

Nossos resultados também mostram que para os fungos amazônicos testados a inclusão de Tween-80 contribui para o aumento da secreção de lacase e peroxidase. Associa-se a isso ao fato do acréscimo também de bagaço de cana-de-açúcar ao meio o que corrobora com o resultado de ARORA & GILL (2000) que constataram esse suplemento nutricional como excelente indutor de lacase em *Phlebia fascicularia* e *P. floridenses*.

Outros aspectos constatado através do nosso resultado é o efeito do período de incubação na produção de lacase. Para os fungos amazônicos testado a produção de lacase alcançou seu máximo com 10 dias para *Lentinus crinitus*, *Datronia*, *brunneoleuca* e *Trametes lactinea* e 15 dias para *Xylaria* s.p. A produção relativa de lacase em *Lentinus crinitus* e *Datronia brunneoleuca* deu outro máximo no vigésimo dia, e *Trametes lactinea* no vigésimo quinto dia com um concomitante aumento na biomassa e atividade específica da lacase .

Isto pode ter sido devido a autólise do fungo a qual liberou lacase intracelular para o meio conforme sugerido por ARORA & GILL (2000).

Nosso resultado para *Xylaria* sp. corrobora com a opinião de que fungos Xylareaceos são também capazes de produzir podridão branca, e subsidia evidencias da deslignificação da madeira por alguns táxon de Xylariaceas (POINTING et. al, 2003)

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos na presente pesquisa podemos concluir que:

- Para melhor crescimento radial dos fungos testados em meio sintético, o extrato de malte e temperatura de 30 °C é onde se obteve o maior valor absoluto de crescimento para *Datronia brunneoleuca*, *Trametes lactinea* e *Lentinus crinitus*.
- O melhor pH para crescimento dos fungos testados esta na faixa de 4-5.
- O meio regional de jerimum acrescido de surfactante, dextrose e sulfato de magnésio é adequado para obtenção de grande densidade micelial para os fungos *Datronia brunneoleuca*, *Trametes lactinea* e *Lentinus crinitus*.
- A inclusão de Tween-80 no meio líquido contribui para o aumento da secreção de lacase pelos fungos testados.
- Existe uma relação positiva entre a atividade enzimática e produção de massa micelial nos fungos estudados.

- O gênero *Xylaria* é capaz de produzir podridão branca da madeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARORA, D. S. & GILL, P. K. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. **Bioresource Technology** 73: 283-285, 2000.

AKHTAR, M., BLANCHETTE, R. A., KIRK, T.K, 1997. Fungal delignification and biomechanical pulping of wood. In: **Advances in Biochemical Engineering\ Biotechnology**, New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, V. 57, p. 159-195.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL M. 1996. **Introductory mycology**. John Wiley; Sons, New York. 869p.

ANDER, P. & ERIKSSON, K.E. 1976. The Importance of Phenol-oxidase Activity in Lignin degradation by White-rot Fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Arch. Microbiol.** 109:1-8.

AZAMORA, P. et al. 2003. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. **Applied Catalysis B: Environmental**. v 42, n. 2, p.131-144.

AZEVEDO, J. L. 2003. Fungos: Genética e Melhoramento de Fungos na Biotecnologia. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio01/1hp>> Acesso em 04/12/08.

BARR, M.E. 1976. Perspectives in the Ascomycotina. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, 28(1): 1-8.

(BIERMANN, 1996; DANIEL, 2003).

BLANCHETTE, R.A. 1995. Degradation of lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.* 73: S999- S1010. *apud* Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. & Itavaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology** 72: 169-183.

BONONI, V.L.R. 1999. **Zigomicetos, Bazidiomicetos e Deuteromicetos. Noções básicas de taxonomia e aplicações Biotecnológicas**. Instituto de Botânica, secretaria do Estado de Meio Ambiente. São Paulo-SP.

BONONI, V.L.R. 1997. Biodegradação de Organoclorados no solo por Basidiomicetos Lignocelulosíticos. In: **Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: EMBRAPA- CNPMA** (243-268).

BOURBONNAIS, R. & PAICE, M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Letters**. v. 267, p.99-102.

BURNETT, J. H. 1976. Fundamentals of Mycology. New York: **Crane Russak & Company** (2^a ed.) 673 pp.

CASTRO E SILVA, A.; SILVA, M. B. C.; CAVALCANTI, M. A. 2002 .FUNGOS: **O inexplorado potencial enzimático da biodiversidade amazônica**. Disponível em: <[http:// www.geocities.com.br/ biodiversidade 2002/fungos](http://www.geocities.com.br/biodiversidade_2002/fungos)>. Acesso em 10/02/2008.

CASTRO E SILVA, A. 1996. Micromorfologia da Degradação de Madeira da espécie Amazônica *Hura creptans* L. por fungos ligninolíticos pertencentes a classe Hymenomycetes (**Tese de Doutorado**). Manaus: INPA/FUA.

CALL, H.P. & MUCKE, I. 1997. History, overview and application of mediated lignolytic system, especially laccase-mediator-systems (Lignozyme®- process). **Journal of Biotechnology**, v.53,p. 163-202.

CAMARERO, S.; SARKAR, S.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T. 1999. Description of a versatile peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites. **Journal Biol. Chem.** 274 : 10324-10330.

CLAUS, H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron.**, **35**: p. 93-96.

CHUA, M. G. S.; CHOI, S. & KIRK, T. K. 1983. Mycelium Binding and Depolymerization of Synthetic C- Labeled Lignin During Decomposition by *Phanerochaete chrysosporium*. **Holzforschung** **37** (2): 55-61.

CHUA, M. G. S.; CHEN, C. L. & CHANG, H. M. C- NMR 1982. Spectroscopic Study of Spruce Lignin Degraded by *Phanerochaete chrysosporium*. **Holzforschung** **36**, 165-172.

D'ALMEIDA, G. L. 1982. O em "Composição Química dos Materiais em Celulose e Papel –**Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica**" vol. I Ed. IPT- São Paulo, SP pp42-54.

DAVIS, S; BURNS, R.G. 1978. Decolorization of phenolic effluents by soluble and Immobilized phenol oxidases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 32:721-729.

DITTMANN, J.; HEYSER, W.; BUCKING, H. 2002. Biodegradation of aromatic compounds by white rot and ectomycorrhizal fungal species and the accumulation of chlorinated benzoic acid in ectomycorrhizal pine seedling. **Chemosphere**. v. 49, n. 3, p. 297-306.

DEACON, J.W. 1997. Modern mycology. **London: Blackwell Scientific. Oxford.** 3. ed. 303p.

DONALD VOET & JUDITH VOET. 2002. **Biochemistry** 2nd Edition.

- DURAN, N. ESPOSITO, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidases-like compounds in wastewater and soil treatment: A Review. *Appl.Catalysis B. Environ.*, 28,83-99.
- EGGERT, C; TEMP, U. & ERIKSSON, K.E.L. 1996. The lignolytic system of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**. n.62, v. 4,p.115-158.
- ERIKSSON, K. E. L. 1990. Biotechnology in Pulp and Paper Industry. *Wood Scit Technol.* v.24, p.79-101.
- ESPOSITO, E. e AZEVEDO, J.L. 2004 **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS.
- ESAU, K. 1965. Em "Plant Anatomy" 2th ed. **John Wiley International** - New York pp. 35, 49.
- FERRAZ. A. L. 2004. Fungos Decompositores de Materiais Lignocelulósicos. in: **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia /Orgs.** Elisa Espósito e João Lúcio de Azevedo. Caxias do Sul: Educs.
- FENGEL, D. e WEGENER, G. 1989. In *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. **Water de Gruyter**, Berlin pp 66-75. 613p.
- FRAGOEIRO, S. & MAGAN, N. 2005. Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. **Environmental Microbiology**. 7 (3): 348.
- FRIES, E. M. 1821. **Systema Mycologicum**. Vol. 1. Johnson Reprint Corporation, Nova York, 520p.
- FORSS, K.; JOKINEN, K.; SAVOLANEN, M; WILLIANSO, H. 1989. Utilization of enzymes for effluent treatment in the pulp and paper industry. **Paperi Ja Puu** 10:1108-1110.
- GARRIL, A.1995. Transport, In: N.A.R. Cow & G.M. GADD (Eds.) *The growing Fungus*, **Chapman & Hall.UK**, 473p.
- GEWIN V. 2002. All living things, online. **Nature** 418: 362-364.
- GOODELL, B., JELLISON, J., LIU, J., DANIEL, G., PASZCZYNSKY, A., FEKETE, F., KRISHNAMURTHY, S., JUN, L. XU,G. 1997. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolate from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. **Journal of Biotechnology**, v.53, p. 133-152.
- GLENN, J.K; GOLD, M.H.1985. Purification and characterization of extracellular Mn (II)- Dependent Peroxidase from the liginin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Arsh. Biochem. Biophys.** 242:329-334.

- GUGLIOTTA, A.M. & CAPELARI, M. 1998. **Taxonomia de basidiomicetos. In: Bononi, V.L.R. (Org.). Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**, Instituto de Botânica, São Paulo, 184 p.
- HAWKSWORTH, D.L, KIRK, P.M., SUTTON, B.C. & PEGLE, D.N.1995. Ainsworth & Bisby's **Dictionary of the Fungi**. 8th. Edn., CAB International, Wallingford, UK, 616pp.
- HAWKSWORTH DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research** **105**(12): 1422-1432.
- HAMLIN, P.F. 1998. Fungal biotechnology. **British Mycol. Soc. Newsletter** **3**: 45-56.
- HIGUCHI, T.,1985. Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components, Orlando: **Academic Press**. 679p.
- HOLF JA, KLOPFENSTEIN NB, TONN JR, MCDONALD GI, ZAMBINO PJ, ROGERS JD, PEEVER TL, CARRIS LM. 2004. Roles of Woody Root-Associated Fungi in Forest Ecosystem Processes: Recent Advances in Fungal Identification. USDA Forest Service RMRS-RP-47, **Rocky Mountain Research Station**.
- KARAN, J.; NICELL, J.A. 1997. Potential applications of enzymes in wastes treatment. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 69: 141 – 153.
- KIM, S. W. 2002. Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii* **Letter in Applied Microbiology**, 34: 389-393.
- KIRK, T.K., CULLEN, D. 1998. Enzymology and molecular genetics of Wood degradation by white-rot degradation by white-rot fungi. In: **Environmentally**
- KIRK,T.K; FARRELL, R.L. 1987. Enzimática "combustion": The microbial degradation of lignin. **Ann. Rev. Microbiol.** **41**:465-505.
- KORF, R. P. 1997. Tropical and Subtropical discomycetes.. In: Diversity of tropical Microfungi. **University of Hong Kong Press**.. Pp. 229-240
- FRIENDLY. 1998,Technologies for the Pulp and Paper Industry. New York: John Wiley and Sons. p.273-307.
- KÜES U, LIU Y. 2000. Fruiting body production in Basidomycetes. **Applied Microbiology Biotechnology** 54: 141-152.
- KLONOWSKA, A.; GAUDIN, C.; FOURNEL, a.; ASSO, M.; PETIT, J. L.; GIORGI, M. & TRON, T. 2002. Characterization of a low redox potencial

laccase from the basidiomycete C30. **European Journal of Biochemistry**. v.269, p.6119-6125.

LACAZ, C.L. 2002. Tratado de Micología Médica. 9ª ed. São Paulo: **ARVIER**.

LEATHAM, G.F. & KIRK, T.K. 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. **FEMS Microbiology Letters**. 16: 65-67.

LEATHAM, G.F. 1986. The ligninolytic activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 24: 51-58.

LEONOWICZ, A. et al. Fungal laccase: Properties and Activity on Lignin. **Journal Basic. Microbiol.** Berlin, 2001.v.41, p 185-227.

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S., **Hofrichter, M. & Rogalski, J.** 1999. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 27: 175-185.

LODGE DJ. 2001. Diversidad Mundial y regional de hongos. 291-304, in Hernández HM, Aldrete HAF, Álvarez F, Ulloa M. **Enfoques contemporâneos para el estudio de la biodiversidad**. México, Instituto de Biología, UNAM.

LODGE DJ, CANTRELL S. 1995. Fungal communities in wet tropical forest: variation in time and space. *Canadian Journal Botany* 73(1): 1391-1398.

LODGE DJ, CHAPELA I, SAMUELS G, UECKER FA, DESJARDIN D, HORAK E, MILLER OK, HENNEBERT GL, DECOCK AA, AMMIRATI J, BURDSALL HHJ, KIRK PM, MINTER DW, HAILING R, LAESSOE T, MUELLER G, HUHNDORF S, OBERWIENKLER F, PEGLER DN, SPOONER B, PETERSEN RH, ROGERS JD, RYVARDEN L, WATLING R, TURNABULL E, WHALLEY AJS. 1995. A Survey of Patterns of Diversity in Non-Lichenized Fungi. *Mitt. Eidgenöss. Forsh.anst. Wald Schnee Landsch* 70(1): 157-173.

MAYER, A. M. STAPLES, R.C. 2002. Lacase: **New functions for an old enzyme phytochemistry**. v.60, p.551-565.

MATA, G; DELPECH, P.; SAVOIE, J. M. 2001. Selection of strains of *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* adapted for efficient mycelial growth on weath straw. **Rev. Iberoamericana de Micologia** 18:118-122.

MICHEL, FC; DASS, B; GRULKE, E.A et al. Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaetes chrysosporium* in the decolorization of craft bleach plant effluent. **Appl. Env. Microbiol.** 57(8) : 2368-2375. 1991

MOORE D, FRAZER LAN. 2002. Essential Fungal Genetics. New York: **Springer**.

MOORE-LANDECKER, E. 1982. Fundamentals of the FUNGI. New Jersey: Prentice-Hall, **INC. Englewood Cliffs**.578pp.

MUELLER GM, BILLS GF. 2004. Introduction. 159-163, in Mueller GM, Bills GF, Foster MS. Biodiversity of Fungi – Inventory and monitoring methods. Amsterdam: Elsevier, **Academic Press**.

NEUFELD, P. 1997. Micologia. **Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro - RJ.

ÖNNERUD, H., ZHANG, L., GELLERSTEDT, G. & HENRIKSSON, G. 2002. Polymerization of Monolignols by Redox Shuttle–**Mediated Enzymatic**.

PALMER, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; SCALONI, A.; CAPASSO, A & SANNIA, G. 1997. A Novel White Laccase From *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biological Chemistry**, v.50,p. 31301-31307.

PALMER, J.M.; HARVEY, P. J.; SCHOEMAKER, H. E. 1987. The role of peroxidases, radical cation and oxigen in the degradation of lignin. *Phil. Trans. R. Soc.* London. A31: 495-502.

PERALTA- XIA, Z.; YOSHIDA, T.; FUNAOKA, M. 2003. Enzymatic degradation of highly phenolic lignin-based polymers (lignophenols). *European Polymer Journal*. v. 39, n. 5, p. 909-914.

Prosser 1995

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T.L.1998. **Os Reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul, Rs: EDUNISC.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. 2004. **Os Reinos Dos Fungos. Vol. 2.** 2ed . Santa Cruz do Sul: EDUNISC.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. 2002. **Os Reinos Dos Fungos. Vol. 1.** Santa Cruz do Sul: EDUNISC.

PRESTON, R. D. 1974. The physical biology of plant cell walls. London: **Chapman & Hall Ltd**.

POINTING, S. B; PARUNGAO, M.M.& HYDE, K. D. 2003. Production of Wood-decay enzymes, man loss and lignin solubilization in Wood by tropical Xylariaceae. **Mycological Research** 107:231-235.

RAVEN, P. H.; et al. 2001. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara KOOGAN.

ROSA LH, MACHADO KMG, JACOB CC, CAPELARI M, ROSA CA, ZANI CL. 2003. Screening of Brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 98(7): 967-974.

- SAPARRAT, M. C. N.; GUILLEN, F.; ARAMBARRI, A. M.; MARTINEZ, A. T.; MARTINEZ, A. T. 2002. Induction, Isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriopsis rigida*. **Appl. Env. Microb.** **68** (4): 1534-1540.
- SOARES, C. H. L. 1998. Estudos Mecanisticos da Degradação de Efluentes de Indústrias de Papel e Celulose por Fungos Basidiomicetos Degradadores de Madeira. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas – SP.
- SHAN, V. & NERUD, F. 2002. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. **Can. J. Microbiol.** **48**: 857-870.
- SHON Y.H, NAM K.S. 2001. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. **Journal of Ethnopharmacology** **77**: 103-109.
- STAMETS P. 2002. Novel antimicrobials from mushrooms. **HerbalGram** **54**: 29-33.
- SILVA, M.; ESPOSITO, E. 2004. O papel dos fungos na recuperação ambiental. Pp. 337–378. In: Espósito, E.; Azevedo, J.L. (orgs). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs.
- SILVA, R. 2002. Antibiosis entre hongos lignívoros y antagônicos para efecto del biopulpaje de madera de *Pinus radiata*. 120p. **Memória Ingeniero Forestal. Universidad de Chile**.
- SUNDARAMOORTHY, M; KISHI,K; GOLD, M.H et al. 1994. Preliminary crystallographic analysis of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Mol. Biol.** **238**:845-848.
- SZKLARZ, G.D. 1989. Production of phenol oxidases and peroxidases end peroxidases by wood fungi. **Micology.** **81**: 234-240.
- TIEN,M; KIRK , T. K. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification characterization and catalytic. Properties of a unique H₂O₂ - requiring oxigenase. **Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)**: **81**:2280-2289.
- TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, A. L. F.; ROCHA, W. C. & FERNANDES, O. C. C. 2001. **Produção de Compostos Bioativos de Interesse Industrial**. Universidade do Amazonas. Fundação UNISOL. Manaus – AM.
- TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A. & ITAVAARA, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology.** **72**: 169-183.
- THURSTON, F. 1994. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology.** **140** 19-26.

VASCONCELO, A. F. D. 2000. Optimization of lacases production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. **Process Biochem.** 35:1131-1138.

VOLC, J.; KUBATOVA, E.; DANIEL, G.; PRIKRYLOVA, V. 1996. **Only C –2 specific glucose oxidase activity is expressed in ligninolytic cultures of the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium.**

WESSELS, J.G.H. 1994. Development regulation of fungal cell wall formation. *Annual Review Phytopathology.* 32: 413-437. *apud* Pessoni, R. 2002. Isolamento e caracterização de enzimas extracelulares e de parede celular do fungo *Penicillium janczewskii*, crescido em diferentes fontes de carbono. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 163 p.

WHITESIDE, J.O., GARNSEY, S.M. & TIMMER, L.W. (Eds.) 1988. *Compendium of Citrus diseases.* **APS Press**, USA. 80 pp.

WU, I. Z. 2004. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr) Singer. Part 2; Effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. **Food Chemistry** 85: 101-105.

XIAO, Y.Z., TU, X.M., WANG, J., ZHANG, M., CHENG, Q., ZENG, W.Y. & SHI, Y.Y. 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a lacase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 60: 700-707.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.