

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ATIVIDADE DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS NO  
CRESCIMENTO DE *Lentinula edodes* EM  
SUBPRODUTOS ENERGÉTICOS**

**MAGALI REGINA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP - Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia - Área de Concentração em Energia  
na Agricultura

BOTUCATU - SP  
Outubro / 2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ATIVIDADE DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS NO  
CRESCIMENTO DE *Lentinula edodes* EM  
SUBPRODUTOS ENERGÉTICOS**

**MAGALI REGINA**

Prof. Dr. Fernando Broetto

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP - Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia - Área de Concentração em Energia  
na Agricultura

BOTUCATU - SP  
Outubro / 2004

REPRODUÇÃO  
AUTORIZADA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E  
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO  
UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

R335a Regina, Magali, 1966-  
Atividades de enzimas lignocelulolíticas no crescimento  
de *Lentinula edodes* em subprodutos energéticos / Magali  
Regina. -- Botucatu, [s.n.], 2004.  
xi, 87 f. : il. color., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) -- Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrônômicas.

Orientador: Fernando Broetto.

Inclui bibliografia.

1. Cogumelos comestíveis 2. Enzimas microbianas.  
3. Resíduos agrícolas. 4. Enzimas extracelulares.  
I. Broetto, Fernando. II. Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade  
de Ciências Agrônômicas. III. Título.

Palavras-chave: Shiitake; Cogumelos comestíveis; Enzimas  
microbianas; Enzimas extracelulares.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ATIVIDADE DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS NO CRESCIMENTO  
DE *Lentinula edodes* EM SUBPRODUTOS ENERGÉTICOS"

ALUNA: MAGALI REGINA

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO BROETTO

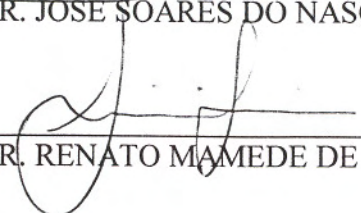
Aprovado pela Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. FERNANDO BROETTO

  
\_\_\_\_\_  
PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI

  
\_\_\_\_\_  
PROFA. DRA. ADRIANE MARIA FERREIRA MILAGRES

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. JOSÉ SOARES DO NASCIMENTO

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. RENATO MAMEDE DE C. MONTINI

Data da Realização: 27 de outubro de 2004.

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA / UNESP – Universidade Estadual Paulistra do Campus de Botucatu, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Ao Prof. Dr. Fernando Broetto, pela orientação, amizade, confiança, incentivo e apoio que foram fundamentais durante todo o curso.

Ao Prof. Dr. Giovanni G. Sermanni - Departamento de Agrobiologia e Agroquímica - Università Degli Studi Della Tuscia (Viterbo – Itália), pela orientação e confiança.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Adriana M. F. Milagres do Departamento de Bioquímica - Faculdade de Engenharia Química de Lorena / USP, pelo apoio e atenção.

Aos velhos e novos amigos da pós-graduação

À minha família pelo apoio espiritual, moral e físico

Ao CNPq pela bolsa concedida de Doutorado Sandwich

À CAPES pelo apoio financeiro para realização do curso.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Lista de Figuras .....	IX
Lista de Tabelas .....	XI
<b>1. RESUMO</b> .....	1
<b>2. SUMMARY</b> .....	2
<b>3. INTRODUÇÃO</b> .....	3
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
4.1. Degradação dos compostos lignocelulósicos .....	6
4.2. Importância das enzimas lignocelulósicas .....	8
4.2.1. Bioremediação .....	8
4.2.2. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos .....	8
4.2.3. Industrial .....	11
4.3. Condições para a produção enzimática .....	11
4.4. Relação enzimas e resíduos agroindustriais .....	12
4.5. Bioreatores .....	14
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
5.1. Obtenção das linhagens de <i>L. edodes</i> .....	15
5.2. Obtenção dos resíduos agroindustriais .....	15
5.3. Multiplicação das linhagens de <i>L. edodes</i> .....	16
5.4. Protocolo de preparação dos substratos para instalação dos experimentos .....	17
5.5. Determinação do teor de lignina e holocelulose presentes nos materiais lignocelulósicos .....	17
5.5.1. Teor de lignina .....	17
5.5.2. Teor de holocelulose .....	18
5.6. Determinação da atividade de enzimas oxidativas de <i>L. edodes</i> durante crescimento em meio de cultura líquido .....	20
5.6.1. Adaptação das linhagens de <i>L. edodes</i> ao meio de cultura líquido .....	20
5.6.2. Instalação do experimento em meio de cultura líquido .....	21

5.6.3. Análise da atividade de enzimas oxidativas de <i>L. edodes</i> no meio de cultura líquido .....	21
5.7. Velocidade média de crescimento miceliano de <i>L. edodes</i> em substratos sólidos .....	22
5.7.1. Adaptação das linhagens aos substratos sólidos .....	22
5.7.2. Instalação do experimento em substratos sólidos .....	22
5.8. Determinação da atividade de enzimas oxidativas e hidrolíticas de <i>L. edodes</i> durante crescimento em sistema estacionário .....	23
5.8.1. Instalação do experimento em sistema estacionário .....	23
5.8.2. Análise da atividade de enzimas oxidativas de <i>L. edodes</i> durante crescimento em sistema estacionário .....	24
5.8.3. Análise da atividade de enzimas hidrolíticas de <i>L. edodes</i> durante crescimento em sistema estacionário .....	24
5.8.3.1.Preparo das soluções .....	25
5.8.3.2.Fase I – Valor intrínseco da concentração de açúcares redutores .....	25
5.8.3.3.Fase II – Substratos enzimáticos .....	26
5.8.3.4.Determinação da atividade de enzimas hidrolíticas .....	27
5.9. Determinação da atividade de enzimas oxidativas e hidrolíticas de <i>L. edodes</i> em serragem de eucalipto durante crescimento em bioreator .....	27
5.9.1. Preparo do inóculo das linhagens de <i>L. edodes</i> .....	27
5.9.2. Instalação do experimento em bioreator .....	27
5.9.3. Análise da atividade de enzimas oxidativas de <i>L. edodes</i> incubadas em bioreator .....	29
5.9.4. Análises das enzimas hidrolíticas em linhagens de <i>L. edodes</i> incubadas em bioreator .....	29
5.10. Análise Estatística.....	29

<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
6.1. Determinação da atividade de enzimas oxidativas de <i>L. edodes</i> durante crescimento em meio de cultura líquido .....	30
6.1.1. Atividade de enzimas oxidativas em meio de cultura líquido à base de serragem de eucalipto .....	31
6.1.2. Atividade de enzimas oxidativas em meio de cultura líquido à base de bagaço de cana-de-açúcar .....	32
6.1.3. Atividade de enzimas oxidativas em meio de cultura líquido à base de casca de arroz .....	34
6.1.4. Atividade de enzimas oxidativas em meio de cultura líquido à base de bagaço de mandioca .....	35
6.2. Velocidade média de crescimento miceliano das linhagens de <i>L. edodes</i> em substratos sólidos .....	38
6.3. Determinação da atividade de enzimas oxidativas em linhagens de <i>L. edodes</i> durante crescimento em sistema estacionário .....	40
6.3.1. Atividade de enzimas oxidativas em serragem de eucalipto.....	41
6.3.2. Atividade de enzimas oxidativas em bagaço de cana-de-açúcar .....	41
6.3.3. Atividade de enzimas oxidativas em casca de arroz .....	42
6.3.4. Atividade de enzimas oxidativas em bagaço de mandioca .....	43
6.4. Determinação da atividade de enzimas hidrolíticas de <i>L. edodes</i> durante crescimento em sistema estacionário .....	46
6.4.1. Atividade de enzimas hidrolíticas de <i>L. edodes</i> em serragem de eucalipto .....	46
6.4.2. Atividade de enzimas hidrolíticas de <i>L. edodes</i> em bagaço de cana-de-açúcar .....	48
6.4.3. Atividade de enzimas hidrolíticas de <i>L. edodes</i> em casca de arroz .....	50
6.4.4. Atividade de enzimas hidrolíticas de <i>L. edodes</i> em bagaço de mandioca ..	52
6.5. Determinação da atividade de enzimas oxidativas de <i>L. edodes</i> em serragem de eucalipto durante crescimento em bioreator .....	56
6.6. Determinação da atividade de enzimas hidrolíticas de <i>L. edodes</i> em serragem de eucalipto durante crescimento em bioreator.....	58



<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	66
APÊNDICE .....	78

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Bioreator instalado com o experimento de atividade enzimática do <i>L. edodes</i> durante crescimento em serragem de eucalipto .....	28
<b>Figura 2.</b> Atividades de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em meio de cultura líquido à base de serragem de eucalipto .....	32
<b>Figura 3.</b> Atividades de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em meio de cultura líquido à base de bagaço de cana-de-açúcar. ....	33
<b>Figura 4.</b> Atividades de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em meio de cultura líquido à base de casca de arroz. ....	35
<b>Figura 5.</b> Atividades de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em meio de cultura líquido à base de bagaço de mandioca. ....	36
<b>Figura 6.</b> Velocidade média de L17, L22 e Leax incubadas em tubo de ensaio nos diversos substratos .....	39
<b>Figura 7.</b> Atividade de Lacase e MnP de L17, L22 e Leax em serragem de eucalipto incubados em sistema estacionário .....	41
<b>Figura 8.</b> Atividade de Lacase e MnP de L17, L22 e Leax em bagaço de cana-de-açúcar incubados em sistema estacionário .....	42
<b>Figura 9.</b> Atividade de Lacase e MnP de L17, L22 e Leax em casca de arroz incubados em sistema estacionário .....	43
<b>Figura 10.</b> Atividade de Lacase e MnP de L17, L22 e Leax em bagaço mandioca incubados em sistema estacionário .....	44
<b>Figura 11.</b> Atividades de enzimas hidrolíticas de L17, L22 e Leax em serragem de eucalipto durante crescimento em sistema estacionário. ....	47
<b>Figura 12.</b> Atividades de enzimas hidrolíticas de L17, L22 e Leax em bagaço de cana-de-açúcar durante crescimento em sistema estacionário. ....	49
<b>Figura 13.</b> Atividades de enzimas hidrolíticas de L17, L22 e Leax em casca de arroz durante crescimento em sistema estacionário .....	51
<b>Figura 14.</b> Atividades de enzimas hidrolíticas de L17, L22 e Leax em bagaço de mandioca durante crescimento em sistema estacionário .....	53

<b>Figura 15.</b> Atividade de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em serragem de eucalipto durante crescimento em bioreator. ....	57
<b>Figura 16.</b> Atividades de enzimas hidrolíticas de L17, L22 e Leax em serragem de eucalipto durante crescimento em bioreator. ....	60

**Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Percentual de lignina e holocelulose presente nos substratos .....	19
---	----

## 1. RESUMO

O cultivo de cogumelos comestíveis, em subprodutos energéticos, representa o principal exemplo da conversão direta de resíduos lignocelulósicos em um artigo com alto valor agregado, com benefício para o gênero humano e uma fonte de energia biosintética comercialmente importante. O objetivo do trabalho foi verificar a atividade de enzimas lignocelulolíticas do *Lentinula edodes* crescendo em resíduos agrícolas, utilizando-se três tipos de incubação: meio líquido, sistema estacionário e bioreator. As linhagens LE 95/17, LE 96/22 e Leax foram incubadas em substratos compostos de casca de arroz (CA), serragem de eucalipto (SE), bagaço de mandioca (BM) e bagaço de cana-de-açúcar (BC), suplementado com 20% de farelo de arroz e 1% de CaCO<sub>3</sub>. Foram avaliados a velocidade de crescimento miceliano e a atividade de enzimas oxidativas e hidrolíticas. As linhagens em meio de cultura líquido não apresentam atividades expressivas de manganês peroxidase e lacase. SE e BC, utilizados no sistema estacionário, mostraram ser os mais eficientes para as atividades de MnP, enquanto que para a atividade da lacase apenas SE. O sistema estacionário, em SE, foi melhor que o bioreator para atividade de enzimas hidrolíticas. O bagaço de mandioca pode ser uma alternativa viável como substrato, ou na forma de complemento à outros substratos, por propiciar um rápido crescimento miceliano. A lignina peroxidase não foi detectada em nenhum dos experimentos

LIGNOCELULOLITIC ENZYMES ACTIVITY IN *Lentinula edodes* GROWING IN ENERGETIC WASTES. Botucatu, 2004. 87p. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MAGALI REGINA

Adviser: FERNANDO BROETTO

## 2. SUMMARY

The cultivation of mushrooms in by-products represents the main example of the direct conversion of lignocellulosic residues in an article with high attached value with benefit for the mankind and source of commercially important biosynthetic energy. The aim of this work was verify the activity of the *Lentinula edodes* lignocellulolitic enzymes growing in agricultural residues utilizing three kinds of incubation: liquid culture medium, solid static state and bioreactor. The LE 17/95, LE 22/96 and Leax strains were incubated in substrates composed of peel of rice (PR), eucalyptus sawdust (ES), cassava bagasse (CB) and sugar cane bagasse (SB), supplemented with 20% of rice brans and 1% of CaCO<sub>3</sub>. The mycelium growth velocity, the oxidative and hydrolytic enzymes activity were evaluated. The strains in liquid culture medium don't presented expressive activities of manganese peroxidase (MnP) and laccase. SE and BC utilized in solid static state system showed to be more efficient to MnP activity while laccase only SE. The solid static state system was better than bioreactor to hydrolytic enzymes activity in SE. The cassava bagasse can be a substrate alternative for having a fast mycelium growth. The lignin peroxidase was not detected in the experiments.

---

Keywords: *Lentinula edodes*, oxidative enzymes, hydrolytic enzymes, lignocellulosic residues.

### 3. INTRODUÇÃO

O cogumelo *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler, conhecido popularmente como shiitake, cresce como saprófita em madeiras de árvores de copas largas e forma corpos de frutificação à temperaturas baixas (15 a 20°C) e sob condições de alta umidade relativa (80 a 90%). A espécie é classificada como pertencente à Classe dos Basidiomycetes (Holobasidiomycetes), Ordem Agaricales, Família Tricholomataceae (Agaricaceae). Este cogumelo comestível é o mais difundido na China e o segundo mais consumido no mundo (ZHANXI e ZHANHUA, 1995).

O shiitake possui sabor característico, acompanhado de alto valor nutricional. Esta propriedade inclui fontes de proteína, vitaminas do complexo B e sais minerais (COCHARAN, 1978). Além disso, possui substâncias com propriedades medicinais antimicrobianas, antitumorais e atua na redução do colesterol (LEATHAM, 1982). Estes atributos promoveram, também, um aumento do seu consumo nas últimas décadas e há a expectativa de se continuar em ascensão. A produção em 1983 era estimada em 207.000 t e em 1997 chegou a 1.573.000 t (CHANG, 1999, 2002). Segundo Royse e Sanchez-Vasques (2003) a produção de shiitake teve um aumento sete vezes maior em 14 anos.

O cultivo de shiitake, no Brasil, tem sido conduzido quase que exclusivamente no sistema de toras de árvores. Porém a utilização de subprodutos energéticos para este fim, tem sido uma alternativa muito procurada devido a redução no tempo de cultivo e grande disponibilidade deste tipo de material. Com isso nos últimos anos tem se intensificado estudos sobre a utilização dos resíduos lignocelulósicos entre eles bagaço de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, casca de café, casca de arroz, etc.

O *L. edodes* pertence a um grupo do tipo fungo de podridão branca, os quais são conhecidos pela eficiente capacidade de degradação de compostos lignocelulósicos na natureza, principalmente a madeira. O sistema de degradação da lignina por estes fungos tem aplicações potenciais no biobranqueamento (ONYSKO, 1993; REID e PAICE, 1994; MESSNER e STREBOTNIK, 1994) e na biodegradação de poluentes (FIELD, 1993; BARR e AUST, 1994). Entre as enzimas extracelulares do sistema enzimático do *L. edodes* estão a lacase e a manganês peroxidase (HATVANI e MÉCS, 2003).

A necessidade de estudos referentes a atividade das enzimas lignocelulolíticas, em linhagens de *L. edodes* utilizadas no Brasil, relacionadas ao resíduo agroindustrial e a produção de shiitake constitui-se uma importante linha de pesquisa, não somente, para compreender a atividade enzimática do *L. edodes*, sob determinadas condições, mas, se possível, gerar resultados básicos para pesquisas biotecnológicas futuras.

O presente trabalho teve por objetivo verificar a atividade de enzimas lignocelulolíticas de *L. edodes* em subprodutos energéticos e a influência desta interação em diferentes formas de incubação.



#### **4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Os avanços nas técnicas de cultivo de shiitake conduziram a um tipo de produção, que diferem muito das condições do seu ambiente natural (MATA e SAVOIE, 1998). A técnica conhecida como cultivo axênico é atualmente utilizada por vários produtores. Este método baseia-se na utilização de sacos plásticos de polietileno de alta densidade, contendo substratos à base de serragem suplementada com farelos, que após passarem pelo processo de esterilização, são inoculados com a matriz secundária, em condições assépticas. A incubação ocorre em recinto fechado com controle de temperatura e umidade (EIRA et al., 1997).

A utilização de outros substratos além da serragem, como os substratos de subprodutos energéticos oriundos das agroindústrias, no cultivo axênico é uma alternativa perfeitamente possível uma vez que o micélio do shiitake é apto a crescer em uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos.

Nos últimos anos tem ocorrido um interesse maior na utilização eficiente de resíduos agroindustriais (PANDEY et al., 1999; ROSALES et al., 2002). Muitos processos têm sido desenvolvidos baseados nesses materiais como substratos em bioprocessos

para produção de proteínas isoladas, ácidos orgânicos, etanol, cogumelos comestíveis, enzimas e metabólitos secundários biologicamente importantes (PANDEY et al., 1999; MASSADEH et al., 2001; LAUFENBERG et al., 2003). O uso destes resíduos agrícolas em bioprocessos pode prover substratos alternativos e além disso auxilia na resolução de problemas ambientais, os quais são diferentemente causados por sua disposição (REDDY, 2003).

#### **4.1. Degradação dos compostos lignocelulósicos**

Os tecidos de plantas, em geral, são formados de celulose (polímeros de D-glicose), hemicelulose (xilose e manose), lignina (polímero de fenil propano) outros polissacarídeos e glicoproteínas. Estes polímeros são dispostos em associações íntimas e a mistura destes componentes em certas quantidades específicas podem influenciar no acesso à celulose pela enzima de degradação microbiana (ISAAC, 1997). A quantidade dessas substâncias varia de acordo com o tipo de resíduo vegetal. Em madeira, por exemplo (dependendo do tipo) esta variação apresenta-se entre 35-45% de celulose, 25-40% de hemicelulose e 20-35% de lignina. Já em palhas, a porcentagem de lignina é menor, variando de 10-20%, o teor de celulose entre 35-45% e o de hemicelulose, entre 25-30% (BOYLE, 1998).

A habilidade em degradar os três maiores componentes lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina), têm sido estudado baseando-se em diferentes linhagens de *L. edodes*. A degradação da celulose varia de 35,4 a 74,0%; de hemicelulose, de 8,4 a 63,4%; e a lignina entre 5,3 a 62,1% (SMITH, 1977 HAARS e HUTTERMANN, 1980; LEATHAM e STAHMANN, 1981; LEATHAM, 1985). Muitas linhagens degradam mais prontamente a celulose que a hemicelulose ou a lignina.

A celulose é uma macromolécula presente nos vegetais composta de microfibrilas, hidrolisável por ação das celulases. Neste processo, as fibras de celulose são degradadas por uma série de reações enzimáticas, iniciadas pela enzima endo  $\beta(1-4)$  glucanase, a qual separa as ligações internas entre os componentes das cadeias de glucana.

Esta reação resulta na formação de cadeias isoladas de  $\beta(1-4)$  D-glucana. Depois deste processo, uma segunda enzima, a  $\beta(1-4)$  D-glucana celobiohidrolase, degrada estas cadeias de  $\beta(1-4)$  glucana (cadeias de celulose), a partir das extremidades, originando a celobiose (um dissacarídeo). Subseqüentemente, a celobiose é convertida para glicose pela atividade de outra enzima, a  $\beta(1-4)$  glicosidase. Desta forma a glicose é liberada das microfibrilas de celulose tornando-se disponível para ser absorvida pela hifa do fungo. A primeira enzima, endo  $\beta(1-4)$ -D glucanase, cria sítios os quais a segunda enzima  $\beta(1-4)$  D-glucan celobiohidrolase) possa agir (ISAAC, 1997).

Do ponto de vista químico a lignina é uma macromolécula constituída de interunidades de fenilpropanoide, as quais são unidas por várias ligações covalentes. Devido aos tipos de ligações e de sua heterogeneidade, a lignina não pode ser quebrada por enzimas hidrolíticas como a maior parte de outros polímeros naturais (celulose, amido, proteínas) (HOFRICHTER, 2002).

No curso da evolução, somente um grupo de organismos, os basidiomicetos, tem desenvolvido a habilidade de degradar substancialmente a lignina mineralizando-a a dióxido de carbono (HATAKKA, 1994).

Os três maiores grupos de enzimas de modificação da lignina produzidos pelos fungos são lacase, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP) (BOOMINATHAN e REDDY, 1992; HATAKKA, 1994; KIRK e FARRELL, 1987; THURSTON, 1994). Alguns fungos da podridão branca produzem todas essas enzimas enquanto outros produzem somente uma ou duas delas (HATAKKA, 1994).

A habilidade de sintetizar MnP é encontrada em distintos grupos taxonômicos de basidiomicetos (CAIRNEY e BURKE, 1998), típicos colonizadores de madeira das famílias *Meruliaceae*, *Coriolaceae* e *Polyporaceae* bem como colonizadores de solo das famílias *Strophariaceae* e *Tricholomataceae* (HOFRICHTER, 2002).

## **4.2. Importância das enzimas lignocelulósicas**

### **4.2.1. Bioremediação**

As enzimas de fungos têm se mostrado úteis na degradação de uma variedade de persistentes poluentes ambientais. Muitas dessas enzimas são extracelulares, e na natureza provavelmente estão envolvidas na degradação da madeira (MAYER e STAPLES, 2002).

Os estudos, em meio de cultura líquido, comprovaram a degradação de 2,4,6-triclorofenol pelos fungos de podridão branca *Panus tigrinus* e *Coriolus versicolor*. Em culturas de *P. Tigrinus* foi catalizado predominantemente por MnP enquanto em *C. Versicolor* por lacase, sugerindo que o modo de regulação destas enzimas foi diferente nestes dois fungos (LEONTIEVSKY et al., 2000).

A bioremediação de efluentes industriais também tem sido pesquisada utilizando fungos de podridão branca, verificando-se a capacidade destes fungos na descoloração e descontaminação de efluentes. As enzimas encontradas, nestes casos, foram em grande parte representadas pela presença de lacase, MnP e LiP confirmando, mais uma vez, o potencial dessas enzimas (MAYER e STAPLES, 2002).

### **4.2.2. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos**

Os fungos degradam compostos de vários materiais, retirando entre outros elementos, carbono, nitrogênio, enxofre, necessários para o seu crescimento, através da ação de enzimas secretadas durante o seu processo de desenvolvimento. Tal capacidade, credencia estes fungos como ferramentas na reciclagem de subprodutos energéticos, oriundos de diferentes atividades agroindustriais (GRIFFIN, 1994).

O cultivo de cogumelos comestíveis, em resíduos lignocelulósicos, representa o principal exemplo da conversão direta de resíduos de baixo grau, em um artigo com alto valor agregado com benefício para o homem e uma fonte produtora de metabólitos comercialmente importantes (BUSWELL e CHANG, 1993).

O custo de produção e a baixa produtividade dessas enzimas são os maiores problemas da aplicação industrial. Embora, tem sido feitas investigações na habilidade de linhagens de microrganismos na hidrólise de celulose e hemicelulose em substratos de baixo custo (KANG et al., 2004).

A madeira e outros materiais lignocelulósicos destacam-se como fontes renováveis para a indústria de papéis, alimentos, substâncias químicas e combustíveis. Em função da sua importância, houve aumento nas pesquisas com ênfase nos processos de degradação de lignina por fungos (BOOMINATHAN e REDDY, 1992; KIRK e FARRELL, 1987). Dentre estes estudos destacam-se os processos degradativos da lignina por intermédio dos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* (GOLD et al., 1988; GOLD & ALIC, 1993). Recentemente porém, houve aumento do interesse destas enzimas, com ampliação no número de fungos relacionados a podridão branca, inclusive *L. edodes*. Estes estudos incluem desde a biologia comparativa até pesquisas sobre os sistemas de degradação da lignina para uso em várias aplicações biotecnológicas (D'SOUZA et al., 1996; HATAKKA, 1994; ORTH et al., 1993; PELÁEZ et al., 1995).

Rossi (1999) verificou que o bagaço de cana-de-açúcar necessita ser suplementado com outras fontes de carbono. No cultivo axênico do shiitake, quando a fonte utilizada foi o farelo de arroz, o autor observou alta velocidade de crescimento miceliano.

As principais características físico-químicas do bagaço de cana-de-açúcar foram descritas por Burgi (1985) como sendo: 100 a 150Kg/m<sup>3</sup> de densidade e 48,21% de matéria seca. A matéria seca compõe-se de: 1,86% de proteína bruta, 45,09% de fibra bruta, 48,06% de extrativo não nitrogenado, 2,26% de extrato etéreo e 2,73% de matéria mineral. Dentro da fração fibra bruta, predomina a celulose com 44,69%, a hemicelulose com 22,91% e a lignina com 14,89%.

O bagaço de mandioca é exemplo de outro resíduo fibroso que pode ser degradado facilmente por microrganismos, sem a necessidade de pré tratamentos (PANDEY , 2000). Neste sentido, muitos estudos têm sido realizados com este resíduo como substrato na produção de alimentos (BARBOSA, 1995; BEUX e SOCCOL, 1996), ácidos orgânicos (SHANKARANAND e LONSANE, 1994; VANDENBERGHE, 1999; HANG e WOODAMS, 1998) e enzimas (CARTA et al., 1997).

Os processos que envolvem o cultivo de microrganismos em bagaço de mandioca podem ser classificados dentro de dois grupos: processos baseados em fermentação líquida e fermentação em estado sólido (FES). A maior parte dos trabalhos tem sido em relação ao sistema FES (SOCCOL, 1996). A maior capacidade de retenção de água (85-90 %) também confirma ser um substrato ideal para os processos FES. O processo de fermentação submersa (FSm) raramente tem sido utilizada devido a razões de custo e benefício.

Com relação a sua composição físico-química têm-se: 9,03 % de umidade; 1,26 % de proteína; 0,24 % de lipídeos; 12,61 % de fibras; 1,70 % de cinzas e 75,16 % de carboidratos (BEUX e SOCCOL, 1996). A quantidade de amido, em relação ao peso seco, é cerca de 50 % (CARTA, 1999).

Na comparação entre o bagaço de cana-de-açúcar e o bagaço de mandioca, no cultivo de shiitake, a mistura de 80% de bagaço de mandioca com 20% de bagaço de cana-de-açúcar foi considerado o melhor resultado (BEUX e SOCCOL, 1996). Barbosa et al. (1995) confirmaram o potencial de utilização do bagaço de mandioca no cultivo do shiitake e de outros fungos comestíveis.

As principais características da casca de arroz, segundo Soccol (1996) são: proteínas 2,06%, fibras 46,16%, cinzas 12,38%, carboidratos 25,82%, lipídeos 5,78%.

Leatham e Kirk (1983) cultivaram *L. edodes* e *Pleurotus ostreatus* em palha de milho (frascos cônicos) os quais mostraram diferentes taxas de crescimento. Após uma semana, o substrato foi totalmente colonizado pelo micélio de *L. edodes*, sendo que *P. ostreatus* precisou de duas semanas para cobrir o substrato. Observou-se que na cultura de *L. edodes* houve uma redução de cerca de 20% da lignina após 11 dias, chegando-se a 43% após 7 semanas de cultivo, estes resultados confirmam que *L. edodes* é um degradador seletivo de lignina.

### **4.2.3. Industrial**

Muitos trabalhos têm sido direcionados a desenvolver linhagens microbianas mais produtivas enquanto outros se preocupam em aperfeiçoar os processos de fermentação (ESTERBAUER et al., 1991; HALTRICH et al., 1996).

Entre vários tipos de materiais de biomassa, a lignocelulósica tem sido vista como promissora devido à sua abundância, seu baixo custo e sua enorme viabilidade potencial. A fermentação no estado sólido (FES) oferece vantagens sobre a fermentação líquida, ou submersa, (SmF). Muitas publicações informam da viabilidade de produção de enzimas de importância industrial, tal como protease, celulase, ligninase, xilanase, pectinase, amilase, glucoamilase, etc e vários subprodutos agrícolas tem sido utilizados com sucesso em FES (PANDEY et al., 1999).

### **4.3. Condições para a produção enzimática**

O desenvolvimento da habilidade ligninolítica requer condições nutricionais e culturais, incluindo substrato metabolizável, altos níveis de oxigênio, um limite de nitrogênio e várias outras condições de cultivo (KIRK e FARRELL, 1987; BUSWELL, 1991). Além disso, os tipos e quantidades de enzimas, que podem ser produzidas para a transformação de alguns constituintes ligninosos em formas absorvíveis, são atualmente definidos pelo genótipo específico do fungo associado à adaptação a um determinado substrato de crescimento (SHEARER, 1995).

Alguns autores confirmaram o papel do carbono e do nitrogênio na ativação do sistema lignolítico (KIRK e FARREL, 1987; REID, 1979) em fungos da podridão branca. Posteriormente, verificou-se o papel essencial exercido pelo manganês na produção da LiP e da MnP por estes fungos (KERN, 1989; BONNARME e JEFFRIES, 1990; BROWN et al., 1990).

#### 4.4. Relação enzimas e resíduos agroindustriais

O *L. edodes* tem sido cultivado com outros materiais, misturados, ou não, com serragem. Entre estes, incluem-se palhas, sabugos de milho triturados e outros resíduos agroindustriais como o bagaço de cana de açúcar (PRZYBYLOWICZ e DONOGHUE, 1988). A escolha de um ou mais resíduos depende, dentre outros fatores, de sua disponibilidade na região (EIRA e MINHONI, 1996), como também do clima, ambiente, cultura da população e do tipo de natureza da tecnologia regional (RAJARATHNAM e BANO, 1992).

Alguns trabalhos apontam a ausência da LiP, em *L. edodes*, conforme o meio de cultivo (KAAL et al., 1995; ORTH et al., 1993; MASAPHY e LEVANON, 1992; WALDNER et al., 1988). Porém proteínas fracionadas de fluidos extracelulares de *L. edodes* mostraram atividade positiva da LiP (MISHRA & LEATHAM, 1990). Conseqüentemente, a ausência comumente observada da atividade de LiP não significa, necessariamente, que este fungo não possa produzi-la.

Quando cultivado em serragem de eucalipto suplementado com farelo de aveia, o shiitake obteve um crescimento muito rápido nos primeiros 90 dias (LEATHAM, 1985). Neste período, o autor relatou perda de peso com o acúmulo de glicosamina (analisado após hidrólise ácida). Foram feitas certas correlações entre as atividades de enzimas com o padrão de degradação do meio, com o crescimento ou com o desenvolvimento. Ainda neste estudo, verificou-se a atividade de enzimas dos sistemas celulolíticos, hemicelulases, lignolítico, (glico-) amilase, pectinase, ácido protease, enzimas de degradação da parede celular, ácido fosfatase e lacase.

Conforme Kalberer (1995), a hidrólise enzimática de celulose e hemicelulose libera moléculas menores e solúveis em água, como oligo, di e monossacarídeos. A análise da fase aquosa do substrato fornece informação sobre os nutrientes (qualitativa e quantitativa) imediatamente disponíveis ao micélio.

Alguns autores determinaram a atividade enzimática, em relação a diversas fases do cultivo de shiitake e outros fungos, em diferentes substratos. Okeke et al. (1994), observaram dois picos máximos de atividade da lacase. Um deles durante o crescimento miceliano e outro no momento do choque frio usado na indução da frutificação. O



padrão de atividade da LAC, em toras de madeiras, foram previamente descritas como complexas (LEATHAM, 1985). O bagaço de cana-de-açúcar mostrou ser o melhor suplemento na produção da lacase para *Phlebia fascicularia* seguido da palha de trigo e da de arroz (ARORA e GILL, 2000).

Segundo Mata e Savoie (1998), a atividade da MnP aumentou durante o crescimento miceliano em palha de trigo e ficou inativo durante o período de aparecimento dos primórdios. Kaal et al. (1995), observaram que a atividade desta enzima teve um estímulo pelos altos níveis de peptona-N em *L. edodes* e nos demais fungos testados. Com linhagens que possuíam baixa ou média capacidade de degradação de lignina (40 %) e alta de celulose (60 %) observou-se uma frutificação mais rápida comparando-se às linhagens com alta degradação da lignina (50 %) (CHANG et al., 1995).

Segundo Kang et al. (2004), em experimento com palha de arroz e farelo de trigo na produção de celulase e hemicelulase, verificaram que a palha de arroz utilizada sem ser misturada com farelo de trigo se constituiu num ótimo substrato de atividade de xylanase (5070 UI g<sup>-1</sup>) e FPase (19.0 UI g<sup>-1</sup>).

No trabalho de Reddy et al. (2003) os níveis de atividade de endocelulase (CMCase) e exocelulase (FPase) foram muito baixos, para duas espécies de *Pleurotus* cultivados em substratos à base de folha e pseudocaule de bananeira. Buswell et al. (1993) também reportaram que nenhuma atividade foi detectada em sobrenadantes de cultura de *P. sajor-caju* e *L. edodes* crescidos em celulose cristalina e durante seu cultivo em serragem de madeira.

Ohga e Royse (2001) verificaram que a expressão genética da lacase e da celulase em *L. edodes*, estão diretamente correlacionadas com nível mensurado de atividade de enzima extracelular e produção biosintética de enzimas. As atividades da lacase e celulase foram estudadas durante o crescimento e frutificação, em serragem de cedro (*Quercus acutissima*) suplementado com farelo de arroz. A lacase teve um rápido declínio durante o *stress* fisiológico, provocado pelo o abaixamento da temperatura, enquanto a celulase teve sua atividade aumentada, condição que permaneceu durante o período de frutificação.

Lacase é uma enzima extracelular a qual atividade parece estar regulada à associação com a morfogênese e muitas vezes com o desenvolvimento de corpos de frutificação (PHILIPS e LEONARD, 1976; WOOD, 1984).

## 4.5. Bioreatores

Segundo Bellon-Maurel et al. (2003), nos últimos 30 anos, a fermentação no estado sólido tem sido estudada em laboratório e em escala piloto, em um grande número de aplicações como silagem, biomassa e produção metabólica usando substratos orgânicos e suportes inertes. Os principais parâmetros a serem medidos e controlados em processo de fermentação no estado sólido são: temperatura, aeração homogênea, pH e conteúdo de água.

Os bioreatores existem em uma grande variedade e complexidade de modelos devido aos problemas originados para se monitorar e controlar fatores ambientais, biomassa e/ou produção metabólica da fermentação em estado sólido (BELLON-MAUREL et al., 2003). Estes reatores ou bioreatores conhecidos como *drum bioreactor* (RDR), possuem um tambor cilíndrico horizontal, ou inclinado, e a agitação é feita por um sistema de rotação no eixo central, ou por pás dentro do tambor. As condições possibilitam: fermentação asséptica, mistura suave, possível automatização, baixa remoção de calor (HAN e ANDERSON, 1975; HESSELTINE, 1977; LONSANE et al., 1985)

No Brasil, as pesquisas com as linhagens utilizadas para o cultivo do *L. edodes* tem gerado resultados importantes para o processo de produção e aumento de produtividade. Porém a forte relação existente entre o substrato e a atividade enzimática, expressa geneticamente, define a importância de se pesquisar de forma mais profunda a atividade enzimática do *L. edodes* relacionada às várias fases do seu desenvolvimento sobre diferentes substratos.

A possibilidade de uso dos resíduos agroindustriais como substrato para cultivo de cogumelos é uma atraente opção. Porém faz-se necessário pesquisas que possam garantir a exequibilidade de sua utilização. Neste sentido, estudos direcionados à degradação, pelo *L. edodes*, poderão contribuir na compreensão do seu sistema enzimático, o qual exerce função primordial no seu desenvolvimento.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Obtenção das linhagens de *L. edodes***

As linhagens LE 95/17 (L17), LE 96/22 (L22) e Leax de *L. edodes* foram fornecidas pela Micoteca do Módulo de Cogumelos do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP - Campus de Botucatu, São Paulo.

### **5.2. Obtenção dos resíduos agroindustriais**

Os resíduos agroindustriais utilizados durante os experimentos tiveram as seguintes procedências:

- Bagaço de cana-de-açúcar - fornecido pela Usina de Açúcar de Barra Bonita – São Paulo;
- Bagaço de mandioca - do Centro de Estudos de Raízes Tropicais da Unesp /Botucatu, São Paulo;

- Casca de arroz - da beneficiadora de arroz da Fazenda Lageado da Unesp /Botucatu, São Paulo.
- Serragem de eucalipto - foi utilizado do Departamento de Agrobiologia e Agrochimica - Università Degli Studi Della Tuscia (Viterbo – Itália), oriundo da produção local.

### 5.3. Multiplicação das linhagens de *L. edodes*

Antecedendo as instalações dos experimentos, fez-se a inoculação das linhagens em meio de cultura a base de serragem de eucalipto, garantindo assim material suficiente para todas as fases da pesquisa.

Primeiramente, preparou-se 200g de substrato composto (matéria seca) de, 79% de serragem de eucalipto, 20% de farelo arroz e 1% de CaCO<sub>3</sub>. Adicionou-se água destilada para obtenção da umidade a 60% e em seguida, foram autoclavados por 30 minutos a 120°C (1atm).

Depois do substrato de serragem de eucalipto ser autoclavado, preparou-se o seu extrato adicionando-se 1 L de água destilada e em seguida, colocou-se para aquecer. Após 20 minutos em ebulição, a mistura foi coada em algodão e o extrato recebeu 10g L<sup>-1</sup> de dextrose e 15g L<sup>-1</sup> de ágar. Completou-se o volume a 1 L no Erlenmeyer e em seguida, o extrato foi autoclavado à 120° C (1 atm), por 30 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri e em tubos de ensaio, sendo estes últimos, mantidos inclinados para polimerização.

Cada placa de Petri e cada tubo de ensaio foi inoculado com uma determinada linhagem, devidamente identificado e incubado em câmara de crescimento, no escuro, a temperatura de 25°C.

#### 5.4. Protocolo de preparação dos substratos para instalação dos experimentos

Os substratos foram compostos, em todas as fases experimentais, de 40% de material lignocelulósico com umidade corrigida à 60%. Na composição de 40% do material lignocelulósico adicionou-se farelo de arroz e carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), conforme descrito abaixo:

- **BM** = 79% bagaço de mandioca + 20% farelo de arroz + 1% de  $\text{CaCO}_3$
- **CA** = 79% casca de arroz + 20% farelo de arroz + 1% de  $\text{CaCO}_3$
- **SE** = 79% serragem de eucalipto + 20% farelo de arroz + 1% de  $\text{CaCO}_3$
- **BC** = 79% bagaço de cana-de-açúcar + 20% farelo de arroz + 1% de  $\text{CaCO}_3$

#### 5.5. Determinação do teor de lignina e holocelulose presentes nos materiais lignocelulósicos

As análises dos teores de fibras nos materiais lignocelulósicos foram realizadas em triplicata, conforme as metodologias descritas abaixo:

##### 5.5.1. Teor de lignina

A determinação de lignina foi feita conforme metodologia descrita por Halse (1926). Primeiramente determinou-se o peso de massa seca inicial das amostras ( $P_1$ ). Para isso, pesou-se 1,0 g de cada amostra em cadinhos de porcelana e os quais foram mantidos em estufa a 105° C até atingirem peso constante (ZADRAZIL, 1985).

Para as demais determinações pesou-se 1,0 g de cada uma das amostras, as quais foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL; acrescentou-se 50 mL de HCl (37%) e 5mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95-98%). Após reação por 1 h, os frascos foram mantidos em mesa giratória (140 rpm) por 16 h. Ao término deste procedimento, as amostras foram lavadas com 450 mL de água deionizada e transferidas para Erlenmeyers de 1000 mL, sendo aquecidas e mantidas em ebulição durante 10 minutos. As amostras foram filtradas em lã de vidro (porosidade entre 40-100 µm) e lavadas em água deionizada fervente.

Após a lavagem, as amostras foram mantidas, até peso constante, em estufa a 105°C para determinação do peso seco ( $P_2$ ) e em seguida, em mufla a 550°C para determinação do teor de cinzas ( $P_3$ ).

$$\text{Cálculo: \% Lignina} = \frac{P_2 - P_3}{P_1} \times 100$$

$P_1$  = peso seco inicial

$P_2$  = peso seco a 105° C

$P_3$  = cinzas

### 5.5.2. Teor de holocelulose

Determinou-se os teores de holocelulose (celulose e hemicelulose) através da fração de polissacarídeos insolúveis em água, segundo Adams e Castagne (1948). O peso seco inicial das amostras ( $P_1$ ) foi obtido pesando-se 1,0 g de cada amostra em cadinhos de porcelana e mantidos em estufa a 105° C até atingirem peso constante.

Posteriormente, foram pesados 3,0 g de cada amostra e colocados em Erlenmeyers de 500 mL. Adicionou-se 150 mL de água destilada e os frascos foram mantidos em banho-maria a 75°C. Assim que a temperatura foi atingida, acrescentou-se 0,18 mL de ácido acético glacial e 4,5mL de solução saturada de NaClO<sub>2</sub> por frasco. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes a cada hora. Nos intervalos, os frascos foram agitados por duas ou três vezes. Decorrida uma hora após a última adição dos reagentes, as amostras foram

filtradas lã de vidro (porosidade 100-160  $\mu$ ) e lavadas, primeiro com água destilada gelada e a seguir com acetona. As amostras foram secas em estufa a 105° C para determinação do peso seco ( $P_2$ ) e transferidas para mufla a 550° C, para determinação do teor de cinzas ( $P_3$ ).

$$\text{Cálculo: \% Holocelulose} = \frac{P_2 - P_3}{P_1} \times 100$$

$P_1$  = peso seco inicial

$P_2$  = peso seco a 105° C

$P_3$  = cinzas

Os teores de fibras presentes nos substratos podem ser verificados na tabela 1.

**Tabela 1.** Percentual de lignina e holocelulose presente nos substratos

Substratos	Holocelulose (%)	Lignina (%)
Serragem de eucalipto	66,7	17,3
Casca de arroz	54,9	15,8
Bag. de cana-de-açúcar	72,1	9,7
Bag. de mandioca	4,2	0,9

## **5.6. Determinação da atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* durante crescimento em meio de cultura líquido**

A análise enzimática, durante incubação em meio líquido, foi realizada através de uma fase inicial de adaptação em meio líquido, sendo posteriormente instalado o experimento.

### **5.6.1. Adaptação das linhagens de *L. edodes* ao meio de cultura líquido**

Inicialmente preparou-se cada substrato na quantidade de 100 g, conforme protocolo descrito no ítem 5.3. Após autoclavagem, preparou-se o extrato pela adição de 500 mL de água destilada, seguido de fervura por 20 min. Ao final, o extrato foi coado em algodão e armazenado para utilização posterior.

O meio de cultura líquido foi preparado com o extrato coado, adicionando-se 10 g L<sup>-1</sup> de dextrose. Transferiu-se 250 mL de cada extrato para Erlenmeyers de 500 mL, os quais foram autoclavados à 120° C (1 atm), por 30 minutos.

A inoculação foi feita com as linhagens mantidas em tubo de ensaio (ítem 5.4). Antes deste procedimento, adicionou-se água destilada dentro do tubo de ensaio, cobrindo totalmente o micélio crescido, e posteriormente este foi mixado com o auxílio de um Ultra-Turrax (IKA-Werk, Darmstadt Germania), por aproximadamente 10 segundos.

Cada Erlenmeyer com os meios líquidos de um determinado substrato recebeu 2 mL de inóculo de uma determinada linhagem, em câmara de fluxo laminar. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em agitador com rotação orbital (150 rpm) e temperatura controlada à 25°C, durante uma semana no escuro. Após este período, a massa miceliana obtida, foi utilizada como fonte de inóculo da fase seguinte.



### 5.6.2. Instalação do experimento em meio de cultura líquido

Para instalação deste experimento foram preparados novos meios de cultura líquidos, de cada substrato proposto, conforme descrito em 5.6.1. Em Erlenmeyers de 500 mL, foram colocados 200 mL de meio de cultura líquido de cada substrato e autoclavados a 120° C (1 atm) por 30 minutos.

Após a autoclavagem, os meios líquidos foram inoculados com as linhagens, do mesmo tratamento, já adaptadas conforme item 5.6.1. e postos para incubar em agitador com rotação orbital (150 rpm), no escuro, e temperatura controlada à 25°C.

As coletas para as análises enzimáticas foram feitas aos 2, 4, 7, 11, 14, 18, 22, 25, e 28 dias após a inoculação. Inicialmente as amostras foram coletadas em eppendorf e centrifugadas (10.000 rpm) por 5 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para as análises enzimáticas.

O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições num esquema fatorial 4x3.

### 5.6.3. Análise da atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* no meio de cultura líquido

A atividade da lacase foi determinada espectrofotometricamente utilizando-se 2,6 dimetoxifenol (DMOP) como substrato (Slomczynsky et al., 1995). O volume total de reação (1 mL) foi composto por 2 mM DMOP, em tampão acetato 0,1 M (pH 4.2) e 5 µl de amostra. A oxidação do DMOP foi seguida em cinética a 30°C, sendo a leitura feita a 477 nm ( $\epsilon_{477} = 14600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

A atividade da manganês peroxidase (MnP) foi determinada pelo método de Waarishi et al. (1992). O volume de reação (1 mL) foi composto por 0,1 mM  $\text{MnSO}_4$ ; 10 µl de amostra em tampão malonato 50 mM pH 4.5 e 75 µM de peróxido de hidrogênio. A formação do complexo quelado de Mn(III)-malonato foi seguida em cinética a 30 °C, por 1 minuto, medindo o aumento da absorbância a 270 nm ( $\epsilon_{270} = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Para a determinação da lignina peroxidase (LiP), foi medido a formação no tempo de veratrilaldeído (3,4 dimetoxibenzaldeído). O volume de reação (1 mL) foi composto por 0.4 mM de álcool veratril em tampão tartarato 0,1 M pH 3.0; 0,2 mM de peróxido de hidrogênio e volume necessário de amostra. A atividade foi seguida em cinética a 30°C, medindo absorção a 310 nm ( $\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Todas as determinações enzimáticas foram efetuadas com 3 repetições por tratamento.

### **5.7. Velocidade média de crescimento miceliano de *L. edodes* em substratos sólidos**

Para a determinação da velocidade média de crescimento miceliano em substratos sólidos, preparou-se inicialmente um “pré-inóculo” possibilitando a adaptação do micélio aos diferentes substratos. Após este procedimento instalou-se o experimento para a devida coleta de dados.

#### **5.7.1. Adaptação das linhagens aos substratos sólidos**

Amostras de 150 g de substrato foram preparados conforme protocolo descrito no item 5.4 e colocados em frascos de vidros; seguindo autoclavagem de 120°C (1atm) por 30 minutos. Após a autoclavagem, os substratos foram inoculados, em câmara de fluxo laminar, com as linhagens oriundas das placas de Petri (item 5.3), identificados e colocados em câmara climatizada a 25°C, no escuro, para o crescimento.

#### **5.7.2. Instalação do experimento em substratos sólidos**

Para a instalação deste experimento, primeiramente, realizou-se a uniformização dos materiais lignocelulósicos. Para este procedimento, os diferentes substratos foram triturados em moinho com peneira de 1mm de diâmetro.

Após a operação de uniformização, preparou-se os substratos conforme protocolo descrito no item 5.4. Com o auxílio de um funil, 40 g do material foi transferido para tubo de ensaio com 2,8 cm de diâmetro e 19,8 cm de comprimento.

Os tubos foram fechados com chumaço de algodão, cobertos com uma folha de papel comum e, por cima, uma folha de papel do tipo laminado. Depois foram autoclavados por 30 min. a 120° C (1 atm).

Após o resfriamento, os tubos foram inoculados com as linhagens oriundas do mesmo tratamento de adaptação (item 5.7.1) e devidamente identificados. Duas retas foram traçadas no sentido longitudinal dos tubos, do início ao fim do substrato, para a coleta de dados. Ao término destas operações os tubos foram postos para incubar, no escuro, em câmara climatizada à 25° C.

A partir do terceiro dia de incubação, o crescimento miceliano foi acompanhado fazendo-se uma marca na extremidade do micélio em dois pontos distintos do tubo, diariamente, ou a intervalos de 2 a 4 dias, até a completa colonização do substrato.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com 3 repetições, em esquema fatorial de 4x3.

## **5.8. Determinação da atividade de enzimas oxidativas e hidrolíticas de *L. edodes* durante crescimento em sistema estacionário**

O experimento de incubação em sistema estacionário foi realizado com os substratos no estado sólido e sem movimentação.

### **5.8.1. Instalação do experimento em sistema estacionário**

Foram pesados 25 g de cada tipo de substrato conforme protocolo (item 5.4), transferidos para Erlenmeyers de 250 mL e esterilizados em autoclave a temperatura de 120°C (1atm) por 30 minutos. Para a inoculação utilizou-se o inóculo líquido preparado com as linhagens, previamente multiplicadas em tubo de ensaio (item 5.3), mixadas conforme no item 5.6.1. Cada Erlenmeyer foi inoculado com 3mL de inóculo líquido, de uma

linhagem do mesmo tratamento, e fechado com tampão de algodão. Em seguida, foram ligeiramente misturados com uma movimentação circular do Erlenmeyer, uma única vez, e mantidos em câmara de incubação, no escuro, com temperatura controlada a 25 °C.

A atividade de enzimas lignocelulolíticas foi determinada aos 8, 11, 14, 17 e 20 dias após a incubação, sendo instalado em triplicata para cada dia de observação. O modelo experimental utilizado foi o inteiramente casualizado num esquema fatorial 4x3.

Para o processo de extração das enzimas, na datas determinadas, adicionou-se aos Erlenmeyers, 80mL de solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.0, os quais foram mantidos em agitador com rotação orbital (50 rpm) por 1 hora.

A suspensão obtida foi filtrada (40-100µm) e o extrato recolhido foi utilizado para determinação da atividade enzimática. O substrato, após a extração, foi seco em estufa a 105° C até peso constante, para determinação do seu peso seco.

### **5.8.2. Análise da atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* durante crescimento em sistema estacionário.**

As análises de lacase, MnP e LiP foram realizadas conforme descrito em 5.6.3

### **5.8.3. Análise da atividade de enzimas hidrolíticas de *L. edodes* durante crescimento em sistema estacionário**

As análises das enzimas hidrolíticas foram feitas conforme método modificado de Nelson ( ROBIT *et.al*, 1968).

### 5.8.3.1. Preparo das soluções

Solução A: Misturou-se a 1 L de água destilada 25 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anidro, 25 g de tartarato de  $\text{NaK} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 20 g de  $\text{NaHCO}_3$  anidro, 200 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. A solução foi mantida a temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , em agitação, para evitar precipitação.

Solução B: 30 g de  $\text{CuSO}_4$  em 200 mL de água destilada com 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.

Solução C: 25 g de molibdato de amônio em solução de 450 mL de água destilada mais 21 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Misturou-se a esta solução, 3g de arseniato de sódio em 25 mL de água destilada e ajustou-se o volume final a 500 mL com água destilada. O reagente foi aquecido a temperatura de  $55^\circ\text{C}$  por 30 minutos.

Solução D: Esta solução foi preparada, misturando-se 20 mL da solução A com 0,8 mL de solução B.

### 5.8.3.2. Fase I – Valor intrínseco da concentração de açúcares redutores

Nesta fase determinou-se o valor intrínseco da concentração de açúcares redutores nas amostras. Em tubos de ensaio, reagiu-se 20  $\mu\text{L}$  de amostra com 980  $\mu\text{L}$  de água destilada, após adição de 1 mL de solução D (item 5.8.3.1), pela incubação da solução por 20 min. a  $100^\circ\text{C}$ . Após 5 min. de resfriamento, adicionou-se 1 mL da solução C seguido de 15 segundos de agitação em vórtex, finalizando-se com a adição de 20 mL de água destilada. Após a homogeneização da solução efetuou-se a leitura em espectrofotômetro a 520 nm.

Para os tubos em branco, misturou-se 1 mL de água destilada e 1 mL de solução D e efetuou-se o mesmo procedimento para a determinação do valor intrínseco.

### 5.8.3.3. Fase II – Substratos enzimáticos

Os substratos enzimáticos foram preparados em tampão acetato 50 mM a pH 5.0, conforme segue-se:

- Xilano - para a atividade de endo-1,4- $\beta$ -xilânase (xilânase, EC 3.2.1.8): 0,25 g de xilano em 100 mL de tampão acetato.
- Amido solúvel - para atividade de  $\alpha$ -amilase (amilase): 0,5 g em 100 mL de tampão acetato
- Carboximetil celulose - para a atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase (carboximetil celulase, CMCase, EC 3.2.1.4): 1 g em 100 mL de tampão acetato
- Celulose microcristalina - para a atividade de exo-1,4- $\beta$ -glucanase (FPase, EC 3.2.1.91): 0,5 g em 100 mL de tampão acetato
- Pectina - para a atividade de pectinase: 0,24 g em 100 mL de tampão acetato + 0,12 M NaCl + 6mM EDTA

A reação ocorreu com a adição de 1980  $\mu$ L de substrato mais 20  $\mu$ L de amostra. Colocou-se a solução para incubar por 10 min. a 37 °C e em seguida, para paralisar a reação, os tubos permaneceram por 5 min. a 100 °C. Retirou-se 1,5 mL do *mix* de reação e colocou-se em eppendorf para ser centrifugado, a 14.000 rpm, por 2 minutos. Após a centrifugação, pipetou-se 1 mL do sobrenadante o qual foi transferido para tubo de ensaio. Adicionou-se 1 mL da solução D (item 5.8.3.1) e incubou-se a solução 100 °C por 20 minutos. Ao término da incubação e resfriamento, adicionou-se 1 mL de solução C (item 5.8.3.1); a mistura foi homogeneizada por 15 segundos em vórtex e acrescentou-se 20 mL de água destilada. Efetuou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 520 nm.

#### 5.8.3.4. Determinação da atividade de enzimas hidrolíticas

A equação obtida para determinação da atividade de enzimas hidrolíticas com base na reta padrão foi a seguinte:

- $C_{\mu\text{g.mL}^{-1}} = [(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) - 0,0049] / 0,002 \times \text{fator de diluição}$
- $\text{UI.mL}^{-1} = (C_{\mu\text{g/mL}} - \text{valor intrínseco}) / \text{peso molecular do substrato} / \text{minutos de incubação (10 min.)}$

### 5.9. Determinação da atividade de enzimas oxidativas e hidrolíticas de *L. edodes* em serragem de eucalipto durante crescimento em bioreator

#### 5.9.1. Preparo do inóculo das linhagens de *L. edodes*

O inóculo líquido foi preparado utilizando-se 500 mL de SE para cada tratamento, de acordo com o método descrito em 5.6.1, e colocado para incubar em agitador com rotação orbital (150 rpm) e temperatura controlada à 25 °C.

#### 5.9.2. Instalação do experimento em bioreator

Preparou-se o substrato SE conforme protocolo (item 5.4) na quantidade de 6,396 Kg para cada tratamento. Depois de devidamente misturado, o substrato foi transferido para um reator do tipo batelada giratório, conhecido como *rotatory drum reactor* (RDR) (Figura 1), com volume de 20 L, e autoclavado a 120 °C (1 atm) por 1h e 30 min. Após o resfriamento, cada reator recebeu 300 mL de inóculo de cada linhagem (item

5.9.1). Para cada linhagem, foram instalados experimentos em triplicata, num delineamento inteiramente casualizado.

A incubação foi conduzida nos reatores, os quais foram programados para realizarem 4 rotações.dia<sup>-1</sup>. Cada movimentação foi de 1/6 do reator (total de 24 movimentações dia<sup>-1</sup>) com velocidade de 5,5 cm s<sup>-1</sup>. A fase gasosa foi monitorada por analisador paramagnético de oxigênio e por um detector a infra-vermelho de dióxido de carbono (Modelo Beckman 860, Reino Unido). A concentração de CO<sub>2</sub> foi mantida constante a 3% e a temperatura a 25 °C.

Amostras de 25 g, de cada reator, foram retiradas aos 8, 11, 14, 17 e 20 dias após a incubação. A extração enzimática foi realizada da mesma forma como descrita para o experimento em sistema estacionário (item 5.8.1).



**Figura 1.** Bioreator instalado com o experimento de atividade enzimática do *L. edodes* durante crescimento em serragem de eucalipto.



### **5.9.3. Análise da atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* em bioreator**

As análises de lacase, MnP e LiP foram realizadas conforme descrito em 5.6.3.

### **5.9.4. Análises das enzimas hidrolíticas em linhagens de *L. edodes* em bioreator**

As análises das enzimas hidrolíticas foram efetuadas conforme descrito em 5.8.3.

## **5.10. Análise Estatística**

A metodologia estatística utilizada para avaliar os experimentos seguiu um modelo de regressão não linear. Para a comparação dos parâmetros foi feita a análise de variância não paramétrica com aplicação do teste de Kruskal-Wallis. Nos casos em que houve diferença significativa foi aplicado o teste de Student-Newman-Kills (SNK) ao nível de 5 % de significância.

Os resultados estatísticos encontrados foram apresentados em forma tabelas e colocados como apêndice.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Determinação da atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* durante crescimento em meio de cultura líquido

Nos ensaios realizados, detectou-se atividade da MnP e lacase em cultura líquida de *L. edodes*. No entanto, para o mesmo experimento, a enzima LiP não apresentou atividade detectável.

Estes resultados concordam com os observados por Kaal et al. (1995); Orth et al. (1993); Masaphy e Levanon (1992); Waldner et al. (1988); Leatham & Stahmann (1981)

Entretanto, Mishra e Leatham (1990) encontraram atividade positiva da LiP em proteínas fracionadas de fluidos extracelulares de *L. edodes*.

Embora não tenha sido detectada atividade de LiP no presente experimento, não se pode descartar completamente a sua ausência, pois são vários os fatores que contribuem para a ativação do sistema lignocelulolítico como condições nutricionais e culturais, substrato metabolizável, altos níveis de oxigênio, limite de nitrogênio e várias outras condições de cultivo (KIRK e FARRELL, 1987; BUSWELL, 1991).

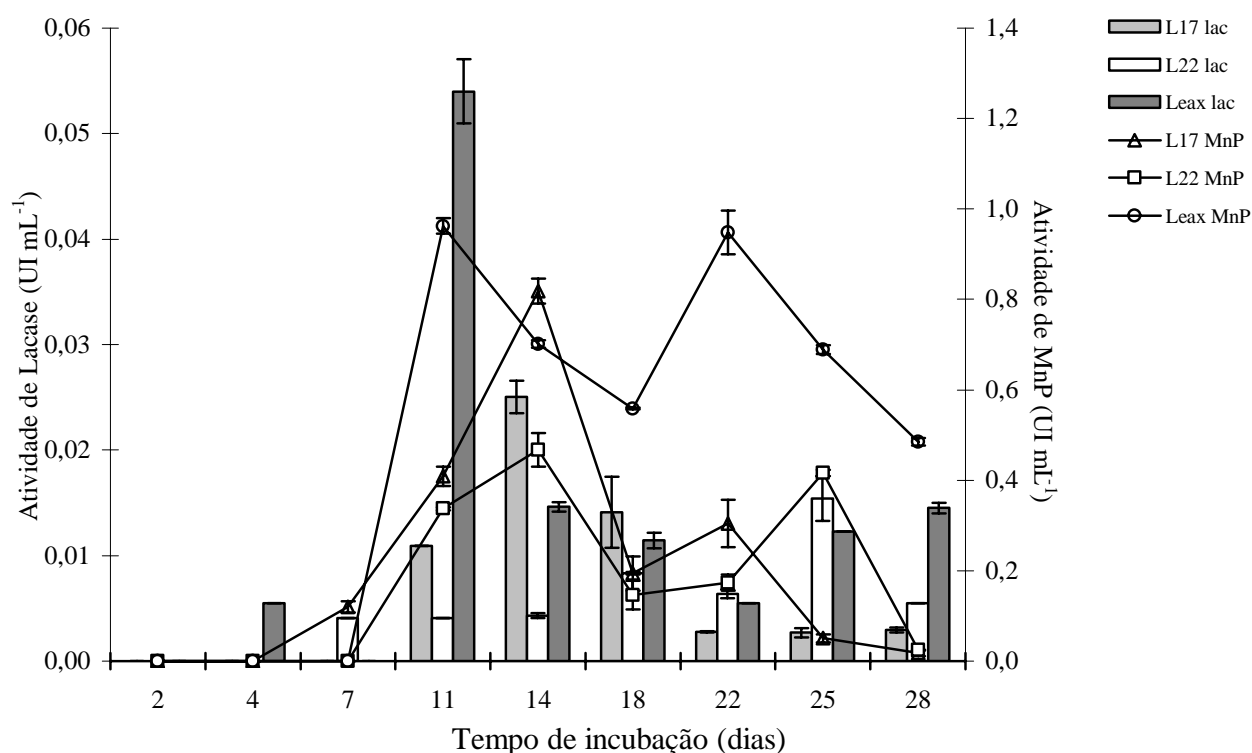
Além disso, os tipos e quantidades de enzimas são também definidos pelo genótipo específico do fungo associado à adaptação a um determinado substrato de crescimento (SHEARER, 1995).

### **6.1.1. Atividade de enzimas oxidativas em meio de cultura líquido à base de serragem de eucalipto**

As linhagens Leax e L22 apresentaram dois pontos máximos de produção de MnP, sendo um deles coincidentes com a atividade máxima de lacase (Figura 2) (Tabela 2, em anexo). Enquanto L17 apresentou apenas um ponto de atividade máxima coincidente para as duas enzimas.

Verificou-se que apenas a partir do 11º dia as linhagens produziram maior atividade lacase e MnP. Até o final de incubação a atividade das duas enzimas apresentou diferença significativa de atividade, exceto no 18º dia entre Leax e L17 na atividade lacásica e entre L17 e L22 na atividade de MnP. No 28º dia não ocorreu diferença estatística de atividade, tanto de lacase e quanto de MnP, entre L17 e L22.

Em serragem, as linhagens estudadas mostraram as atividades enzimáticas concentradas, principalmente, no tempo médio do período de incubação. No final da incubação, no 28º dia, ocorreu a diminuição da atividade da lacase e da MnP. Exceto para Leax que terminou com atividade de lacase com  $0,015 \text{ UI mL}^{-1}$  significativamente maior que L17 e L22.



**Figura 2.** Atividades de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em meio de cultura líquido à base de serragem de eucalipto. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

### 6.1.2. Atividade de enzimas oxidativas em meio de cultura líquido à base de bagaço de cana-de-açúcar

No meio líquido BC (Figura 3) (Tabela 3, em anexo), ao contrário de SE as linhagens apresentaram atividade lacásica durante os primeiros dias de incubação

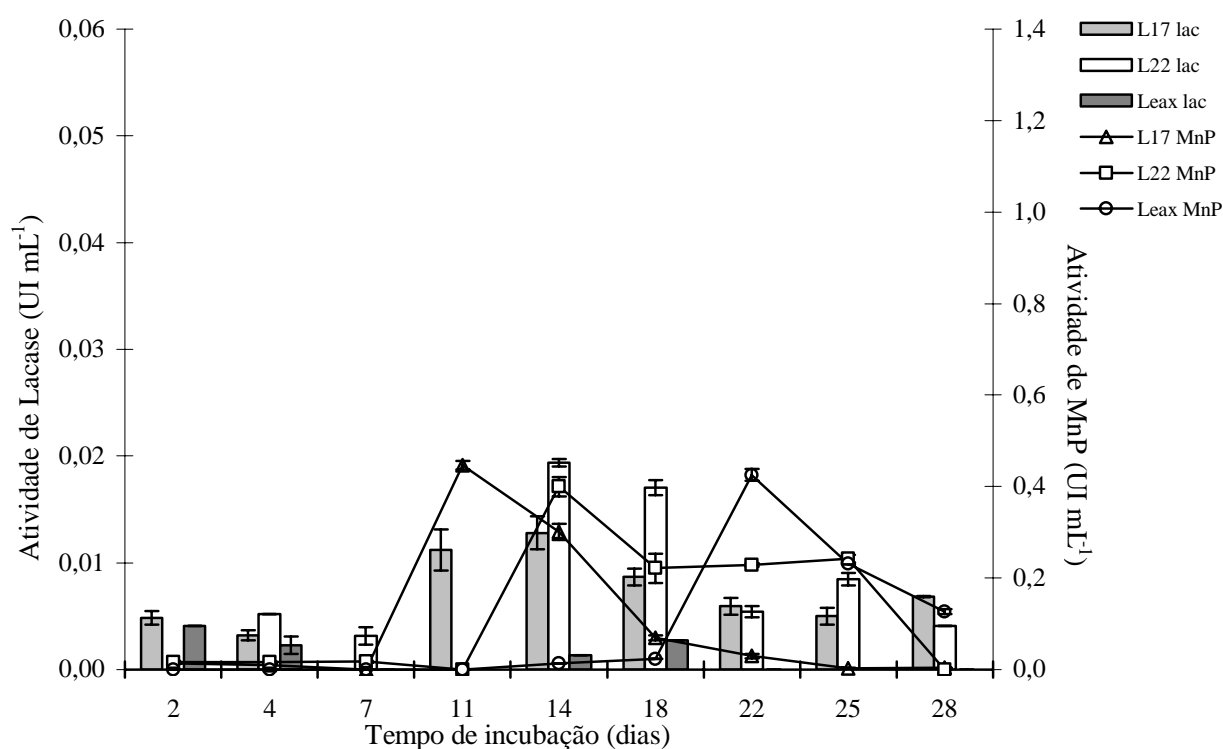
Leax apresentou baixa atividade de lacase durante a incubação e L22 apresentou atividade máxima 14<sup>o</sup> dia e 18<sup>o</sup> dia sem diferença significativa e L17 no 11<sup>o</sup> (0,011 UI mL<sup>-1</sup>) e 14<sup>o</sup> dia (0,013 UI mL<sup>-1</sup>) também sem diferença significativa, entre eles.

Durante os primeiros dias de incubação em BC, houve baixa atividade de MnP para L22 e L17, sem diferença significativa e Leax não apresentou atividade. L17 teve sua atividade máxima no 11<sup>o</sup> dia de MnP (0,447 UI mL<sup>-1</sup>) correspondente à atividade

máxima de lacase no 11°. Após o 11° dia a atividade de MnP diminuiu e permaneceu até final da incubação com baixa atividade.

A linhagem L22 também atingiu atividade máxima para MnP no 14° dia (0,400 UI mL<sup>-1</sup>) o que acompanhou a atividade máxima observada para lacase. Após esse ponto, a atividade de MnP diminuiu até o final de incubação e terminou sem atividade.

Leax apresentou atividade de MnP a partir do 14° dia chegando a um valor máximo de atividade no 22° dia (0,425 UI mL<sup>-1</sup>) seguido de diminuição até o final da incubação, porém com valor significativamente superior à L17 e L22 no 28° dia.



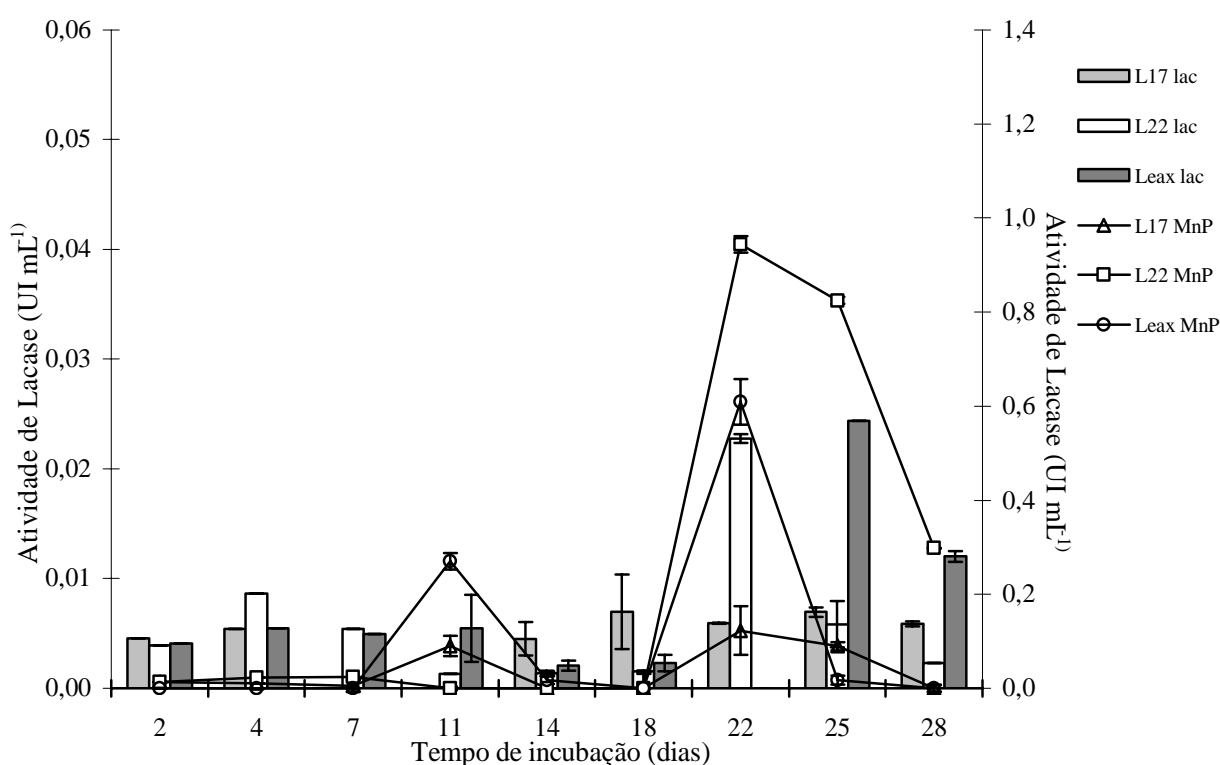
**Figura 3.** Atividades de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em meio de cultura líquido à base de bagaço de cana-de-açúcar. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

### **6.1.3. Atividade de enzimas oxidativas em meio de cultura líquido à base de casca de arroz**

A atividade lacásica não apresentou diferença estatística entre as linhagens durante os primeiros dias de incubação no meio de cultura líquido CA (Figura 4) (Tabela 4, em anexo). L22 apresentou atividade máxima de lacase no 22º dia (0,023 UI mL<sup>-1</sup>) e Leax no 25º dia (0,024 UI mL<sup>-1</sup>).

As linhagens apresentaram atividade máxima de MnP no dia 22º, sendo que L22 atingiu a maior atividade (0,944 UI mL<sup>-1</sup>), seguido de Leax (0,6093 UI mL<sup>-1</sup>) e depois L17 (0,123 UI mL<sup>-1</sup>). Todas as linhagens tiveram diminuição de atividade após o 22º dia

Em L22 a atividade máxima de lacase e MnP foram correspondentes, ao contrário das demais testadas. Apenas L22 apresentou atividade de MnP no final da incubação (0,298 UI mL<sup>-1</sup>)



**Figura 4.** Atividades de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em meio de cultura líquido à base de casca de arroz. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

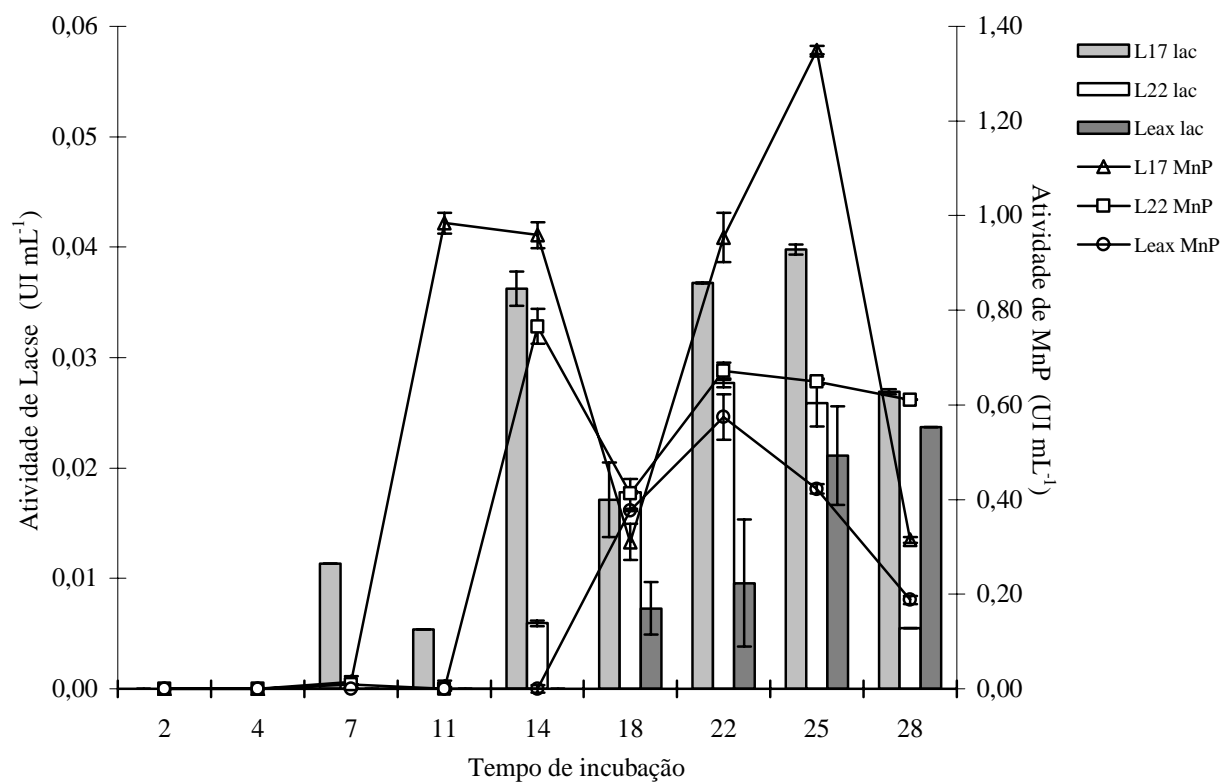
#### 6.1.4. Atividade de enzimas oxidativas em meio de cultura líquido à base de bagaço de mandioca

Neste meio de cultura observou-se as maiores atividades das duas enzimas estudadas. Verificou-se que para L17 a partir do 7º dia iniciou-se a produção de lacase e MnP (Figura 5) (Tabela 5, em anexo). L22 iniciou a atividade lacásica no 14º dia e Leax no 18º dia.

A partir do 14º dia, em L17, a atividade de lacase foi constantemente alta sem diferenças significativas, exceto nos dias 18 e 28 em que houve diminuição significativa de atividade. L17 apresentou as maiores atividades de lacase em comparação com as demais linhagens.

A atividade de MnP teve sua atividade máxima para L17 no dia 25, enquanto L22 no 14° dia e Leax no 22° dia.

Todas as linhagens mostraram diminuição de atividade da MnP no final da incubação, exceto L22 que apresentou atividade constante do 22° ao 28° dia, finalizando o período de incubação com atividade superior às demais linhagens.



**Figura 5.** Atividades de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em meio de cultura líquido à base de bagaço de mandioca. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).



Considerando os diferentes tipos de meio de cultura líquido, verificou-se que as atividades enzimáticas apresentaram níveis diferenciados dependendo da linhagem analisada. No meio líquido SE a atividade de lacase e MnP foi mais expressiva em Leax; enquanto que no meio BC tanto lacase quanto MnP foram mais ativas em L22. No meio CA, L22 e Leax tiveram a melhor atividade de lacase e L22 foi a linhagem que teve mais atividade de MnP, já em BM a atividade de lacase e MnP foi melhor expressa por L17.

Todas as linhagens apresentaram atividades de MnP superiores às de lacase durante praticamente todo o período de incubação.

Hatvani e Mécs (2001) quando pesquisaram a atividade enzimática em *L. edodes* crescendo em resíduo de malte, sob diferentes formas de incubação, encontraram no meio líquido, baixos valores de lacase em relação à MnP. A maior atividade de lacase foi ao 30° dia de incubação com aproximadamente 100 U.L<sup>-1</sup> e para MnP também ao 30° dia de incubação com aproximadamente 1400 U L<sup>-1</sup>.

Resultados semelhantes foram reportados por Kaal et al. (1995) ao analisarem a atividade de enzimas lignolíticas de fungos da podridão branca crescendo em meio líquido. Os autores concluíram que o *L. edodes* além de produzir maior atividade de MnP em relação a lacase, foi também o que superou os outros fungos.

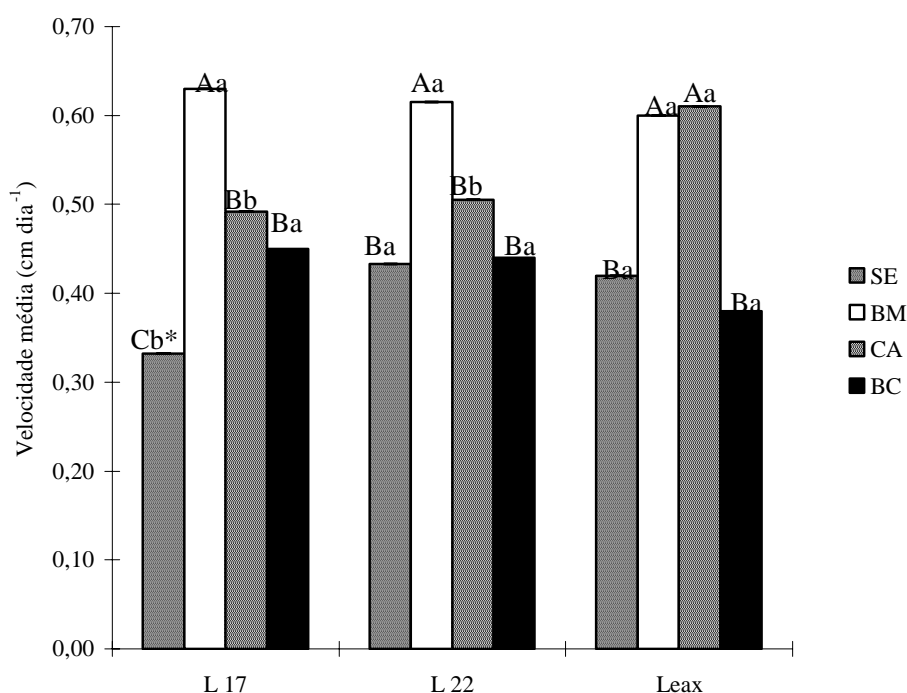
Quando comparado com outras formas de incubação, a cultura em meio líquido apresenta valores de atividade enzimática normalmente baixos. Neste tipo de meio, algumas enzimas são principalmente encontradas em atividade na parede celular do micélio, enquanto que em substrato sólido, se encontram mais no substrato de crescimento e em menor atividade na parede celular (IWASHITA, 1998; HASHIMOTO et al., 1999).

Além disso, o efeito negativo do processo de agitação (estresse mecânico) tem sido documentado como inibidor da produção de peroxidases (BONNARME et al., 1993; VENKATADRI e IRVINE, 1990) e lacases (YOSHIAMA e ITO, 1994; HESS et al., 2002) em fungos.

## **6.2. Velocidade média de crescimento miceliano das linhagens de *L. edodes* em substratos sólidos**

Verificou-se que as linhagens apresentaram diferença estatística na velocidade média de crescimento miceliano (Figura 6) dentro dos diferentes substratos, exceto para BM e BC em que as velocidades médias não tiveram diferença estatística entre as linhagens. Em SE, observou-se velocidades médias inferiores a L17 em comparação às outras duas linhagens. No substrato CA, Leax ( $0,61 \text{ cm dia}^{-1}$ ) apresentou velocidade média estatisticamente superior em relação à L17 e L22.

Para o efeito dos substratos dentro de cada linhagem, verificou-se que em L17 o substrato BM propiciou velocidade média significativamente maior em relação aos demais substratos, enquanto CA e BC não apresentaram diferença estatística e foram superiores a SE. Na linhagem L22, também o substrato BM teve velocidade significativamente superior aos demais os substratos, os quais não apresentaram diferença estatística entre eles. Em Leax os substratos BM e CA tiveram velocidades médias de crescimento estatisticamente superiores à SE e BC.



**Figura 6.** Velocidade média de L17, L22 e Leax incubadas em tubo de ensaio nos diversos substratos.

\*Letras maiúsculas: Para cada linhagem, substratos representados pela média seguida de mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Letras minúsculas: Para cada substrato, linhagens representadas pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições.

L17 teve uma baixa velocidade média de crescimento miceliano no substrato SE ( $0,33 \text{ cm dia}^{-1}$ ), em comparação com a velocidade nos demais substratos. A baixa velocidade média de L17 provavelmente foi devida a alta porcentagem de holocelulose e lignina de 66,7 e 17,3%, respectivamente, conforme mostra a Tabela 1 (item 5.5)

Leax colonizou SE e BC com baixa velocidade média de crescimento miceliano, sem diferença significativa entre eles ( $0,42 \text{ cm dia}^{-1}$  e  $0,38 \text{ cm dia}^{-1}$ , respectivamente). No substrato BC a quantidade de lignina (Tabela 1, item 5.5) não chega a ser tão grande quanto em serragem porém o teor de holocelulose (72,1 %) é maior que em serragem.

Possivelmente, ocorreu uma sensível resposta de cada linhagem quanto aos teores de fibras existentes no substratos. Com foi observado em L22 não houve diferença significativa entre os substratos SE, CA e BC.

Em pesquisa realizada sobre crescimento miceliano, em tubo de ensaio, de duas linhagens de *L. edodes* inoculadas em palha de trigo, sabugo de milho e serragem de carvalho, Philippoussis et al. (2003) verificaram que as duas linhagens exibiram taxas de crescimento superiores em serragem de carvalho, enquanto que em sabugo de milho foram as menores.

No entanto, Beux e Soccol (1996), verificaram que o bagaço de mandioca e farelo de milho foram excelentes substratos para a colonização do *L. edodes* comparando-se com farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, casca de café e casca de arroz.

Segundo Leatham (1986), o micélio *L. edodes* quando inoculado em substratos artificialmente preparados, degrada preferencialmente os sacarídeos e os polissacarídeos, sendo considerado como um fungo moderadamente lignocelulósico. Entre os monossacarídeos a preferência é pela a glicose; e entre os polissacarídeos pelo amido (BEUX e SOCCOL, 1996). O tipo de substrato parece ter influência na resposta do aumento do nível de aproveitamento dos nutrientes existentes (ROYSE, 2004)

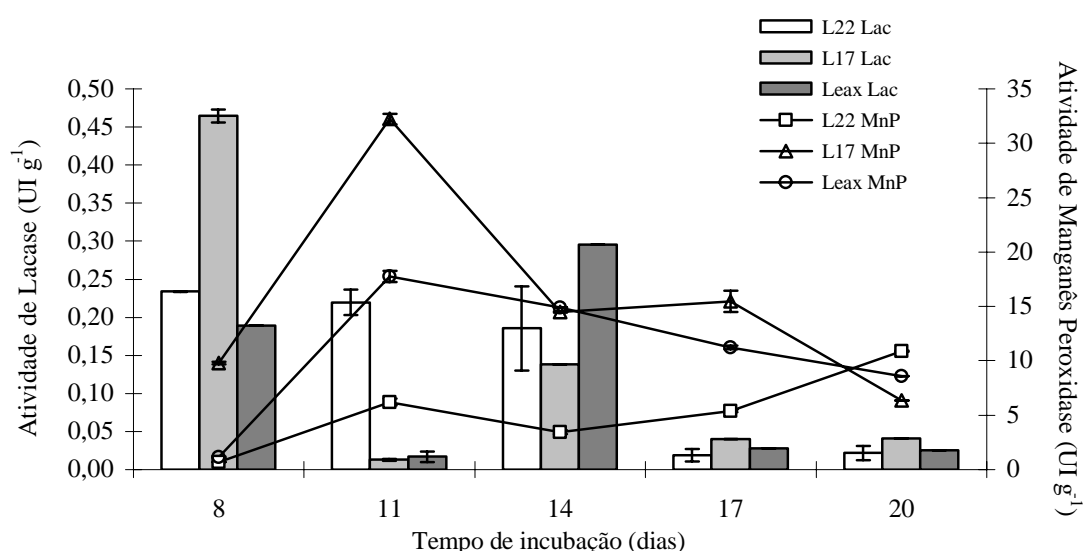
### **6.3. Determinação da atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* durante crescimento em sistema estacionário**

Nas análises realizadas, detectou-se atividade da MnP e lacase para as linhagens estudadas nos diferentes substratos em sistema estacionário. No entanto, a enzima LiP não apresentou atividade detectável.

### 6.3.1. Atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* em serragem de eucalipto

As linhagens expressaram atividade de lacase mais acentuadas no 8° e 14° dia (Figura 7) (Tabela 6, anexo). Após o 14° dia, a atividade diminuiu até o final da incubação em todas as linhagens sem diferença significativa. A maior atividade foi observada em L17 no 8° dia de incubação (0,465 UI g<sup>-1</sup>).

A MnP apresentou atividade máxima tanto para L17 quanto para Leax no 11° dia (32,229 UI g<sup>-1</sup> e 17,756 UI g<sup>-1</sup>, respectivamente). Após este período ocorreu diminuição significativa em sua atividade, enquanto que L22 aumentou significativamente a atividade de MnP a partir do 14° dia até o final da incubação (10,862 UI g<sup>-1</sup>).



**Figura 7.** Atividade de Lacase e MnP de L17, L22 e Leax em serragem de eucalipto incubados em sistema estacionário. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

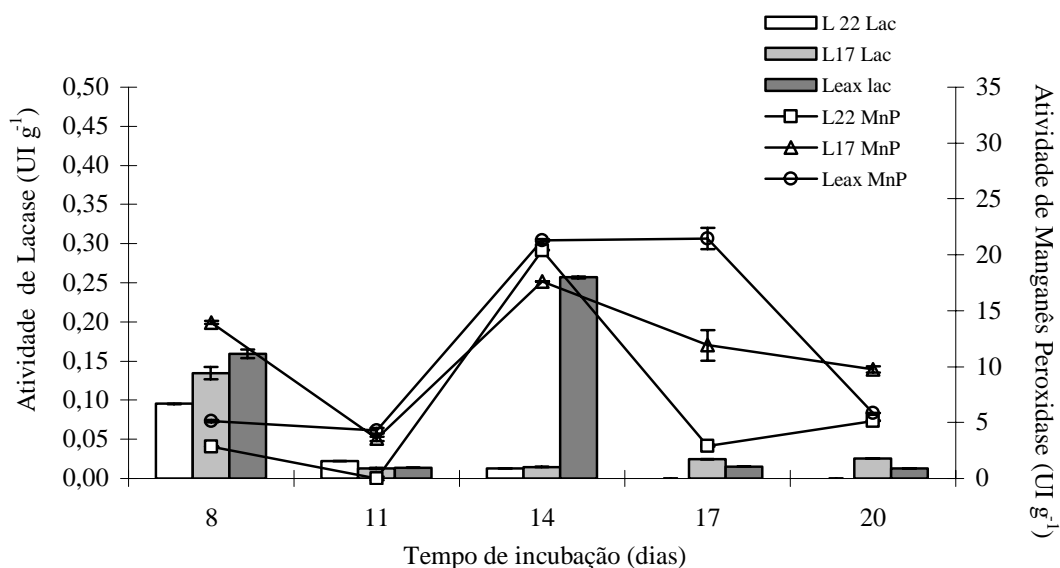
### 6.3.2. Atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* em bagaço de cana-de-açúcar

As linhagens apresentaram atividade lacásica distintas no 8° dia de incubação, sendo que Leax atingiu o maior valor de atividade (Figura 8) (Tabela 7, em anexo). Após esse período, ocorreu drástica queda na atividade desta enzima em todas as linhagens,

até o fim da incubação, com exceção de Leax que apresentou sua atividade máxima no 14° dia ( $0,2568 \text{ UI.g}^{-1}$ ), seguido de diminuição até o final da incubação.

A atividade de MnP diminuiu após o 8° dia de incubação, no entanto no 14° dia voltou a aumentar atingindo atividade máxima, para as 3 linhagens. Porém Leax e L22 não apresentaram diferença significativa nesse ponto de incubação. Leax manteve a atividade até o 17° e depois diminuiu no final da incubação, enquanto L22 diminuiu fortemente após o 14° dia e chegou no 20° dia de incubação sem diferença significativa com Leax.

L17 apresentou leve diminuição após o 14° dia e chegou no 20° dia com atividade significativamente maior que as outras linhagens.



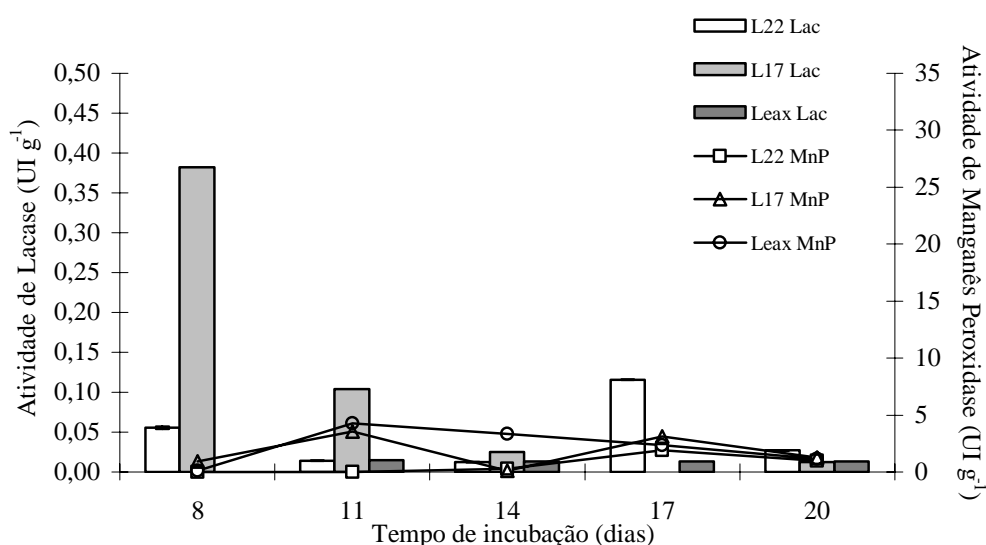
**Figura 8.** Atividade de Lacase e MnP de L17, L22 e Leax em bagaço de cana-de-açúcar incubados em sistema estacionário. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

### 6.3.3. Atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* em casca de arroz

A linhagem L17 apresentou a maior atividade de lacase no 8° dia ( $0,382 \text{ UI g}^{-1}$ ) em comparação com as demais. Após este período diminuiu fortemente até o final da incubação (Figura 9) (Tabela 8, em anexo). Leax iniciou a atividade a partir do 11° dia

e permaneceu sem alteração até o final da incubação. L22 teve atividade máxima no 17º dia (0,115 UI g<sup>-1</sup>) e diminuiu no 20º dia.

Em CA, as linhagens não apresentaram atividades expressivas de MnP. A atividade máxima detectada para Leax foi no 11º dia e L17 no 11º e 17º dia, sem diferença estatística entre eles.



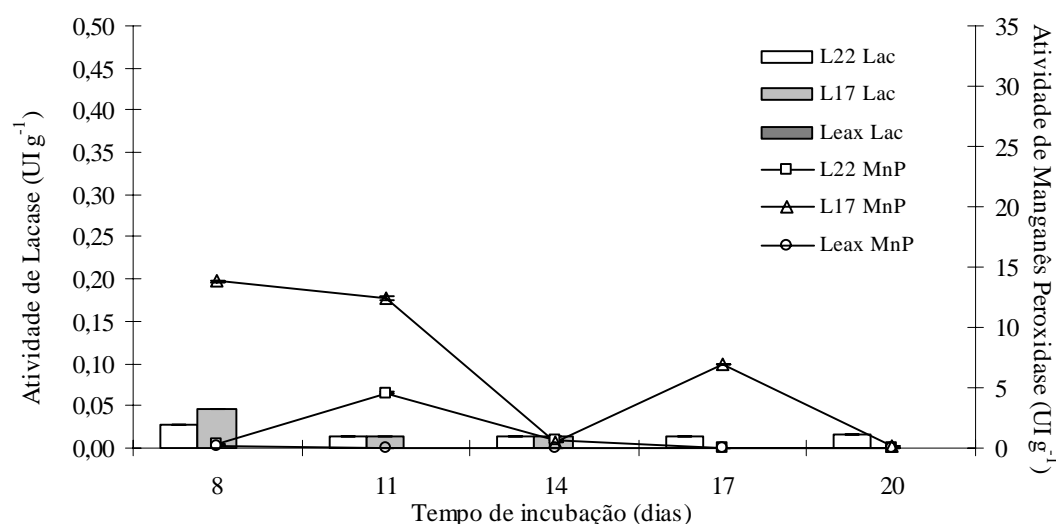
**Figura 9.** Atividade de Lacase e MnP de L17, L22 e Leax em casca de arroz incubados em sistema estacionário. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

#### 6.3.4. Atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* em bagaço de mandioca

As linhagens L17 e L22 apresentaram baixa atividade de lacase em substrato BM, enquanto Leax não apresentou atividade lacásica para este substrato (Figura 10) (Tabela 9, em anexo).

A atividade de MnP em L17 teve no 8º dia de incubação a atividade máxima e até o 11º dia permaneceu sem diferença significativa. No 14º dia teve diminuição de atividade e no 17º dia voltou apresentar uma atividade maior. L17 terminou a incubação com baixa atividade de MnP. L22 apresentou atividade apenas no início da incubação com atividade máxima no 11º dia, após esse período não apresentou atividade de MnP. Em Leax a

atividade de MnP foi detectada apenas no 8° e 17° dia, sendo que nos demais pontos de coleta não detectou-se atividade.



**Figura 10.** Atividade de Lacase e MnP de L17, L22 e Leax em bagaço de mandioca incubados em sistema estacionário. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

Verificando-se as atividades enzimáticas das linhagens, nos diferentes substratos, observou-se que em SE houve de um modo geral, do início ao fim da incubação, atividade enzimática com valores superiores em comparação com demais substratos. Em BC ocorreu uma atividade considerável de lacase no início da incubação e de MnP no tempo médio de incubação, superior à encontrada em CA e BM. Nestes dois últimos substratos, a atividade de lacase e de MnP foram bem reduzidas, exceto no 8° dia de incubação para L17, quando a atividade de lacase apresentou atividade máxima.

Embora em BM e em CA não tenham ocorrido atividades expressivas de lacase e MnP, foi exatamente nestes substratos onde a velocidade média de crescimento miceliano alcançou melhor resultado, exceto onde não ocorreram diferenças significativas, em L17 e L22. A baixa velocidade média de crescimento miceliano em SE e BC associada a uma maior atividade de enzimas oxidativas advém, provavelmente, da dificuldade em se degradar os compostos e fibras presentes em SE e em BC.



Segundo Kadimaliev (2003), as mudanças na atividade lignolítica e biosíntese de lacase e peroxidase pelos fungos, durante o cultivo em estado sólido, dependem do tipo de substrato usado.

Neste sentido, pesquisas realizadas com serragem de videira e serragem de pinheiro como substratos, indicaram que em serragem de videira a degradação da lignina foi muito maior que em serragem de pinheiro por *Panus (Lentinula) tigrinus*. Segundo o autor Kadimaliev (2003), a quantidade de substâncias que restringem o seu crescimento miceliano (por exemplo, resinas) e a existência de uma estrutura supramolecular mais intrincada, podem ter relação com este resultado.

A lacase e a MnP não foram as principais enzimas envolvidas no crescimento miceliano em BM e em CA. Conforme verificou Leatham (1985), compostos como polissacarídeos celulósicos e não celulósicos, existentes na parede celular de palhas, são considerados geralmente mais disponíveis às enzimas hidrolíticas do que em substratos mais ricos em ligninas.

Verificou-se que as linhagens tiveram respostas diferentes quando inoculadas em BM meio líquido e sistema estacionário (substrato sólido). Neste experimento, BM não apresentou a mesma boa *performance* de lacase e MnP, comparado ao observado em meio líquido.

Provavelmente, no substrato sólido a resistência das fibras de BC e SE provoquem um estímulo maior das enzimas oxidativas. Segundo Shearer (1995) os tipos e quantidades de enzimas, que podem ser produzidas para a transformação de alguns constituintes lignosos em formas absorvíveis, são atualmente definidos pelo genótipo específico do fungo associado à adaptação a um determinado substrato de crescimento.

## **6.4. Determinação da atividade de enzimas hidrolíticas de *L. edodes* durante crescimento em sistema estacionário**

### **6.4.1. Atividade de enzimas hidrolíticas de *L. edodes* em serragem de eucalipto**

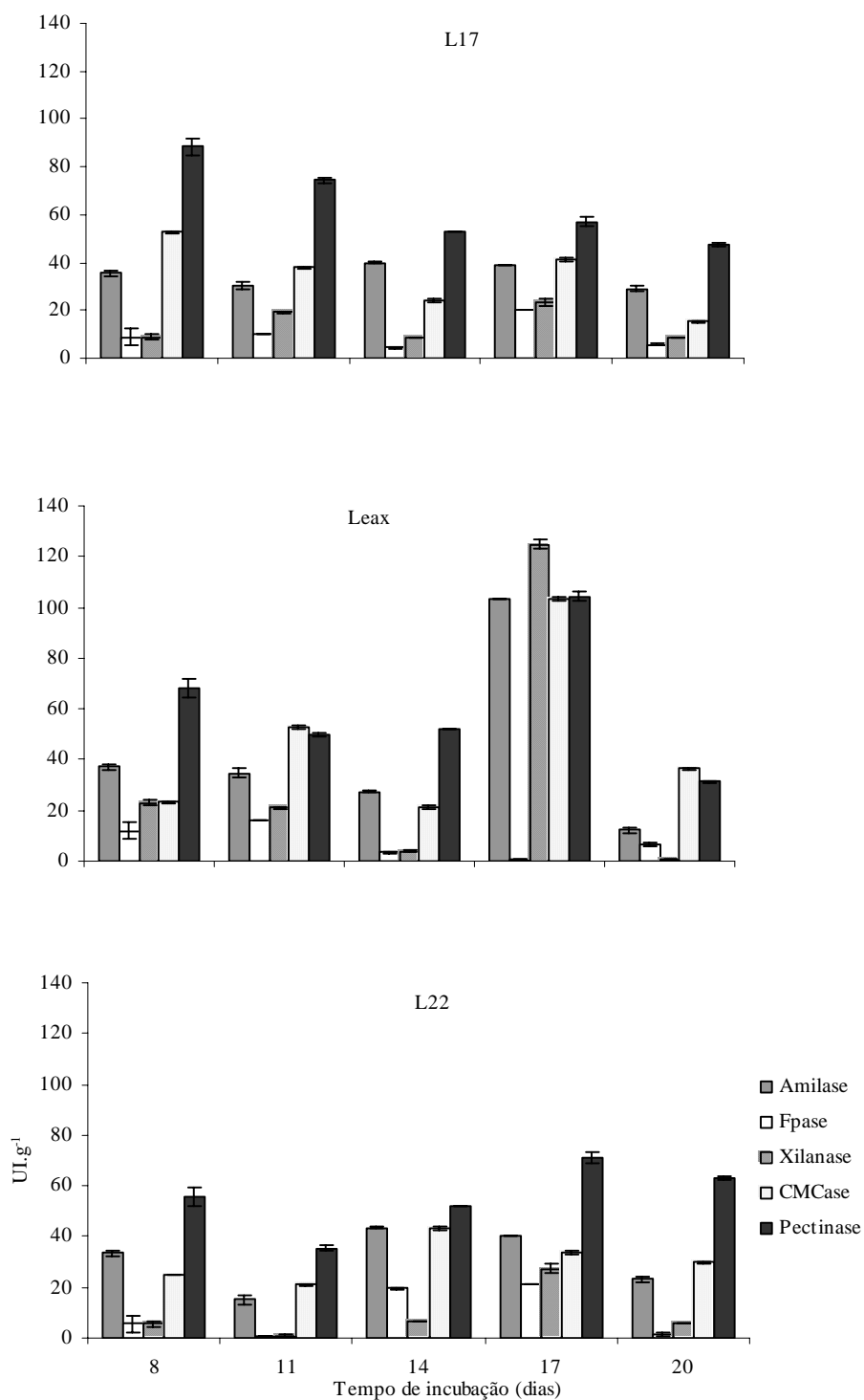
A atividade de amilase ( $\alpha$ -amilase), no 8° dia de incubação, não apresentou diferença estatística entre as linhagens. No 17° dia, Leax apresentou máxima atividade em relação a L17 e L22 (Figura 11) (Tabela 10, em anexo).

As linhagens não apresentaram diferença estatística para a atividade enzimática de FPase (exo-1,4- $\beta$ -glucanase) até o 14° de incubação onde L22 apresentou maior atividade. No 17° dia Leax apresentou atividade significativamente menor em comparação a L17 e L22 que tiveram atividade estatisticamente iguais. No 20° dia, Leax teve atividade estatisticamente igual a L17.

Xilanase (endo-1,4- $\beta$ -xilanase) apresentou atividade estatisticamente distinta entre as linhagens durante a incubação, com excessão do 11° dia entre L17 e Leax; e do 17° dia entre L17 e L22. Todas as linhagens expressaram atividade máxima no 17° dia de incubação, com o maior índice de atividade apresentado por Leax. No 20° dia de incubação as linhagens apresentaram significativa diminuição de atividade, sendo mais acentuada para Leax.

A atividade de CMCCase (carboximetil celulase), entre as linhagens, foi estatisticamente diferente durante todo o período de incubação, com exceção para o 8° dia entre Leax e L22, e no 17° dia entre L17 e Leax. Leax apresentou atividade máxima de CMCCase no 17° dia em comparação com as demais linhagens.

Durante a incubação as linhagens apresentaram uma atividade de pectinase estatisticamente diferente durante a incubação, exceto no 14° em que as linhagens apresentaram atividades sem diferença significativa entre si. L17 iniciou com a máxima atividade de pectinase e após isso diminuiu levemente, enquanto Leax teve a máxima atividade no dia 17° dia.



**Figura 11.** Atividades de enzimas hidrolíticas de L17, L22 e Leax em serragem de eucalipto durante crescimento em sistema estacionário. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

#### **6.4.2. Atividade de enzimas hidrolíticas de *L. edodes* em bagaço de cana-de-açúcar**

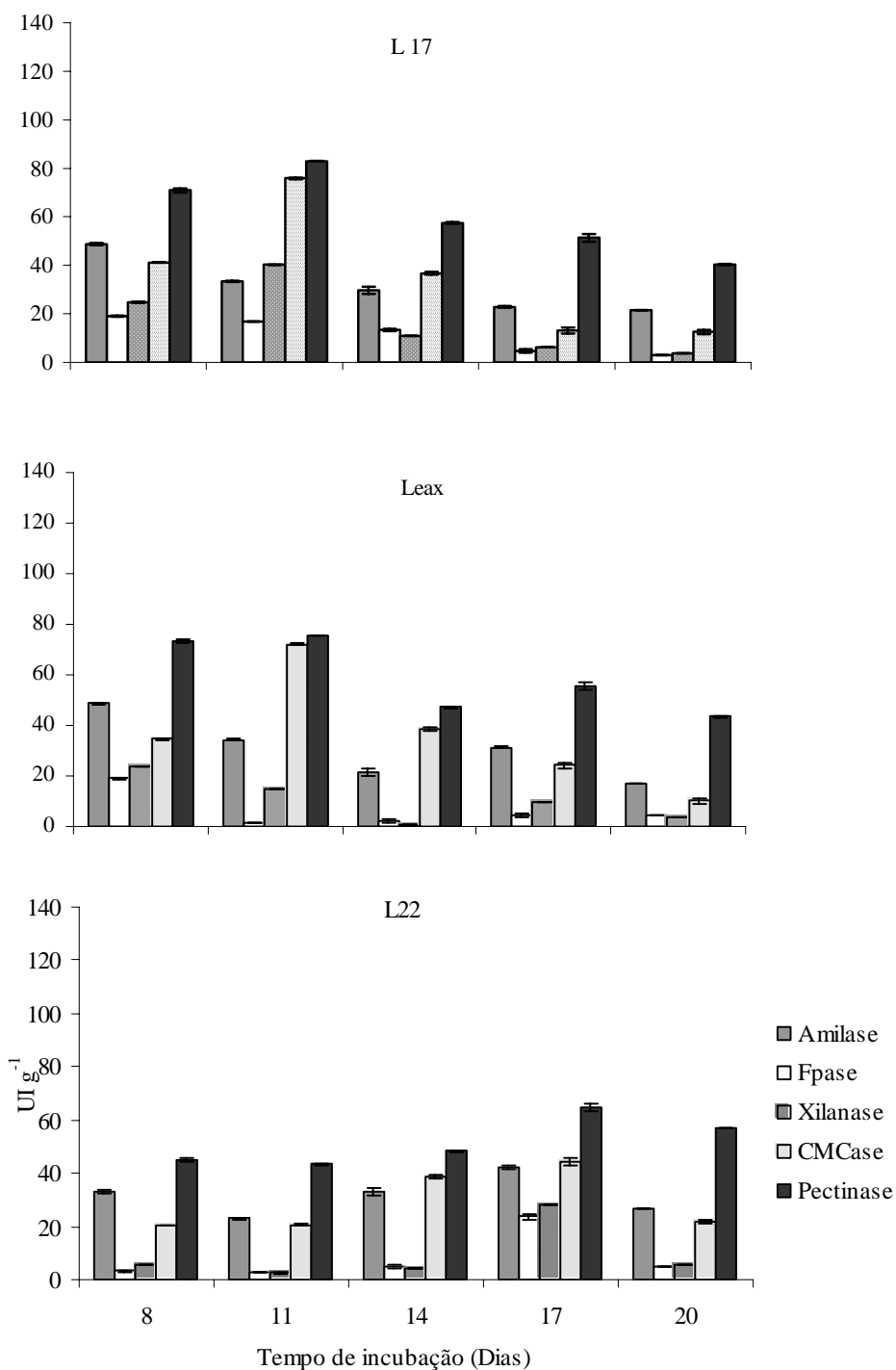
As maiores atividades de amilase em BC (Figura 12) (Tabela 11, em anexo) para L17 e Leax ocorreram no início da incubação no 8º dia, sem diferença estatística entre elas. A linhagem L22 teve maior atividade no 17º dia. As linhagens chegaram ao 20º dia com atividade sem diferença significativa.

Durante os primeiros dias de incubação, a atividade de Fpase foi significativamente maior em L17 do que nas demais linhagens, apenas no 8º dia de incubação verificou-se que Leax mostrou atividade estatisticamente igual a L17. Para a linhagem L22 a atividade máxima ocorreu no 17º dia e foi significativamente maior em relação a L17 e Leax, as quais não apresentaram diferença. As linhagens terminaram o período de incubação com baixa atividade de FPase e sem diferença estatística.

O nível de atividade de xilanase no 8º dia de incubação foi estatisticamente igual entre L17 e Leax e superior à L22 que permaneceu com baixa atividade até 14º dia e atingiu seu nível máximo no 17º dia de incubação, sendo estatisticamente superior às atividades de xilanase em L17 e Leax. A linhagem L17 apresentou atividade máxima no 11º dia e estatisticamente superior à Leax e L22. As linhagens terminaram a incubação com atividade de xilanase estatisticamente iguais.

As linhagens L17 e Leax mostraram atividade máxima de CMCase no 11º dia. Tanto L17 quanto Leax após o 11º dia tiveram uma ligeira diminuição da atividade até o final da incubação. L22 apresentou atividade máxima de CMCase no 17º dia de incubação e significativamente superior à L17 e Leax.

A atividade da pectinase entre L17 e Leax, no 8º dia de incubação, não apresentou diferença significativa entre si, porém foi significativamente maior que L22. Tanto L17 quanto Leax apresentam no 8º e 11º dia suas maiores atividades, enquanto L22 apresentou no 17º dia.



**Figura 12.** Atividades de enzimas hidrolíticas de L17, L22 e Leax em bagaço de cana-de-açúcar durante crescimento em sistema estacionário. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

### 6.4.3. Atividade de enzimas hidrolíticas de *L. edodes* em casca de arroz

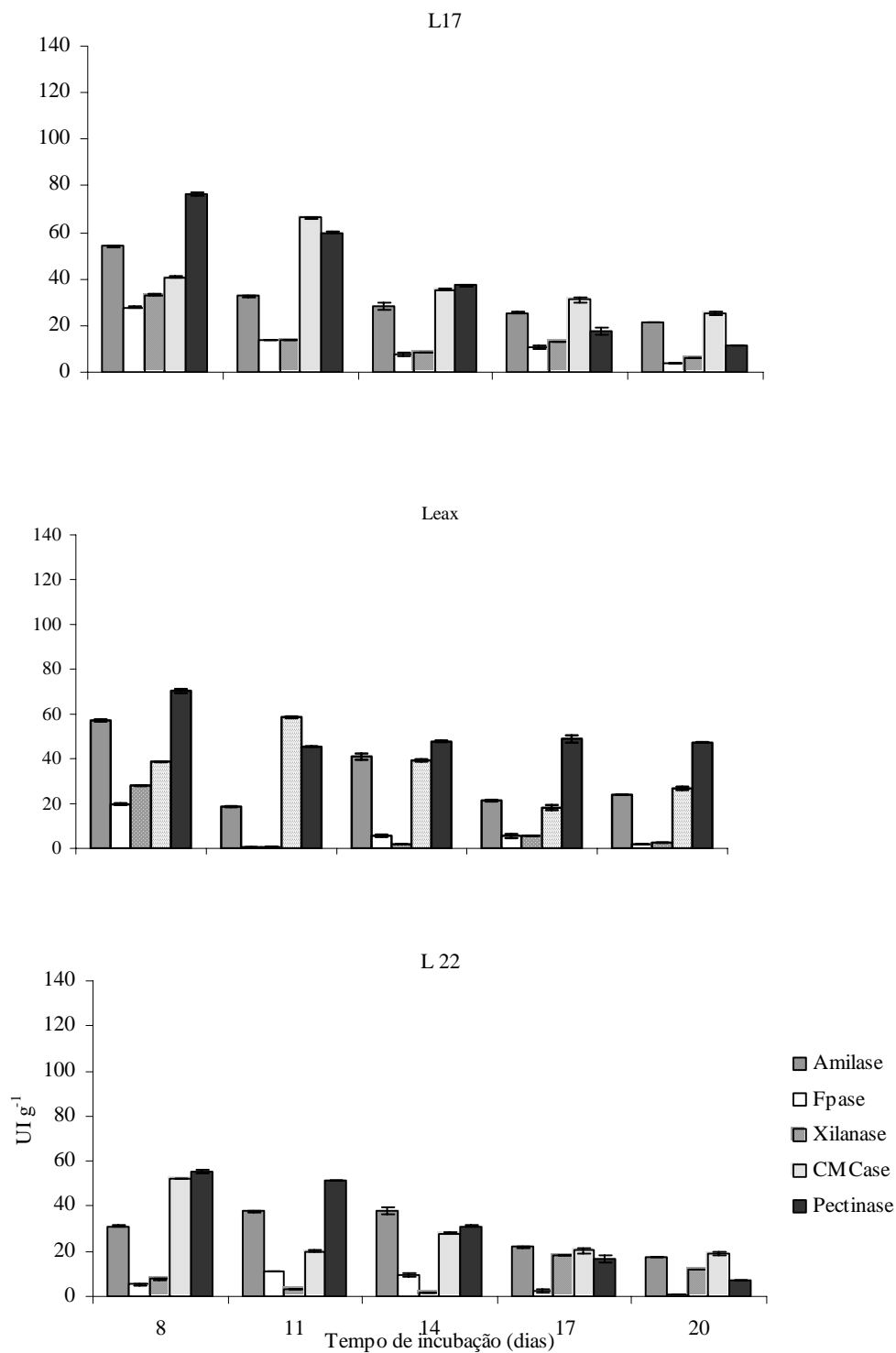
A atividade de amilase no 8º dia de incubação foi estatisticamente igual entre L17 e Leax e significativamente superior em comparação à L22. A partir do 17º dia não ocorreu diferença na atividade de amilase entre as linhagens (Figura 13) (Tabela 12, em anexo)

As linhagens L17 e Leax iniciaram (8º dia) com atividade de FPase estatisticamente superior à L22. No 17º e 20º dia, L17 mostrou atividade significamente maior que Leax e L22, as quais não apresentaram diferença entre si.

O nível de atividade de xilanase no 8º dia, para L17 e Leax, foi superior à L22, após este período a atividade, em Leax, diminuiu fortemente. Em L17, também ocorreu diminuição porém a atividade manteve-se até o 14º dia superior à Leax e L22. A partir do 17º dia, L22 aumentou significativamente sua atividade em relação a L17 e Leax.

A linhagem L22 no 8º dia expressou atividade da CMCase significativamente superior a L17 e Leax. No 11º dia, L17 foi significativamente superior a Leax e L22. As linhagens terminaram o período de incubação com atividades de CMCase inferiores ao início da incubação.

Verificou-se uma alta atividade de pectinase em todas as linhagens no início da incubação. A partir do 14º dia Leax teve uma atividade estatisticamente maior que L17 e L22 e permaneceu significativamente superior até o final da incubação.



**Figura 13.** Atividades de enzimas hidrolíticas de L17, L22 e Leax em casca de arroz durante crescimento em sistema estacionário. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

#### 6.4.4. Atividade de enzimas hidrolíticas de *L. edodes* em bagaço de mandioca

A atividade da amilase no 8º dia de incubação, para as linhagens L17 e Leax não expressaram diferença estatística entre elas, porém foram significativamente superiores à L22 (Figura 14) (Tabela 13, em anexo). Após este ponto de observação as linhagens apresentaram diminuição de atividade, exceto L17 que no 11º dia apresentou aumento de atividade em relação a Leax e L22. Na sequência, L17 permaneceu com atividade sem diferença significativa até o final da incubação. Por outro lado Leax voltou a ter aumento na atividade no 17º dia e permaneceu constante até o 20º dia. Em L22, no 20º dia de incubação ocorreu aumento significativo de atividade, sendo estatisticamente igual à atividade atingida por Leax e superior à atividade de L17.

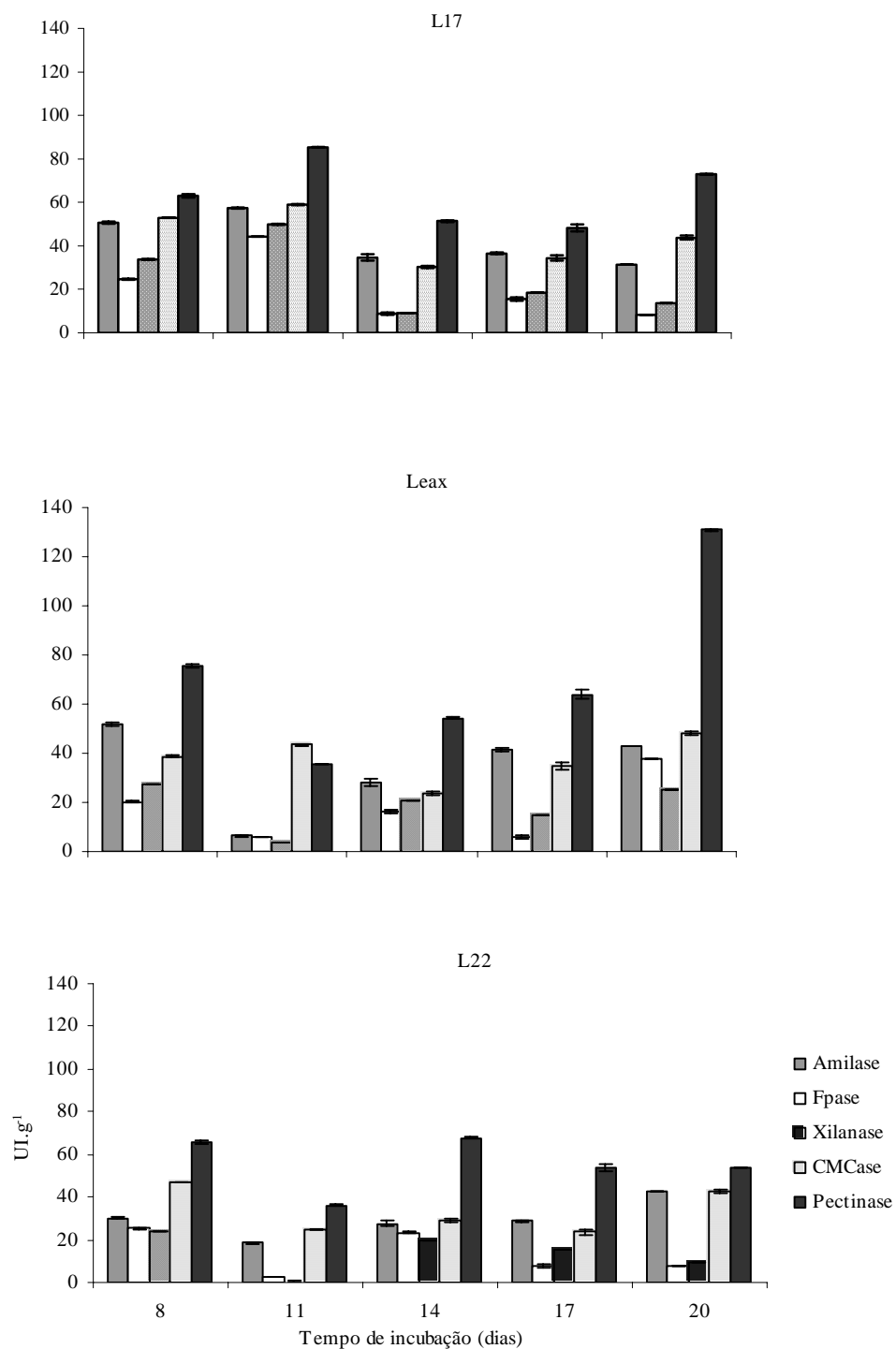
As linhagens L17 e L22 no 8º dia de incubação apresentaram atividade sem diferença significativa da FPase. L17 no 11º dia aumentou significativamente sua atividade enquanto Leax e L22 diminuíram. No entanto, no 14º dia L17 diminuiu bruscamente e L22 apresentou atividade superior à Leax e L17. No final da incubação, 20º dia, Leax apresentou seu ponto máximo de atividade e estatisticamente superior à L17 e L22.

A atividade de xilanase até o 11º dia de incubação apresentou atividade superior em L17, quando ocorreu seu ponto máximo de atividade. No 14º dia, L17 diminuiu significativamente e Leax e L22 tiveram atividades estatisticamente iguais, porém superiores à L17. No 20º dia a atividade de xilanase em Leax foi estatisticamente superior à L17 e L22.

A linhagem L17, no início da incubação, apresentou atividade de CMCase superior à Leax e L22. Todas as linhagens tiveram diminuição significativa de atividade no 17º dia, exceto L22 que não apresentou diferença do 14º ao 17º dia. No final da incubação, as linhagens tiveram atividade de CMCase sem diferença estatística.

A atividade de Pectinase no 8º dia de incubação, em Leax foi superior à L17 e L22. No 11º dia, L17 apresentou seu ponto máximo de atividade, enquanto Leax apresentou no final da incubação e L22 teve dois pontos máximos de atividade que não diferiram estatisticamente, no 8º e 14º dia.





**Figura 14.** Atividades de enzimas hidrolíticas de L17, L22 e Leax em bagaço de mandioca durante crescimento em sistema estacionário. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

De um modo geral, durante a maior parte do período de incubação, a atividade da pectinase foi superior a atividade da amilase e esta à da xilanase. O mesmo observou-se com relação as enzimas de degradação da celulose como a CMCase, a qual foi superior à atividade de FPase.

Pelos valores encontrados de atividade, neste experimento, verificou-se que as linhagens utilizaram muito mais as enzimas hidrolíticas para seu crescimento do que as enzimas oxidativas como mencionado anteriormente neste trabalho.

Resultados semelhantes foram encontrados por Reddy et al. (2003) os quais utilizaram folha e pseudocaule de bananeira, no cultivo de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju*, baixa atividade de FPase em relação à CMCase. A baixa atividade de FPase limita a taxa a qual os fungos de podridão branca degradam a celulose natural. Esta ação é necessária para a degradação de formas altamente ordenadas de celulose (cristalina) onde age sinergisticamente com a atividade da enzima CMCase (MACKENZIE et al., 1984; LEATHAM, 1985). Este padrão de degradação permite a utilização da lignina, sem perda de celulose dos materiais lignocelulósicos, por alguns fungos de podridão branca, (ANDER e ERIKSSON, 1977). Dessa forma estes materiais, livres da lignina, podem ser uma boa fonte para alimentação animal (REDDY et al., 2003).

A produção de celulasas e hemicelulase, geralmente, varia de acordo com a natureza do substrato usado na fermentação. Em experimentos conduzidos com *Aspergillus niger* KK2 com casca de arroz e farelo de trigo, verificou-se que quando a casca de arroz foi utilizada sem ser misturada com farelo de trigo obteve-se maior atividade enzimática para xilanase (5070 UI.g<sup>-1</sup>) e FPase (19,0 UI.g<sup>-1</sup>) (KANG et al. (2004).

Sriroth et al. (2000) verificaram em seus estudos com resíduos da mandioca que a atividade da amilase está relacionada à atividade da celulase e da pectinase. Após a destruição da matriz fibrosa pela celulase e pectinase, os grãos de amido ficam expostos, dessa maneira aumentando sua suscetibilidade à ação da amilase.

Em estudo realizado sobre atividade de enzimas hidrolíticas, em cultura líquida sem movimentação à base de bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho e palha de trigo, utilizando fungos de podridão branca, observou-se que os níveis de atividade da xilanase, glucanase e celulase aumentaram após 7 dias de incubação e diminuíram no 14° e 21° dia (final da incubação) (ABD EL NASSER, 1997).

Estes resultados confirmam alguns dos resultados apresentados das enzimas hidrolíticas estudadas, no presente experimento, em que ocorreu diminuição da atividade de algumas enzimas, principalmente no final da incubação.

A regulação genética da atividade da lacase e CMCCase foi reportada por Ohga e Royse (2001) durante o cultivo de *L. edodes* em substrato à base de serragem de carvalho, verificando o efeito da temperatura e umidade relativa. Os autores concluíram que os substratos expostos a baixa temperatura e condições de alta umidade, estimulou a expressão genética em resposta aos efeitos do ambiente, aumentando a atividade da CMCCase e inibindo a da lacase. O que explica o procedimento adotado pelos produtores de shiitake para induzir a frutificação.

Portanto, a atividade enzimática está fortemente relacionada aos efeitos do ambiente que podem ou não estimular a expressão genética de determinadas enzimas. O perfil enzimático pode ser diferente para cada sistema de incubação e o nível total de enzima pode variar de sistema para sistema e de ciclo para ciclo (OHGA e ROYSE, 2001).

Embora a atividade de lacase, no presente trabalho, tenha diminuído no final da incubação, principalmente em SE e BC, nenhuma relação foi encontrada entre a sua atividade e a da CMCCase. Isto porque a temperatura foi mantida constante a 25° C, conforme as pesquisas relatadas anteriormente em que a diminuição da temperatura foi condição para o estímulo do aumento da CMCCase.

A alta atividade de pectinase observada praticamente em todos os substratos e principalmente em L17 e Leax, indicam que estas sejam linhagens com potencial de estudo para produção desta enzima em outros substratos e formas de incubação, devido a sua importância em indústrias de suco de frutas e têxteis, bem como várias aplicações biotecnológicas conforme relatam Kashyap et al. (2001).

### **6.5. Determinação da atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* em serragem de eucalipto durante crescimento em bioreator**

Nas análises realizadas, detectou-se atividade da MnP e lacase para as linhagens estudadas durante a incubação em bioreator. No entanto, como nos demais experimentos, a enzima LiP não apresentou também atividade detectável.

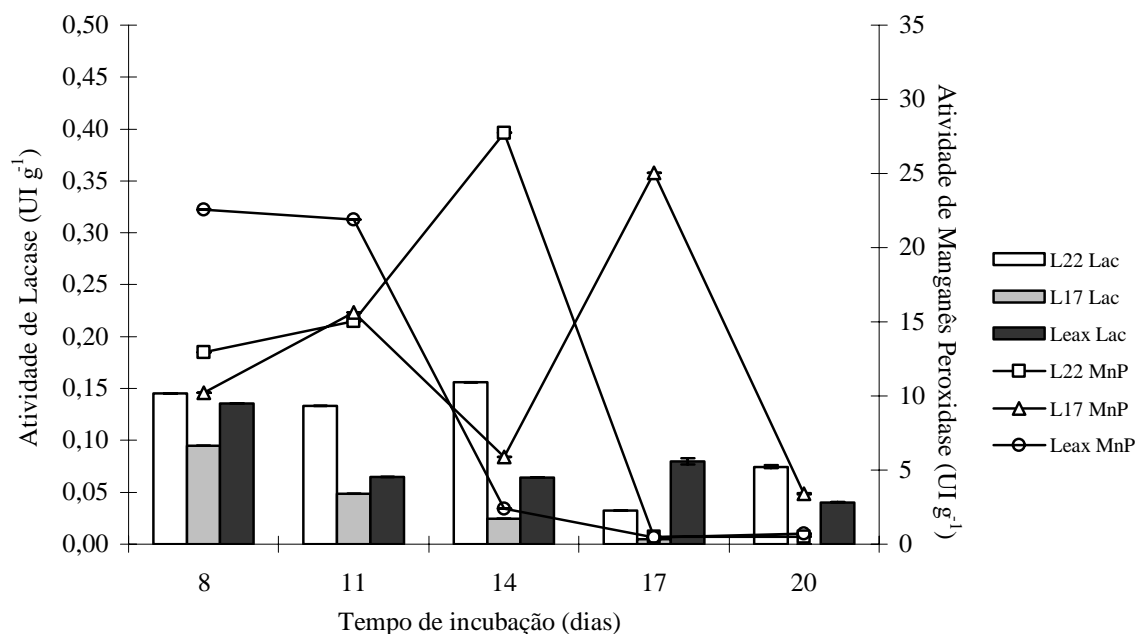
Para a execução deste experimento utilizou-se apenas serragem de eucalipto, e verificou-se comportamentos distintos na produção de lacase e MnP (Figura 15) (Tabela 14, em anexo). A atividade de lacase em L17 apresentou níveis estatisticamente inferiores em relação a Leax e L22, sendo que no 14° dia não foi mais detectada a sua atividade.

Em Leax a atividade de lacase após o 8° dia diminuiu e permaneceu baixa até o final da incubação.

A atividade de MnP, em Leax, do 8° ao 11° dia apresentou valores sem diferença significativa e estatisticamente superiores aos de L17 e L22. No entanto, Leax no 14° dia mostrou uma forte diminuição de atividade e permaneceu baixa até o final da incubação.

Enquanto L22 apresentou sua atividade máxima no 14° dia com posterior declínio acentuado de atividade no 17° dia, até o final da incubação.

L17 no 14° dia apresentou significativa diminuição de atividade, porém no 17° dia aumentou novamente sendo detectada sua atividade máxima. Como nas demais linhagens, mostrou declínio acentuado no final da incubação.



**Figura 15.** Atividade de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em serragem de eucalipto durante crescimento em bioreator. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

A atividade de lacase em bioreator para L22 apresentou características semelhantes a atividade observada para o cultivo em sistema estacionário, exceto para o final da incubação. Para L17 esta atividade foi menor em bioreator, enquanto que para Leax a atividade lacásica foi mais uniforme neste sistema.

Todas as linhagens tiveram apresentaram atividades de MnP, superiores no 8º dia de incubação em sistema de bioreator. Atividade de Leax, em bioreator, após este período e até o final da incubação foi significativamente inferior. O mesmo não foi observado durante incubação em sistema estacionário

Para L22, observou-se atividade maior de MnP em bioreator comparado ao sistema estacionário, exceto no final da incubação.

Da mesma forma que em sistema estacionário, a atividade de lacase em bioreator foi bem inferior quando comparada com a atividade de MnP.

Conforme relatam Bollag e Leonowicks (1984), fungos basidiomicetos, geralmente produzem pequenas quantidades de lacase. Somado a isso, a produção de lacase pode ser influenciada pela concentração de nitrogênio no meio de cultura. Muitas vezes, altos níveis de nitrogênio são requeridos para aumentar a formação de lacase, conforme relatado por Gianfreda et al. (1999).

O controle de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, em fermentação no estado sólido para fungos de podridão branca, é considerado um fator que interfere na produção de enzimas de degradação da lignina, como mostram vários pesquisadores (WHITE e BODDY, 1992; REID & SEIFERT, 1981; GIOVANNONZI SERMANNI et al., 1996).

Referente à isso, Fenice et al. (2003) relatam em seus estudos, sobre atividade de MnP e lacase em *P. tigrinus* quando incubado em bioreator do tipo RDR que a maior atividade de lacase observada foi quando a concentração de CO<sub>2</sub> foi fixado a 5 %; e para MnP quando foi fixada a 3 %.

#### **6.6. Determinação da atividade de enzimas hidrolíticas em linhagens de *L. edodes* em serragem de eucalipto durante crescimento em bioreator**

A atividade de amilase entre as linhagens durante a incubação em bioreator, foi estatisticamente diferente, exceto no 14° dia em que L17 e Leax apresentaram a mesma atividade. Observou-se que L17 expressou atividade constantemente superior em relação a Leax e L22 (Figura 16) (Tabela 15, em anexo).

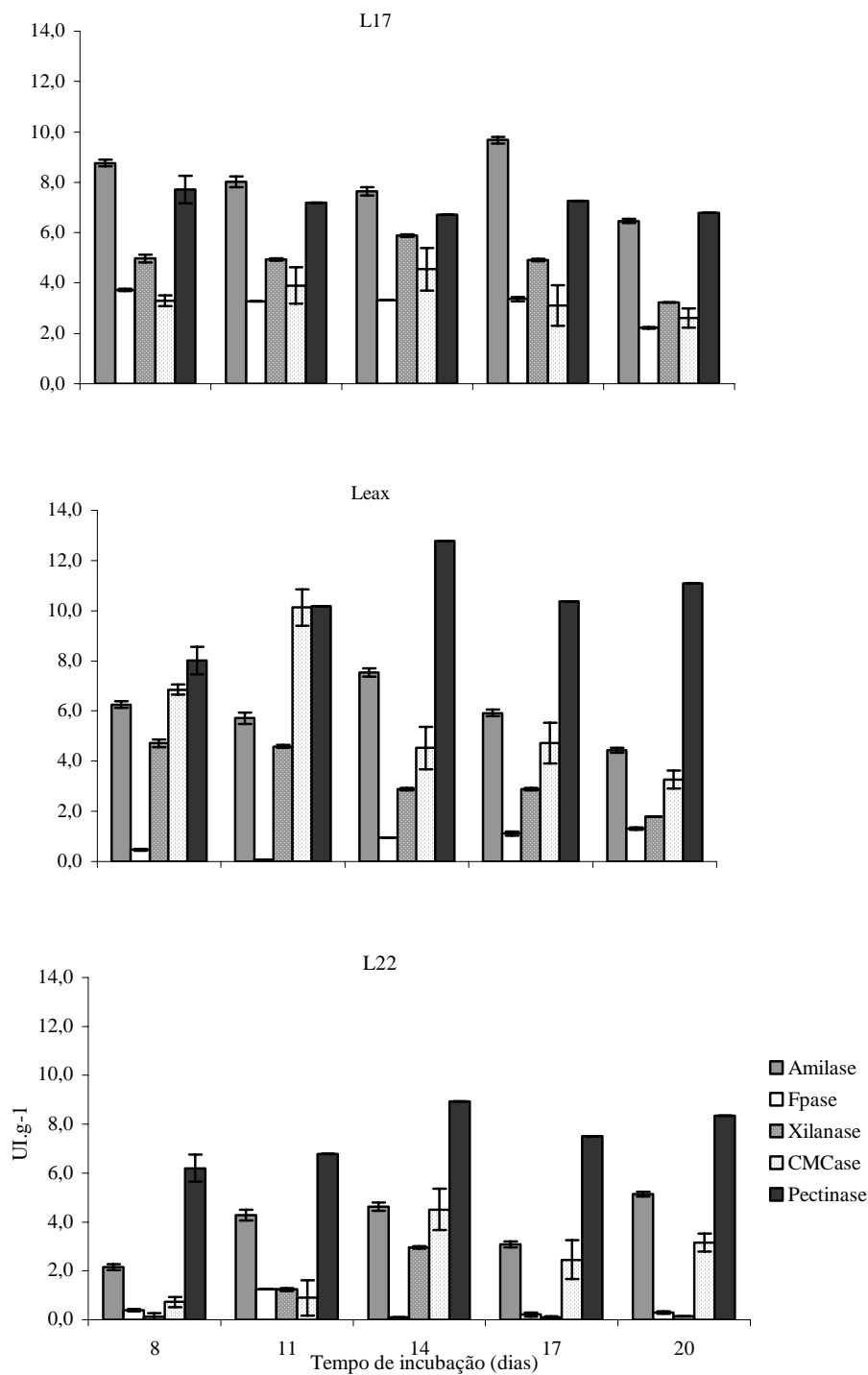
As linhagens tiveram a atividade de FPase distinta estatisticamente durante a incubação, com exceção do 8° dia entre Leax e L22. L17 manteve a atividade de FPase do 8° ao 17° dia sem diferença estatística, diminuindo ao final.

A atividade de xilanase para L17 apresentou uma atividade constante, sem diferença estatística com a atividade de Leax, até o 11° dia. L17 mostrou uma atividade de xilanase superior a partir do 17° dia de incubação. L22 apresentou baixa atividade de xilanase comparando-se a L17 e Leax, exceto no 14° dia em que não diferenciou-se de Leax.

A atividade de CMCase também ocorreu com diferença significativa entre as linhagens, exceto no 14° e 20° dia. Leax iniciou com a maior atividade de CMCase com relação a L17 e L22 e atingiu seu ponto máximo de atividade no 11° dia.

A atividade da pectinase apresentou diferença estatística entre as linhagens no 14° dia. Neste ponto da incubação Leax apresentou sua atividade máxima e até o permaneceu até final da incubação com atividades significativamente superiores à L17 e L22

Em L17, a atividade de todas as enzimas foram mais estáveis, durante toda a incubação, quando incubada em bioreator do que em sistema estacionário. A pectinase e a amilase foram as enzimas que tiveram melhores resultados para esta linhagem. Em Leax, CMCase apresentou, nos primeiros dias de incubação, atividades estatisticamente iguais à pectinase. Durante toda a incubação, a atividade de CMCase foi superior à de FPase. A pectinase, amilase e CMCase foram as enzimas de melhor atuação em Leax. Em L22, a pectinase também teve uma atividade constante, seguida da atividade da amilase. FPase teve baixíssimos valores comparados com aos das demais enzimas.



**Figura 16.** Atividade de enzimas hidrolíticas de L17, L22 e Leax durante crescimento em bioreator. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).



Os resultados encontrados para a atividade de enzimas hidrolíticas, em bioreator, apresentaram diminuição em relação aos valores verificados em sistema de sistema estacionário.

Os fatores que podem estar relacionados com essa diminuição da atividade seriam possivelmente, entre outros, a taxa de aeração e a taxa de movimentação. Techapun et al. (2003) verificaram esse fato em estudo realizado com *Streptomyces* sp., sendo incubado com taxa de movimentação fixa e variação da taxa de aeração. Os autores concluíram que o aumento da taxa de aeração diminuiu significativamente a atividade da xilanase. Quando a taxa de movimentação e aeração variaram, eles verificaram que ocorreu redução da xilanase com as altas taxas de aeração e movimentação.

A alteração da morfologia do fungo com a movimentação, neste caso, pode ser a explicação para os resultados obtidos, conforme relataram alguns pesquisadores após realizarem análises microscópicas em *Penicillium janthinellum* e *Paecilomyces sinclairii* submetidos a efeitos de diferentes taxas de agitação (PALMA et al., 1996; CHO et al., 2002).

No presente trabalho, cada movimentação realizada pelo bioreator (24 movimentações de  $5\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ ) gerava uma desorganização do micélio que, para o restabelecimento do mesmo ao substrato, provavelmente tenha utilizado preferivelmente as enzimas oxidativas ao invés das hidrolíticas. A taxa de aeração utilizada (3%) pode ter contribuído também para os resultados encontrados. Possivelmente, se o período de incubação tivesse se estendido, teria sido verificado talvez uma atividade maior das enzimas hidrolíticas.

Resultados contrários foram verificados por Abd El-Nasser et al. (1997) estudando a incubação de *Phanerochaete chrysosporium*, em meio líquido, realizada em sistema estacionário e sob agitação. Os autores verificaram que, na incubação em agitação, ocorreu leve aumento da atividade da xilanase, glucanase e celulase, quando foram utilizados como substratos, bagaço de cana-de-açúcar, espiga de milho e palha de trigo.

Ohga e Royse (2001) verificaram baixa atividade de celulase em relação à de lacase durante o crescimento miceliano de *L. edodes* em serragem de eucalipto, porém esta relação inverteu-se após o substrato ter formado a capa miceliana e os primeiros primórdios aparecerem.

Dekker et al. (2001), em seus estudos com *Botryosphaeria* sp., verificaram que a xilanase apresentou maior atividade enzimática, em comparação com pectinase, FPase, CMCase e amilase. Verificaram também que a fonte de celulose utilizada não influenciou a atividade da CMCase; e encontraram baixos índices de atividade da FPase.

Watanabe (2002) argumenta que os mecanismos moleculares que regulam a expressão genética das enzimas durante a incubação em estado sólido, podem ser muito complicados. Segundo o autor, o isolamento dos genes de expressão e mudanças no citoesqueleto e nos mecanismos de secreção dos fungos filamentosos, são condições necessárias para controlar a produção de enzimas específicas em FES.

Além disso, Fenice et al. (2003) constataram diferentes valores de atividade enzimática durante incubação de *P. tigrinus* em diferentes tipos de bioreatores. Os autores concluíram, entre outras coisas, que a forma de incubação altera o sistema enzimático.

No experimento com enzimas hidrolíticas, a diferença de atividade enzimática foi muito mais expressiva comparando-se com o sistema estacionário, enquanto que no experimento da atividade de lacase e MnP houve pontos de diferença dependentes da linhagem estudada e tipo de incubação.

Segundo Raghavarao et al. (2003), o bioreator é o coração do processo de fermentação em que a matéria prima, sob condições adequadas, é convertida no produto desejado. A taxa de maximização de formação e rendimento do produto dentro do bioreator é uma parte do segredo do processo de otimização da produção. Muitos são os fatores que podem afetar o desempenho de um bioreator como a quantidade de substrato, teor de umidade no substrato, regulação da aeração e temperatura, entre outros. E ainda, o estímulo de produção de inibidores enzimáticos em FES é um estudo que está em desenvolvimento.

Entre os substratos utilizados o bagaço de mandioca em relação a velocidade de crescimento e atividade enzimática, mostrou ser um resíduo que ainda tem muito a ser pesquisado tanto como substrato de cultivo quanto para produção de metabólitos.

O bagaço de mandioca pode oferecer numerosas vantagens em comparação a outros resíduos agrícolas como casca de arroz e palha de trigo, por ser considerado como uma rica reserva de energia solar devido a sua fácil capacidade de regeneração. Quando comparado com o bagaço de cana-de-açúcar, oferece vantagens por não requerer pré-tratamento algum e por ser facilmente degradado por microrganismos. Sua alta

capacidade de retenção de água (85-90%) faz com que o bagaço mandioca seja considerado um substrato ideal para FES (PANDEY et al. 2000).

Beux et al. (1995) indicam o bagaço de mandioca como uma tecnologia alternativa ideal para produção de shiitake. Em seus experimentos, os melhores resultados foram obtidos quando 80% de bagaço de mandioca foi misturado com 20% de bagaço de cana-de-açúcar. Os autores verificaram que cerca de 77% do amido foi utilizado durante o processo de biotransformação.

Resultados semelhantes foram encontrados por Barbosa et al. (1995) quando observaram que a mistura 80% de bagaço de mandioca com 20% de bagaço de cana-de-açúcar promoveram uma boa produção de *Pleurotus sajor-caju*.

Um outro aspecto que embora não tenha sido alvo deste estudo, porém merece ser ressaltado, é o tempo de recobrimento do substrato, pelo micélio, observado durante o experimento desenvolvido em bioreator. Com 15 dias de incubação, 6,396 kg de substrato foi uniformemente colonizado e após ser retirado do bioreator, colocou-se o substrato em sacos plásticos e a capa miceliana foi formada em 7 dias.

Verificou-se que a atividade enzimática em bioreator não foi superior à observada em sistema estacionário, salvando-se as exceções. Portanto, o rápido recobrimento do substrato não foi devido a produção enzimática, mas provavelmente fatores como agitação e aeração tenham sido os responsáveis por promover em 22 dias um substrato apto à frutificação.

O desenvolvimento de um bioreator mais simples, de baixo custo, com maior capacidade utilização de substrato e a seleção de linhagens mais adaptadas a este tipo de incubação poderia incrementar a produção de cogumelo no país. Além disso, a uniformização da produção e o menor tempo de cultivo são características, entre outras, indispensáveis para a comercialização de cogumelos

O Brasil possui uma enorme gama de subprodutos agrícolas a serem explorados cientificamente, seja para conversão destes em alimento ou para produção de metabólitos importantes, nos mais diversos setores da indústria e do meio ambiente. A caracterização enzimática das linhagens de fungos da podridão branca, entre eles os produtores de cogumelos, sob determinadas condições, contribui principalmente para poder melhor direcioná-los a um fim ao qual estão melhor destinados.

## 7. CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados, pôde-se chegar às seguintes conclusões

- As linhagens de *L. edodes* L17, L22 e Leax têm atividade de MnP superior à atividade de lacase seja qual for o tipo de incubação.
- A enzima lignina peroxidase não foi detectada como atuante no sistema lignolítico para as linhagens L17, L22 e Leax, nas diferentes formas de incubação e substratos utilizados.
- As linhagens de *L. edodes* estudadas, durante crescimento em meio de cultura líquido, não apresentaram atividades expressivas de MnP e lacase.
- A atividade de enzimas hidrolíticas em bagaço de mandioca e casca de arroz, em cultivo estacionário, indicou estar relacionado com a

velocidade de crescimento miceliano nestes substratos. Enquanto que em serragem e bagaço de cana-de-açúcar, concluiu-se que o crescimento foi mais fortemente relacionado à atividade de enzimas oxidativas.

- O crescimento em serragem de eucalipto e bagaço de cana-de-açúcar, em sistema estacionário, mostrou ser o mais eficiente para a atividade de MnP, enquanto que para a de lacase foi em serragem de eucalipto.
- A utilização do bioreator pode ser indicado como sistema viável para indução da atividade de lacase para L22 e Leax e à atividade de MnP para L17 e L22.
- O cultivo no sistema estacionário em serragem de eucalipto, possibilita atividade superior de enzimas hidrolíticas do que em bioreator.
- O bagaço de mandioca pode ser uma boa alternativa de substrato, ou como complemento a outros substratos, por propiciar um rápido crescimento miceliano.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-NASSER, N. H.; HELMY, S. M.; EL-GAMMAL, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with rot fungi. *Polymer degradation and stability*, Essex, v. 55, p. 249-255, 1997.

ADAMS, G.A.; CASTAGNE, A.E. Holoceluloses from Straw. *Canadian Journal of Research*, v. 26, p. 325-334, 1948.

ANDER, P.; ERICKSSON, K. E. Selective degradation of wood components by white-rot fungi. *Physiology Plant*, Berne, v. 41, p. 239-248, 1977.

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

BARBOSA, M. C. S. et al. Prospect for production of *Pleurotus sajor-caju* from cassava fibrous waste. In: ROUSSOS, S.; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. *Advances in Solid State Fermentation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.513-525.

- BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science. Technology*, Easton, v. 28, p. 78-87, 1994
- BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation : a review. *Process Biochemistry*, London, v. 38, p. 881-896, 2003.
- BEUX, M. R.; SOCCOL, C. R. Cultivo do fungo comestível *Lentinula edodes* em resíduos agroindustriais do Paraná através do uso de fermentação no estado sólido. *B.CEPPA*, Curitiba, v. 14, p. 11-24, 1996.
- BOLLAG J.M.; LEONOWICKZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied Environmental Microbiology*; v. 48, p. 849-854, 1984.
- BONNARME, P.; JEFFRIES, T. W. Selective production of extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* in an airlift bioreactor. *Journal Fermentation Bioengineering*, Osaka, v. 70, p. 158-163, 1990.
- BONNARME, P. et al. Toward a control of lignin and manganese peroxidase hypersecretion by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated vessels: evidence of the superiority of pneumatic bioreactors on mechanically agitated bioreactors. *Biotechnology Bioengineer*, New York, v. 41, p. 440-445, 1993.
- BOOMINATHAN, K.; REDDY, C. A. Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. In: ARORA, D.K., BHARAT, R., MUKERJI, K.G., KNUDSEN, G.. *Handbook of applied mycology*. volume 4: Fungal biotechnology, New York: Marcel Dekker Inc., 1992. p.763-822.
- BOYLE, C. D. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, v. 30, n. 6, p. 817-823, 1998.
- BROWN, J.A.; GLENN, J.K.; GOLD, M.H. Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal Bacteriology*, v. 172, p. 3125-3130, 1990.
- BURGI, R. *Produção de cana de açúcar auto-hidrolisado e avaliação do seu teor nutritivo para ruminantes*. 1985. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal e Pastagem) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

BUSWELL, J. A. Fungal degradation of lignin. In: ARORA, D. K.; BHARAT, R.; MUKERJI, K. G.; KNUDSEN, G. *Handbook of applied mycology*. volume 1: Soil and plants. New York: Marcel Dekker Inc., 1991. p. 425-480.

BUSWELL, J. A.; CHANG, S. T. Edible mushrooms: Attributes and applications. In: CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A., MILES, P. G.. *Genetics and breeding of edible mushrooms*. Gordon and Breach Scientific Publishers, Philadelphia, 1993. p. 297-324.

CAIRNEY, J. W. C; BURKE, R. M. Do ecto- and ericoid mycorrhizal fungi produce peroxidases activity. *Mycorrhiza*, v. 8, p. 61-65, 1998.

CARTA, F. S. et al. Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. *Bioresource Technology*, Essex, v. 68, p. 23-28, 1999.

CARTA, F. S.; SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L .P. S.; LEBAULT, J. M. Enzymatic hydrolysis of cassava bagasse for production of metabolites obtained by fermentation. Paper presented in *Enzytec-97*, Rio de Janeiro, 1997.

CHANG. S.T. Production of cultivated edible mushroom in China with emphasis on *Lentinula edodes*. *ISMS Newsletter*; v. 4, p. 3-6, 1999.

CHANG, S.T. Past and present trends in the production of *Lentinula edodes* in Asia. In: International Conference of Mushroom, 4., 2002, Cuernavaca. *Proceedings...*, 2002, p. 1-8.

CHANG, S. T.; KWAN, H. S.; KANG, Y. N. Collection, characterization, and utilization of germ plasm of *Lentinula edodes*. *Canadian Journal Botanical*, v. 73, n. 1, p. 955-965, 1995.

CHO, Y. J. et al. Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. *Journal Biotechnological*, v. 95, p.13-23, 2002.

COCHARAN, K. W. Medicinal effects. In: CHANG, S.T., HAYES, W.A. (Ed.) *The biology and cultivation of edible mushrooms*. New York: Academic Press, 1978, p. 169-87.



DEKKER, R. F. H. et.al. A new role for veratryl alcohol: regulation of synthesis of lignocellulose-degrading enzymes in the lignolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.; influence of carbon source. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v. 23, p. 1987-1993, 2001

D'SOUZA, T. M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C. A. Isolation of laccase gene specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied Environmental*, v. 62, p. 3739-3744, 1996.

EIRA, A. F., MARINO, R. H., ICHIDA, M. S. Produção de inoculantes. In: EIRA, A.F., MINHONI, M.T.A. *Manual teórico prático do cultivo de cogumelos comestíveis*. 2.ed. Botucatu: Fundação de Pesquisa Agro-pecuária e Florestais, 1997. p.20-33.

EIRA, A. F., MINHONI, M. T. A. *Cultivo de cogumelos comestíveis*. Botucatu: Curso Elo, Instituto de Economia Associativa. São Paulo, 1996. 68 p.

ESTERBAUER, H. et al. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*, Essex, v. 36, p. 51-65, 1991.

FENICE, M. et al. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Biotechnology*, Frankfurt, v.100, p.77-85, 2003.

FIELD, J. A. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *TIBTECH*, v.11, p.44-49, 1993.

GIANFREDA, L.; XU, L.; BOLLAG, L. M.. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*; v. 26, p. 1-25, 1999.

GIOVANNONZI SERMANNI, G. et. al. The production of exo-enzymes of *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus* and their use for upgrading corn straw. *Bioresource Technology*, Essex, v. 48, p. 173-178, 199.

GOLD, M. H.; ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiology Review*, Amsterdam, v. 57, p. 605-622, 1993.

- GOLD, M. H.; GLENN, J. K.; ALIC, M. Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. *Methods Enzymology*, v. 161, p. 74-78, 1988.
- GRIFFIN, D. H. Growth. In:\_. *Fungal Physiology*. 2<sup>a</sup> ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 458p
- HAARS, A.; HUTTERMANN, A. Function of laccase in white-rot fungus. *Archive of Microbiology*, Berlin, v. 125, p. 233-237, 1980
- HALTRICH, D. et al. Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology*, Essex, v.58, p.137-161, 1996.
- HAN, Y. W.; ANDERSON, A. W. Semisolid fermentation of ryegrass straw. *Applied Microbiology*; v. 30, p. 930-934, 1975.
- HANG, Y. D.; WOODAMS, F. F. Production of citric acid from corn cobs by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, Essex, v. 65, p.2 51-254, 1998.
- HASHIMOTO, T. et al. Production and some properties of salt-tolerant b-xylosidases from a shoyu koji mold, *Aspergillus oryzae* in solid and liquid cultures. *Journal Bioscience Bioengineer*; v. 88, p. 479-483, 1999.
- HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Review*, Amsterdam, v. 13, p. 125-135, 1994.
- HATVANI, N.; MÉCS, I. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York, v. 55, p. 199-203, 2003.
- HESS, J. et al. Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, v. 98, p. 229-241, 2002.
- HESELTIME, C. W. Solid state fermentation . *Process Biochemistry*, London, v. 12, p .29-32, 1977.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidases (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*; New York, v. 30, p. 454-466, 2002.

ISAAC, S. How do fungi degrade and obtain nutrients from cellulose? *Mycologist*, Cambridge, v. 11, p. 92-93, 1997.

IWASHITA, K. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound  $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*; Clifton, v. 62, p. 1938-1946, 1998.

KAAL, E. E. J.; FIELD, J. A.; JOYCE, T. W. Increasing lignolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen sufficient media. *Bioresource Technology*, Essex, v. 53, p. 133-139, 1995.

KADIMALIEV, D. A. et al. Effect of wood modification on lignin consumption and synthesis of lignolytic enzymes by the fungus *Panus (Lentinus) tigrinus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*; v. 39, n. 5, p. 488-492, 2003

KALBERER, P. P. An investigation of the incubation phase of a shiitake (*Lentinus edodes*) culture. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Rotterdam, p. 375-83, 1995.

KANG S. W. et al. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*; Essex, v. 91, p. 153-156, 2004.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector : a review. *Bioresource Technology*, Essex, v. 77, p. 215-227, 2001

KERN, H. W. Improvement in the production of extracellular lignin peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of solid manganese (IV) oxide. *Applied Microbiology and Biotechnology*., Berlin, v. 32, p. 223-234, 1989.

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

SHEARER, C.A. Fungal competition. *Canadian Journal of Botany*, v.73, p.1259-1264, 1995.

- SRIROTHA, K. et al. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. *Bioresource Technology*, Essex, v. 71; p. 63-69, 2000.
- LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYZTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; practical implementations. *Bioresource Technology*, Essex, v. 87, p. 167-198, 2003.
- LEATHAM, G. F.. The lignolytic activities of *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 24, p. 24-58, 1986.
- LEATHAM, G.F. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.50, p. 859-867, 1985.
- LEATHAM, G.F.; KIRK, T. K. Regulation of lignolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *Microbiologist*, v. 16, p. 65-8, 1983.
- LEATHAM, G. F. Cultivation of shiitake, the Japanese forest mushroom, on logs: a potential industry for the United States. *Forest Products Journal*, Madison, v. 32, n. 8, p. 29-35, 1982.
- LEATHAM, G. F.; STAHMANN, M. A. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with development of fruiting bodies. *Journal Genetic Microbiology*, v. 50, p. 859-867, 1981
- LEONTIEVSKY, A. A. et al. Transformation of 2,4,6- trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. *Biodegradation*, Dordrecht, v. 11, p. 331-340, 2000.
- LONSANE, B. K. et al. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 7, p. 258-265, 1985.
- MACKENZIE, C. R.; BILOUS, D.; JOHNSON, K. G. Purification and characterization of an exoglucanase from *Streptomyces flavogriseus*. *Canadian Journal Microbiology*; v. 30, p. 1171- 1178, 1984.

MASAPHY, S.; LEVANON, D. The effect of lignocellulose on lignocellulytic activity of *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture. *Appied Microbiology Review*, v. 36, p. 828-832, 1992.

MASSADEH, M. et al. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnological Letters*, v. 23, 1771-1774, 2001.

MATA, G.; SAVOIE, S. M. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Oxford, v. 14, p. 513-519, 1998.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, New York, v. 60, p. 551-565, 2002

MESSNER, K.; STREBOTNIK, E. Biopulping: and overview of developments in environmentally safe paper-making technology. *FEMS Microbiology Review*, Amsterdam, v. 13, p. 351-364, 1994.

MISHRA, C.; LEATHAM, G. F. Recovery and fractionation of the extracellular degradative enzymes from *Lentinula edodes* cultures cultivated on a solid lignocellulosic substrate. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 69, p. 8-15, 1990.

OHGA, S.; ROYSE, D.J. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. *FEMS Microbiology Letters*, v. 201, p. 111-115, 2001.

OKEKE, B. C. et al. The relationship between phenol oxidase activity, soluble protein and ergosterol with growth of *Lentinus* species in oak sawdust logs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 41, n. 1, p. 28- 31, 1994.

ONYSKO, K.A. Biological bleaching of chemical pulps: a review. *Biotechnology Advances*, New York, v. 11, p. 179-198, 1993.

ORTH, A. B.; ROYSE, D. J.; TIEN, M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Applied Environmental Microbiology*, v. 59, p. 4017-4023, 1993.

- PALMA, M. B. et al. Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. *Process Biochemistry*, London, v. 31, p. 141-145, 1996.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Sciences*, v. 77, p. 149-162, 1999.
- PANDEY, A. Biotechnological potential of agro-industrial. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology*, Essex, v. 74, p. 81-87, 2000.
- PELÁEZ, F.; MARTÍNEZ, M. F.; MARTÍNEZ, A. T. Screening of 68 species of basidiomycetes involved in lignin degradation. *Mycology. Res.*, v. 99, p. 37-42, 1995.
- PHILIPPOUSSIS, A. N.; DIAMANTOPOULOU, P. A.; ZERVAKIS, G. I. Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.19, p.551-557, 2003.
- PHILIPS, L. E.; LEONARD, T. J. Extracellular and intracellular phenoloxidase activity during growth and development in *Schizophyllum*. *Micologia*, v. 68, p. 268-78, 1976.
- PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. *Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation*. Iowa: kendall/Hunt, 1988. 217p.
- RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN T. V.; KARANTH; N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*; v. 13, p. 127-135, 2003.
- RAJARATHNAM, S. & BANO, Z. Biopotencialites of basidiomacromycetes. *Advances in Applied Microbiology*, San Diego, v. 37, p. 233-361, 1992.
- REDDY, G.V. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochemistry*, London, v. 38, p. 1457-62, 2003.
- REID, I.D.; SEIFERT, K.A. Effect of atmosphere of oxygen on growth, respiration, and lignin degradation by white-rot fungi. *Canadian Journal Botanical*, v. 60, p. 252-260, 1981.

REID, I.D.; PAICE, M.G. Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiology Review*, Amsterdam, v. 13, p. 369-376, 1994.

REID, I.D. The influence of nutrient balance on lignin degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Canadian Journal Botanical*, v. 57, p. 2050-2058, 1979.

ROSALES, E.; COUTO, R.; SANROMAN, A. New uses of food waste: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. *Biotechnological Letters*, v. 24, p.701-4, 2002.

ROSSI, I.R.. *Suplementação de bagaço de cana-de-açúcar para cultivo axênico do cogumelo shiitake [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]*. 1999. 129p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

ROYSE, D. J. et al. Yield mushroom size and time to production of *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) grown on switch grass substrate spawned and supplemented at various rates. *Bioresource Technology*, Essex, v. 91, p. 85-91, 2004.

ROYSE, D. J.; SANCHEZ-VASQUES, J. E. Influence of precipitated calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) on shiitake (*Lentinula edodes*) yield and mushroom size. *Bioresource Technology*, Essex, v. 90, p. 225-228, 2003.

SHANKARANAND, V. S.; LONSANE, B. K. Citric acid by solid state fermentation a case study for commercial exploitation. In: PANDEY, A. *Solid State Fermentation*. New Delhi: Wiley Eastern, 1994. p. 149-152.

SHEARER, C.A. Fungal competition. *Canadian Journal of Botany*, v. 73, p. 1259-1264, 1995.

SOCOL, C.R. Biotechnological products from cassava roots by solid state fermentation. *Journal Science Industrial Residues*; v. 55, p. 358-364, 1996.

SMITH, R.E. Rapid tube test for detecting fungal cellulase production, *Applied Environmental Microbiology*, v. 33, p. 380-91, 1977.

SLOMCZYNSKI, D., NAKAS, J.P., TANENBAUM, S.W. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. *Applied Environmental Microbiology*, v. 61, p. 907-912, 1995.

TECHAPUN, C. et al. Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulase-free xylanase production by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab 106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 95, n. 3, p. 298-301, 2003.

THURSTON, C. F. The structure and function of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymology*, v. 140, p. 19-26, 1994.

VANDENBERGHE, L. P. S. Solid State fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, Essex, 1999, in press.

VENKATADRI, R.; IRVINE, R. L. Effect of agitation on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 56, p. 2684-2691, 1990.

WALDNER, R., LEISOLA, M.S.A., FIECHTER, A.. Comparison of lignolytic activities of selected white-rot fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*, Berlin, v. 29, p. 400-407, 1988.

WATANABE, K. Linking genetics, Physiology and ecology: and interdisciplinary approach for advancing bioremediation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v 94, n. 6, 557-562, 2002.

WHITE, N.; BODDY, L.. Differential extracellular enzyme production in colonies of *Coriolus versicolor*, *Phlebia radiata* and *Phlebia rufa*: effect of gaseous regime. *Journal Genecti Microbiology*; v. 138, p. 2589-2598, 1992.

WOOD, D.A.. Microbial process in mushroom cultivation: a large-scale solid substrate fermentation. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, Oxford, v. 34, p. 232-240, 1984.

YOSHIYAMA, M.; ITO, Y. Polyphenol oxidase production in a jar fermentor by *Coriolus versicolor*. *Journal Fermentation Bioengineering*, Osaka, v. 78, p. 188-190, 1994.



ZHANXI, L.; ZANHUA, L. Fungi cultivation with Jun-Cao. *Asia Pacific Mushroom Training*, Center, 1995.

## APÊNDICE

Tabela 2. Comparação entre as médias da atividade de lacase e MnP, segundo linhagem e dias de incubação, durante crescimento em meio de cultura líquido à base de serragem de eucalipto.

Dias	Lacase (UI mL <sup>-1</sup> )			MnP (UI mL <sup>-1</sup> )		
	L17	L22	Leax	L17	L22	Leax
2	0,000 <sup>Ad</sup> *	0,000 <sup>Ad</sup>	0,000 <sup>Ae</sup>	0,000 <sup>Ag</sup>	0,000 <sup>Af</sup>	0,000 <sup>Af</sup>
4	0,000 <sup>Bd</sup>	0,000 <sup>Bd</sup>	0,005 <sup>Ac</sup>	0,000 <sup>Ag</sup>	0,000 <sup>Af</sup>	0,000 <sup>Af</sup>
7	0,000 <sup>Bd</sup>	0,004 <sup>Ac</sup>	0,000 <sup>Be</sup>	0,120 <sup>Ae</sup>	0,000 <sup>Bf</sup>	0,000 <sup>Bf</sup>
11	0,011 <sup>Bb</sup>	0,004 <sup>Cc</sup>	0,054 <sup>Aa</sup>	0,409 <sup>Bb</sup>	0,337 <sup>Cc</sup>	0,962 <sup>Aa</sup>
14	0,025 <sup>Aa</sup>	0,004 <sup>Cc</sup>	0,015 <sup>Bb</sup>	0,819 <sup>Aa</sup>	0,467 <sup>Ca</sup>	0,701 <sup>Bb</sup>
18	0,014 <sup>Ab</sup>	0,008 <sup>Bb</sup>	0,011 <sup>Ad</sup>	0,194 <sup>Bd</sup>	0,146 <sup>Bd</sup>	0,559 <sup>Ad</sup>
22	0,003 <sup>Bc</sup>	0,006 <sup>Ab</sup>	0,005 <sup>Ac</sup>	0,305 <sup>Bc</sup>	0,173 <sup>Cd</sup>	0,948 <sup>Aa</sup>
25	0,003 <sup>Cc</sup>	0,015 <sup>Aa</sup>	0,012 <sup>Bd</sup>	0,051 <sup>Cf</sup>	0,416 <sup>Bb</sup>	0,689 <sup>Ac</sup>
28	0,003 <sup>Bc</sup>	0,005 <sup>Bc</sup>	0,015 <sup>Ab</sup>	0,017 <sup>Bf</sup>	0,025 <sup>Be</sup>	0,485 <sup>Ae</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições.

Tabela 3. Comparação entre as médias da atividade de lacase e MnP, segundo linhagem e dias de incubação, durante crescimento em meio de cultura líquido à base de bagaço de cana-de-açúcar.

Dias	Lacase (UI mL <sup>-1</sup> )			MnP (UI mL <sup>-1</sup> )		
	L17	L22	Leax	L17	L22	Leax
2	0,005 <sup>Ad</sup> *	0,000 <sup>Bd</sup>	0,004 <sup>Aa</sup>	0,013 <sup>Ad</sup>	0,016 <sup>Ac</sup>	0,000 <sup>Be</sup>
4	0,003 <sup>Ad</sup>	0,005 <sup>Ac</sup>	0,002 <sup>Aa</sup>	0,010 <sup>Ad</sup>	0,016 <sup>Ac</sup>	0,000 <sup>Be</sup>
7	0,000 <sup>Be</sup>	0,003 <sup>Ac</sup>	0,000 <sup>Bb</sup>	0,000 <sup>Bd</sup>	0,017 <sup>Ac</sup>	0,000 <sup>Be</sup>
11	0,011 <sup>Aa</sup>	0,000 <sup>Bd</sup>	0,000 <sup>Bb</sup>	0,447 <sup>Aa</sup>	0,000 <sup>Bd</sup>	0,000 <sup>Be</sup>
14	0,013 <sup>Ba</sup>	0,019 <sup>Aa</sup>	0,001 <sup>Ca</sup>	0,301 <sup>Bb</sup>	0,400 <sup>Aa</sup>	0,013 <sup>Ced</sup>
18	0,009 <sup>Bb</sup>	0,017 <sup>Aa</sup>	0,003 <sup>Ca</sup>	0,069 <sup>Bc</sup>	0,222 <sup>Ab</sup>	0,023 <sup>Cd</sup>
22	0,006 <sup>Ad</sup>	0,005 <sup>Ac</sup>	0,000 <sup>Bb</sup>	0,029 <sup>Cc</sup>	0,229 <sup>Bb</sup>	0,425 <sup>Aa</sup>
25	0,005 <sup>Bd</sup>	0,008 <sup>Ab</sup>	0,000 <sup>Cb</sup>	0,003 <sup>Cd</sup>	0,243 <sup>Ab</sup>	0,231 <sup>Ab</sup>
28	0,007 <sup>Ac</sup>	0,004 <sup>Bc</sup>	0,000 <sup>Cb</sup>	0,003 <sup>Bd</sup>	0,000 <sup>Cd</sup>	0,126 <sup>Ac</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições.

Tabela 4. Comparação entre as médias da atividade de lacase e MnP, segundo linhagem e dias de incubação, durante crescimento em meio de cultura líquido à base de casca de arroz.

Dias	Lacase (UI mL <sup>-1</sup> )			MnP (UI mL <sup>-1</sup> )		
	L17	L22	Leax	L17	L22	Leax
2	0,005 <sup>Aa*</sup>	0,004 <sup>Ab</sup>	0,004 <sup>Ac</sup>	0,013 <sup>Ab</sup>	0,014 <sup>Ad</sup>	0,000 <sup>Bd</sup>
4	0,005 <sup>Aa</sup>	0,009 <sup>Ab</sup>	0,005 <sup>Ac</sup>	0,010 <sup>Bb</sup>	0,023 <sup>Ae</sup>	0,000 <sup>Ca</sup>
7	0,000 <sup>Bb</sup>	0,005 <sup>Ab</sup>	0,005 <sup>Ac</sup>	0,006 <sup>Bbc</sup>	0,025 <sup>Ae</sup>	0,000 <sup>Cd</sup>
11	0,000 <sup>Bb</sup>	0,001 <sup>Bc</sup>	0,005 <sup>Ac</sup>	0,090 <sup>Aa</sup>	0,000 <sup>Cf</sup>	0,270 <sup>Bb</sup>
14	0,005 <sup>Aa</sup>	0,001 <sup>Bc</sup>	0,002 <sup>Bcd</sup>	0,000 <sup>Ac</sup>	0,000 <sup>Af</sup>	0,017 <sup>Ac</sup>
18	0,007 <sup>Aa</sup>	0,002 <sup>Bc</sup>	0,002 <sup>Bcd</sup>	0,000 <sup>Ac</sup>	0,000 <sup>Af</sup>	0,000 <sup>Ad</sup>
22	0,006 <sup>Ba</sup>	0,023 <sup>Aa</sup>	0,000 <sup>Ccd</sup>	0,123 <sup>Ca</sup>	0,944 <sup>Aa</sup>	0,609 <sup>Ba</sup>
25	0,007 <sup>Ba</sup>	0,006 <sup>Ba</sup>	0,024 <sup>Aa</sup>	0,090 <sup>Ba</sup>	0,825 <sup>Ab</sup>	0,017 <sup>Cc</sup>
28	0,006 <sup>Ba</sup>	0,002 <sup>Cc</sup>	0,012 <sup>Ab</sup>	0,000 <sup>Bc</sup>	0,298 <sup>Ac</sup>	0,000 <sup>Bd</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições.

Tabela 5. Comparação entre as médias da atividade de lacase e MnP, segundo linhagem e dias de incubação, durante crescimento em meio de cultura líquido à base de bagaço de mandioca.

Dias	Lacase (UI mL <sup>-1</sup> )			MnP (UI mL <sup>-1</sup> )		
	L17	L22	Leax	L17	L22	Leax
2	0,000 <sup>Ae</sup>	0,000 <sup>Ad</sup>	0,000 <sup>Ad</sup>	0,000 <sup>Ae</sup>	0,000 <sup>Ad</sup>	0,000 <sup>Ae</sup>
4	0,000 <sup>Ae</sup>	0,000 <sup>Aad</sup>	0,000 <sup>Ad</sup>	0,000 <sup>Ae</sup>	0,000 <sup>Ad</sup>	0,000 <sup>Ae</sup>
7	0,011 <sup>Ac</sup>	0,000 <sup>Bd</sup>	0,000 <sup>Bd</sup>	0,015 <sup>Ad</sup>	0,010 <sup>Bd</sup>	0,000 <sup>Be</sup>
11	0,005 <sup>Ad</sup>	0,000 <sup>Bd</sup>	0,000 <sup>Bd</sup>	0,984 <sup>Ab</sup>	0,000 <sup>Bd</sup>	0,000 <sup>Be</sup>
14	0,036 <sup>Aa</sup>	0,006 <sup>Bc</sup>	0,000 <sup>Cd</sup>	0,959 <sup>Ab</sup>	0,766 <sup>Ba</sup>	0,000 <sup>Ce</sup>
18	0,017 <sup>Ac</sup>	0,018 <sup>Ab</sup>	0,007 <sup>Ab</sup>	0,310 <sup>Bc</sup>	0,413 <sup>Ac</sup>	0,377 <sup>Ac</sup>
22	0,037 <sup>Aa</sup>	0,028 <sup>Aa</sup>	0,010 <sup>Bab</sup>	0,953 <sup>Ab</sup>	0,671 <sup>Bb</sup>	0,575 <sup>Ca</sup>
25	0,040 <sup>Aa</sup>	0,026 <sup>Ba</sup>	0,021 <sup>Bac</sup>	1,350 <sup>Aa</sup>	0,649 <sup>Bb</sup>	0,423 <sup>Cb</sup>
28	0,027 <sup>Ab</sup>	0,005 <sup>Bc</sup>	0,024 <sup>Aac</sup>	0,315 <sup>Bc</sup>	0,611 <sup>Ab</sup>	0,188 <sup>Cd</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições.

Tabela 6. Comparação entre as médias da atividade de lacase e MnP, segundo linhagem e dias de incubação, durante crescimento em serragem de eucalipto em sistema estacionário.

Dias	Lacase (UI g <sup>-1</sup> )			MnP (UI g <sup>-1</sup> )		
	L17	L22	Leax	L17	L22	Leax
8	0,465 <sup>Aa</sup>	0,234 <sup>Ba</sup>	0,189 <sup>Cb</sup>	9,804 <sup>Ac</sup>	0,700 <sup>Bd</sup>	1,157 <sup>Be</sup>
11	0,013 <sup>Bd</sup>	0,220 <sup>Aa</sup>	0,017 <sup>Bc</sup>	32,230 <sup>Aa</sup>	6,206 <sup>Cb</sup>	17,757 <sup>Ba</sup>
14	0,138 <sup>Cb</sup>	0,185 <sup>Ba</sup>	0,296 <sup>Aa</sup>	14,502 <sup>Ab</sup>	3,441 <sup>Bc</sup>	14,899 <sup>Ab</sup>
17	0,040 <sup>Bc</sup>	0,019 <sup>Ab</sup>	0,028 <sup>Ac</sup>	15,468 <sup>Ab</sup>	5,385 <sup>Cb</sup>	11,226 <sup>Bc</sup>
20	0,040 <sup>Bc</sup>	0,022 <sup>Ab</sup>	0,0026 <sup>Ac</sup>	6,354 <sup>Cd</sup>	10,863 <sup>Aa</sup>	8,581 <sup>Bd</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições.

Tabela 7. Comparação entre as médias da atividade de lacase e MnP, segundo linhagem e dias de incubação, durante crescimento em bagaço de cana-de-açúcar em sistema estacionário.

Dias	Lacase (UI g <sup>-1</sup> )			MnP (UI g <sup>-1</sup> )		
	L 22	L17	Leax	L22	L17	Leax
8	0,095 <sup>Cb</sup>	0,134 <sup>Aa</sup>	0,159 <sup>Bb</sup>	2,848 <sup>Cc</sup>	13,958 <sup>Ab</sup>	5,131 <sup>Bb</sup>
11	0,022 <sup>Aa</sup>	0,013 <sup>Bb</sup>	0,014 <sup>Bc</sup>	0,000 <sup>Cd</sup>	3,545 <sup>Bd</sup>	4,273 <sup>Ab</sup>
14	0,013 <sup>Bc</sup>	0,015 <sup>Bb</sup>	0,257 <sup>Aa</sup>	20,425 <sup>Aa</sup>	17,637 <sup>Ba</sup>	21,298 <sup>Aa</sup>
17	0,000 <sup>Cd</sup>	0,024 <sup>Ac</sup>	0,015 <sup>Bd</sup>	2,908 <sup>Cc</sup>	11,911 <sup>Bb</sup>	21,447 <sup>Aa</sup>
20	0,000 <sup>Cd</sup>	0,026 <sup>Ac</sup>	0,013 <sup>Bd</sup>	5,141 <sup>Bb</sup>	9,745 <sup>Ac</sup>	5,865 <sup>Bb</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições.

Tabela 8. Comparação entre as médias da atividade de lacase e MnP, segundo linhagem e dias de incubação, durante crescimento em casca de arroz em sistema estacionário.

Dias	Lacase (UI g <sup>-1</sup> )			MnP (UI g <sup>-1</sup> )		
	L22	L17	Leax	L22	L17	Leax
8	0,055 <sup>Bb</sup>	0,382 <sup>Aa</sup>	0,000 <sup>Cc</sup>	0,000 <sup>Cd</sup>	0,922 <sup>Ac</sup>	0,100 <sup>Be</sup>
11	0,014 <sup>Bc</sup>	0,104 <sup>Ab</sup>	0,015 <sup>Ba</sup>	0,000 <sup>Bd</sup>	3,545 <sup>Aa</sup>	4,273 <sup>Aa</sup>
14	0,012 <sup>Bc</sup>	0,025 <sup>Ac</sup>	0,013 <sup>Bb</sup>	0,261 <sup>Bc</sup>	0,098 <sup>Cd</sup>	3,361 <sup>Ab</sup>
17	0,115 <sup>Aa</sup>	0,000 <sup>Ce</sup>	0,013 <sup>Bb</sup>	1,941 <sup>Ba</sup>	3,109 <sup>Aa</sup>	2,354 <sup>Bc</sup>
20	0,027 <sup>Ad</sup>	0,013 <sup>Bd</sup>	0,013 <sup>Bb</sup>	1,008 <sup>Bb</sup>	1,246 <sup>Ab</sup>	1,158 <sup>Ad</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições

Tabela 9. Comparação entre as médias da atividade de lacase e MnP, segundo linhagem e dias de incubação, durante crescimento em bagaço de mandioca em sistema estacionário.

Dias	Lacase (UI g <sup>-1</sup> )			MnP (UI g <sup>-1</sup> )		
	L22	L17	Leax	L22	L17	Leax
8	0,028 <sup>Bab</sup>	0,046 <sup>Aa</sup>	0,000 <sup>Ca</sup>	0,359 <sup>Bb</sup>	13,810 <sup>Aa</sup>	0,189 <sup>Ba</sup>
11	0,013 <sup>Ac</sup>	0,014 <sup>Ab</sup>	0,000 <sup>Ba</sup>	4,578 <sup>Ba</sup>	12,384 <sup>Aa</sup>	0,000 <sup>Ca</sup>
14	0,014 <sup>Ac</sup>	0,014 <sup>Ab</sup>	0,000 <sup>Ba</sup>	0,615 <sup>Ab</sup>	0,538 <sup>Bc</sup>	0,000 <sup>Ca</sup>
17	0,014 <sup>Ac</sup>	0,000 <sup>Bb</sup>	0,000 <sup>Ba</sup>	0,000 <sup>Bb</sup>	6,908 <sup>Ab</sup>	0,022 <sup>Ba</sup>
20	0,015 <sup>Abc</sup>	0,000 <sup>Bb</sup>	0,000 <sup>Ba</sup>	0,000 <sup>Ab</sup>	0,174 <sup>Ac</sup>	0,000 <sup>Aa</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições.

Tabela 10. Comparação entre as médias da atividade de enzimas hidrolíticas, segundo linhagem e dias de incubação, durante crescimento em serragem de eucalipto em sistema estacionário.

Enzimas	Linhagens	Dias de incubação				
		8	11	14	17	20
Amilase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	35,54 <sup>Ab</sup>	30,39 <sup>Abc</sup>	40,04 <sup>Aa</sup>	38,78 <sup>Ba</sup>	28,91 <sup>Bc</sup>
	Leax	37,06 <sup>Ab</sup>	34,52 <sup>Ab</sup>	27,46 <sup>Bc</sup>	102,99 <sup>Aa</sup>	12,39 <sup>Ad</sup>
	L22	33,50 <sup>Ab</sup>	15,06 <sup>Bd</sup>	43,39 <sup>Aa</sup>	40,39 <sup>Ba</sup>	23,20 <sup>Bc</sup>
Fpase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	8,58 <sup>Ab</sup>	10,14 <sup>Ab</sup>	4,38 <sup>Ac</sup>	20,44 <sup>Aa</sup>	5,68 <sup>Ab</sup>
	Leax	12,02 <sup>Aa</sup>	15,89 <sup>Aa</sup>	3,31 <sup>Ab</sup>	0,37 <sup>Bb</sup>	6,53 <sup>Ab</sup>
	L22	5,58 <sup>Ab</sup>	1,01 <sup>Ab</sup>	19,58 <sup>Ba</sup>	21,35 <sup>Aa</sup>	1,37 <sup>Bb</sup>
Xilanase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	8,86 <sup>Bc</sup>	19,20 <sup>Ab</sup>	8,62 <sup>Ac</sup>	23,56 <sup>Ba</sup>	8,81 <sup>Ac</sup>
	Leax	23,03 <sup>Ab</sup>	20,91 <sup>Ab</sup>	3,98 <sup>Cc</sup>	124,78 <sup>Aa</sup>	0,48 <sup>Cd</sup>
	L22	5,63 <sup>Cb</sup>	0,73 <sup>Bc</sup>	6,61 <sup>Bb</sup>	27,36 <sup>Ba</sup>	6,11 <sup>Bb</sup>
CMCase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	52,67 <sup>Aa</sup>	37,74 <sup>Bb</sup>	23,84 <sup>Bc</sup>	40,93 <sup>Bb</sup>	15,50 <sup>Cd</sup>
	Leax	23,15 <sup>Bd</sup>	52,89 <sup>Ab</sup>	21,46 <sup>Bd</sup>	103,56 <sup>Aa</sup>	36,36 <sup>Ac</sup>
	L22	25,03 <sup>Bc</sup>	20,90 <sup>Cd</sup>	43,08 <sup>Aa</sup>	33,90 <sup>Cb</sup>	29,79 <sup>Bb</sup>
Pectinase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	88,56 <sup>Aa</sup>	74,35 <sup>Ab</sup>	53,12 <sup>Ac</sup>	57,11 <sup>Bc</sup>	47,57 <sup>Bc</sup>
	Leax	67,95 <sup>Bb</sup>	49,70 <sup>Bc</sup>	51,75 <sup>Ac</sup>	104,41 <sup>Aa</sup>	31,28 <sup>Cd</sup>
	L22	55,92 <sup>Cc</sup>	35,49 <sup>Cd</sup>	52,21 <sup>Ac</sup>	70,96 <sup>Ca</sup>	62,95 <sup>Ab</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições.

Tabela 11. Comparação entre as médias da atividade de enzimas hidrolíticas, segundo linhagem e dias de incubação, durante crescimento em bagaço de cana-de-açúcar em sistema estacionário.

Enzimas	Linhagens	Dias de incubação				
		8	11	14	17	20
Amilase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	48,669 <sup>Aa</sup>	33,364 <sup>Ab</sup>	29,695 <sup>Ab</sup>	22,841 <sup>Cc</sup>	21,597 <sup>Ac</sup>
	Leax	48,729 <sup>Aa</sup>	34,261 <sup>Ab</sup>	21,389 <sup>Bc</sup>	31,273 <sup>Bb</sup>	17,393 <sup>Ac</sup>
	L22	33,193 <sup>Ba</sup>	23,106 <sup>Bb</sup>	33,049 <sup>Aa</sup>	42,192 <sup>Ac</sup>	26,695 <sup>Ab</sup>
Fpase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	19,022 <sup>Aa</sup>	16,837 <sup>Aa</sup>	13,289 <sup>Ab</sup>	4,652 <sup>Bc</sup>	2,891 <sup>Ac</sup>
	Leax	18,935 <sup>Aa</sup>	1,819 <sup>Bb</sup>	2,345 <sup>Bb</sup>	4,635 <sup>Bb</sup>	4,276 <sup>Ab</sup>
	L22	3,336 <sup>Bb</sup>	2,783 <sup>Bb</sup>	4,843 <sup>Bb</sup>	23,574 <sup>Aa</sup>	4,706 <sup>Ab</sup>
Xilanase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	24,699 <sup>Ab</sup>	40,214 <sup>Aa</sup>	10,935 <sup>Ac</sup>	6,177 <sup>Cd</sup>	3,626 <sup>Ad</sup>
	Leax	23,739 <sup>Aa</sup>	14,748 <sup>Bb</sup>	0,482 <sup>Ce</sup>	9,811 <sup>Bc</sup>	3,872 <sup>Ad</sup>
	L22	5,599 <sup>Bb</sup>	2,647 <sup>Cb</sup>	4,111 <sup>Bb</sup>	28,288 <sup>Aa</sup>	5,295 <sup>Ab</sup>
CMCase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	41,151 <sup>Aa</sup>	75,863 <sup>Aa</sup>	36,704 <sup>Bb</sup>	13,066 <sup>Cc</sup>	12,571 <sup>Bc</sup>
	Leax	34,609 <sup>Bb</sup>	72,024 <sup>Aa</sup>	38,360 <sup>Ab</sup>	24,190 <sup>Bc</sup>	10,047 <sup>Bd</sup>
	L22	20,380 <sup>Cc</sup>	20,566 <sup>Bc</sup>	38,587 <sup>Ab</sup>	44,197 <sup>Aa</sup>	21,711 <sup>Ac</sup>
Pectinase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	70,939 <sup>Ab</sup>	82,946 <sup>Aa</sup>	57,436 <sup>Bc</sup>	51,424 <sup>Bc</sup>	40,303 <sup>Bd</sup>
	Leax	73,158 <sup>Aa</sup>	75,457 <sup>Ba</sup>	47,299 <sup>Ac</sup>	55,447 <sup>Bb</sup>	43,364 <sup>Bc</sup>
	L22	45,039 <sup>Bcd</sup>	43,314 <sup>Cd</sup>	48,246 <sup>Ac</sup>	64,820 <sup>Aa</sup>	57,041 <sup>Ab</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições.

Tabela 12. Comparação entre as médias da atividade de enzimas hidrolíticas, segundo linhagem e dias de incubação, durante crescimento em casca de arroz em sistema estacionário.

Enzimas	Linhagens	Dias de incubação				
		8	11	14	17	20
Amilase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	54,182 <sup>Aa</sup>	32,593 <sup>Ab</sup>	28,340 <sup>Bc</sup>	25,381 <sup>Ac</sup>	21,231 <sup>Ac</sup>
	Leax	57,171 <sup>Aa</sup>	18,634 <sup>Cd</sup>	40,980 <sup>Ab</sup>	21,373 <sup>Ad</sup>	24,002 <sup>Ac</sup>
	L22	31,084 <sup>Bb</sup>	37,626 <sup>Ba</sup>	38,213 <sup>Aa</sup>	22,119 <sup>Ac</sup>	17,581 <sup>Ad</sup>
FPase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	27,772 <sup>Aa</sup>	13,479 <sup>Ab</sup>	7,655 <sup>Ac</sup>	10,404 <sup>Ac</sup>	4,062 <sup>Ad</sup>
	Leax	19,723 <sup>Ba</sup>	0,386 <sup>Bd</sup>	5,641 <sup>Bb</sup>	5,502 <sup>Bb</sup>	1,806 <sup>Bc</sup>
	L22	5,361 <sup>Cc</sup>	11,010 <sup>Aa</sup>	9,603 <sup>Ab</sup>	2,556 <sup>Bc</sup>	0,563 <sup>Bd</sup>
Xilanase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	33,156 <sup>Aa</sup>	13,643 <sup>Ab</sup>	8,079 <sup>Ac</sup>	12,970 <sup>Ab</sup>	6,047 <sup>Bc</sup>
	Leax	27,924 <sup>Ba</sup>	0,463 <sup>Cc</sup>	1,900 <sup>Bc</sup>	5,491 <sup>Cb</sup>	2,498 <sup>Cb</sup>
	L22	7,571 <sup>Cc</sup>	3,127 <sup>Bd</sup>	1,689 <sup>Bd</sup>	17,935 <sup>Ba</sup>	12,039 <sup>Ab</sup>
CMCase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	40,835 <sup>Bb</sup>	66,228 <sup>Aa</sup>	35,454 <sup>Ac</sup>	31,049 <sup>AcD</sup>	25,418 <sup>Ad</sup>
	Leax	38,644 <sup>Bb</sup>	58,542 <sup>Ba</sup>	39,279 <sup>Ab</sup>	18,199 <sup>Bd</sup>	26,759 <sup>Ac</sup>
	L22	52,339 <sup>Aa</sup>	20,116 <sup>Cc</sup>	28,006 <sup>Bb</sup>	20,293 <sup>Bc</sup>	19,091 <sup>Bc</sup>
Pectinase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	76,331 <sup>Aa</sup>	59,898 <sup>Ab</sup>	37,299 <sup>Bc</sup>	17,420 <sup>Bd</sup>	11,320 <sup>Be</sup>
	Leax	70,310 <sup>Ba</sup>	45,487 <sup>Cb</sup>	47,786 <sup>Ab</sup>	48,883 <sup>Ab</sup>	47,300 <sup>Ab</sup>
	L22	55,182 <sup>Ca</sup>	51,214 <sup>Ba</sup>	31,099 <sup>Bb</sup>	16,772 <sup>Bc</sup>	7,013 <sup>Cd</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições.



Tabela 13. Comparação entre as médias da atividade de enzimas hidrolíticas, segundo linhagem e dias de incubação, durante crescimento em bagaço de mandioca em sistema estacionário.

Enzimas	Linhagens	Dias de incubação				
		8	11	14	17	20
Amilase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	50,619 <sup>Ab</sup>	57,439 <sup>Aa</sup>	34,717 <sup>Ac</sup>	36,572 <sup>Ac</sup>	31,370 <sup>Ac</sup>
	Leax	51,836 <sup>Aa</sup>	6,465 <sup>Cd</sup>	28,340 <sup>Bc</sup>	41,482 <sup>Bb</sup>	43,144 <sup>Bb</sup>
	L22	30,191 <sup>Bb</sup>	18,521 <sup>Bd</sup>	27,697 <sup>Bc</sup>	28,857 <sup>Cbc</sup>	42,966 <sup>Ba</sup>
Fpase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	24,699 <sup>Ab</sup>	44,302 <sup>Aa</sup>	8,818 <sup>Cd</sup>	15,626 <sup>Ac</sup>	8,208 <sup>Bd</sup>
	Leax	20,201 <sup>Bb</sup>	6,210 <sup>Bc</sup>	16,169 <sup>Ac</sup>	5,706 <sup>Bc</sup>	37,921 <sup>Aa</sup>
	L22	25,270 <sup>Aa</sup>	2,603 <sup>Bc</sup>	23,307 <sup>Ba</sup>	7,444 <sup>Bb</sup>	7,475 <sup>Bb</sup>
Xilanase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	33,796 <sup>Ab</sup>	49,912 <sup>Aa</sup>	9,010 <sup>Bd</sup>	18,597 <sup>Ac</sup>	13,751 <sup>Bd</sup>
	Leax	27,495 <sup>Ba</sup>	3,618 <sup>Bd</sup>	20,600 <sup>Ab</sup>	14,831 <sup>Bc</sup>	25,184 <sup>Aa</sup>
	L22	23,898 <sup>Ba</sup>	0,394 <sup>Cd</sup>	19,473 <sup>Aab</sup>	15,749 <sup>Bb</sup>	9,347 <sup>Bc</sup>
CMCase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	52,958 <sup>Ab</sup>	59,065 <sup>Aa</sup>	30,352 <sup>Ad</sup>	34,388 <sup>Ad</sup>	43,832 <sup>Ac</sup>
	Leax	38,881 <sup>Cb</sup>	43,390 <sup>Ba</sup>	23,654 <sup>Bc</sup>	34,829 <sup>Ab</sup>	47,892 <sup>Aa</sup>
	L22	46,836 <sup>Ba</sup>	24,838 <sup>Cb</sup>	28,971 <sup>Ab</sup>	23,758 <sup>Bb</sup>	42,966 <sup>Aa</sup>
Pectinase (UI g <sup>-1</sup> )	L17	63,094 <sup>Bc</sup>	85,340 <sup>Aa</sup>	51,450 <sup>Bd</sup>	48,395 <sup>Cd</sup>	72,953 <sup>Bb</sup>
	Leax	75,789 <sup>Ab</sup>	35,596 <sup>Be</sup>	54,220 <sup>Bd</sup>	63,953 <sup>Ac</sup>	130,824 <sup>Aa</sup>
	L22	65,796 <sup>Ba</sup>	36,208 <sup>Bc</sup>	67,627 <sup>Aa</sup>	53,911 <sup>Bb</sup>	53,802 <sup>Cb</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições.

Tabela 14. Comparação entre as médias da atividade de lacase e MnP, segundo linhagem e dias de incubação em substrato à base de serragem de eucalipto, durante crescimento em bioreator do tipo RDR.

Dias	Lacase (UI g <sup>-1</sup> )			MnP (UI g <sup>-1</sup> )		
	L22	L17	Leax	L22	L17	Leax
8	0,145 <sup>Ab</sup>	0,095 <sup>Ba</sup>	0,135 <sup>Aa</sup>	12,958 <sup>Bc</sup>	10,219 <sup>Cc</sup>	22,557 <sup>Aa</sup>
11	0,133 <sup>Ac</sup>	0,049 <sup>Bb</sup>	0,065 <sup>Bb</sup>	15,055 <sup>Bb</sup>	15,641 <sup>Bb</sup>	21,906 <sup>Aa</sup>
14	0,156 <sup>Aa</sup>	0,025 <sup>Cc</sup>	0,064 <sup>Bb</sup>	27,742 <sup>Aa</sup>	5,866 <sup>Bd</sup>	2,409 <sup>Cb</sup>
17	0,032 <sup>Ad</sup>	0,005 <sup>Cd</sup>	0,080 <sup>Bc</sup>	0,497 <sup>Bd</sup>	25,048 <sup>Aa</sup>	0,450 <sup>Bc</sup>
20	0,075 <sup>Ad</sup>	0,000 <sup>Cd</sup>	0,040 <sup>Bb</sup>	0,512 <sup>Cd</sup>	3,395 <sup>Ae</sup>	0,726 <sup>Bc</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições

Tabela 15. Comparação entre as médias da atividade de enzimas hidrolíticas, segundo linhagem e dias de incubação em substrato à base de serragem de eucalipto, durante crescimento em bioreator do tipo RDR.

Enzimas	Linhagens	Dias de incubação				
		8	11	14	17	20
Amilase (UI g <sup>-1</sup> )	L22	2,155 <sup>Cd</sup>	4,276 <sup>Cb</sup>	4,624 <sup>Bb</sup>	3,077 <sup>Cc</sup>	5,138 <sup>Ba</sup>
	L17	8,765 <sup>Ab</sup>	8,027 <sup>Ac</sup>	7,650 <sup>Ac</sup>	9,673 <sup>Aa</sup>	6,465 <sup>Ad</sup>
	Leax	6,259 <sup>Bb</sup>	5,713 <sup>Bb</sup>	7,545 <sup>Aa</sup>	5,922 <sup>Bb</sup>	4,438 <sup>Cc</sup>
Fpase (UI g <sup>-1</sup> )	L22	0,388 <sup>Bb</sup>	1,247 <sup>Ba</sup>	0,103 <sup>Cd</sup>	0,213 <sup>Cd</sup>	0,298 <sup>Bc</sup>
	L17	3,726 <sup>Aa</sup>	3,272 <sup>Aa</sup>	3,333 <sup>Aa</sup>	3,364 <sup>Aa</sup>	2,221 <sup>Ab</sup>
	Leax	0,466 <sup>Bb</sup>	0,076 <sup>Cc</sup>	0,944 <sup>Ba</sup>	1,115 <sup>Ba</sup>	1,306 <sup>Aa</sup>
Xilanase (UI g <sup>-1</sup> )	L22	0,123 <sup>Bc</sup>	1,237 <sup>Bb</sup>	2,973 <sup>Ba</sup>	0,088 <sup>Cc</sup>	0,145 <sup>Cc</sup>
	L17	4,972 <sup>Ab</sup>	4,936 <sup>Ab</sup>	5,887 <sup>Aa</sup>	4,917 <sup>Ab</sup>	3,220 <sup>Ac</sup>
	Leax	4,716 <sup>Aa</sup>	4,589 <sup>Aa</sup>	2,889 <sup>Bb</sup>	2,888 <sup>Bb</sup>	1,778 <sup>Bc</sup>
CMCase (UI g <sup>-1</sup> )	L22	0,730 <sup>Cc</sup>	0,895 <sup>Cc</sup>	4,509 <sup>Aa</sup>	2,459 <sup>Ab</sup>	3,161 <sup>Ab</sup>
	L17	3,301 <sup>Ba</sup>	3,896 <sup>Ba</sup>	4,549 <sup>Aa</sup>	3,110 <sup>Aa</sup>	2,610 <sup>Ba</sup>
	Leax	6,856 <sup>Ab</sup>	10,130 <sup>Aa</sup>	4,528 <sup>Ac</sup>	4,720 <sup>Ac</sup>	3,267 <sup>Ad</sup>
Pectinase (UI g <sup>-1</sup> )	L22	6,202 <sup>Bd</sup>	6,792 <sup>Bd</sup>	8,944 <sup>Ba</sup>	7,512 <sup>Bc</sup>	8,355 <sup>Bb</sup>
	L17	7,718 <sup>Aa</sup>	7,194 <sup>Bb</sup>	6,708 <sup>Cb</sup>	7,263 <sup>Bb</sup>	6,798 <sup>Cb</sup>
	Leax	8,021 <sup>Ac</sup>	10,188 <sup>Aa</sup>	12,772 <sup>Aa</sup>	10,369 <sup>Aa</sup>	11,083 <sup>Ab</sup>

\*Letras maiúsculas: Para cada dia de incubação, linhagens representadas pela média seguida de mesma de letra não diferem significativamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills.

Letras minúsculas: Para cada linhagem, dias de incubação representados pela média seguida de mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Student-Newman-Kills. Médias referentes a 3 repetições

**ATIVIDADE DE ENZIMAS OXIDATIVAS DO *Lentinula edodes* EM MEIO DE CULTURA  
LÍQUIDO DE SUBPRODUTOS ENERGÉTICOS<sup>1</sup>**

Magali Regina (**Regina, M.**) – Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Unesp, Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, [magaregina@hotmail.com](mailto:magaregina@hotmail.com)

Fernando Broetto (**Broetto, F.**) – Prof. Dr. do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Unesp, Rubião Júnior, s/nº, Botucatu, São Paulo, [broetto@ibb.unesp.br](mailto:broetto@ibb.unesp.br)

<sup>1</sup> Trabalho extraído de tese defendida, exclusivamente, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Energia na Agricultura

## RESUMO

O cultivo de cogumelos comestíveis, em subprodutos energéticos, representa o principal exemplo da conversão direta de resíduos lignocelulósicos em um artigo com alto valor agregado, com benefício para o gênero humano e uma fonte de energia biosintética comercialmente importante. O objetivo do trabalho foi verificar a atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* crescendo em meio de cultura líquido à base de resíduos agrícolas. As linhagens LE 95/17, LE 96/22 e Leax foram incubadas em meio de cultura líquido à base de de casca de arroz (CA), serragem de eucalipto (SE), bagaço de mandioca (BM) e bagaço de cana-de-açúcar (BC), suplementado com 20% de farelo de arroz e 1% de CaCO<sub>3</sub>. Foram analisadas as enzimas oxidativas durante o período de crescimento. As linhagens de *L. edodes* LE 95/17, LE 96/22 e Leax têm atividade de MnP superior à atividade de lacase. As linhagens em meio de cultura líquido não apresentaram atividades expressivas de manganês peroxidase e lacase. A lignina peroxidase não foi detectada em nenhum dos experimentos.

Palavras-chave: shiitake, resíduos, enzimas.

## SUMMARY

OXIDATIVE ENZYMES ACTIVITY OF *Lentinula edodes* IN LIQUID CULTURE MEDIUM OF ENERGETIC WASTES

The cultivation of mushrooms in by-products represents the main example of the direct conversion of lignocellulosic residues in an article with high attached value with benefit for the mankind and source of commercially important biosynthetic energy. The aim of this work was verify the activity of the *Lentinula edodes* oxidative enzymes growing in liquid medium of agricultural residues. The LE 17/95, LE 22/96 and Leax strains were incubated in liquid medium composed of peel of rice (PR), eucalyptus sawdust (ES), cassava bagasse (CB) and sugar cane bagasse (SB), supplemented with 20% of rice brans and 1% of CaCO<sub>3</sub>. The strains LE17/95, LE 22/96 and Leax had higher MnP activity than lacase. The oxidative enzymes were evaluated during the growth. The strains in liquid culture medium don't presented expressive activities of manganese peroxidase (MnP) and laccase. The lignin peroxidase was not detected in the experiments.

Keywords: shiitake, wastes, enzymes.

## 9. INTRODUÇÃO

O cogumelo *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler, conhecido popularmente como shiitake, cresce como saprófita em madeiras de árvores de copas largas e forma corpos de frutificação à temperaturas baixas (15 a 20°C) e sob condições de alta umidade relativa (80 a 90%). A espécie é classificada como pertencente à Classe dos Basidiomycetes (Holobasidiomycetes), Ordem Agaricales, Família Tricholomataceae (Agaricaceae). Este cogumelo comestível é o mais difundido na China e o segundo mais consumido no mundo (ZHANXI & ZHANHUA, 1995).

O shiitake possui sabor característico, acompanhado de alto valor nutricional. Esta propriedade inclui fontes de proteína, vitaminas do complexo B e sais minerais (COCHARAN, 1978). Além disso, possui substâncias com propriedades medicinais antimicrobianas, antitumorais e atua na redução do colesterol (LEATHAM, 1982). Estes atributos promoveram, também, um aumento do seu

consumo nas últimas décadas e há a expectativa de se continuar em ascensão. A produção em 1983 era estimada em 207.000 t e em 1997 chegou a 1.573.000 t (CHANG, 1999, 2002). Segundo Royse & Sanchez-Vasques (2003) a produção de shiitake teve um aumento sete vezes maior em 14 anos.

O *L. edodes* pertence a um grupo do tipo fungo de podridão branca, os quais são conhecidos pela eficiente capacidade de degradação de compostos lignocelulósicos na natureza, principalmente a madeira. O sistema de degradação da lignina por estes fungos tem aplicações potenciais no biobranqueamento (ONYSKO, 1993; REID & PAICE, 1994; MESSNER & STREBOTNIK, 1994) e na biodegradação de poluentes (FIELD, 1993; BARR & AUST, 1994). Entre as enzimas extracelulares do sistema enzimático do *L. edodes* estão a lacase e a manganês peroxidase (HATVANI & MÉCS, 2003).

A utilização de outros substratos além da serragem, como os substratos de subprodutos energéticos oriundos das agroindústrias, no cultivo axênico é uma alternativa perfeitamente possível uma vez que o micélio do shiitake é apto a crescer em uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos.

Nos últimos anos tem ocorrido um interesse maior na utilização eficiente de resíduos agroindustriais (PANDEY et al., 1999; ROSALES et al., 2002). Muitos processos têm sido desenvolvidos baseados nesses materiais como substratos em bioprocessos para produção de proteínas isoladas, ácidos orgânicos, etanol, cogumelos comestíveis, enzimas e metabólitos secundários biologicamente importantes (PANDEY et al., 1999; MASSADEH et al., 2001; LAUFENBERG et al., 2003). O uso destes resíduos agrícolas em bioprocessos pode prover substratos alternativos e além disso auxilia na resolução de problemas ambientais, os quais são diferentemente causados por sua disposição (REDDY, 2003).

As enzimas de fungos têm se mostrado úteis na degradação de uma variedade de persistentes poluentes ambientais. Muitas dessas enzimas são extracelulares, e na natureza provavelmente estão envolvidas na degradação da madeira (MAYER & STAPLES, 2002).

Os estudos, em meio de cultura líquido, comprovaram a degradação de 2,4,6-triclorofenol pelos fungos de podridão branca *Panus tigrinus* e *Coriolus versicolor*. Em culturas de *P. Tigrinus* foi catalizado predominantemente por MnP enquanto em *C. Versicolor* por lacase, sugerindo que o modo de regulação destas enzimas foi diferente nestes dois fungos (LEONTIEVSKY et al., 2000).

A bioremediação de efluentes industriais também tem sido pesquisada utilizando fungos de podridão branca, verificando-se a capacidade destes fungos na descoloração e descontaminação de efluentes. As enzimas encontradas, nestes casos, foram em grande parte representadas pela presença de lacase, MnP e LiP confirmando, mais uma vez, o potencial dessas enzimas (MAYER & STAPLES, 2002).

O desenvolvimento da habilidade ligninolítica requer condições nutricionais e culturais, incluindo substrato metabolizável, altos níveis de oxigênio, um limite de nitrogênio e várias outras condições de cultivo (KIRK & FARRELL, 1987; BUSWELL, 1991). Além disso, os tipos e quantidades de enzimas, que podem ser produzidas para a transformação de alguns constituintes ligninosos em formas absorvíveis, são atualmente definidos pelo genótipo específico do fungo associado à adaptação a um determinado substrato de crescimento (SHEARER, 1995).

A necessidade de estudos referentes a atividade das enzimas lignocelulolíticas, em linhagens de *L. edodes* utilizadas no Brasil, relacionadas ao resíduo agroindustrial e a produção de shiitake constitui-se uma importante linha de pesquisa, não somente, para compreender a atividade enzimática do *L. edodes*, sob determinadas condições, mas, se possível, gerar resultados básicos para pesquisas biotecnológicas futuras.

No Brasil, as pesquisas com as linhagens utilizadas para o cultivo do *L. edodes* tem gerado resultados importantes para o processo de produção e aumento de produtividade. Porém a forte relação existente entre o substrato e a atividade enzimática, expressa geneticamente, define a importância de se pesquisar de forma mais profunda a atividade enzimática do *L. edodes* relacionada às várias fases do seu desenvolvimento sobre diferentes substratos.

A possibilidade de uso dos resíduos agroindustriais como substrato para cultivo de cogumelos é uma atraente opção. Porém faz-se necessário pesquisas que possam garantir a exeqüibilidade de sua utilização. Neste sentido, estudos direcionados à degradação, pelo *L. edodes*, poderão contribuir na compreensão do seu sistema enzimático, o qual exerce função primordial no seu desenvolvimento.

O presente trabalho teve por objetivo verificar a atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* durante crescimento em meio de cultura líquido à base de subprodutos energéticos .

## 10. MATERIAL E MÉTODOS

### 10.1. Obtenção das linhagens de *L. edodes*

As linhagens LE 95/17 (L17), LE 96/22 (L22) e Leax de *L. edodes* foram fornecidas pela Micoteca do Módulo de Cogumelos do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP - Campus de Botucatu, São Paulo.

### 10.2. Obtenção dos resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais utilizados durante os experimentos tiveram as seguintes procedências:

- Bagaço de cana-de-açúcar - fornecido pela Usina de Açúcar de Barra Bonita – São Paulo;
- Bagaço de mandioca - do Centro de Estudos de Raízes Tropicais da Unesp /Botucatu, São Paulo;
- Casca de arroz - da beneficiadora de arroz da Fazenda Lageado da Unesp /Botucatu, São Paulo.
- Serragem de eucalipto - foi utilizado do Departamento de Agrobiologia e Agrochimica - Università Degli Studi Della Tuscia (Viterbo – Itália), oriundo da produção local.



### 10.3. Multiplicação das linhagens de *L. edodes*

Antecedendo as instalações dos experimentos, fez-se a inoculação das linhagens em meio de cultura a base de serragem de eucalipto, garantindo assim material suficiente para todas as fases da pesquisa.

Primeiramente, preparou-se 200g de substrato composto (matéria seca) de, 79% de serragem de eucalipto, 20% de farelo arroz e 1% de CaCO<sub>3</sub>. Adicionou-se água destilada para obtenção da umidade a 60% e em seguida, foram autoclavados por 30 minutos a 120°C (1atm).

Depois do substrato de serragem de eucalipto ser autoclavado, preparou-se o seu extrato adicionando-se 1 L de água destilada e em seguida, colocou-se para aquecer. Após 20 minutos em ebulição, a mistura foi coada em algodão e o extrato recebeu 10g L<sup>-1</sup> de dextrose e 15g L<sup>-1</sup> de ágar. Completou-se o volume a 1 L no Erlenmeyer e em seguida, o extrato foi autoclavado à 120° C (1 atm), por 30 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri e em tubos de ensaio, sendo estes últimos, mantidos inclinados para polimerização.

Cada placa de Petri e cada tubo de ensaio foi inoculado com uma determinada linhagem, devidamente identificado e incubado em câmara de crescimento, no escuro, a temperatura de 25°C.

### 10.4. Protocolo de preparação dos substratos para instalação dos experimentos

Os substratos foram compostos, em todas as fases experimentais, de 40% de material lignocelulósico com umidade corrigida à 60%. Na composição de 40% do material lignocelulósico adicionou-se farelo de arroz e carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), conforme descrito abaixo:

- **BM** = 79% bagaço de mandioca + 20% farelo de arroz + 1% de CaCO<sub>3</sub>
- **CA** = 79% casca de arroz + 20% farelo de arroz + 1% de CaCO<sub>3</sub>
- **SE** = 79% serragem de eucalipto + 20% farelo de arroz + 1% de CaCO<sub>3</sub>

➤ **BC** = 79% bagaço de cana-de-açúcar + 20% farelo de arroz + 1% de  $\text{CaCO}_3$

## **10.5. Determinação da atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* durante crescimento em meio de cultura líquido**

A análise enzimática, durante incubação em meio líquido, foi realizada através de uma fase inicial de adaptação em meio líquido, sendo posteriormente instalado o experimento.

### **10.5.1. Adaptação das linhagens de *L. edodes* ao meio de cultura líquido**

Inicialmente preparou-se cada substrato na quantidade de 100 g, conforme protocolo descrito no ítem 2.4. Após autoclavagem, preparou-se o extrato pela adição de 500 mL de água destilada, seguido de fervura por 20 min. Ao final, o extrato foi coado em algodão e armazenado para utilização posterior.

O meio de cultura líquido foi preparado com o extrato coado, adicionando-se  $10 \text{ g L}^{-1}$  de dextrose. Transferiu-se 250 mL de cada extrato para Erlenmeyers de 500 mL, os quais foram autoclavados à  $120^\circ \text{C}$  (1 atm), por 30 minutos.

A inoculação foi feita com as linhagens mantidas em tubo de ensaio (ítem 2.3). Antes deste procedimento, adicionou-se água destilada dentro do tubo de ensaio, cobrindo totalmente o micélio crescido, e posteriormente este foi mixado com o auxílio de um Ultra-Turrax (IKA-Werk, Darmstadt Germania), por aproximadamente 10 segundos.

Cada Erlenmeyer com os meios líquidos de um determinado substrato recebeu 2 mL de inóculo de uma determinada linhagem, em câmara de fluxo laminar. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em agitador com rotação orbital (150 rpm) e temperatura controlada à  $25^\circ \text{C}$ , durante uma semana no escuro. Após este período, a massa miceliana obtida, foi utilizada como fonte de inóculo da fase seguinte.

### 10.5.2. Instalação do experimento em meio de cultura líquido

Para instalação deste experimento foram preparados novos meios de cultura líquidos, de cada substrato proposto, conforme descrito em 2.5.1. Em Erlenmeyers de 500 mL, foram colocados 200 mL de meio de cultura líquido de cada substrato e autoclavados a 120° C (1 atm) por 30 minutos.

Após a autoclavagem, os meios líquidos foram inoculados com as linhagens, do mesmo tratamento, já adaptadas conforme item 2.5.1. e postos para incubar em agitador com rotação orbital (150 rpm), no escuro, e temperatura controlada à 25°C.

As coletas para as análises enzimáticas foram feitas aos 2, 4, 7, 11, 14, 18, 22, 25, e 28 dias após a inoculação. Inicialmente as amostras foram coletadas em eppendorf e centrifugadas (10.000 rpm) por 5 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para as análises enzimáticas.

O delineamento estatístico adotado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições num esquema fatorial 4x3.

### 10.5.3. Análise da atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* no meio de cultura líquido

A atividade da lacase foi determinada espectrofotometricamente utilizando-se 2,6 dimetoxifenol (DMOP) como substrato (Slomczynsky et al., 1995). O volume total de reação (1 mL) foi composto por 2 mM DMOP, em tampão acetato 0,1 M (pH 4.2) e 5 µl de amostra. A oxidação do DMOP foi seguida em cinética a 30°C, sendo a leitura feita a 477 nm ( $\epsilon_{477} = 14600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

A atividade da manganês peroxidase (MnP) foi determinada pelo método de Waarishi et al. (1992). O volume de reação (1 mL) foi composto por 0,1 mM MnSO<sub>4</sub>; 10 µl de amostra em tampão malonato 50 mM pH 4.5 e 75 µM de peróxido de hidrogênio. A formação do complexo quelado de Mn(III)-malonato foi seguida em cinética a 30 °C, por 1 minuto, medindo o aumento da absorbância a 270 nm ( $\epsilon_{270} = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Para a determinação da lignina peroxidase (LiP), foi medido a formação no tempo de veratrilaldeído (3,4 dimetoxibenzaldeído). O volume de reação (1 mL) foi composto por 0.4 mM de álcool veratril em tampão tartarato 0,1 M pH 3.0; 0,2 mM de peróxido de hidrogênio e volume necessário de amostra. A atividade foi seguida em cinética a 30°C, medindo absorção a 310 nm ( $\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Todas as determinações enzimáticas foram efetuadas com 3 repetições por tratamento.

#### **10.6. Análise Estatística**

A metodologia estatística utilizada para avaliar os experimentos seguiu um modelo de regressão não linear. Para a comparação dos parâmetros foi feita a análise de variância não paramétrica com aplicação do teste de Kruskal-Wallis. Nos casos em que houve diferença significativa foi aplicado o teste de Student-Newman-Kills (SNK) ao nível de 5 % de significância.

## **11. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **11.1. Determinação da atividade de enzimas oxidativas de *L. edodes* durante crescimento em meio de cultura líquido**

Nos ensaios realizados, detectou-se atividade da MnP e lacase em cultura líquida de *L. edodes*. No entanto, para o mesmo experimento, a enzima LiP não apresentou atividade detectável.

Estes resultados concordam com os observados por Kaal et al. (1995); Orth et al. (1993); Masaphy & Levanon (1992); Waldner et al. (1988); Leatham & Stahmann (1981)

Entretanto, Mishra & Leatham (1990) encontraram atividade positiva da LiP em proteínas fracionadas de fluidos extracelulares de *L. edodes*.

Embora não tenha sido detectada atividade de LiP no presente experimento, não se pode descartar completamente a sua ausência, pois são vários os fatores que contribuem para a ativação do sistema lignocelulolítico como condições nutricionais e culturais, substrato metabolizável, altos níveis de oxigênio, limite de nitrogênio e várias outras condições de cultivo (KIRK & FARRELL, 1987; BUSWELL, 1991).

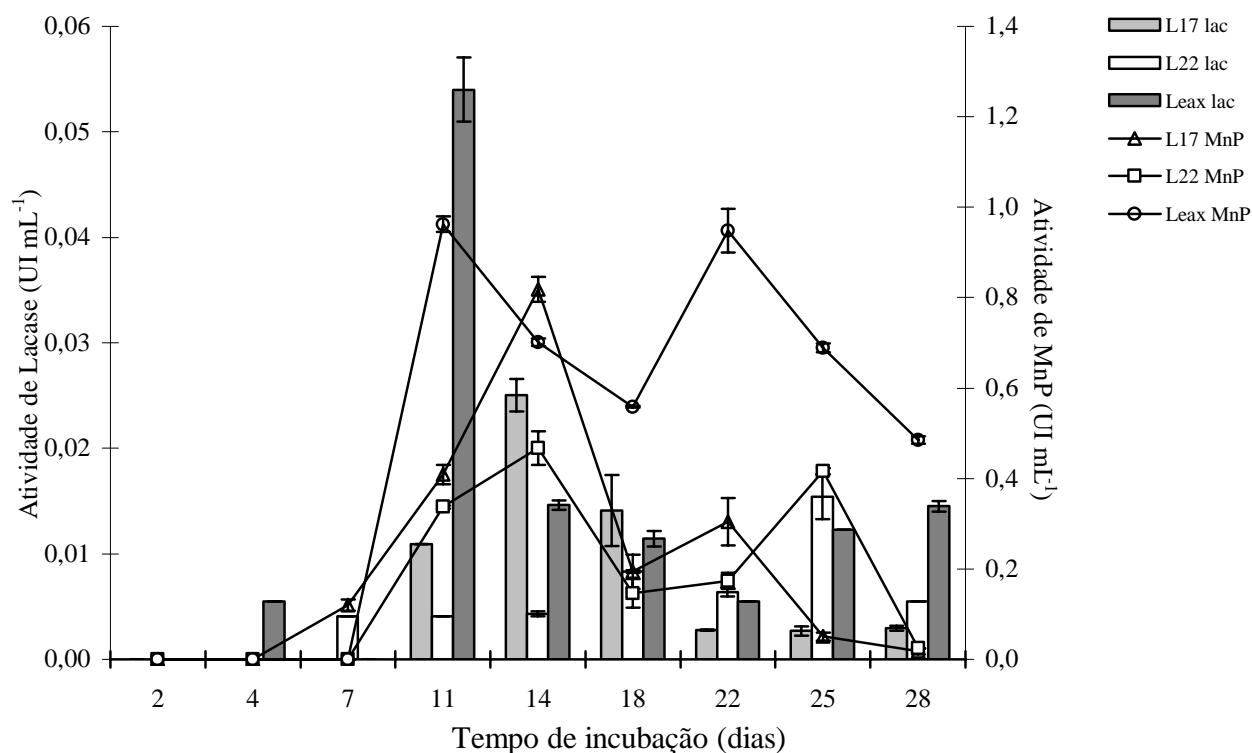
Além disso, os tipos e quantidades de enzimas são também definidos pelo genótipo específico do fungo associado à adaptação a um determinado substrato de crescimento (SHEARER, 1995).

#### **11.1.1. Atividade de enzimas oxidativas em meio de cultura líquido à base de serragem de eucalipto**

As linhagens Leax e L22 apresentaram dois pontos máximos de produção de MnP, sendo um deles coincidentes com a atividade máxima de lacase (Figura 1). Enquanto L17 apresentou apenas um ponto de atividade máxima coincidente para as duas enzimas.

Verificou-se que apenas a partir do 11º dia as linhagens produziram maior atividade lacase e MnP. Até o final de incubação a atividade das duas enzimas apresentou diferença significativa de atividade, exceto no 18º dia entre Leax e L17 na atividade lacásica e entre L17 e L22 na atividade de MnP. No 28º dia não ocorreu diferença estatística de atividade, tanto de lacase e quanto de MnP, entre L17 e L22.

Em serragem, as linhagens estudadas mostraram as atividades enzimáticas concentradas, principalmente, no tempo médio do período de incubação. No final da incubação, no 28º dia, ocorreu a diminuição da atividade da lacase e da MnP. Exceto para Leax que terminou com atividade de lacase com 0,015 UI mL<sup>-1</sup> significativamente maior que L17 e L22.



**Figura 1.** Atividades de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em meio de cultura líquido à base de serragem de eucalipto. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

### 11.1.2. Atividade de enzimas oxidativas em meio de cultura líquido à base de bagaço de cana-de-açúcar

No meio líquido BC (Figura 2), ao contrário de SE as linhagens apresentaram atividade lacásica durante os primeiros dias de incubação

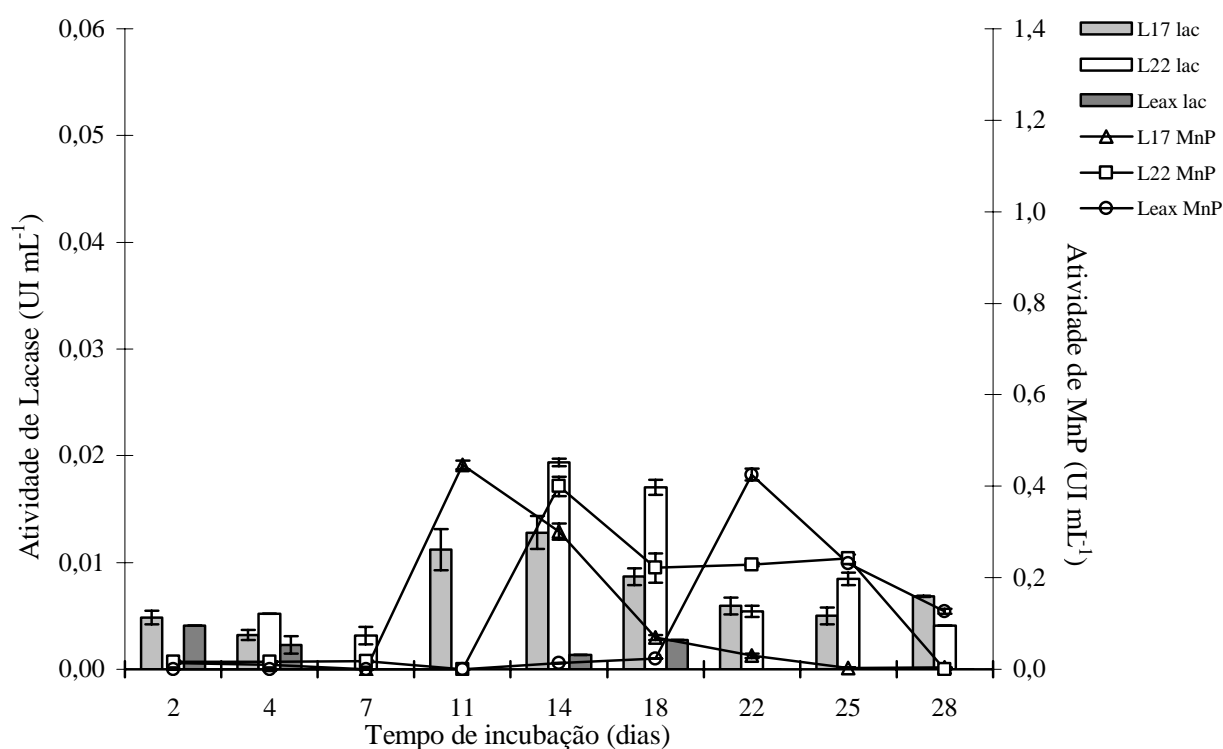
Leax apresentou baixa atividade de lacase durante a incubação e L22 apresentou atividade máxima 14º dia e 18º dia sem diferença significativa e L17 no 11º (0,011 UI mL<sup>-1</sup>) e 14º dia (0,013 UI mL<sup>-1</sup>) também sem diferença significativa, entre eles.

Durante os primeiros dias de incubação em BC, houve baixa atividade de MnP para L22 e L17, sem diferença significativa e Leax não apresentou atividade. L17 teve sua atividade máxima no

11º dia de MnP ( $0,447 \text{ UI mL}^{-1}$ ) correspondente à atividade máxima de lacase no 11º. Após o 11º dia a atividade de MnP diminuiu e permaneceu até final da incubação com baixa atividade.

A linhagem L22 também atingiu atividade máxima para MnP no 14º dia ( $0,400 \text{ UI mL}^{-1}$ ) o que acompanhou a atividade máxima observada para lacase. Após esse ponto, a atividade de MnP diminuiu até o final de incubação e terminou sem atividade.

Leax apresentou atividade de MnP a partir do 14º dia chegando a um valor máximo de atividade no 22º dia ( $0,425 \text{ UI mL}^{-1}$ ) seguido de diminuição até o final da incubação, porém com valor significativamente superior à L17 e L22 no 28º dia.



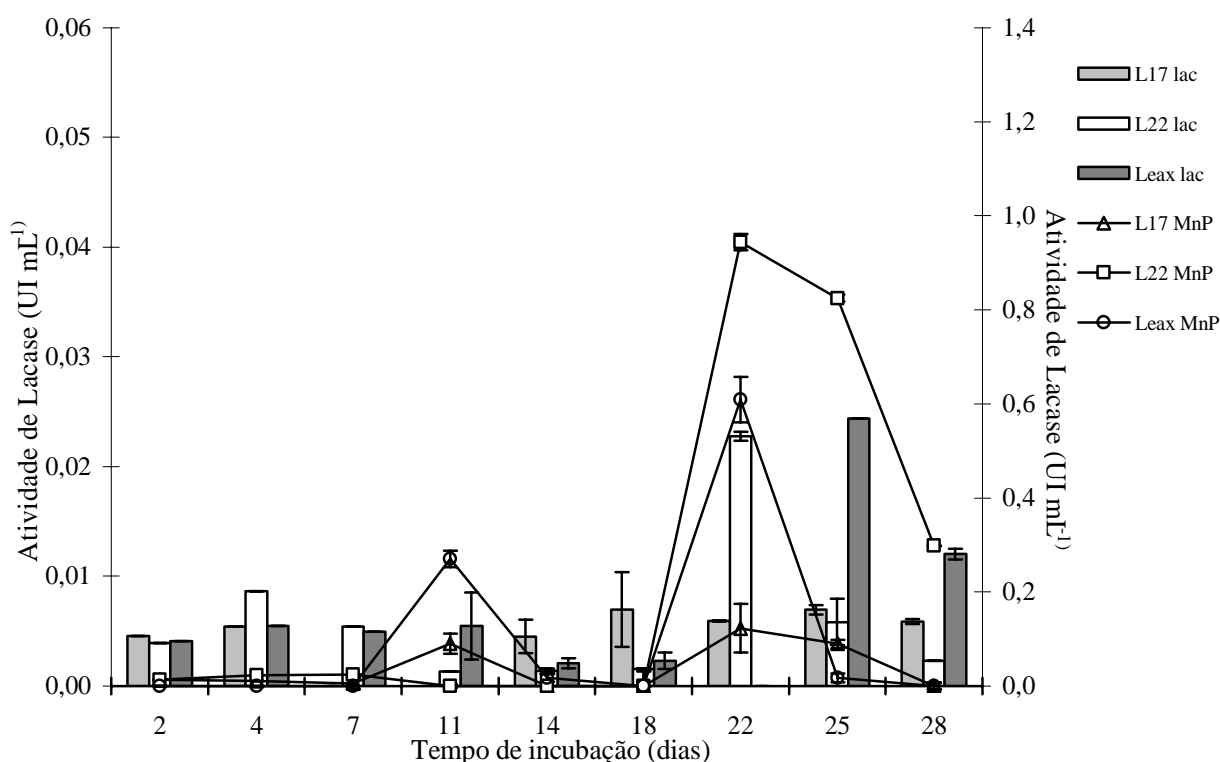
**Figura 2.** Atividades de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em meio de cultura líquido à base de bagaço de cana-de-açúcar. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

### 11.1.3. Atividade de enzimas oxidativas em meio de cultura líquido à base de casca de arroz

A atividade lacásica não apresentou diferença estatística entre as linhagens durante os primeiros dias de incubação no meio de cultura líquido CA (Figura 3). L22 apresentou atividade máxima de lacase no 22º dia (0,023 UI mL<sup>-1</sup>) e Leax no 25º dia (0,024 UI mL<sup>-1</sup>).

As linhagens apresentaram atividade máxima de MnP no dia 22º, sendo que L22 atingiu a maior atividade (0,944 UI mL<sup>-1</sup>), seguido de Leax (0,6093 UI mL<sup>-1</sup>) e depois L17 (0,123 UI mL<sup>-1</sup>). Todas as linhagens tiveram diminuição de atividade após o 22º dia

Em L22 a atividade máxima de lacase e MnP foram correspondentes, ao contrário das demais testadas. Apenas L22 apresentou atividade de MnP no final da incubação (0,298 UI mL<sup>-1</sup>)



**Figura 3.** Atividades de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em meio de cultura líquido à base de casca de arroz. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).



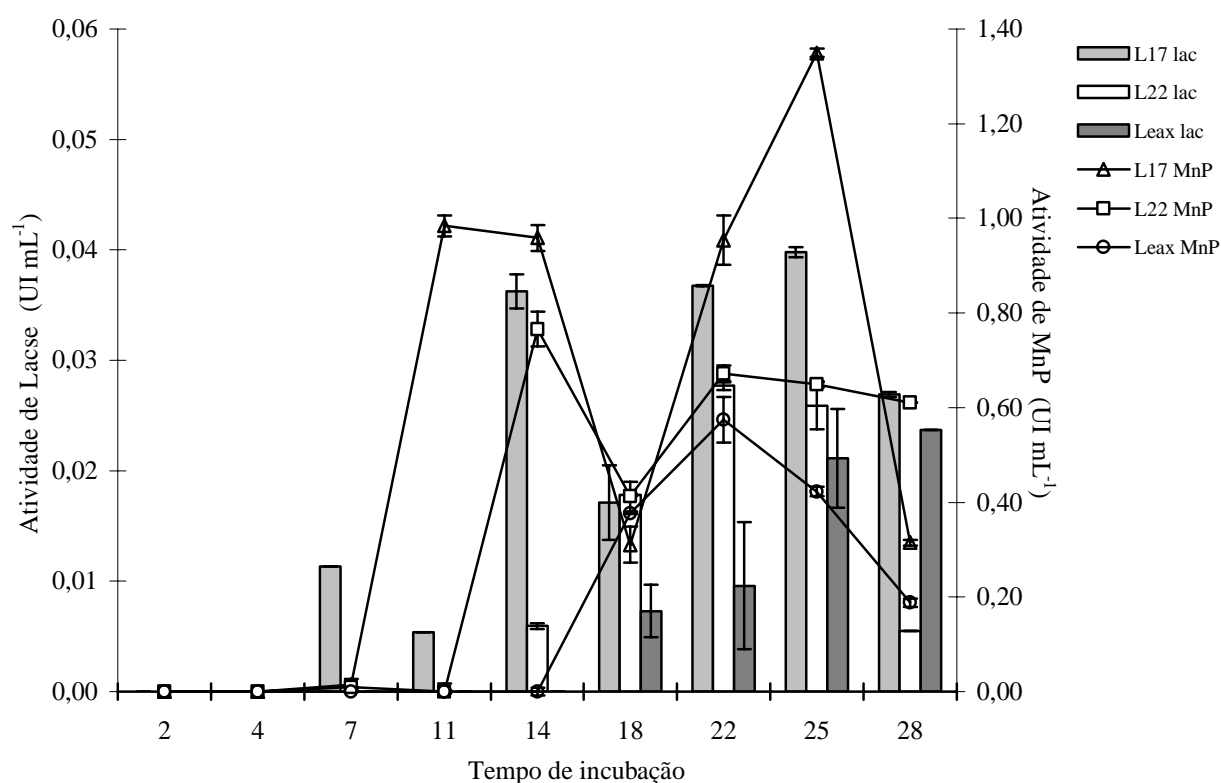
#### **11.1.4. Atividade de enzimas oxidativas em meio de cultura líquido à base de bagaço de mandioca**

Neste meio de cultura observou-se as maiores atividades das duas enzimas estudadas. Verificou-se que para L17 a partir do 7º dia iniciou-se a produção de lacase e MnP (Figura 4). L22 iniciou a atividade lacásica no 14º dia e Leax no 18º dia.

A partir do 14º dia, em L17, a atividade de lacase foi constantemente alta sem diferenças significativas, exceto nos dias 18 e 28 em que houve diminuição significativa de atividade. L17 apresentou as maiores atividades de lacase em comparação com as demais linhagens.

A atividade de MnP teve sua atividade máxima para L17 no dia 25, enquanto L22 no 14º dia e Leax no 22º dia.

Todas as linhagens mostraram diminuição de atividade da MnP no final da incubação, exceto L22 que apresentou atividade constante do 22º ao 28º dia, finalizando o período de incubação com atividade superior às demais linhagens.



**Figura 4.** Atividades de lacase e MnP de L17, L22 e Leax em meio de cultura líquido à base de bagaço de mandioca. Barras verticais representam o desvio padrão da média (n=3).

Considerando os diferentes tipos de meio de cultura líquido, verificou-se que as atividades enzimáticas apresentaram níveis diferenciados dependendo da linhagem analisada. No meio líquido SE a atividade de lacase e MnP foi mais expressiva em Leax; enquanto que no meio BC tanto lacase quanto MnP foram mais ativas em L22. No meio CA, L22 e Leax tiveram a melhor atividade de lacase e L22 foi a linhagem que teve mais atividade de MnP, já em BM a atividade de lacase e MnP foi melhor expressa por L17.

Todas as linhagens apresentaram atividades de MnP superiores às de lacase durante praticamente todo o período de incubação.

Hatvani & Mécs (2003) quando pesquisaram a atividade enzimática em *L. edodes* crescendo em resíduo de malte, sob diferentes formas de incubação, encontraram no meio líquido, baixos valores de lacase em relação à MnP. A maior atividade de lacase foi ao 30º dia de incubação com aproximadamente 100 U.L<sup>-1</sup> e para MnP também ao 30º dia de incubação com aproximadamente 1400 U L<sup>-1</sup>.

Resultados semelhantes foram reportados por Kaal et al. (1995) ao analisarem a atividade de enzimas lignolíticas de fungos da podridão branca crescendo em meio líquido. Os autores concluíram que o *L. edodes* além de produzir maior atividade de MnP em relação a lacase, foi também o que superou os outros fungos.

Quando comparado com outras formas de incubação, a cultura em meio líquido apresenta valores de atividade enzimática normalmente baixos. Neste tipo de meio, algumas enzimas são principalmente encontradas em atividade na parede celular do micélio, enquanto que em substrato sólido, se encontram mais no substrato de crescimento e em menor atividade na parede celular (IWASHITA, 1998; HASHIMOTO et al., 1999).

Além disso, o efeito negativo do processo de agitação (estresse mecânico) tem sido documentado como inibidor da produção de peroxidases (BONNARME et al., 1993; VENKATADRI & IRVINE, 1990) e lacases (YOSHIAMA & ITO, 1994; HESS et al., 2002) em fungos.

## 12. CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados, pôde-se chegar às seguintes conclusões:

- As linhagens de *L. edodes* L17, L22 e Leax têm atividade de MnP superior à atividade de lacase.

- A enzima lignina peroxidase não foi detectada como atuante no sistema lignolítico para as linhagens L17, L22 e Leax, nos substratos utilizados.
- As linhagens de *L. edodes* estudadas, durante crescimento em meio de cultura líquido, não apresentaram atividades expressivas de MnP e lacase.

### 13. AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão de bolsa de doutorado e ao CNPq pela bolsa de doutorado sanduiche

### 14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science. Technology*, Easton, v. 28, p. 78-87, 1994

BONNARME, P. et al. Toward a control of lignin and manganese peroxidase hypersecretion by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated vessels: evidence of the superiority of pneumatic bioreactors on mechanically agitated bioreactors. *Biotechnology Bioengineer*, New York, v. 41, p. 440-445, 1993.

BUSWELL, J. A. Fungal degradation of lignin. In: ARORA, D. K.; BHARAT, R.; MUKERJI, K. G.; KNUDSEN, G. *Handbook of applied mycology*. volume 1: Soil and plants. New York: Marcel Dekker Inc., 1991. p. 425-480.

CHANG, S.T. Production of cultivated edible mushroom in China with emphasis on *Lentinula edodes*. *ISMS Newsletter*; v. 4, p. 3-6, 1999.

CHANG, S.T. Past and present trends in the production of *Lentinula edodes* in Asia. In: International Conference of Mushroom, 4., 2002, Cuernavaca. *Proceedings...*, 2002, p. 1-8.  
CHANG, 1999, 2002

COCHARAN, K. W. Medicinal effects. In: CHANG, S.T., HAYES, W.A. (Ed.) *The biology and cultivation of edible mushrooms*. New York: Academic Press, 1978, p. 169-87.

FIELD, J. A. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *TIBTECH*, v.11, p.44-49, 1993.

HASHIMOTO, T. et al. Production and some properties of salt-tolerant  $\beta$ -xylosidases from a shoyu koji mold, *Aspergillus oryzae* in solid and liquid cultures. *Journal Bioscience Bioengineer*; v. 88, p. 479-483, 1999.

HATVANI, N.; MÉCS, I. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York, v. 55, p. 199-203, 2003.

HESS, J. et al. Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, v. 98, p. 229-241, 2002.

IWASHITA, K. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound  $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*; Clifton, v. 62, p. 1938-1946, 1998.

KAAL, E. E. J.; FIELD, J. A.; JOYCE, T. W. Increasing lignolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen sufficient media. *Bioresource Technology*, Essex, v. 53, p. 133-139, 1995.

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

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYZTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; practical implementations. *Bioresource Technology*, Essex, v. 87, p. 167-198, 2003.

LEATHAM, G. F.; STAHMANN, M. A. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with development of fruiting bodies. *Journal Genetic Microbiology*, v. 50, p. 859-867, 1981

LEATHAM, G. F. Cultivation of shiitake, the Japanese forest mushroom, on logs: a potential industry for the United States. *Forest Products Journal*, Madison, v. 32, n. 8, p. 29-35, 1982.

LEONTIEVSKY, A. A. et al. Transformation of 2,4,6- trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. *Biodegradation*, Dordrecht, v. 11, p. 331-340, 2000.

MASAPHY, S.; LEVANON, D. The effect of lignocellulose on lignocellulytic activity of *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture. *Applied Microbiology Review*, v. 36, p. 828-832, 1992.

MASSADEH, M. et al. Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnological Letters*, v. 23, 1771-1774, 2001.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, New York, v. 60, p. 551-565, 2002

MESSNER, K.; STREBOTNIK, E. Biopulping: and overview of developments in environmentally safe paper-making technology. *FEMS Microbiology Review*, Amsterdam, v. 13, p. 351-364, 1994.

MISHRA, C.; LEATHAM, G. F. Recovery and fractionation of the extracellular degradative enzymes from *Lentinula edodes* cultures cultivated on a solid lignocellulosic substrate. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 69, p. 8-15, 1990.  
Mishra & Leatham (1990)

ONYSKO, K.A. Biological bleaching of chemical pulps: a review. *Biotechnology Advances*, New York, v. 11, p. 179-198, 1993.

ORTH, A. B.; ROYSE, D. J.; TIEN, M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Applied Environmental Microbiology*, v. 59, p. 4017-4023, 1993.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Sciences*, v. 77, p. 149-162, 1999.

REDDY, G.V. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochemistry*, London, v. 38, p. 1457-62, 2003.

REID, I.D.; PAICE, M.G. Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiology Review*, Amsterdam, v. 13, p. 369-376, 1994.

ROSALES, E.; COUTO, R.; SANROMAN, A. New uses of food waste: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. *Biotechnological Letters*, v. 24, p.701-4, 2002.

ROYSE, D. J.; SANCHEZ-VASQUES, J. E. Influence of precipitated calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) on shiitake (*Lentinula edodes*) yield and mushroom size. *Bioresource Technology*, Essex, v. 90, p. 225-228, 2003.

SHEARER, C.A. Fungal competition. *Canadian Journal of Botany*, v. 73, p. 1259-1264, 1995.

VENKATADRI, R.; IRVINE, R. L. Effect of agitation on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 56, p. 2684-2691, 1990.

WALDNER, R., LEISOLA, M.S.A., FIECHTER, A.. Comparison of linolytic activities of selected white-rot fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*, Berlin, v. 29, p. 400-407, 1988.

YOSHIYAMA, M.; ITO, Y. Polyphenol oxidase production in a jar fermentor by *Coriolus versicolor*. *Journal Fermentation Bioengineering*, Osaka, v. 78, p. 188-190, 1994.

ZHANXI, L.; ZHANHUA, L. Fungi cultivation with Jun-Cao. Asia Pacific Mushroom Training Center, 1995.