ROBSON DE ALMEIDA FARIA

Estudo da produção de enzimas ligninolíticas
por *Ceriporiopsis subvermispora*

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção de Título de Mestre em Ciências. Área
de Concentração: Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Walter de Carvalho

Lorena – S.P.

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Faria, Robson de Almeida

Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispota* / Robson de Almeida Faria; orientador Walter de Carvalho. – Lorena: 2010.

102 p. : il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Enzimas 2. *Ceriporiopsis subvermispota* 3. Manganês Peroxidase
4. Lacase. I. Título

577.15 - CDU

***“Dedico esta dissertação aos meus pais
minhas irmãs Letícia e Leonara e a Kátia
pessoas que sempre me deram força e
credibilidade.”***

AGRADECIMENTOS

A Deus pela iluminação e sapiência.

Aos meus pais Romildo e Leni, as pessoas mais importantes da minha vida.

À Kátia pessoa maravilhosa e fonte de alegria e amor.

Ao Prof. Dr. Walter de Carvalho, pela orientação, apoio e paciência durante todo o desenvolvimento do projeto de mestrado.

Aos amigos Sérgio, Victor, Paula, Celso, Germano, Joseana, Michel, Fernando “Budaia”, Bruno, Flavio, Boutros, Fernando “Perna” e Vinicius, entre outros que foram presentes em minha vida, pela amizade e momentos de descontração.

Aos funcionários do Departamento de Biotecnologia pelo apoio técnico.

À FAPESP e CAPES pelo financiamento do projeto e pela bolsa de Mestrado.

RESUMO

FARIA, R. A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora***. 2010. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

Este trabalho compreendeu estudar e definir as condições de cultivo que maximizam a produção de manganês peroxidases (MnPs) e lacases (Lacs) por *C. subvermispora*, fungo de degradação branca da madeira envolvido em processos industriais de biopolpação. O estudo envolveu cultivos submersos, em superfície ou com micélio imobilizado em espuma de poliuretano em meios complexo ou definido, e cultivos imobilizados em meio definido nos quais foram avaliados os efeitos: de diferentes concentrações de Mn^{2+} , dos indutores 2,5-xilidina e álcool veratrílico, e do surfactante Tween 80, que levaram a diferentes níveis de expressões de Lacs e MnPs. Para a determinação de como essas condições afetam a produção das enzimas oxidativas (MnPs e Lacs), os cultivos foram avaliados cineticamente quanto à concentração de proteínas, às atividades enzimáticas, ao espectro de absorção de luz na região UV-VIS, ao teor de açúcares redutores, ao crescimento micelial, ao teor de amônio, ao pH, à condutividade elétrica. Também foram realizadas análises eletroforéticas de extratos de cultivos selecionados. Nos cultivos que tiveram como inóculo discos de micélio, a condição imobilizada em meio de composição complexa demonstrou potencial para produção de Lac (147,5 UI/L). Já nos cultivos inoculados com suspensão de micélio macerado em água, a condição imobilizada em meio de composição definida se destacou com produção seletiva de MnP (277,5 UI/L). Verificou-se que os cultivos em meio complexo nas formas submersa e imobilizada favoreceram a produção de Lac em detrimento de MnP. Nos cultivos de *C. subvermispora* imobilizado em espuma de poliuretano, em meio definido, a variação da concentração de manganês no meio de cultura alterou a produção de MnP, sendo a concentração de 11 ppm de Mn^{+2} promotora da máxima atividade (108,5 UI/L). No entanto, ao suprimir manganês do meio, ocorreu produção seletiva de Lac (15,5 UI/L). Com a suplementação do meio contendo 11 ppm de Mn^{+2} com 0,5 e 1,0 mM de 2,5-xilidina, foram alcançados máximos de atividade de Lac de 14,0 e 22 UI/L, respectivamente. A atividade máxima de MnP não foi afetada pela adição de 2,5-xilidina. Não houve aumentos significativos nas atividades máximas de Lac e de MnP quando o meio foi suplementado com álcool veratrílico. A suplementação do meio contendo 11 ppm de Mn^{+2} com Tween 80 nas concentrações de 0,05% e 0,5% v/v, em adição a 2,5-xilidina 1,0 mM, aumentou ainda mais a produção de Lac, com máximos de atividade de 53 e 61 UI/L, e de MnP, com picos de 175 e 182 UI/L, respectivamente. As eletroforeses em condições desnaturantes revelaram bandas proteicas de 12,4 a 118,3 KDa e nos géis de atividade foram detectadas atividades de MnP e Lac com mais de uma banda de atividade. Durante os cultivos, a exaustão de açúcares redutores acarretou em diminuição da concentração de micélio fúngico e aumento da concentração de nitrogênio amoniacal no meio, provavelmente devido à ocorrência de autólise celular. O pH e a condutividade variaram relativamente pouco. Em meio complexo, obsevou-se aumento da condutividade durante o cultivo, provavelmente devido à secreção de ácidos orgânicos pelo fungo.

PALAVRAS CHAVE: Enzimas. *Ceriporiopsis subvermispora*. Manganês Peroxidase. Lacase.

ABSTRACT

FARIA, R. A. **Study of the production of ligninolytic enzymes by *Ceriporiopsis subvermispora***. 2010. 102p. Dissertation (Master in Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

This work involved the research and definition of the culture conditions that maximize the production of manganese peroxidase (MnP) and laccase (Lac) by *C. subvermispora*, a white-rot fungus studied in biopulping industrial processes. The study involved submerged or static cultures with immobilized mycelium in polyurethane foam in complex or defined medium, and immobilized cultures in defined medium with different concentrations of Mn^{2+} and inductors, 2,5-xylinidin and veratryl alcohol, and surfactant, Tween 80, resulting in different expressions levels of MnPs and Lacs. To determine how these conditions affect the production of oxidative enzymes (MnP and Lac), the cultures were evaluated kinetically regarding the concentration of proteins, enzymatic activities, the absorption of light in the UV-VIS regions, the concentration of reducing sugars, the micelyal growth, the concentration of ammonium, pH, electrical conductivity. We also performed electrophoretic analysis of some selected cultures. In the cultures inoculated with discs of mycelium, the condition immobilized in polyurethane foam with complex medium showed potential for producing Lac (147.5 IU / L). In the cultures inoculated with homogenized mycelium, the immobilized condition with defined medium showed selective production of MnP (277.5 IU/L). It was found that the submerged and immobilized cultures in complex medium increased the production of Lac instead of MnP. In the immobilized cultures with defined medium, the variation of the concentration of manganese in the medium altered the production of MnP, being the concentration of 11 ppm that promoting maximum activity (108.5 IU/L). However, in the absence of manganese in the medium, the selective production of Lac (15.5 IU / L) was observed. With the supplementation of the defined medium containing 11 ppm Mn^{+2} with 0.5 or 1.0 mM 2,5-xylinidine, maximum activities of Lac of 14.0 and 22.0 IU / L, respectively, were achieved. The maximum activity of MnP was not affected by the addition of 2,5-xylinidine. There was no significant increase in the maximum activities of Lac and MnP when the medium was supplemented with veratryl alcohol. Supplementation of the medium with Tween 80, at concentrations of 0.05% and 0.5% v/v, in addition to 11 ppm Mn^{+2} and 1.0 mM 2,5-xylinidine, further increased the production of Lac, with highest activities of 53 and 61 IU/L; MnP activities were 175 and 182 IU/L, respectively. Electrophoresis under denaturing conditions revealed bands of approximately 12.4-118.3 KDa in the electrophoresis non-denaturing PAGE showed MnP and Lac activities in different bands. During the cultivations, the exhaustion of sugars led to decreased concentrations of mycelium and increased concentrations of ammonia in the extracts, probably due to the occurrence of cellular autolysis. The pH and conductivity showed low variations. The culture in complex medium showed an increased conductivity with time, probably due to the secretion of organic acids by the fungus.

KEY WORDS: Enzymes. *Ceriporiopsis subvermispora*. Manganese Peroxidase. Laccase.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO CATALÍTICO DE LiPs.....	20
FIGURA 2. CICLO CATALÍTICO DE MnPs	21
FIGURA 3. FORMAÇÃO DE RADICAIS PELO SISTEMA CATALÍTICO DE MnPs NA PRESENÇA DE DIFERENTES SUBSTRATOS.....	22
FIGURA 4. CICLO CATALÍTICO DE LACS.....	23
FIGURA 5. <i>CERIPORIOPSIS SUBVERMISPO</i> CRESCIDO EM CAVACOS DE <i>PINUS RADIATA</i> EM ESCALA DE LABORATÓRIO	26
FIGURA 6. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MECANISMO DE AÇÃO ENZIMÁTICA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATO.	44
FIGURA 7. CINÉTICA DE REAÇÃO ENZIMÁTICA DE MNP	46
FIGURA 8. CINÉTICA DE REAÇÃO ENZIMÁTICA DE LAC.....	47
FIGURA 9. VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA	60
FIGURA 10. VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	61
FIGURA 11. VARIAÇÃO DO pH.	61
FIGURA 12. VARIAÇÃO DA CONDUTIVIDADE	63
FIGURA 13. ATIVIDADE DE MNP E LAC EM CULTIVOS DE <i>C. SUBVERMISPO</i> IMOBILIZADO EM ESPUMA DE POLIURETANO, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Mn^{2+}	65
FIGURA 14. ATIVIDADE DE MNP E LAC EM CULTIVOS DE <i>C. SUBVERMISPO</i> IMOBILIZADO EM ESPUMA DE POLIURETANO EM MEIO DEFINIDO SUPLEMENTADO OU NÃO COM 2,5-XILIDINA E/OU TWEEN 80.....	70
FIGURA 15. VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA, AÇÚCARES REDUTORES E AMÔNIO.	72
FIGURA 16. VARIAÇÃO DO pH E DA CONDUTIVIDADE	73
FIGURA 17. VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES VERSUS ABSORBÂNCIA RELATIVA	75
FIGURA 18. ABSORBÂNCIA RELATIVA A 405 NM VERSUS ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MNP E ABSORBÂNCIA RELATIVA A 610 NM VERSUS ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LAC	76
FIGURA 19. PERFIL DE VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MNP E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LAC AO LONGO DOS CULTIVOS DE <i>C. SUBVERMISPO</i> IMOBILIZADO EM ESPUMA DE POLIURETANO EM MEIO COMPLEXO E EM MEIO DEFINIDO SUPLEMENTADO OU NÃO COM 2,5- XILIDINA E/OU TWEEN 80	79
FIGURA 20. ATIVIDADE ESPECÍFICA DOS CULTIVOS DE <i>C. SUBVERMISPO</i> IMOBILIZADO EM ESPUMA DE POLIURETANO EM MEIO COMPLEXO E EM MEIO DEFINIDO SUPLEMENTADO OU NÃO COM 2,5-XILIDINA E/OU TWEEN 80	81
FIGURA 21. GÉIS DE ELETROFORESE DESNATURANTE E NÃO DESNATURANTE	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DA MADEIRA POR FUNGOS.....	16
TABELA 2. CARACTERÍSTICAS DAS ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.	18
TABELA 3. REAGENTES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DO GEL CONCENTRADOR (SDS-PAGE).	49
TABELA 4. REAGENTES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DO GEL SEPARADOR (SDS-PAGE).....	49
TABELA 5. VOLUMES DE EXTRATO CONCENTRADO E DE TAMPÃO DA AMOSTRA INJETADOS NO GEL DESNATURANTE (SDS-PAGE), COM AS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS TOTAIS EM CADA CONDIÇÃO DE CULTIVO DE <i>C. SUBVERMISPORA</i>	50
TABELA 6. REAGENTES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DO TAMPÃO DA AMOSTRA (SDS-PAGE).....	50
TABELA 7. REAGENTES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DO GEL CONCENTRADOR (NATIVE-PAGE).....	52
TABELA 8. REAGENTES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DO GEL SEPARADOR (NATIVE-PAGE).	52
TABELA 9. VOLUMES DE EXTRATOS CONCENTRADOS E DE TAMPÃO DA AMOSTRA INJETADOS NAS CANALETAS DOS GÉIS NÃO DESNATURANTES (NATIVE-PAGE) PARA REVELAÇÃO DAS ATIVIDADES DE MANGANÊS PEROXIDASE (MnP) E LACASE (LAC), COM AS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS TOTAIS E ATIVIDADES DE MnP E LAC.....	53
TABELA 10. REAGENTES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DO TAMPÃO DA AMOSTRA (NATIVE-PAGE).....	53
TABELA 11. ATIVIDADE ENZIMÁTICA MÁXIMA DE MANGANÊS PEROXIDASE E LACASE, VERIFICADAS DURANTE OS 21 DIAS DE CULTIVO. INÓCULO: DISCOS DE MICÉLIO.....	56
TABELA 12 ATIVIDADE ENZIMÁTICA MÁXIMA DE MANGANÊS PEROXIDASE E LACASE, VERIFICADAS DURANTE OS 21 DIAS DE CULTIVO. INÓCULO: MICÉLIO MACERADO.	59
TABELA 13. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS MÁXIMAS DE MANGANÊS PEROXIDASE E LACASE VERIFICADAS DURANTE OS CULTIVOS SUPLEMENTADOS OU NÃO COM ÁLCOOL VERATRÍLICO E 2,5-XILIDINA.	68

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	FUNGOS E ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA LIGNINA	15
2.1.1	<i>Lignina Peroxidase</i>	19
2.1.2	<i>Manganês Peroxidase</i>	20
2.1.3	<i>Lacase</i>	23
2.1.4	<i>Peroxidase Versátil</i>	24
2.2.	<i>CERIOPORIOPSIS SUBVERMISPORE</i>	25
2.3.	CULTIVO DE FUNGOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS	29
2.3.1.	<i>Indução da produção de enzimas ligninolíticas</i>	33
2.4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
3.	OBJETIVOS	36
4.	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	FUNGO E PREPARO DO INÓCULO	37
4.2.	PREPARO DO MEIO DE CULTURA	38
4.3.	CONDIÇÕES DE CULTIVO	39
4.4.	RECUPERAÇÃO DO MICÉLIO E DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO	40
4.5.	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES	40
4.6.	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS TOTAIS	41
4.7.	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITROGÊNIO AMONÍACAL	41
4.8.	MEDIÇÃO DO PH, CONDUTIVIDADE E ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO UV-VIS	42
4.9.	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	42
4.9.1.	<i>Determinação da atividade enzimática de lacase</i>	42
4.9.2.	<i>Determinação da atividade enzimática de manganês peroxidase</i>	42
4.9.3.	<i>Determinação da atividade enzimática de lignina peroxidase</i>	43
4.9.4.	<i>Determinação da atividade enzimática de celobiose desidrogenase</i>	43
4.9.5.	<i>Exemplos de cálculos de atividade enzimática</i>	44
4.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4.11.	ELETROFORESE DESNATURANTE (SDS-PAGE) E NÃO DESNATURANTE (NATIVE-PAGE)	47
4.11.1.	<i>Preparação das amostras para as análises eletroforéticas</i>	47
4.11.2.	<i>Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE)</i>	48
4.11.2.1.	Géis	48
4.11.2.2.	Amostras	49
4.11.2.3.	Tampão da amostra	50
4.11.2.4.	Revelação	51

4.11.3.	<i>Eletroforese nativa (NATIVE-PAGE).....</i>	51
4.11.3.1.	Géis	51
4.11.3.2.	Amostras	52
4.11.3.3.	Tampão da amostra.....	53
4.11.3.4.	Revelação.....	53
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	CULTIVOS DE <i>C. SUBVERMISPO</i> RA EM MEIOS INOCULADOS COM DISCOS DE MICÉLIO CRESCIDOS EM MEIO SÓLIDO	55
5.2.	CULTIVOS DE <i>C. SUBVERMISPO</i> RA EM MEIOS INOCULADOS COM SUSPENSÃO DE MICÉLIO MACERADO CRESCIDO EM MEIO LÍQUIDO	57
5.2.1.	<i>Variação das concentrações de biomassa e açúcares redutores, do pH e da condutividade durante os cultivos de C. subvermispora.....</i>	60
5.3.	CULTIVOS DE <i>C. SUBVERMISPO</i> RA EM MEIO DEFINIDO IMOBILIZADO EM ESPONJA DE POLIURETANO INOCULADOS COM UMA SUSPENSÃO DE MICÉLIO MACERADO	63
5.3.1.	<i>Efeito do manganês na atividade das enzimas ligninolíticas.....</i>	64
5.3.2.	<i>Efeito do álcool veratrílico e da 2,5-xilidina na atividade das enzimas ligninolíticas.....</i>	67
5.3.3.	<i>Efeito do Tween 80 nas atividades das enzimas ligninolíticas.....</i>	68
5.3.3.1.	<i>Variação das concentrações de biomassa e açúcares redutores, amônio, pH, condutividade e proteínas extracelulares durante os cultivos em meio definido suplementados ou não com Tween 80 e/ou 2,5-xilidina.....</i>	71
5.4.	CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA DAS PROTEÍNAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR <i>C. SUBVERMISPO</i> RA EM CULTIVOS SELECIONADOS	77
6.	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
	APÊNDICE.....	100

1. Introdução

O presente estudo se insere na linha de pesquisa “Biodegradação da madeira: Uma abordagem química, bioquímica e tecnológica”. Esta linha de pesquisa visa compreender os mecanismos envolvidos na biodegradação da madeira, assim como avaliar a utilização de fungos ligninolíticos como uma etapa de pré-tratamento nos processos de polpação. Uma perspectiva tecnológica não engloba somente a aplicação em biodegradação de madeira, mas também o uso de fungos em processos que envolvam a descoloração de efluentes têxteis, biobranqueamento de polpas celulósicas, deslignificação de palha e outros materiais lignocelulósicos, para facilitar a digestão por animais ruminantes, a produção de etanol e a biorremediação de poluentes ambientais recalcitrantes, entre outras.

Na degradação da lignina por fungos estão envolvidas enzimas extracelulares como as lignina peroxidases (LiPs), manganês peroxidases (MnPs) e lacases (Lacs). As peroxidases são heme-proteínas com ciclos catalíticos que envolvem ativação por H_2O_2 . Dentre as peroxidases, LiPs apresentam alto potencial de oxidação e têm habilidade para catalisar a clivagem oxidativa de ligações C-C e C-O-C em estruturas aromáticas não-fenólicas, dando origem a radicais catiônicos instáveis. Enquanto, MnPs oxidam Mn(II) a Mn(III), com conseqüente degradação de estruturas aromáticas fenólicas ou, quando na presença de mediadores apropriados, também de estruturas aromáticas não fenólicas (WONG, 2009). As Lacs, por sua vez, são oxidases extracelulares que contêm cobre. Possuem a habilidade de oxidação de substratos fenólicos, com concomitante redução de oxigênio à água. Na presença de certos mediadores, também podem oxidar estruturas aromáticas não fenólicas, aumentando o interesse industrial da enzima devido à variedade de substratos que podem ser oxidados (CULLEN, 1997; HAMMEL; CULLEN, 2008).

Dentre os fungos ligninolíticos, *Ceriporiopsis subvermispota* se enquadra entre os fungos de decomposição branca da madeira (*White-rot fungi*). Este fungo é conhecido por sua habilidade de degradação seletiva de lignina, sendo alvo de estudos aplicados em processos industriais de biopolpação (AKHTAR, 1998, 2000; FERRAZ, 2008). Em condições ligninolíticas ele é capaz de produzir Lacs e MnPs que são as principais enzimas correlacionadas com a mineralização da lignina (RUTTIMAN et al., 1992). Em cultivos de

C. subvermispora em cultivos líquidos em meio definido foram identificados sete isoformas de MnP e quatro de Lac. Estas isoenzimas também foram produzidas quando o mesmo fungo foi cultivado em madeira, porém ocorreu um atraso na produção das diferentes isoenzimas (LOBOS et al., 1994).

Diferentes isoformas das enzimas ligninolíticas são encontradas em cultivos de fungos e a produção e secreção destas isoenzimas são extremamente influenciadas pelas condições de cultivo às quais estão submetidos os fungos produtores. Por exemplo, o nível de produção das enzimas ligninolíticas pode variar conforme a disponibilidade de diferentes nutrientes no meio de cultura como fonte de carbono (glicose), nitrogênio, compostos aromáticos, compostos xenobióticos e íons metálicos. Em outra mão, estudos têm sido realizados com *C. subvermispora* crescido em cavacos de madeira ou em culturas líquidas (submersa ou em superfície) apresentando os mais variados níveis de expressão de MnP e Lac (BABIC; PAVKO, 2007; FERRAZ; CÓRDOVA; MACHUCA, 2003; MANUBENS et al., 2003; MENDONÇA et al., 2008; RUTTIMAN-JOHNSON et al., 1993). Nesse sentido, este trabalho compreendeu estudar e definir as condições de cultivo (em superfície, submerso ou imobilizado em espuma de poliuretano, em meios de composição definida ou complexa, na presença ou ausência de indutores) que maximizam a produção de MnPs e Lacs por *C. subvermispora*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Fungos e enzimas envolvidas na degradação da lignina

Na natureza a conversão de biomassa vegetal esta ligada diretamente com o ciclo do carbono e parte deste ciclo é promovida pelos fungos decompositores presentes no meio ambiente. Investigações dos processos de degradação têm sido feitas em ecossistemas de florestas e alguns fungos envolvidos são pertencentes às divisões Basidiomycota, Ascomycota e Deuteromycota. A degradação feita por estes fungos pode ser classificada em três categorias (degradação branca, parda e branda) caracterizadas quanto ao aspecto visual da madeira degradada (Tabela 1).

A divisão Basidiomycota é dividida em dois grupos, os fungos de degradação branca (*White-rot fungi*) que possuem capacidade de degradação de todos os componentes da parede celular inclusive a lignina. Estes possuem por sua vez a habilidade de metabolizar grandes somas de lignina da madeira. Outro grupo são os fungos de degradação parda (*Brown-rot fungi*) que promovem a despolimerização da celulose rapidamente nos primeiros estágios de colonização. São responsáveis pela degradação de celulose da parede celular deixando um substrato rico em lignina que origina um aspecto quebradiço e amarronzado em forma de cubos na madeira seca. Os fungos classificados como de degradação branda (*Soft-rot fungi*) são pertencentes às divisões Ascomycota e Deuteromycota. Estes fungos são capazes de formar cavidades dentro da parede secundária da célula da madeira ou promover a erosão completa destas ocorrendo consumo extensivo da celulose e aumento da concentração de lignina nos resíduos (BLANCHETTE, 1991, 2000).

Tabela 1. Classificação da degradação da madeira por fungos.

Fungo	Componente da madeira degradado	Características da degradação	Alguns gêneros
Degradação Branca (<i>White-rot fungi</i>)	Todos os componentes da parede da célula, algumas espécies atacam preferencialmente lignina.	Progressiva erosão de toda a parede da célula. Lamela média é degradada.	<i>Phanerochaete</i> , <i>Phlebia</i> , <i>Trametes</i> e <i>Ceriporiopsis</i>
Degradação Parda (<i>Brown-rot fungi</i>)	Carboidratos e alguma modificação da lignina.	Despolimerização difusa da celulose	<i>Poria</i> e <i>Polyporus</i>
Degradação Branda (<i>Soft-rot fungi</i>)	Carboidratos e alguma modificação da lignina.	Forma cavidades na parede secundária da célula e erosão progressiva sem degradar a lamela média.	<i>Chaetomium</i> , <i>Paecilomyces</i> e <i>Fusarium</i>

(modificado de BLANCHETTE, 2000 e TUOMELA et al., 2000).

O modo de ação dos fungos ligninolíticos é evidenciado na distribuição de suas hifas ao penetrarem na parede da célula da madeira através do lúmen, na qual secretam metabólitos que atuam sobre os componentes da madeira. Estes metabólitos são constituídos por enzimas extracelulares específicas e outros compostos de baixa massa molar secretados junto à matriz polissacarídica da madeira. A despolimerização da hemicelulose e celulose e fragmentação da lignina são convertidos em moléculas solúveis susceptíveis ao metabolismo intracelular que culmina na geração de energia para a célula, CO₂ e água (mineralização) (KIRK; CULLEN, 1998).

Os fungos classificados como basidiomicetos, dentre os quais os de degradação branca (*White-rot fungi*), promovem dois tipos de degradação na madeira: 1) a degradação simultânea em que a celulose, hemicelulose e lignina são mais ou menos removidas ao mesmo tempo, 2) a degradação seletiva em que a lignina e hemicelulose são removidas antes da celulose. Na degradação simultânea a erosão da célula da madeira ocorre abaixo da hifa com concomitante redução da espessura da parede secundária da célula de maneira não uniforme até a lamela média que é removida completamente. A degradação seletiva consiste na deslignificação da célula da madeira no sentido lúmen lamela média, que em um primeiro momento mantém sua morfologia original preservando a matriz polissacarídea e posteriormente ocorre sua despolimerização nos estágios mais avançados

da degradação. Estes dois tipos de degradação ocorrem em razão da ação das enzimas e outros compostos excretados pelos fungos como supramencionado, mas os fatores que envolvem o uso de um tipo de degradação ou outro pelo fungo ainda não são conhecidos (BLANCHETTE, 1991; KIRK; CULLEN, 1998).

Com relação às enzimas principais para a degradação da madeira, estas podem ser representadas por: 1) enzimas hidrolíticas, celulases e hemicelulases, relacionadas à despolimerização da celulose e da hemicelulose, e 2) enzimas oxidativas, peroxidases (lignina peroxidases e manganês peroxidases) e lacases, relacionadas à biodegradação da lignina (KERSTEN; KIRK, 1987).

As celulases e as hemicelulases apresentam elevada especificidade. Destas, as primeiras estão envolvidas em um sistema sinérgico de três diferentes enzimas (endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases) na degradação completa da celulose, e as hemicelulases agem sob uma ação combinada de diferentes enzimas na degradação da hemicelulose. Por outro lado, as peroxidases e as lacases oxidam a lignina de maneira inespecífica, uma vez que sua ação pode ser mediada por compostos de baixa massa molar (CARVALHO et al. 2009; KIRK; CULLEN, 1998).

As lacases (Lacs) e as manganês peroxidases (MnPs) apresentam potencial redox suficiente para abstrair elétrons somente de estruturas fenólicas, embora na presença de mediadores apropriados sua ação possa ser estendida também para estruturas não fenólicas (BAO et al., 1994; BOURBONNAIS; PAICE, 1990). As lignina peroxidases (LiPs), por apresentarem potencial redox maior que as Lacs e MnPs, podem oxidar diretamente estruturas aromáticas não fenólicas dando origem a radicais catiônicos (KIRK; FARREL, 1987), embora possam também exercer a sua ação catalítica por meio de mediadores de baixa massa molar (TIEN; MA, 1997).

Quatro principais grupos de enzimas que auxiliam no processo de degradação da lignina são produzidas pelos fungos degradadores da madeira como: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP), peroxidase versátil (PV) e lacase (Lac). Há também ação cooperativa de enzimas acessórias que incluem glioxal oxidase e superóxido dismutase para produção de H_2O_2 , bem como piranose 2-oxidase, glicose 1-oxidase, aril álcool oxidase, celobiose: quinona oxireductase (CQO) e celobiose desidrogenase (CDH) que estão envolvidas em circuitos de retroalimentação e ligam a degradação da lignina com a da celulose e hemicelulose (LEONOWICZ et al., 1999).

As enzimas ligninolíticas são produzidas pelos fungos de degradação branca geralmente durante o metabolismo secundário. A síntese e secreção destas enzimas são

freqüentemente induzidas pelos níveis de nutrientes (carbono ou nitrogênio); ademais a produção de LiP e MnP por fungos de degradação branca geralmente é ótima em alta tensão de oxigênio, mas é reprimida pela agitação em culturas líquidas submersas, enquanto Lac é favorecida pela agitação (WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003). O conhecimento destes efeitos promovidos no cultivo dos fungos e das características físico-químicas das enzimas ligninolíticas produzidas por eles é de fundamental importância para a aplicação destes fungos em diferentes processos industriais (biopolpação, biorremediação, etc). A Tabela 2 descreve as principais características das enzimas ligninolíticas comumente produzidas pelos fungos de degradação branca.

Tabela 2. Características das enzimas ligninolíticas.

	MnP (1.11.1.13)	LiP (1.11.1.14)	Lac (1.10.3.2)
Grupo prostético	Heme	Heme	1 Cobre tipo I, 1cobre tipo II e 2 cobres pareados tipo III
MM (kDa)	32-62,5	38-47	59-110 (tetrâmeros ≤ 390)
Glicosilação	N-	N-	N
Isoformas	Monômeros; acima de 11	Monômeros; acima de 15	Mono-, di-, tetrâmeros, vários
pI	2,8-7,2	3,2-4,7	2,6-4,5
Potencial redox (mV)	1510	1450	500-800
Requer H₂O₂	Sim	Sim	Não
Estabilidade	+++	+	+++
Mediadores naturais	Mn ²⁺ , Mn ³⁺	AV ⁽¹⁾ , 2Cl-1,4DMB ⁽²⁾	3-HAA ⁽³⁾
Especificidade	Mn ²⁺	ampla, aromáticos incluindo não fenólicos	ampla, aromáticos fenólicos
Mediadores secundários e sintéticos	Tióis, ácidos graxos insaturados	não	ABTS ⁽⁴⁾ , HBT ⁽⁵⁾ e siringaldazina

¹ Álcool veratrílico;

² 2-Cloro-1,4-dimetoxibenzeno;

³ Ácido 3-hidroxiantrarfílico;

⁴ Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico);

⁵ 1-hidroxibenzotriazol;

(modificado de WESENERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003).

As enzimas anteriormente citadas serão abordadas mais intimamente a seguir, sendo apresentadas suas características moleculares e bioquímicas.

2.1.1 Lignina Peroxidase

Dentre as enzimas ligninolíticas LiP foi a primeira a ser identificada em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* crescido em meio com limitação de nitrogênio (KIRK; FARREL, 1987). Esta enzima é relativamente não específica, sendo conhecida por oxidar substratos aromáticos fenólicos e também promover a clivagem oxidativa de ligações C-C e C-O-C em estruturas aromáticas não-fenólicas como modelos de lignina bem como uma gama de compostos orgânicos com potencial redox acima de 1,4 V, na presença de H₂O₂ (WONG, 2009).

As isoenzimas de LiP são glicoproteínas globulares com massa molecular (M_R) em torno de 38-42 kDa, com ponto isoelétrico (pI) de 3,2-4,0 e possuem pH ótimo próximo de 3,0. Elas são hemoproteínas monoméricas com dois domínios: distal (C-terminal) e proximal (N-terminal); o Fe (III) do grupo heme está localizado entre estes dois domínios, sendo pentacoordenado com quatro nitrogênios tetrapirrol e uma quinta ligação com resíduo de histidina (HAMMEL; CULEN, 2008).

Durante o ciclo catalítico, o Fe contido no grupo heme da LiP passa por diferentes estados de oxidação (Figura 1). O primeiro passo compreende a oxidação do Fe (III) da enzima nativa para Fe (IV), pela ação do H₂O₂ um aceptor natural de elétrons, que atua como substrato na reação com a enzima nativa gerando o composto I oxidado, radical catiônico da LiP deficiente de dois elétrons. Pela redução do composto I, por transferência de um elétron, é formado o composto II, em que o ferro está ainda como Fe (IV), mas não como um radical livre. O agente redutor pode ser um substrato como o álcool veratrílico. Finalmente, uma etapa de redução por um elétron doado por um segundo substrato retorna a enzima a seu estado nativo, completando o ciclo catalítico. Na ausência do substrato redutor, o composto II é oxidado pelo H₂O₂ para o composto III, uma forma da LiP com limitada capacidade catalítica gerada na presença de excesso de H₂O₂ (HAMMEL; CULEN, 2008; MARTINEZ, 2002; WONG, 2009).

Figura 1. Ciclo catalítico de LiPs (MOREIRA NETO, 2006).

O álcool veratrílico (AV) é um metabolito produzido juntamente com LiP por *P. chrysosporium*, sendo bem conhecido por promover o aumento na atividade de LiP e a taxa de mineralização de lignina (FAISON; KIRCK, 1985; SCHOEMAKER; LEISOLA, 1990). Isto se deve ao fato do álcool veratrílico poder atuar como um mediador redox em reações catalisadas por LiP, formando o radical álcool veratrílico (AV^+) (HATAKKA, 2001). Este radical formado na primeira redução pelo composto I existe como um complexo com o composto II, que é cataliticamente ativo com uma segunda molécula de AV para formar um aldeído. Este radical também é implicado aparentemente na proteção da LiP pela inativação causada pela formação de composto III pela incubação prolongada da enzima com excesso de H_2O_2 , onde o álcool veratrílico converte o composto III na enzima nativa via formação de AV^+ (VALLI; WARIISHI; GOLD, 1990) e atua como mediador redox, oxidando substratos que LiP não poderia oxidar diretamente (JOHIMA et al., 1999).

2.1.2 Manganês Peroxidase

Característica comum entre os fungos causadores da podridão branca, as MnPs são heme-proteínas glicosiladas expressas como múltiplas isoenzimas. Em geral, apresentam

M_R em torno de 45 kDa e ponto isoelétrico (pI) em pH inferior a 7.0 (HATAKKA, 1994; HOFRICHTER, 2002). Os motivos que levam à variabilidade de isoformas ainda não são totalmente compreendidos, embora seja conhecido que, em *P. chrysosporium*, a expressão é finamente regulada em função da idade do cultivo (PEASE; TIEN, 1992), da composição do meio (LEISOLA et al., 1987) e da disponibilidade de Mn^{2+} (BONNARME; JEFFRIES, 1990).

Conforme ilustrado na Figura 2, o ciclo catalítico das MnPs é semelhante ao das LiPs e inicia-se com a sua oxidação por H_2O_2 ou peróxidos orgânicos, que levam a enzima à um estado de oxidação deficiente em dois elétrons denominado composto I. A redução da enzima até a forma nativa ocorre através de dois passos sucessivos, por meio da formação de um intermediário denominado composto II. Enquanto o composto I pode ser convertido em composto II tanto na presença de Mn^{2+} quanto de outros doadores de elétrons com potencial redox apropriado, a conversão do composto II até a enzima nativa ocorre somente na presença de Mn^{2+} . Além disso, elevadas concentrações de H_2O_2 podem inativar reversivelmente a enzima através da formação de outro intermediário denominado composto III (WARIISHI; AKALESWARAN; GOLD, 1988).

Figura 2. Ciclo catalítico de MnPs (modificado de HOFRICHTER, 2002).

O Mn^{3+} formado durante a catálise, estabilizado por ácidos orgânicos produzidos pelo próprio fungo, pode abstrair elétrons de vários compostos orgânicos (incluindo fenóis,

aminas aromáticas, compostos orgânicos sulfurados e ácidos graxos insaturados) de maneira inespecífica, levando à formação de radicais bastante reativos (Figura 3) que podem atacar estruturas recalcitrantes com alto poder de redução (CARVALHO, 2009; HOFRICHTER, 2002; KAWAI et al., 1995; WARIISHI; AKALESWARAN; GOLD, 1988). Estes quelatos, pela ação do Mn^{3+} , podem levar à formação de superóxido, o qual se acredita ser uma fonte de peróxidos na ausência de H_2O_2 (HOFRICHTER et al., 1998; URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998).

A atuação da MnP na degradação da lignina esta ligada diretamente a ação de mediadores de baixa massa, entre os quais Mn^{3+} que age diretamente sobre estruturas fenólicas e também em um sistema baseado na mediação por ácidos graxos insaturados, que pela geração de radicais intermediários reativos (radicais peroxil) têm sido relacionados com a degradação de estruturas não fenólicas (HOFRICHTER, 2002; JENSEN et al., 1996; KAPICH; JENSEN; HAMMEL, 1999).

Figura 3. Formação de radicais pelo sistema catalítico de MnPs na presença de diferentes substratos (modificado de HOFRICHTER, 2002).

2.1.3 Lacase

As lacases são oxidases extracelulares N-glicosiladas produzidas por quase todos os basidiomicetos degradadores da madeira, apresentando M_R em torno de 60-80 kDa e pI 3-6 (BADRIAN, 2006; HATAKKA, 2001; WESENBURG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003). Sua estrutura possui quatro átomos de cobre (Cu) no seu sítio ativo, classificados em três tipos (um átomo de cobre T1, um T2 e dois átomos T3) de acordo com suas diferentes propriedades e características específicas (WONG, 2009). No mais, as Lacs podem atuar diretamente sobre estruturas fenólicas, oxidando-as pela abstração de um elétron associada à redução de Cu^{+2} em Cu^{+} . A enzima retorna à sua forma nativa (Cu^{+2}) promovendo a redução de O_2 em H_2O (KIRK; CULLEN, 1998; BREEN; SINGLETON, 1999). Na presença de mediadores adequados, como ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzo-tiazol-6-sulfônico), 1-hidróxibenzotriazol e ácido 3-hidróxiantranílico, também podem oxidar compostos com elevado potencial redox, conforme demonstrado pelo esquema apresentado na Figura 4 (MESTER; TIEN, 2000).

Figura 4. Ciclo catalítico de Lacs (modificado de BREN; SINGLETON, 1999).

A maior parte dos microrganismos contém múltiplos genes de Lacs, pelo menos cinco em *Trametes villosa* e quatro em *Rhizoctonia solani* (KIRK; CULLEN, 1998). A expressão dos genes que codificam a síntese destas enzimas não depende da depleção de nutrientes. Pelo contrário, as enzimas são expressas constitutivamente em muitos basidiomicetos (EGGERT; TEMP; ERIKSSON, 1996; SMITH et al., 1998), sendo a baixa expressão geralmente realçada pela adição de indutores, como 2,5-xilidina, ao meio de cultivo (COLLINS; DOBSON, 1997).

Os fungos de degradação branca secretam Lacs como diferentes isoenzimas. Uma exceção descrita na literatura ocorre nos cultivos de *P. chrysosporium* onde a atividade de lacases é relativamente baixa, sendo fortemente reprimida na presença de glicose (EGGERT; TEMP; ERIKSSON, 1996). Entretanto, cultivos de *P. chrysosporium* em meio líquido rico em cobre apresentaram uma relativa produção de Lac e quatro diferentes isoformas sendo este íon capaz de induzir a produção da enzima em condições ligninolíticas (DITTMER, 1997).

Lacases têm sido intensamente estudadas para aplicação industrial e são enzimas excepcionalmente versáteis, catalisando reações com diferentes substratos, alguns destes recalcitrantes (WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003). São enzimas de ampla distribuição ocorrendo em todos os domínios dos seres vivos: bactérias, plantas, insetos e fungos (GIANFREDA; XU; BOLLAG, 1999; MAYER, 2006).

2.1.4 Peroxidase Versátil

Peroxidases Versáteis (PVs) são enzimas da família das peroxidases secretadas por muitos basidiomicetos de degradação branca como *Pleurotus* sp. e *Bjerkandera* sp. (CAMARERO et al., 1999; KAMITSUJI et al., 2005b; MOREIRA et al., 2005; POGNI et al., 2005). Estas enzimas não são específicas para Mn (II) como as MnPs, mas também oxidam compostos típicos de LiP na ausência de manganês. Uma explicação para isto é que na estrutura molecular da PV há resíduos de aminoácidos típicos das MnPs no sítio de ligação de Mn (II), bem como resíduos típicos das LiPs que envolvem a interação com álcool veratrílico e compostos aromáticos, o que gera na PV características tanto de MnP quanto de LiP (MARTINEZ, 2002; WONG, 2009).

O ciclo catalítico da PV é similar ao das demais peroxidases supramencionadas, em que a enzima catalisa a transferência de elétrons para um substrato oxidável como o H_2O_2 , envolvendo a formação e redução dos intermediários Composto I e Composto II até a enzima nativa (WONG, 2009).

Portanto, um sistema altamente eficiente na produção de PV é desejado para aplicações biotecnológicas nos processos industriais e bioremediação de poluentes recalcitrantes (MARTINEZ, 2002) e também uma análise detalhada do relacionamento estrutura-função desta enzima ainda não foi realizada (HAMEL; CULLEN, 2008).

2.2. *Ceriporiopsis subvermispora*

Os fungos do gênero *Ceriporiopsis* Dom. são causadores de decomposição branca à madeira. Pertencem à família Polyporaceae (HAROLD JR, 1998) e são conhecidos por sua grande seletividade para a degradação de lignina, sendo por este motivo considerados em processos de biopolpação (AKHTAR et al., 1998; AKHTAR et al., 2000; FERRAZ et al., 2008).

O basidiomiceto *Ceriporiopsis subvermispora* (Figura 5) tem sido alvo de intensos estudos que abordam a compreensão dos mecanismos químicos e bioquímicos envolvidos nos processos de degradação da madeira. Para tanto, este fungo apresenta uma série de enzimas hidrolíticas e oxidativas.

Sethuraman e colaboradores (1998) estudaram cultivos de *C. subvermispora* onde utilizaram diferentes fontes de carbono no meio de cultivo, as quais induziram enzimas dos complexos celulolítico (endoglucanase, baixa produção de β -glicosidase e nenhuma exoglucanase), hemicelulolítico (xilanases, β -xilosidase e mananase) e lignolítico (MnP e Lac), além de proteases. Em outro estudo, em extratos obtidos a partir de cultivos deste fungo em cavacos de *Eucalyptus grandis* e *Pinus taeda*, foi caracterizada uma mananase (156 kDa), duas xilanases (33 e 80 kDa) e duas β -glicosidases, uma de 53 e outra de 110 kDa (HEIDORNE et al., 2006).

Figura 5. *Ceriporiopsis subvermispora* crescido em cavacos de *Pinus radiata* em escala de laboratório (LOBOS, 2001).

Com relação às ligninases, *C. subvermispora* produz Lacs e MnPs que são consideradas as principais enzimas envolvidas na mineralização da lignina e que, na decomposição da madeira, atuam em conjunto com compostos de baixa massa molar (AGUIAR; FERRAZ, 2008; FERRAZ; CÓRDOVA; MACHUCA, 2003; RUTTIMAN-JOHNSON et al., 1993). Embora genes semelhantes aos que codificam para LiPs em outros fungos tenham sido identificados em *C. subvermispora* (RAJAKUMAR et al., 1996), a presença de atividade desta enzima não é normalmente detectada em cultivos deste fungo (SOUZA CRUZ et al., 2004). Entretanto, o grupo de Tanaka et al. (2009) relataram que identificaram pela primeira vez atividade de LiP em culturas de *C. subvermispora* crescidos em cavacos de *Fagus crenata*. Estes pesquisadores observaram atividade enzimática de LiP após duas semanas de cultivo, com pico na terceira semana, diminuindo rapidamente após este período até a oitava semana. Outra enzima, cuja produção pelo mesmo fungo, também é relatada na literatura é a celobiose desidrogenase (CDH), uma enzima que aparentemente coliga os sistemas celulolítico e oxidativo de fungos basidiomicetos, ascomicetos e em algumas bactérias (HENRIKSSON; JOHANSSON; PETTERSSON, 2000b; ZÁMOCKÝ et al., 2006). Em cultivo líquido de *C. subvermispora* suplementado com celulose e extrato de levedura, em biorreator, foi observado atividade de CDH nos estágios iniciais do cultivo com um aumento significativo após 7 dias (170 U/L). A partir do extrato obtido da cultura, duas isoformas de CDH com M_{Rs} estimadas de 98 e 87 kDa foram determinadas em géis de eletroforese (SDS-PAGE); da análise dos géis de focalização isoeletrica, foi possível determinar o ponto isoeletrico de cada isoforma, com pIs de 3,0 e 3,1, respectivamente (HARREITHER et al., 2009).

O estudo realizado por Lobos et al. (1994), cultivando *C. subvermispora* em meio líquido de composição definida a base de glicose e tartarato de amônio, mostrou que o padrão de isoenzimas de MnP produzidas pelo fungo foi influenciado pela concentração de Mn^{2+} presente no meio, embora não tenha variado ao longo do período de cultivo. Por outro lado, quando o fungo foi cultivado em cavacos de *Pinus radiata* suplementados com tartarato de amônio e glicose, observou-se que o padrão de isoenzimas de MnP extraídas dos cavacos variou com o tempo de cultivo. Enquanto, no 4º dia, quatro bandas com atividade de MnP com *pIs* iguais a 4,40, 4,17, 4,04 e 3,53 foram detectadas por meio de focalização isoeletrica, a partir do 8º dia, quatro bandas com *pIs* iguais a 3,53, 3,40, 3,30 e 3,20 foram detectadas nos extratos obtidos. Posteriormente, SDS-PAGE das amostras fracionadas por meio de focalização isoeletrica revelou que as bandas com *pIs* iguais a 3,20, 3,30 e 3,40 apresentaram M_R igual a 62,5 kDa, enquanto a banda com *pI* igual a 3,53 originou duas bandas com M_{Rs} iguais a 62,5 kDa e 56 kDa. A suplementação dos cultivos em meio sólido com uma maior quantidade de tartarato de amônio atrasou a transição no perfil das isoenzimas produzidas pelo fungo (VICUÑA et al., 1996).

Algumas das isoenzimas de MnP isoladas no estudo mencionado no parágrafo anterior foram caracterizadas com relação à especificidade por diferentes substratos e à necessidade de Mn^{2+} para o desempenho de sua atividade catalítica. Na presença de H_2O_2 , foi observado que estas isoformas requerem Mn^{2+} em diferentes concentrações para a oxidação de guaiacol, vanililacetona, *o*-dianisidina, *p*-anisidina e ABTS. Por último, sugeriu-se que, quando MnP oxida oxalato e glioxilato, é formado H_2O_2 e, assim, na presença destes ácidos orgânicos, MnP é auto-suficiente na produção de peróxido (URZÚA et al., 1995).

Com relação às Lacs, no estudo de Lobos et al. (1994), em meio definido com 11 ppm de Mn^{+2} , quatro isoenzimas foram detectadas por focalização isoeletrica, apresentando valores de *pIs* entre 3,45 e 3,65; ocasionalmente, uma quinta isoforma com *pI* igual a 4,70 também foi detectada. Em outro estudo (SALAS et al., 1995), a utilização de meio à base de farelo de trigo também levou à produção de quatro isoenzimas com *pIs* semelhantes, entre 3,63 e 3,46, além de uma quinta isoenzima com *pI* igual a 4,82. Em ambos os estudos, os padrões de isoenzimas isoladas dos meios de cultivo não variaram em função do tempo.

Fukushima e Kirk (1995) também estudaram a produção de lacases por *C. subvermispora*. Observaram a produção de duas isoformas principais tanto em meio

definido quanto em meio à base de farelo de arroz. Estas isoformas apresentaram pI s e M_R s iguais a 3,4/4,8 e 71/68 kDa, respectivamente.

Em *C. subvermispora*, as diferentes isoformas de MnP e Lac são codificados por três e dois genes, respectivamente, com seus respectivos alelos (KARAHANIAN et al., 1998; LARONDO et al., 2001, 2003; LOBOS et al., 1994). A regulação da expressão gênica é determinada por sítios encontrados em algumas regiões nos genes de MnP (*mnp*) que possuem elementos proximais comuns como: TATA *box*, sítios AP1 e AP2, bem como sítios para regulação da transcrição por metais (MRE), cAMP (CRE), compostos xenobióticos (XRE) e choque térmico (HSE) e para o gene de Lac (*lcs*) a regulação ocorre por elementos promotores TATA *box*, sítios CAAT e MREs e elementos ACE1 (LOBOS et al., 2001).

A adição de Mn^{2+} é estritamente importante para que níveis de expressão de MnP sejam determinados nos cultivos de *C. subvermispora* (RUTTIMAN et al., 1992), este efeito também é observado em culturas de *Trametes versicolor* (JOHANSSON; NYMAN; CULLEN, 2002), *P. cryosporium* (BONNARME; JEFRI, 1990; BROWN; ALIC; GOLD, 1991), *Pleurotus ostreatus* (COHEN; YARDEN; HADAR, 2002) e *Dichomitus squalens* (PÉRIÉ; SHENG; GOLD, 1996). Manubens et al. (2003) têm demonstrado que Mn^{2+} causa uma regulação diferencial no gene *mnp* (1 e 2) em *C. subvermispora*, sendo sugerido que o íon metálico tem participação ativa nos passos de modificação transcricional de RNAm (*mnp*). De fato, *C. subvermispora* é capaz de produzir MnP tanto na presença quanto na ausência de Mn^{2+} , foi verificado que na falta do metal ocorreu à produção de MnP intracelular e que estas foram excretadas para o meio somente após a adição de Mn^{2+} (MANCILLA et al., 2010). Em estudo mais recente Manubens et al. (2007), em seus experimentos, observaram que Mn^{2+} diminui a transcrição de RNAm (*lcs*) e que pelas análises densitométricas de “Northern blot” revelaram que a presença de baixa concentração de Mn^{2+} é suficiente para causar redução abrupta da transcrição de RNAm das culturas de *C. subvermispora*. De forma semelhante, o efeito de cobre na expressão de genes de Lac afeta a transcrição de RNAm (*lcs*) confirmado por análises “Northern blot” realizadas a partir de cultivos de *C. subvermispora* em que na sua ausência Cu^{2+} não foi encontrados transcritos RNAm (*lcs*) ocorrendo o oposto na sua presença (KARAHANIAN et al., 1998). É bem conhecido que cobre é de fundamental importância para a transcrição de RNAm (*lsc*), no entanto, é relatado na literatura que genes *mnp* (1 e 2) de *C. subvermispora* também foram transcritos quando a estas culturas foram suplementadas

com Cu^{2+} o que demonstra que cobre pode exercer regulação diferencial tanto para Lac quanto para MnP (ÁLVAREZ et al., 2009).

2.3. Cultivo de fungos para produção de enzimas ligninolíticas

Diversos são os exemplos de trabalhos que têm procurado avaliar a produção de enzimas ligninolíticas por diferentes fungos de degradação branca. Nos próximos parágrafos, descrevem-se algumas abordagens relatadas na literatura sobre a produção de Lacs e MnPs em cultivos submersos, em superfície e imobilizados, em meios de composição complexa e definida.

Estudos realizados por Ruttiman et al. (1992) avaliaram a produção de enzimas ligninolíticas (MnP e Lac) por diferentes cepas de *C. subvermispora* em meio de cultivo definido. Foram obtidas atividades expressivas de MnP e Lac em cultivos submersos suplementados com manganês (II) e tartarato de amônio. Foram avaliadas concentrações de Mn (II) de 0,32, 11 e 40 ppm, obtendo-se uma maior atividade enzimática de MnP, de 0,6 UI/mL, na concentração de 11 ppm para a cepa FP-105752. O efeito da concentração de nitrogênio na produção de MnP também foi estudado. Foram testadas concentrações de tartarato de amônio de 1, 10 e 50 mM. Os maiores níveis de MnP (0,5 UI/mL) foram verificados para a concentração de 50 mM de tartarato de amônio para as cepas FP-90031 e FP-105752, e em concentração de 10 mM para as cepas L-15225 e FP-104027. Nestas últimas, foi observado um curto período para o início da produção de MnP, em torno de 4 dias.

Em um segundo trabalho, Ruttiman-Johnsson et al. (1993) determinaram que níveis elevados de MnP são obtidos quando a concentração de Mn^{2+} no meio é da ordem de 11 mg/L. Concentrações superiores levam a uma produção levemente maior de MnP e Lac, porém a mineralização de lignina não acompanha o aumento na produção de MnP. A concentração de nitrogênio no meio de cultivo também afetou a produção de MnP e Lac no cultivo de *C. subvermispora*, tendo sido observado que o aumento da concentração de nitrogênio (10 mM de tartarato de amônio) resultou na indução de níveis mais elevados de MnP (0,6 U/mL) e Lac (0,4 U/mL) em relação às concentrações inferiores (1 mM de tartarato de amônio). Também o crescimento fúngico foi aumentado com a maior concentração da fonte de nitrogênio. Concentração de glicose igual a 1% favoreceu uma

maior produção de MnP e de Lac, bem como o crescimento fúngico, tendo sido observado que as enzimas foram expressas durante o metabolismo primário desse fungo.

Tapia et al. (1995), em cultivos submersos de *C. subvermispora* em meio líquido definido, propuseram elucidar a possível incoerência entre os níveis de atividade de MnP e Lac e o grau de mineralização de lignina sintética, relacionando-a com a variação do pH no meio de cultivo. Estes pesquisadores estudaram a variação da concentração da fonte de N (tartarato de amônio 1 mM ou 10 mM, cloreto de amônio 1 mM ou 10 mM e casaminoácidos 0,03% ou 0,3%) e da fonte de carbono (glicose 0,1% ou 1%) nos cultivos do fungo. Observaram que, ao variar a concentração de tartarato de amônio de 10 para 1 mM, ocorreu um aumento na degradação da lignina sintética semelhante ao reportado por Ruttiman-Johnsson et al. (1993). Notadamente observaram também que ao reduzir as concentrações de casaminoácidos ou cloreto de amônio no meio de cultivo para 0,03% e 1,0 mM, respectivamente, com 1% de glicose, promoveram maior degradação da lignina sintética, igualmente ao ocorrido com tartarato de amônio. No entanto, os níveis de atividade para MnP e Lac foram superiores para cultivos suplementados com tartarato de amônio 10 mM (0,7 e 0,3 U/mL, respectivamente) ou casaminoácidos 0,3% (0,9 ou 0,6 U/mL, respectivamente), ambos com glicose a 1%, com concomitante diminuição da degradação da lignina sintética, confirmando a não correlação entre atividade enzimática e decomposição da lignina. Observaram que ocorreu aumento do pH de 4,5 para 6,4 no meio quando as maiores concentrações de tartarato de amônio (10 mM) bem como cloreto de amônio ou casaminoácidos (10 mM e 0,3%, respectivamente) foram utilizados nos cultivos de *C. subvermispora* durante 29 dias. Também realizaram cultivos variando o pH inicial (4,5; 5,0; 5,5 e 6,0) com adição de ácido *trans*-aconítico para controle do pH e suplementado com tartarato de amônio 1 mM; notaram também uma flutuação do pH durante o período em que o cultivo foi realizado, indicando que o pH interfere na atividade de MnP (com pH ótimo de 4,5 a 5,0), sendo o responsável pela discrepância entre os níveis de atividade das enzimas ligninolíticas e a degradação de lignina.

O estudo supramencionado mostrou que uma elevada atividade de MnP e Lac não resultou necessariamente em elevada mineralização da lignina. Nesse sentido, Daina et al. (2002) avaliaram a degradação de dois dímeros-modelo de lignina unidos por ligação do tipo β -5 (composto 1, fenólico; e composto 2, não fenólico) cultivando *C. subvermispora* em meio definido sob diferentes concentrações de nitrogênio e Mn^{2+} . Verificaram que, quando houve variação na concentração de tartarato de amônio de 1 para 10 mM, ocorreram maiores níveis de atividade de MnP e Lac. Porém, houve maior degradação do

composto 1 (80%) em concentração mais baixa da fonte de N enquanto o composto 2 foi pouco degradado nas duas concentrações de N avaliadas. Estes resultados assemelham-se com aqueles alcançados nos trabalhos de Ruttiman-Johnson et al. (1993), que fizeram uso de uma lignina sintética. Já ao variar as concentrações de Mn^{2+} (0, 0,2 e 2 mM) em condição limitante de nitrogênio (1 mM) na presença do composto 1, observaram que a concentração de 0,2 mM de manganês favoreceu maior produção de MnP ($\approx 0,13$ UI/mL) enquanto maior atividade de Lac ($\approx 0,11$ UI/mL) foi observada na ausência de manganês. Com relação à degradação do composto 1, Daina et al. (2002) verificaram que foi degradado rapidamente em extratos com 0,2 e 2,0 mM de manganês. Já na presença do composto 2, houve diminuição da atividade de Lac e não foi aumentada a expressão de MnP.

Em trabalho bastante interessante, Manubens et al. (2003) avaliaram a produção de MnP em meio definido e cultivos estáticos de *C. subvermispora* onde se propuseram a avaliar a influência da transcrição dos genes *mnp* em diferentes níveis de Mn^{2+} . Foram realizados ensaios com diferentes concentrações de $MnSO_4$ (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 μM), tendo sido detectadas atividades de MnP da ordem de 0,5 U/mL em cultivos suplementados com 80 μM e 160 μM aos 12 dias de cultivo. Para concentrações menores de $MnSO_4$, principalmente em concentrações entre 0 e 20 μM do sal, não foram observadas elevadas atividades de MnP nos extratos. Nestes cultivos, foram encontrados transcritos (RNAm) de dois genes (*mnp* 1 e 2) na ausência de Mn^{2+} , embora não tenha sido detectada nenhuma atividade de MnP no meio de cultivo.

Ferraz, Córdova e Machuca (2003) realizaram o crescimento de *C. subvermispora* em meio à base de extrato de malte suplementado com cavacos de *Eucalyptus grandis* durante 90 dias de cultivo. Durante o cultivo, foram avaliadas as atividades de enzimas oxidativas (peroxidases totais e lacase) e hidrolíticas (xilanase e β -glicosidase). Em um primeiro momento, foram feitas análises do cultivo após os 7 dias iniciais, antes da suplementação com cavacos de madeira. Foram encontradas atividades de Lacs e xilanases, não sendo identificada a presença de peroxidases. Após a suplementação com madeira, foram retiradas amostras após 15, 30, 60 e 90 dias de cultivo. Aos 30 dias de cultivo, foi possível recuperar grande parte da atividade de lacases e xilanases na primeira extração. As peroxidases e β -glicosidases, por outro lado, ficaram intensamente adsorvidas nos cavacos de madeira, sendo recuperadas em maior quantidade somente a partir da segunda extração. No decorrer do cultivo, a máxima atividade de lacase (12,6 UI por cultivo) foi detectada aos 30 dias. A produção de peroxidases foi baixa durante todo o cultivo, atingindo a

máxima atividade (5,0 UI por cultivo) aos 30 dias. Inicialmente, não foram encontrados indícios desta enzima no meio sólido puro, sem cavacos de madeira, aos 7 dias de cultivo.

Vicentim e Ferraz (2007), em cultivos do mesmo fungo sobre cavacos de *Eucalyptus grandis* suplementados com Mn^{2+} , milhocina e/ou glicose, por um período de 14 dias, verificaram uma expressiva produção de MnP. Foram realizados 8 ensaios preliminares variando as concentrações dos compostos nos cultivos de *C. subvermispora* conforme segue: cultivo não suplementado, suplementado com Mn^{2+} , com glicose, com Mn^{2+} e glicose, com milhocina, com Mn^{2+} e milhocina, com glicose e milhocina e, por fim, com Mn^{2+} , glicose e milhocina. Foi observado que os maiores níveis de MnP (1317 ± 172 UI/Kg de madeira, peso seco) foram encontrados nos cultivos onde os cavacos foram suplementados com glicose e milhocina 5 g/Kg de madeira (peso seco), sendo também obtido o maior acúmulo de biomassa. Enquanto os níveis de atividade de Lac foram insignificantes no âmbito da avaliação. Verificou-se que em todos os cultivos em que foi adicionado como suplemento milhocina houve enriquecimento tanto no crescimento de biomassa quanto na produção de MnP, sendo esta considerada um excelente indutor de crescimento do fungo e produção de MnP.

Couto et al. (2000) cultivaram o fungo *P. chrysosporium* imobilizado em espuma de poliuretano em um meio definido suplementado com Tween 80 (0,05 % v/v) e também com a combinação de Tween 80 (0,05 % v/v) + álcool veratrílico (concentração final de 2 mM) ou óxido de Mn IV (concentração de 1 g/L), sendo obtidas diferentes atividades das enzimas ligninolíticas MnP e Lac. Em um primeiro momento, ao cultivar o fungo com meio suplementado com 0,05% v/v de Tween 80, foi possível a obtenção de atividade de MnP durante toda a fermentação a partir do 4º dia de cultivo. Os autores obtiveram a máxima atividade de MnP (350 U/L) nessa condição, sendo três vezes maior do que o alcançado na condição controle (sem adição de suplementos ao meio de cultivo). Durante este cultivo não foi encontrada atividade de Lac. Para ambas as combinações supramencionadas, foram obtidas quantidades muito significativas de MnP. Notavelmente, a suplementação do meio de cultivo com Tween 80 + álcool veratrílico ou Tween 80 + óxido de Mn IV não somente induziu a produção de MnP (600 e 1100 U/L, respectivamente), sendo estas cerca de 2 e 3 vezes superiores ao cultivo com apenas Tween 80, como também induziu a produção de Lac, propiciando uma atividade em torno de 75 U/L com óxido de Mn IV e de 100 U/L com álcool veratrílico. Sendo assim, tanto álcool veratrílico quanto óxido de Mn IV se mostraram como possíveis indutores da produção de lacase em cultivos de *P. chrysosporium* imobilizado em esponja de poliuretano; quando

utilizados em combinação com Tween 80, propiciaram um aumento considerável na atividade de MnP.

Em cultivos de *P. chrysosporium* imobilizado em espuma de poliestireno em meio definido, Ürek e Pazarlioglu (2005) estudaram a produção de MnP. Para tanto, suplementaram o meio de cultivo com diferentes compostos em diferentes concentrações a fim de induzir a produção da enzima. Foram utilizados como suplementos Mn^{2+} (100-424 μM), Tween 80 (0,03-0,12 % v/v), nitrogênio (11-44 mM) e glicerol (0,665-10,0 g/L), aplicados cada um em diferentes frascos no início do cultivo. No estudo que envolveu Tween 80, obtiveram uma atividade máxima de aproximadamente 420 U/L a 0,05% v/v do surfactante, a qual foi maior que a alcançada no cultivo controle (sem adição de Tween 80) com nível máximo de 218 U/L. Ao utilizarem Mn^{2+} como suplemento no cultivo, observaram uma atividade máxima de 380 U/L na presença de 174 μM do metal. Assim, a adição de $MnSO_4$ melhorou notavelmente a atividade de MnP nos extratos, o que, segundo os autores, pode estar relacionado diretamente ao fato de Mn^{2+} ser um indutor e substrato de MnP. Já para os cultivos suplementados com diferentes concentrações de N, os níveis de atividade de MnP não apresentaram grandes variações, com atividades máximas em torno de 380, 425 e 300 U/L atingidas com concentrações de 11, 22 e 44 mM, respectivamente. Enquanto a utilização do glicerol não elevou a atividade de MnP em relação aos demais cultivos anteriormente citados. Por esse motivo, os autores decidiram utilizar a glicose, ao invés do glicerol, como fonte de carbono no meio otimizado que foi constituído de: 174 μM de Mn^{2+} , 0,05% v/v de Tween 80, 22 mM de nitrogênio, 10 g/L de glicose e pH 4,5. Por fim, foi realizado um cultivo de *P. chrysosporium* imobilizado em esponja de poliestireno em meio otimizado no qual foi alcançada atividade máxima de MnP igual a 421 U/L no 6º dia de cultivo, culminando com a fase estacionária do crescimento fúngico (ÜREK; PAZARLIOGLU, 2005).

2.3.1. Indução da produção de enzimas ligninolíticas

A produção de enzimas ligninolíticas é regulada por vários compostos (fonte de nitrogênio, fonte de carbono, aromáticos) e íons metálicos (ARORA; GILL, 2000; BONNARME; JEFFRIES, 1990; BUSWELL; CAI; CHANG, 1995; FU; YU; BUSWELL, 1997).

Dentre os compostos aromáticos, destacam-se o álcool veratrílico e a 2,5-xilidina, muito utilizados na indução da produção de LiPs, MnPs e Lacs por diferentes fungos. A adição de álcool veratrílico nos cultivos de *Botryosphaeria* sp. em meio líquido aumentou a produção de Lacs constitutivas (PPO-I e PPO-II) por fatores iguais a 100 e 25 vezes, respectivamente, quando comparada com o cultivo não suplementado (DEKKER; BARBOSA, 2001). Em culturas de *P. chrysosporium*, a suplementação do meio de cultivo com este indutor teve um efeito positivo na produção de LiP (DING et al., 2008; FUJIAN; HONGZHANG; ZUOHU, 2001) bem como de MnP e Lac (COUTO et al., 2000). Para 2,5-xilidina, a suplementação de meios com este composto se mostrou bastante eficiente na indução da atividade de Lac na cultura de *Trametes versicolor* (RANCAÑO et al., 2003), fato que, de acordo com os autores, pode estar ligado com o aumento dos níveis de RNAm promovido pela presença do indutor (COLLINS; DOBSON, 1997). Uma das funções das lacases é a detoxificação de compostos aromáticos, promovendo a formação de radicais livres com concomitante polimerização dos mesmos (THURSTON, 1994). Assim, é possível que a indução de Lac pela 2,5-xilidina seja um indicativo de uma resposta desenvolvida pelo fungo para oxidar e então reduzir a potencialidade de efeitos tóxicos de tal composto (COLLINS; DOBSON, 1997; EGGERT; TEMP; ERIKSSON, 1996).

Por outro lado, o surfactante não iônico Tween 80 tem a capacidade de solubilizar substâncias orgânicas em meios aquosos (POZDNYAKOVA; RODAKIEWICZ-NOWAK; TURKOVSKAYA, 2004). Alguns autores têm observado um aumento na excreção de enzimas ligninolíticas na presença de Tween 80 em culturas de *P. chrysosporium* (COUTO et al., 2000; ÜREK; PAZARLIOGLU, 2005), entretanto o mecanismo envolvido ainda não foi completamente estabelecido. Asther et al. (1987) sugeriram, no entanto, que este surfactante transforma a estrutura da membrana celular e promove a excreção das enzimas para o meio extracelular. Porém, não é conhecido se Tween 80 exerce também um efeito indutivo na produção de enzimas ligninolíticas.

2.4. Considerações finais

Tomando como base a literatura anteriormente apresentada, nos cultivos de fungos promotores de degradação da madeira para produção de enzimas ligninolíticas, em especial

MnP e Lac, muitas são as condições e diferentes são os meios de cultivo utilizados com o intuito de aumentar a produção destas enzimas. Estes trabalhos mostram, de uma maneira geral, que os cultivos de *C. subvermispora* bem como de outros fungos de degradação da madeira são diretamente influenciados pelo tipo de meio, que pode ser de composição complexa ou definida e induzir ou não a expressão e excreção das enzimas ligninolíticas. Para tanto, estes meios de cultivo podem ser adicionados de suplementos ou nutrientes diferenciados como fonte de carbono, fonte de nitrogênio, íons metálicos, compostos aromáticos, compostos xenobióticos e sais, que são utilizados como componentes que podem atuar em nível molecular promovendo a expressão gênica de MnP e Lac. No mais, as condições de cultivo, sejam elas em superfície, submersa ou imobilizada em materiais inertes ou não, também são fatores coadjuvantes para que estes fungos possam produzir quantidades significativas de enzimas, porém, exercendo efeitos em menor grau de intensidade que os constituintes do meio de cultura. Por fim, a produção de enzimas ligninolíticas pode ser induzida ou mesmo reprimida por outros agentes externos bem como pela suficiência e/ou depleção de nutrientes.

3. Objetivos

O objetivo geral desse trabalho foi estudar e definir as condições de cultivo que maximizam a produção de MnPs e Lacs por *C. subvermispora*.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar cultivos em superfície, submersos e imobilizados em espuma de poliuretano, em meios de composição complexa ou definida, inoculados com discos de micélio crescido em meio sólido ou suspensões de micélio macerado crescido em meio líquido;
- Avaliar a influência da suplementação do meio de cultivo definido com diferentes concentrações de compostos como manganês, 2,5-xilidina, álcool veratrílico e Tween 80 em cultivos imobilizados em espuma de poliuretano;
- Caracterizar as proteínas extracelulares produzidas pelo fungo em condições de cultivo pré-selecionadas, por eletroforeses desnaturante (SDS-PAGE) e não desnaturante (NATIVE-PAGE).

4. Material e Métodos

Para execução dos experimentos foram realizados três conjuntos de cultivos, dois de 21 dias e um de 30 dias, com o fungo *C. subvermispora*.

O primeiro conjunto compreendeu seis cultivos, sendo três realizados em meio de composição definida e três em meio de composição complexa, sob diferentes formas de cultivo: em superfície, submerso e imobilizado em esponja de poliuretano. Os cultivos foram inoculados com discos de micélio recém-crescidos na superfície de um meio sólido à base de extrato de malte.

Para o segundo conjunto, que compreendeu quatro cultivos nas formas submersa e imobilizada, dois em meio de composição definida e dois em meio de composição complexa, empregou-se como inóculo uma suspensão de micélio macerado em água, proveniente de um cultivo na superfície de um meio líquido à base de extratos de batata/dextrose e de levedura.

O terceiro conjunto compreendeu cultivos na forma imobilizada em meio de composição definida, inoculados com suspensão de micélio macerado como citado anteriormente. Destes cultivos, três foram realizados variando-se a concentração de Mn^{2+} no meio, quatro foram realizados com adição de indutores da expressão de atividade de ligninases ao meio (dois cultivos foram suplementados com 2,5-xilidina, e dois com álcool veratrílico), e dois outros foram realizados suplementando-se o meio com Tween 80 juntamente com 2,5-xilidina. Para cada uma destas condições foi realizado um cultivo controle.

O preparo dos inóculos bem como as composições dos meios e as condições de cultivo são descritos detalhadamente a seguir.

4.1 Fungo e preparo do inóculo

Ceriporiopsis subvermispora, cepa SS3, gentilmente cedido pelo Prof. André Ferraz (EEL-USP), foi cultivado em placas de Petri com meio contendo 2% de extrato de malte e 2% de agar a 27 °C durante 7 dias.

Inóculo do primeiro conjunto de cultivos: das placas de Petri recém cultivadas com *C. subvermispora* foram retirados, com uma alça de inoculação, 3 discos de micélio com 8 mm de diâmetro, os quais foram inoculados em cada um dos frascos Erlenmeyer contendo o meio de cultivo.

Inóculo do segundo e terceiro conjuntos de cultivos: o fungo foi repicado em Erlenmeyer de 2 L contendo 200 mL de meio líquido composto por 2,4% (p/v) de extrato de batata/dextrose (DIFCO) e 0,7% (p/v) de extrato de levedura (OXOID). O meio foi esterilizado a 121°C/15 min e após resfriamento foi inoculado com 20 discos de 8 mm de diâmetro provenientes de placas de Petri recém cultivadas. Após 12 dias de incubação estática a 27 °C, o micélio crescido em meio líquido foi filtrado, lavado com 300 mL de água esterilizada e macerado em 100 mL de água também esterilizada usando um liquidificador de alumínio para a maceração. Da suspensão obtida foi retirada uma alíquota de 20 mL que foi filtrada sobre papel de filtro previamente seco e pesado em pesa-filtro. O micélio retido mais o papel de filtro mais o pesa-filtro foram então secos a 105 °C até massa constante para a determinação da quantidade de micélio (base seca) contido na suspensão recém preparada. Com base nessa determinação, foi definido o volume de suspensão (homogeneizada) necessário para inocular cada frasco de cultivo com uma concentração de 500 mg de micélio por L de meio.

4.2. Preparo do meio de cultura

Meio de Composição Complexa:

O meio complexo foi composto por 2,4% (p/v) de extrato de batata/dextrose (DIFCO) e 0,7% (p/v) de extrato de levedura (OXOID). Para cada condição de cultivo foram adicionados 600 mL de água destilada em Erlenmeyer de 1 L e dissolvidos os componentes do meio em banho-maria a 100 °C até a completa dissolução. O meio foi autoclavado a 121°C/15 min e, após resfriamento, distribuído nos frascos de fermentação.

Meio de Composição Definida:

A composição do meio definido foi idêntica àquela reportada por Ruttiman-Johnson et al. (1993). O meio de cultivo foi constituído, por litro de solução, por: 10 g de glicose, 10 mM de tartarato de amônio, 10 mM de ácido *trans*-aconítico, 2,0 g KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1,0 mg de tiamina HCl e 1,0 mL de solução de elementos traço. Esta última foi constituída, por litro, por: 15 g de ácido nitriloacético, 1,0 g de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,8 g de $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de $\text{ZnCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,07 g de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (referente à concentração de 1,8 ppm), 0,1 g de H_3BO_3 , 0,1 g de $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 30 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g de NaCl, 0,82 g de CaCl_2 e 5 g de $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (referente à concentração final de 11 ppm de Mn^{2+}). A solução de tiamina HCl foi esterilizada por filtração com filtro de 22 μm (MILLIPORE) em um Erlenmeyer de 125 mL estéril. As demais soluções foram autoclavadas isoladamente a 121 °C/15min, previamente à formulação do meio de cultura. Nos cultivos para o estudo do efeito da concentração de manganês, a concentração de $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ na solução de elementos-traço foi variada de forma a prover concentrações finais no meio de cultura de 0 (sem suplementação), 11 e 40 ppm de Mn^{2+} .

4.3. Condições de cultivo

Os cultivos em superfície e submerso foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL autoclavados a 121 °C/15 min. Após resfriados, foram adicionados 30 mL do meio de cultivo estéril. Para o cultivo imobilizado, foram adicionados 12 cubos de 1,5 cm³ de esponja de poliuretano a cada Erlenmeyer de 125 mL, previamente lavadas três vezes em água destilada, em seguida fervidas (100 °C) com água destilada por 10 minutos, e finalmente secas em estufa (105 °C). Após pesagem, os Erlenmeyers foram autoclavados a 121°C/15 min. Após resfriados, foram adicionados de 30 mL de meio previamente esterilizado.

Os cultivos foram inoculados conforme descrito no item 4.1. Os frascos foram incubados a 27 °C e agitados (180 rpm, cultivo submerso) ou não (cultivo em superfície e imobilizado) por um período de 21 dias para o primeiro e segundo conjuntos de cultivos e 30 dias para o terceiro conjunto, com a retirada de amostras (1 frasco = 1 amostra) a cada 3 dias de cultivo.

Para o terceiro conjunto de cultivos, três diferentes condições foram testadas. Na primeira condição, variou-se a concentração final de manganês, onde foram usados frascos com 0 (sem suplementação), 11 ou 40 ppm de Mn^{+2} , como descrito no item 4.2. Na segunda condição, foram realizados cultivos suplementados com concentração final de 0,5 mM ou 1,0 mM de 2,5-xilidina, e também cultivos suplementados com concentração final de 1,0 mM ou 2,0 mM de álcool veratrílico, mantendo-se a concentração de Mn^{+2} em 11 ppm. Na terceira condição, variou-se a concentração final de Tween 80 (0,05% ou 0,5% v/v) no meio de cultura, mantendo-se a concentração de 2,5-xilidina em 1,0 mM e a concentração de Mn^{+2} em 11 ppm. Os indutores 2,5-xilidina e álcool veratrílico foram esterilizados por filtração com filtros estéreis de 22 μm (MILLIPORE), enquanto o Tween 80 foi esterilizado juntamente com o meio de cultivo. Todos estes aditivos foram adicionados ao meio de cultivo de forma a se obter as concentrações finais anteriormente citadas e foram adicionados ao meio no início dos cultivos, previamente à inoculação.

Cada cultivo foi realizado em duplicata exceto o cultivo controle do terceiro conjunto de experimentos que foi realizado em sextuplicata.

4.4. Recuperação do micélio e determinação do crescimento fúngico

A recuperação do micélio foi realizada por filtração onde o conteúdo de cada Erlenmeyer foi transferido para um funil de inox com filtro de fibra de vidro (AP40, MILLIPORE) previamente pesado (massa seca), acoplado a um frasco Kitasato mantido sob vácuo. O filtrado foi recolhido e congelado para posteriores análises (atividade enzimática, teor de açúcares, proteínas totais, teor de amônia, pH, condutividade, espectro de absorção na região UV-VIS e análises eletroforéticas). O conjunto micélio mais filtro (nos cultivos em superfície e submerso) mais esponja de poliuretano (no cultivo imobilizado), após lavagem com 30 mL de água destilada, foi recolhido em um pesa-filtro (também seco e pesado) e então seco a 105 °C até massa constante para determinação da massa de micélio (base seca).

4.5. Determinação do teor de açúcares redutores

Os açúcares redutores dos extratos foram analisados pelo método do DNS (MILLER, 1959) e sua concentração foi calculada baseada em uma curva de calibração feita com glicose. Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,5 mL de extrato, 1,0 mL de água deionizada e 3,0 mL de DNS. Para o branco, foram utilizados 1,5 mL de água deionizada e 3,0 mL de DNS. As misturas foram levadas em banho-maria a 100 °C por 5 min. Após resfriar a temperatura ambiente, foram adicionados 20 mL de água deionizada e as amostras foram homogeneizadas; por fim, foi realizada leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-VIS a 540 nm.

4.6. Determinação do teor de proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), sendo a concentração calculada baseada em uma curva de calibração feita com soroalbumina bovina. Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,1 mL de extrato e 1 mL do reagente de Bradford. Para o branco foi utilizado 0,1 mL de água deionizada e 1 mL do reagente de Bradford. As misturas reacionais foram agitadas e deixadas em descanso por 15 min e após este período foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-VIS a 595 nm.

4.7. Determinação do teor de nitrogênio amoniacal

A determinação do teor de nitrogênio amoniacal foi realizada pelo método do fenol-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967) e sua concentração calculada baseada em uma curva de calibração feita com sulfato de amônio. Foram utilizadas na reação duas soluções: A- composta de fenol e nitroprussiato e B- composta por NaOH e hipoclorito de sódio. Em um tubo de ensaio foram adicionados 20 µL de extrato, 5,0 mL da solução A e 5,0 mL da solução B. O branco foi feito adicionando-se 20 µL de água deionizada à mistura, no lugar do extrato. Entre a adição da solução A e a da solução B foi realizada agitação vigorosa do tubo de ensaio, sendo repetida esta ação após adição da segunda solução. As

misturas ficaram em repouso à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida foi feita a leitura da absorbância a 625 nm em espectrofotômetro UV-VIS.

4.8. Medição do pH, condutividade e espectro de absorção na região UV-VIS

O pH das amostras foi medido com um pHmetro e a condutividade com um condutivímetro. A absorção de luz na região UV-VIS do espectro (200-700 nm) foi determinada com um espectrofotômetro UV-visível. Fez-se, também, a determinação da concentração de proteínas totais pela absorção de luz a 280 nm, MnP a 405 nm e Lac a 610 nm; para tal, as amostras foram descongeladas, centrifugadas a 12.000 g e apropriadamente diluídas previamente à leitura da absorbância.

4.9. Determinação de atividades enzimáticas

4.9.1. Determinação da atividade enzimática de lacase

A atividade de lacase foi determinada utilizando-se como substrato 0,1 mL de uma solução de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] em concentração de 1 mM. A reação de oxidação foi conduzida em 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM e pH 5,0, 0,1 mL de água e 0,5 mL de extrato. A reação foi monitorada entre 10 s e 5 min através da leitura da absorbância em um aparelho de UV-visível no comprimento de onda de 420 nm. A atividade enzimática foi calculada com base na absortividade molar do ABTS ($\epsilon_{420\text{nm}} = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol do produto formado por minuto (BOURBONNAIS; LEECH; PAICE, 1998).

4.9.2. Determinação da atividade enzimática de manganês peroxidase

Manganês peroxidase foi determinada pela oxidação de 0,5 mL de vermelho de fenol 0,1 % (a dissolução do vermelho de fenol em água foi feita pelo ajuste continuado do pH em 7,4) em 1,5 mL de tampão succinato de sódio 20 mM (pH 4,5), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,25 mL de albumina 1%, 0,5 mL de MnSO_4 1 mM, 0,5 mL de extrato e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM. Em intervalos de tempo definidos entre 1 e 5 minutos, 1 mL da mistura contida no tubo de ensaio foi removida e a esse volume foi feita a adição de 65 μL de hidróxido de sódio 6,5 M para interromper a reação e realizar a leitura no espectrofotômetro. A cinética da reação foi avaliada medindo-se a absorbância do produto de reação em 610 nm. A atividade de MnP foi calculada com base na absorvidade molar do vermelho de fenol oxidado ($\epsilon_{610\text{nm}} = 22.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol do produto formado por minuto (KHINDARIA; GROVER; AUST, 1994; LUNDELL et al., 1990).

4.9.3. Determinação da atividade enzimática de lignina peroxidase

A atividade de lignina peroxidase foi determinada espectroscopicamente de acordo com o método de TIEN E KIRK (1988). A mistura reacional foi composta por 0,22 mL de ácido tartárico 50 mM em pH 2,5, 0,2 mL de álcool veratrílico 10 mM, 0,08 mL de peróxido de hidrogênio 5 mM e 0,5 mL de extrato enzimático. Monitorou-se a oxidação do substrato a 310 nm ($\epsilon_{310\text{nm}} = 9.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1 μmol de produto por minuto.

4.9.4. Determinação da atividade enzimática de celobiose desidrogenase

A atividade de celobiose desidrogenase (CDH) foi determinada pelo método descrito por BAMINGER et al. (1999). A reação foi conduzida em cubeta de 1 mL contendo 0,5 mL de tampão acetato de sódio 100 mM em pH 4,0, 0,2 mL de extrato enzimático, 0,1 mL de NaF 40 mM, 0,1 mL de lactose 300 mM e 0,2 mL de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) 3 mM. A redução de DCPIP foi monitorada por 5 min em 520 nm ($\epsilon_{520\text{nm}} = 6.800$

$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol do substrato consumido por minuto.

4.9.5. Exemplos de cálculos de atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática envolve o estudo da cinética de reação, que deve ser medida em condições nas quais a velocidade de reação seja máxima, de modo que toda enzima esteja ligada ao substrato, como teorizado por Michaelis e Mentem. Assim, a velocidade de reação é proporcional à concentração da enzima de interesse. Para se obter a velocidade máxima, é necessário garantir que o substrato encontre-se em excesso no meio reacional (Figura 6). Para garantir esta condição nas reações de determinação da atividade enzimática, uma estratégia é a diluição do extrato enzimático.

Figura 6. Esquema representativo do mecanismo de ação enzimática em diferentes concentrações de substrato.

A seguir é apresentada a equação de Lambert-Beer e os passos para o cálculo da atividade enzimática.

Lei de Lambert-Beer

$$V_1 = \epsilon \cdot l \cdot V_2 \quad (1)$$

Onde: V_1 – velocidade de reação [Abs/min];
 ϵ – absortividade molar [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$];
 l – caminho ótico [cm];
 V_2 – velocidade de reação [M min^{-1}];

Passos para o cálculo da atividade enzimática:

1º Passo: isolar a variável V_2 e multiplicar por 1×10^6 ;

$$V_2 = \frac{V_1 \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot l} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{L}} \right] \quad (2)$$

2º Passo: dividir a variável V_2 por 1000;

$$V_3 = \frac{V_2}{1000} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mL}} \right] \quad (3)$$

3º Passo: multiplicar a variável V_3 por 1 para o cálculo da atividade de Lac (equação 4) ou por 5 para o cálculo da atividade de MnP (equação 5), estes fatores 1 ou 5 são referentes ao volume da reação (mL);

$$V_4 = V_3 \cdot 1 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right] \quad (4)$$

$$V_4 = V_3 \cdot 5 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right] \quad (5)$$

4º Passo: dividir a variável V_4 pelo volume de extrato (mL) utilizado na determinação da atividade enzimática obtendo a atividade por volume de extrato (A).

$$A = \frac{V_4}{v_{\text{extrato}}} \left[\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right] \quad (6)$$

A seguir são apresentados dois exemplos de cálculos das atividades enzimáticas de MnP e Lac em extratos obtidos a partir dos cultivos de *C. subvermispora*.

Atividade de MnP:

Esta determinação foi realizada com extrato de cultivo em meio definido, estando o micélio imobilizado em espuma de poliuretano. Na Figura 7 apresentam-se os perfis cinéticos de oxidação do substrato empregando-se as diferentes diluições do extrato (não diluído - A, e diluído 5 vezes - B). Foi realizada regressão linear dos dados experimentais pelo método dos mínimos quadrados como forma de obtenção das velocidades de reação

(Abs/min), sendo estas equivalentes aos coeficientes angulares das retas ajustadas aos dados experimentais. Através da equação da lei de Lambert-Beer apresentada anteriormente, chegou-se aos valores de 0,224 UI/mL para o extrato não diluído e 0,082 UI/mL para o extrato diluído 5 vezes. Nota-se que a atividade relativa no extrato diluído foi menor que a apresentada para o extrato não diluído. Teoriza-se que este efeito pode ter ocorrido pelo excesso de H_2O_2 , onde o composto II foi oxidado pelo H_2O_2 até o composto III, uma forma de MnP com limitada capacidade catalítica. Esta hipótese explica a atividade enzimática menor no extrato diluído frente ao não diluído.

Figura 7. Cinética de reação enzimática de MnP conduzida com extrato não diluído (A) e com extrato diluído 5 vezes (B).

Atividade de Lac:

Esta determinação foi realizada com extrato de cultivo em meio complexo, estando o micélio imobilizado em espuma de poliuretano. Na Figura 8 apresentam-se os perfis cinéticos de oxidação do substrato empregando-se as diferentes diluições do extrato (não diluído - A, e diluído 10 vezes - B). Os cálculos e a obtenção do coeficiente angular foram realizados como descrito anteriormente. Foram encontradas atividades de Lac de 0,050 UI/mL no ensaio cujo extrato não foi diluído e atividade de 0,103 UI/mL para o extrato diluído 10 vezes. No ensaio com extrato não diluído a concentração de substrato no meio reacional adquiriu um papel limitante na reação, tornando a concentração de substrato inferior à necessária para saturação. Enquanto que a diluição do extrato proporcionou excesso de substrato no meio reacional, mantendo a velocidade máxima ao longo de todo o tempo da reação. Portanto, a reação de atividade de Lac seguiu o esperado onde a atividade do extrato diluído foi maior que a atividade do extrato não diluído, seguindo a teoria de Michaelis-Mentem.

Figura 8. Cinética de reação enzimática de Lac conduzida com extrato não diluído (A) e com extrato diluído 10 vezes (B).

Em todos os cálculos de atividade enzimática utilizados nesse trabalho foi estabelecido que a absorbância medida no espectrofotômetro ao final da reação deveria ser menor ou igual a 1,0. Caso este limite fosse ultrapassado, deveriam ser realizadas diluições do extrato bruto (as mínimas possíveis) para que o valor da absorbância se mantivesse no limite estipulado.

4.10. Análise estatística

Foi realizada análise de variância para se verificar a existência de diferenças significativas nas atividades enzimáticas máximas obtidas nos diferentes cultivos. Diferenças estatisticamente significativas foram identificadas através do teste de Tukey.

4.11. Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) e não desnaturante (NATIVE-PAGE)

Foi realizada análise eletroforética desnaturante e não desnaturante dos extratos obtidos durante os cultivos de *C. subvermispora* imobilizado em espuma de poliuretano, em meios de composição complexa e definida, sendo este último suplementado ou não com 2,5-xilidina 1,0 mM, na presença ou ausência de Tween 80 0,05% v/v.

4.11.1. Preparação das amostras para as análises eletroforéticas

Todas as amostras provenientes de cada um dos 4 cultivos supramencionados (retiradas ao longo dos cultivos, filtradas e armazenadas em freezer) foram descongeladas e misturadas, formando um único extrato (extrato bruto) para cada um dos cultivos. Os extratos brutos foram centrifugados a 3000 g por 20 min, descartando-se os precipitados.

Os sobrenadantes foram então concentrados 70 vezes por ultra-filtração, utilizando-se uma membrana com diâmetro nominal de poros de 10 kDa (MILIPORE Amicon Ultra-15) em centrífuga operada a 3000 g. Os concentrados foram finalmente transferidos do módulo de ultra-filtração para frascos Eppendorf de 0,5 mL com o auxílio de uma micropipeta, e congelados em freezer convencional até o momento da análise eletroforética.

4.11.2. Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE)

As eletroforeses sob condições desnaturantes foram realizadas em gel de poliacrilamida de duas fases, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). As corridas foram realizadas em duas etapas. Na etapa de concentração, o gel foi submetido a 100 V e 30 mA; já na etapa de separação, empregaram-se diferença de potencial de 150 V e corrente de 30 mA. Os géis foram montados em placas de vidro (10 x 10 cm) com 1 mm de espessura. Para o preenchimento da cuba foi utilizado tampão tris hidroximetil aminometano 51,2 mM/glicina 53,2 mM em pH 8,9, acrescido de SDS 0,1% p/v (ALFENAS et al., 1991).

4.11.2.1. Géis

Os géis de poliacrilamida foram obtidos por copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida na presença de persulfato de amônio e tetrametiletilenodiamina. Os componentes acrílicos foram preparados segundo LAEMMLI (1970), em duas fases, que consistem em géis concentrador e separador, preparados com os componentes descritos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador (SDS-PAGE).

Soluções	Concentração 4,5%
Acrilamida (4,11 M): Bis-acrilamida (51,2 mM) (36,5:1)	0,750 mL
Tris-HCl 0,6173 M pH 6,8	0,375 mL
Água deionizada	2,785 mL
SDS 10% (m/v)	25,0 µL
Persulfato de amônio 10% (m/v)	62,5 µL
TEMED	20,0 µL

Tabela 4. Reagentes utilizados na preparação do gel separador (SDS-PAGE).

Soluções	Concentração 10%
Acrilamida (4,11 M): Bis-acrilamida (51,2 mM) (36,5:1)	2,50 mL
Tris-HCl 3,7780 M, pH 8,9	0,75 mL
Água deionizada	4,20 mL
SDS 10 % (p/v)	50,0 µL
Persulfato de amônio 10 % (p/v)	125,0 µL
TEMED	20,0 µL

4.11.2.2. Amostras

Após o descongelamento, as amostras foram misturadas, em frascos Eppendorf de 0,5 mL, ao tampão da amostra. Os volumes de extrato e de tampão da amostra foram variados em função do extrato, conforme apresentado na Tabela 5. Em seguida, os frascos foram levados à fervura por 5 minutos. Após resfriamento, as amostras foram cuidadosamente injetadas em canaletas formadas no gel concentrador.

Tabela 5. Volumes de extrato concentrado e de tampão da amostra injetados no gel desnaturante (SDS-PAGE), com as respectivas concentrações de proteínas totais em cada condição de cultivo de *C. subvermispora*.

Amostra	Volume de extrato (μL)	Volume do tampão da amostra (μL)	Proteínas totais (mg/L)*
Meio Complexo	15	10	185,2
Meio Definido	25	5	39,7
Meio Definido + 2,5 xilidina 1,0 mM	25	5	38,4
Meio Definido + 2,5 xilidina 1,0 mM + Tween 80 0,05% v/v	25	5	72,8

*Concentração de proteínas totais determinadas no extrato concentrado.

4.11.2.3. Tampão da amostra

O tampão da amostra foi preparado misturando-se os componentes apropriados, de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6. Reagentes utilizados na preparação do tampão da amostra (SDS-PAGE).

Reagentes	Quantidades
Tris-HCl 0,6173M pH 6,8	2,5 mL
SDS 10% (m/v)	4,0 mL
β-Mercaptoetanol	2,0 mL
Glicerol	5,0 mL
H ₂ O destilada	11,5 mL
Azul de Bromofenol	10,0 mg

4.11.2.4. Revelação

Após a corrida eletroforética, as bandas proteicas presentes no gel foram reveladas por impregnação com nitrato de prata. O gel foi incubado por 30 minutos em solução contendo 20 mL de etanol, 5 mL de ácido acético e água destilada para completar 50 mL de solução. Em seguida, o gel foi incubado por 30 minutos numa solução contendo 15 mL de etanol, 0,25 mL de glutardialdeído (25%), 2 mL de tiosulfato de sódio (5%), 3,4 g de acetato de sódio e água destilada em quantidade suficiente para 50 mL de solução. O gel foi então lavado com água destilada (3 vezes), durante 5 minutos para cada lavagem. Após as lavagens, o gel foi mantido por 20 minutos, na ausência de luz, numa solução contendo 5 mL de nitrato de prata (2,5%), 0,02 mL de formaldeído (37%) e água destilada até o volume de 50 mL. O gel foi novamente lavado com água destilada por 2 vezes e, em seguida, colocado em contato com uma solução reveladora contendo 1,25 g de carbonato de sódio, 0,02 mL de formaldeído (37%) e água destilada em quantidade suficiente para 50 mL de solução, no qual permaneceu até o aparecimento das bandas de proteínas. A reação foi interrompida pela transferência do gel para uma solução contendo 3,65 g de EDTA em 250 mL de água destilada. Todas as soluções foram preparadas no momento do uso.

4.11.3. Eletroforese nativa (NATIVE-PAGE)

As eletroforeses nativas foram realizadas em gel de poliacrilamida na ausência de SDS. Na etapa de concentração, o gel foi submetido a 100 V e 30 mA; na etapa de separação, a 150 V e 30 mA. Os géis foram montados em placas de vidro (10 x 10 cm) com 1 mm de espessura. Para o preenchimento da cuba foi utilizado tampão tris hidroximetil aminometano 51,2 mM/glicina 53,2 mM em pH 8,9, na ausência de SDS.

4.11.3.1. Géis

Os géis de poliacrilamida utilizados para a determinação da atividade de Lac e MnP foram preparados por copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida na presença de persulfato de amônio e tetrametiletilenodiamina, de acordo com as Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador (NATIVE-PAGE).

Soluções	Concentração 4,5%
Acrilamida 4,11 M: Bis-acrilamida 51,2 mM (36,5:1)	0,750 mL
Tris-HCl 0,6173 M pH 6,8	0,375 mL
Água deionizada	2,810 mL
Persulfato de amônio 10% (m/v)	62,5 µL
TEMED	20,0 µL

Tabela 8. Reagentes utilizados na preparação do gel separador (NATIVE-PAGE).

Soluções	Concentração 10%
Acrilamida 4,11 M: Bis-acrilamida 51,2 mM (36,5:1)	2,50 mL
Tris-HCl 3,778M, pH 8,9	0,75 mL
Água deionizada	4,25 mL
Persulfato de amônio 10% (m/v)	125,0 µL
TEMED	20,0 µL

4.11.3.2. Amostras

Após o descongelamento, as amostras foram misturadas, em frascos Eppendorf de 0,5 mL, variando-se os volumes de extrato e de tampão da amostra em função do extrato, conforme apresentado na Tabela 9. Logo após a mistura, as amostras foram cuidadosamente injetadas em canaletas formadas no gel concentrador.

Tabela 9. Volumes de extratos concentrados e de tampão da amostra injetados nas canaletas dos géis não desnaturantes (NATIVE-PAGE) para revelação das atividades de manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac), com as respectivas concentrações de proteínas totais e atividades de MnP e Lac.

Amostra	Volume de extrato (µL)		Volume do tampão da amostra (µL)		Atividade (UI/L)*		Proteínas totais (mg/L)*
	MnP	Lac	MnP	Lac	MnP	Lac	
Meio Complexo	25,0	2,5	5,0	27,5	602	2477	185,2
Meio Definido	25,0	25,0	5	5,0	936	340	39,7
Meio Definido + 2,5 xilidina 1,0 mM	25,0	25,0	5	5,0	836	217	38,4
Meio Definido + 2,5 xilidina 1,0 mM + Tween 80 0,05% v/v	15,0	5,0	10	20,0	1936	1338	72,8

* Concentração de proteínas totais e atividade enzimática determinadas no extrato concentrado.

4.11.3.3. Tampão da amostra

O tampão da amostra foi preparado misturando-se os componentes apropriados, de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10. Reagentes utilizados na preparação do tampão da amostra (NATIVE-PAGE).

Reagentes	Quantidades
Tris-HCl 0,6173M pH 6,8	2,5 mL
β-Mercaptoetanol	2,0 mL
Glicerol	5,0 mL
H ₂ O destilada	15,5 mL
Azul de Bromofenol	10,0 mg

4.11.3.4. Revelação

Logo após a saída do marcador, azul de bromofenol, do gel separador, foram feitas as revelações para as atividades de Lac e MnP.

Para a revelação da atividade de Lac, o gel foi incubado com 20 mL de tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,0 em placa de Petri com 20 cm de diâmetro por 10 minutos a temperatura ambiente, para o ajuste do pH do gel. O tampão foi removido e ao gel foi adicionado 20 mL de uma solução de ABTS 1,0 mM para a revelação das bandas proteicas. Ao iniciar o aparecimento de bandas, o gel foi retirado da placa de Petri e as bandas de atividade foram registradas por fotografia (ERKURT; UNYAYAR; KUMBUR, 2007; MURUGESAN et al., 2006; TOSVALET et al., 2007).

Para a revelação da atividade de MnP, o gel foi incubado em 15 mL de tampão succinato de sódio 50 mM em pH 3,2, também em placa de Petri de 20 cm de diâmetro por 10 minutos a temperatura ambiente. Sem descartar o tampão, adicionou-se à placa de Petri: 15 mL de lactato de sódio 50 mM, 5,0 mL de vermelho de fenol 0,1 %, 5,0 mL de sulfato de manganês 1 mM, 2,5 mL de albumina bovina 1,8% e 2,5 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM. O gel foi mantido em contato com essa mistura por 30-40 minutos e, após este período, adicionou-se 0,65 mL de hidróxido de sódio 6,5 mM para parar a reação e promover a revelação das bandas de atividade, que em seguida foram fotografadas (CARVALHO et al., 2008).

5. Resultados e Discussão

Muitos estudos têm focado o cultivo de *C. subvermispora* em processos de biopolpação (AKHTAR, 2000; FERRAZ, 2008; VICENTIN; FERRAZ, 2007). Porém, outros estudos também estão focados na produção de enzimas por *C. subvermispora* em diferentes formas de cultivo com meios líquidos ou sólidos com o uso dos mais diversos suplementos com intuito de variar ou até mesmo otimizar o cultivo desse fungo para alcançar níveis consideráveis das enzimas ligninolíticas MnP e Lac. No Apêndice A está apresentada uma Tabela A que mostra diferentes formas de cultivo (superfície, submersa e imobilizada em suportes inertes ou não), meios (definidos e complexos) e níveis de atividade (MnP e Lac) obtidos nos cultivos de *C. subvermispora* reportados em diferentes trabalhos.

A seguir serão mostrados os principais resultados alcançados nos cultivos de *C. subvermispora* e análises realizadas a partir dos extratos obtidos das diferentes condições estudadas (superfície, submersa e imobilizada), meios de cultivo (definidos e complexos) e suplementos indutores da atividade enzimática ou não (2,5-xilidina, álcool veratrílico e Tween 80) a fim de obter a máxima produção de MnP e Lac.

5.1 Cultivos de *C. subvermispora* em meios inoculados com discos de micélio crescidos em meio sólido

Nesta primeira série de experimentos foram realizados seis cultivos utilizando-se dois meios de cultivo, um de composição complexa e outro de composição definida. Estes cultivos foram realizados sob três diferentes formas de cultivo: a) em superfície, onde o fungo foi incubado estaticamente, b) submerso, onde o fungo foi incubado sob agitação constante, e c) imobilizado, onde o fungo foi incubado estaticamente na presença de espuma de poliuretano. Estes cultivos foram inoculados com discos de micélio crescido em meio sólido.

Na Tabela 11 apresentam-se os níveis de expressão de MnP alcançados durante o cultivo de *C. subvermispora* nas diferentes condições de cultivo supramencionadas. Pode-se notar que em nenhuma das formas de cultivo (superfície, submerso, e imobilizado) e dos meios avaliados (definido e complexo) houve diferença significativa na produção desta enzima. Assim, de acordo com os resultados da análise estatística, nem a forma de cultivo nem a composição do meio influenciaram a atividade de MnP.

Para os cultivos em meio de composição complexa, a forma de cultivo que evidenciou a maior produção de Lac foi o cultivo imobilizado, com um máximo de atividade ($147,5 \pm 5,0$ UI/L) observado aos 9 dias; a máxima atividade de MnP obtida neste cultivo foi relativamente baixa ($16,7 \pm 0,1$ UI/L). Em meio definido, as atividades médias de Lac variaram entre $4,0 \pm 1,4$ UI/L e $70,0 \pm 42,4$ UI/L, dependendo da forma de cultivo (Tabela 11).

Tabela 11. Atividade enzimática máxima de manganês peroxidase e lacase, verificadas durante os 21 dias de cultivo. Inóculo: discos de micélio.

Meio	Cultivo	MnP (UI/L)*	Lac (UI/L)*
Definido*	Superfície	$88,0 \pm 5,7^a$	$12,0 \pm 8,5^{a,e}$
	Submerso	$226,5 \pm 317,5^a$	$70,0 \pm 42,4^{d,e}$
	Imobilizado	$190,0 \pm 65,1^a$	$4,0 \pm 1,4^{a,c}$
Complexo*	Superfície	$8,0 \pm 11,3^a$	$42,0 \pm 59,4^{a,c,d}$
	Submerso	$79,5 \pm 112,4^a$	$75,5 \pm 13,4^d$
	Imobilizado	$16,7 \pm 0,1^a$	$147,5 \pm 5,0^b$

* Valores dos desvios são baseados no desvio padrão da duplicata dos cultivos. Em cada coluna, os valores marcados com letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,10$). O meio definido é formado por glicose, tartarato de amônio e sais e o meio complexo é formado por extrato de batata dextrose e extrato de levedura.

Para o cultivo imobilizado, em particular, uma maior produção de Lac foi obtida em meio complexo enquanto a atividade de MnP foi favorecida no cultivo em meio de composição definida. Isso indica que a atividade destas enzimas ligninolíticas foram influenciadas pela composição do meio de cultura, em conformidade com os trabalhos prévios de Ruttiman-Johnson et al. (1993) e Babic e Pavko (2007). Neste último trabalho, avaliaram diferentes formas de cultivo e variações da composição do meio (definido ou complexo) para o cultivo *C. subvermispora* os quais alcançaram diferentes níveis de atividade de MnP e Lac. Primeiramente estes pesquisadores, otimizaram o meio de cultivo variando diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose e frutose) em culturas

estacionárias do fungo em meio definido. Nestes cultivos foram encontradas diferentes atividades enzimáticas para cada tipo de fontes de carbono onde a máxima atividade de Lac (250 U/L) alcançada com sacarose suplementada no meio de cultura e máxima atividade de MnP (97 U/L) alcançada com glicose. Também avaliaram cultivos de *C. subvermispora* imobilizados em diferentes suportes inertes (espuma de poliuretano) ou não (madeira). Verificaram que as maiores atividades foram alcançadas com cavacos de faia (“*beech Wood*”) usados como suporte e substrato com máximas atividades de 152 UI/L para Lac e 135 U/L para MnP e para pinus e a condição imobilizada em espuma de poliuretano foram observadas atividades de 104 e 2 U/L de Lac e 53 e 41 U/L para MnP, respectivamente (BABIC; PAVKO, 2007).

Durante os cultivos inoculados com discos de micélio, observou-se variabilidade experimental excessiva. Acredita-se que a distribuição não uniforme do micélio no meio sólido utilizado para inocular os diferentes frascos de cultivo tenha sido a causa das consideráveis divergências observadas entre as atividades enzimáticas determinadas nas amostras em duplicata. Assim, para obter-se maior controle da carga de inóculo nos cultivos foi proposto o uso uma suspensão de micélio macerado como inóculo.

5.2. Cultivos de *C. subvermispora* em meios inoculados com suspensão de micélio macerado crescido em meio líquido

Este conjunto de experimentos compreendeu quatro cultivos sendo dois em meio de composição definida e dois em meio de composição complexa nas formas de cultivo submerso e imobilizado em espuma de poliuretano. A diferença em relação ao primeiro conjunto anteriormente apresentado se deveu à forma de inocular o fungo, sendo utilizada para tal uma suspensão de micélio macerado em água, a fim de diminuir a variabilidade experimental observada nos cultivos iniciais (AGUIAR et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; DAINA et al., 2002;).

Os extratos provenientes destes quatro cultivos em meio de composição definida e complexa foram analisados quanto à atividade de MnP, a atividade de Lac, concentração de micélio, consumo de açúcares redutores, pH e condutividade conforme descritos no item 4.

Na Tabela 12 estão apresentadas as atividades máximas nas diferentes formas de cultivo de *C. subvermispora*. No cultivo submerso em meio definido, a atividade máxima de MnP foi de $192,0 \pm 28,3$ UI/L aos 18 dias de cultivo, enquanto para Lac foi de $71,0 \pm 5,7$ UI/L no 6º dia de cultivo. Para ambas as enzimas o início de atividade ocorreu a partir do 3º dia de cultivo. Estes níveis de atividade enzimática estão abaixo dos níveis apresentados por Ruttimann-Johnson et al. (1993), que cultivaram *C. subvermispora* em condições semelhantes. Variando as concentrações das fontes de carbono (glicose) e nitrogênio (tartarato de amônio) em meio de cultivo definido, estes autores obtiveram títulos de atividade de 600 UI/L para MnP e 380 UI/L para Lac com 1% de glicose e 10 mM de tartarato de amônio. Estas diferenças entre os resultados do presente trabalho e aqueles reportados por Ruttimann-Johnson et al. (1993) ilustram a conhecida variabilidade existente entre cepas de um mesmo fungo. Este fato foi confirmado em outro trabalho realizado pelo grupo de Vicuña (RUTTIMANN et al., 1992), onde diferentes cepas de *C. subvermispora* foram cultivadas em meio definido na forma submersa. Os autores observaram níveis de atividade enzimática diferenciados entre cepas de *C. subvermispora* ao variar a concentração da fonte de nitrogênio, tartarato de amônio. Níveis máximos de MnP em torno de 500 e 375 UI/L foram verificados na presença de 10 mM de tartarato de amônio para as cepas L-15225 e FP-90031, respectivamente; ao suplementarem o meio com 50 mM de tartarato de amônio, entretanto, as atividades máximas foram em torno de 300 e 500 UI/L, respectivamente.

No cultivo submerso em meio de composição complexa, a atividade máxima de MnP (69,0 UI/L, aos 12 dias) foi menor que aquela observada em meio definido. Para a atividade de Lac, entretanto, o nível de atividade não foi estatisticamente diferente daquele obtido em meio definido (Tabela 12). Lorenzo et al. (2002), em cultivos submersos de *Trametes versicolor* suplementados com palha de cevada, atingiram níveis de atividade de Lac de 639 U/L. Apesar do cultivo de *C. subvermispora* atingir níveis menores de atividade de Lac em relação ao cultivo de *T. versicolor*, o meio complexo induziu a uma atividade de Lac maior que a de MnP. Por outro lado, quando *C. subvermispora* é cultivado em madeira ocorre o inverso, ou seja, a produção de MnP é favorecida e pouco ou nenhuma atividade de Lac é detectada (VICENTIM ; FERRAZ, 2007; MENDONÇA et al., 2008).

Comparando os níveis de atividade das enzimas ligninolíticas alcançados durante o cultivo imobilizado em meio definido e complexo, foi observado que no primeiro a maior atividade de MnP foi de $277,5 \pm 54,5$ UI/L aos 21 dias de cultivo; este cultivo apresentou

baixa atividade de Lac ($16,0 \pm 5,7$ UI/L). Já as máximas atividades de MnP e Lac obtidas durante o cultivo imobilizado em meio de composição complexa foram de $46,5 \pm 0,7$ UI/L e $112,0 \pm 9,9$ UI/L, respectivamente (Tabela 12). Estes resultados foram superiores àqueles obtidos no estudo de Babic e Pavko (2007), que cultivaram *C. subvermispora* imobilizado em espuma de poliuretano em meio definido e obtiveram baixas atividades de MnP (41 UI/L) e Lac (2 UI/L). Por outro lado, em cultivos de *Bjerkandera adusta*, Nakamura et al. (1999) alcançaram as maiores atividades de MnP e Lac (370 e 100 U/L, respectivamente) quando realizaram o cultivo em meio definido com o fungo imobilizado em espuma de poliuretano.

Tabela 12. Atividade enzimática máxima de manganês peroxidase e lacase, verificadas durante os 21 dias de cultivo. Inóculo: micélio macerado.

Meio	Cultivo	MnP (UI/L)*	Lac (UI/L)*
<i>Definido</i> *	<i>Submerso</i>	$192,0 \pm 28,3^a$	$71,0 \pm 5,7^a$
	<i>Imobilizado</i>	$277,5 \pm 54,5^b$	$16,0 \pm 5,7^b$
<i>Complexo</i> *	<i>Submerso</i>	$69,0 \pm 0,0^c$	$116,5 \pm 50,2^a$
	<i>Imobilizado</i>	$46,5 \pm 0,7^c$	$112,0 \pm 9,9^a$

* Valores dos desvios são baseados no desvio padrão da duplicata dos cultivos. Em cada coluna, os valores marcados com letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,10$). O meio definido é formado por glicose, tartarato de amônio e sais e o meio complexo é formado por extrato de batata dextrose e extrato de levedura.

A melhor forma para produção de MnP foi o cultivo imobilizado em meio definido. As atividades de Lac obtidas nos cultivos submerso e imobilizado em meio complexo e no cultivo submerso em meio definido não diferiram significativamente entre si; em contra partida, a atividade desta enzima foi afetada negativamente no cultivo imobilizado em meio definido. No geral, os cultivos em meio de composição definida favoreceram a atividade de MnP em detrimento de Lac, enquanto os cultivos em meio complexo favoreceram a atividade de Lac em detrimento de MnP semelhante ao observado nos cultivos iniciais (item 5.1). A forma de inoculação, com suspensão de micélio macerado em água, diminuiu a variabilidade experimental, mostrando um efeito positivo na padronização da quantidade de inóculo transferida para cada um dos frascos de cultivo.

5.2.1. Variação das concentrações de biomassa e açúcares redutores, do pH e da condutividade durante os cultivos de *C. subvermispota*

Durante os cultivos de *C. subvermispota* nas diferentes formas de cultivo (submersa e imobilizada em espuma de poliuretano) em meio de composição complexa e definida, foram acompanhados o crescimento celular, o consumo de açúcares redutores, o pH e a condutividade a fim de avaliar o comportamento do fungo durante os diferentes cultivos.

Conforme ilustrado na Figura 9, em todos os cultivos houve um aumento da concentração de biomassa ao longo do tempo. Porém, nota-se uma maior concentração de micélio nos cultivos em que o meio complexo foi utilizado como fonte nutricional, com um máximo de $5,8 \pm 0,0$ g/L aos 18 dias de cultivo submerso e um máximo de $6,1 \pm 0,4$ g/L aos 21 dias de cultivo imobilizado. Para os cultivos em meio de composição definida, o máximo de concentração micelial foi de $3,5 \pm 0,1$ g/L para a condição submersa e de $3,3 \pm 0,0$ g/L para a condição imobilizada (21º e 12º dia, respectivamente). Ao final dos cultivos, a concentração de biomassa obtida no meio complexo foi 1,6-2,3 vezes maior que aquela obtida no meio definido.

Figura 9. Variação da concentração de biomassa ao longo dos cultivos. Meio complexo (MC); meio definido (MD); cultivo submerso (CS); cultivo imobilizado (CI). As barras de erro são referentes às duplicatas experimentais.

A Figura 10 mostra que ao final de todos os cultivos aproximadamente 100% dos açúcares redutores foram consumidos. Observou-se que as concentrações iniciais de açúcares redutores totais foram maiores no meio complexo do que no meio de composição definida. A comparação do consumo de açúcares (Figura 10) com o crescimento da

biomassa (Figura 9) mostra uma relação direta entre estas duas variáveis, ou seja, nos cultivos em meio complexo ocorreu maior acúmulo de biomassa provavelmente devido à maior concentração de açúcares redutores. É possível também que os nutrientes conferidos pelo extrato de levedura tenham favorecido um melhor aproveitamento dos açúcares pelo fungo.

Figura 10. Variação da concentração de açúcares redutores ao longo dos cultivos. As legendas e símbolos são iguais ao apresentado na Figura 7.

Conforme apresentado na Figura 11, não se detectaram variações elevadas no pH durante os cultivos. Apesar do meio complexo não ter sido intencionalmente adicionado de um sistema tampão para estabilizar o pH durante o cultivo, sua composição química atuou como tampão natural minimizando as variações desta variável. O meio definido foi tamponado pela adição de ácido *trans*-aconítico; durante os cultivos não foi observada perda da capacidade tamponante, uma vez que o pH foi mantido numa faixa relativamente estreita (4,5-6,0) durante os 21 dias de cultivo.

Figura 11. Variação do pH ao longo dos cultivos. As legendas e símbolos são iguais ao apresentado na Figura 7.

Os valores de pH observados nos cultivos submerso e imobilizado estão dentro dos limites relatados na literatura, conforme exposto por Mendonça et al. (2008) em cultivos de *C. subvermispora* em meio líquido a base de extrato de malte, peptona e glicose observaram uma variação do pH inicial de 5,5 para 4,1-4,5 (pH final). Tapia e Vicuña (1995) apontaram que vários trabalhos com fungos ligninolíticos reportam uma variação excessiva do pH durante os cultivos, dificultando o seu controle. Estes autores realizaram cultivos de *C. subvermispora* em meio com 1% de glicose e 10 mM de tartarato de amônio, nos quais o pH foi mantido constante pela adição de diferentes tampões, incluindo tampão *trans*-aconitato; observaram que durante os 30 dias de cultivo não houve consumo de nenhum dos constituintes testados devido ao crescimento do fungo (TAPIA; VICUÑA, 1995).

A Figura 12 mostra a variação da condutividade nos cultivos submerso e imobilizado, nos meios complexo e definido. Durante os cultivos submerso e imobilizado em meio definido ocorreu uma pequena flutuação nos valores da condutividade. Entretanto, no cultivo imobilizado em meio complexo, a partir do 3º dia de cultivo ocorreu uma elevação acentuada da condutividade atingindo 5,9 mS/cm aos 21 dias de cultivo. O cultivo submerso em meio complexo também apresentou certa variação na condutividade, de 1,7 para 3,0 mS/cm. De acordo com a literatura, a condutividade em culturas de microrganismos varia conforme a formação ou consumo de eletrólitos devido ao metabolismo do microrganismo (EDEN; EDEN, 1984). Segundo Owens (1985) as trocas de condutividade no meio de cultura são causadas pelo crescimento do microrganismo e são provocados por diferentes fatores entre estes: remoção de íons carregados pela formação ou quelação destes; corrente elétrica promovida por células, polímeros carregados tão quanto proteínas; a condutividade de ambas as espécies H^+ ou OH^- ; e a soma de algumas exoenzimas excretadas que não são consumidas durante o crescimento do microrganismo e podem interferir na condutividade. Por exemplo, a produção de ácido láctico durante o cultivo de bactérias lácticas levou ao aumento da condutividade do meio de fermentação (PAQUET et al., 2000). A assimilação de nitrogênio amoniacal durante o cultivo de leveduras para a produção de vinho, por outro lado, levou à diminuição da condutividade do meio de fermentação (COLOMBIÉ; LATRILLE; SABLAYROLLES, 2007). Em concordância com estes trabalhos, o aumento da condutividade observado nos cultivos em meio complexo poderia ser justificado pela secreção de ácidos orgânicos como

oxalato, malonato e glioxilato, conforme já demonstrado para este fungo (URZÚA; KERSTEN; VICUÑA, 1998), e também pela secreção de nitrogênio amoniacal.

Figura 12 Variação da condutividade ao longo dos cultivos. As legendas e símbolos são iguais ao apresentado na Figura 7.

5.3. Cultivos de *C. subvermispora* em meio definido imobilizado em esponja de poliuretano inoculados com uma suspensão de micélio macerado

Para este conjunto de experimentos foram realizados cultivos de *C. subvermispora* imobilizado em espuma de poliuretano em meio de composição definida inoculados com uma suspensão de micélio macerado durante 30 dias de cultivo. Poucos são os relatos da literatura nos quais cultivos desse fungo são realizados imobilizados em suportes inertes e a decisão de se optar pela condição de cultivo imobilizado em meio definido advém que nessa condição foi obtido o maior nível de atividade de MnP, visto nos cultivos anteriormente apresentados (item 5.2). Pois esta enzima é a principal enzima ligninolítica excretada por *C. subvermispora* em cultivos em madeira sob condições que simulam o processo industrial de biopolpação (SOUZA-CRUZ et al., 2004; VICENTIN; FERRAZ, 2007).

Com o intuito de aumentar a produção tanto de MnP quanto de Lac nos cultivos de *C. subvermispora* na condição supramencionada, o meio de cultivo de composição definida foi modificado pela adição de diferentes ativadores, nomeadamente Mn^{2+} , álcool veratrílico, 2,5-xilidina e Tween 80. A seguir estão apresentados os principais resultados obtidos nesses cultivos.

5.3.1. Efeito do manganês na atividade das enzimas ligninolíticas

Cultivos de *C. subvermispora* imobilizado em espuma de poliuretano foram estudados com diferentes concentrações de MnSO_4 a fim de verificar sua influência na produção de MnP e Lac; os cultivos diferenciaram-se em 0 ppm (não suplementado), 11 ppm (controle) e 40 ppm de Mn^{+2} , sendo estas as concentrações finais de Mn^{2+} no meio de cultivo (Figura 11).

Em relação à produção de MnP, a condição não suplementada alcançou a máxima atividade ($37,0 \pm 2,8$ UI/L) no 6º dia de cultivo. A partir desse ponto houve uma diminuição substancial da atividade de MnP, a qual se manteve numa média de 5 UI/L de atividade até o final do cultivo. Já nas concentrações de 11 e 40 ppm de Mn^{+2} notam-se o aparecimento de dois picos de atividade, aos 6 e 24 dias de cultivo. Ao compararem-se os níveis de atividade de MnP nestes dois cultivos, é possível observar que houve destaque para o cultivo suplementado com 11 ppm, com máxima atividade de $108,5 \pm 0,7$ UI/L, enquanto que no cultivo suplementado com 40 ppm a atividade máxima foi de $55,5 \pm 26,2$ UI/L de MnP. Nestes cultivos suplementados, o segundo pico de atividade de MnP foi de $23,5 \pm 9,2$ e $27,5 \pm 7,8$ UI/L, respectivamente (Figura 13 A).

Figura 13. Atividade de MnP (A) e Lac (B) em cultivos de *C. subvermispora* imobilizado em espuma de poliuretano, em diferentes concentrações de Mn^{2+} . As barras de erro foram calculadas para as duplicatas experimentais.

Nossos resultados mostram que a concentração de Mn^{+2} no meio de cultivo definido influencia a produção de MnP por *C. subvermispora* imobilizado em espuma de poliuretano. De fato, em culturas submersas de *C. subvermispora* em meio definido, Ruttimann et al. (1992) reportaram que a adição de Mn^{2+} foi necessária para a produção de MnP. O nível máximo de MnP (600 UI/L) foi observado quando o meio continha 11 ppm de Mn^{2+} ; maior concentração de Mn^{2+} (40 ppm) levou a menores atividades de MnP, com máximo de 350 UI/L. Manubens et al. (2003) demonstraram que a adição de Mn^{2+} em culturas submersas afeta os níveis de transcrição dos genes *mnp1* e *mnp2* em *C. subvermispora*. Observaram que Mn^{2+} foi essencial para detecção de atividade extracelular de MnP, com máxima atividade (500 UI/L) alcançada para 80 μM - 160 μM de $MnSO_4$. Nenhuma atividade de MnP foi detectada na ausência de Mn^{+2} ; baixos níveis foram detectados com 5 μM de $MnSO_4$. Mais recentemente, Mancilla et al. (2010) também

avaliaram a influência do Mn^{2+} nas culturas de 10 dias do mesmo fungo e observaram que ao expor estes cultivos a diferentes concentrações de Mn^{2+} detectaram a transcrição de RNAm para os genes de *mnp* (1 e 2). Nesses cultivos a atividade específica máxima de MnP foi de $250 \text{ UmL}^{-1} \text{ g}^{-1}$ alcançada com $20 \text{ }\mu\text{M}$ de Mn^{2+} no meio de cultura e que em concentrações maiores do metal esta atividade era diminuída ou baixa atividade foi encontrada no cultivo sem suplementação. Verificaram também que a concentração de manganês auxilia a excreção de MnP para o meio de cultivo. Antes da suplementação com Mn^{2+} não foi observada atividade de MnP sendo verificada somente após a suplementação com o metal.

Para a produção de Lac ocorreu o oposto, ou seja, nos cultivos suplementados com $MnSO_4$ as atividades máximas foram $5,3 \pm 0,4 \text{ UI/L}$ (11 ppm) e $7,0 \pm 1,4 \text{ UI/L}$ (40 ppm). Já no cultivo não suplementado foi alcançada uma atividade maior de Lac ($15,5 \pm 2,1 \text{ UI/L}$), aos 12 dias de cultivo (Figura 13 B). Daina et al. (2002), em seu estudo de degradação de monômeros de lignina por *C. subvermispora*, observaram efeitos semelhantes aos obtidos em nosso estudo onde, ao variarem a concentração de Mn^{2+} no meio de cultivo, obtiveram diferentes níveis de atividade para MnP e Lac. Demonstraram que a atividade de MnP foi diminuída drasticamente de 130 UI/L no meio suplementado com $0,2 \text{ mM}$ de Mn^{2+} para aproximadamente 20 UI/L na ausência de manganês, ao passo que a atividade de Lac alcançou 110 UI/L no meio não suplementado com manganês. Em um trabalho bastante esclarecedor, Manubens et al. (2007) avaliaram a interferência de manganês na produção de Lac com *C. subvermispora* em meio definido. Estes autores verificaram que em baixas concentrações de Mn^{2+} ($0\text{-}10 \text{ }\mu\text{M}$) foram observados elevados níveis de RNAm transcrito do gene *lsc*, enquanto em concentrações maiores ($160\text{-}194 \text{ }\mu\text{M}$) do metal estes níveis foram diminuídos drasticamente. Este fato refletiu diretamente na atividade de Lac, as quais ficaram entorno de 85 e 65 U/g aos 10 e 14 dias de cultivo, respectivamente, na ausência de Mn^{2+} , e na presença de $160 \text{ }\mu\text{M}$ de Mn^{2+} foi de aproximadamente de 33 U/g em ambos os dias analisados.

Assim, no cultivo de *C. subvermispora* imobilizado em espuma de poliuretano, a supressão de manganês no meio de cultivo favoreceu a produção seletiva de Lac. A melhor forma para produção de MnP foi o cultivo suplementado com 11 ppm de Mn^{+2} , sendo esta concentração utilizada nos próximos experimentos. As atividades de Lac obtidas nos cultivos com 11 e 40 ppm de manganês foram relativamente pequenas, aparentemente em função da presença do metal uma vez que a atividade desta enzima foi estimulada quando manganês foi omitido do meio. Estes resultados mostram que a omissão de Mn^{+2} na

composição do meio de cultivo pode ser uma boa estratégia para a obtenção de altos índices de atividade de Lac nos cultivos imobilizados de *C. subvermispora* em meio de composição definida, normalmente ineficientes para a indução da produção de Lac neste fungo como apresentado nos cultivos prévios deste trabalho (item 5.1 e 5.2).

5.3.2. Efeito do álcool veratrílico e da 2,5-xilidina na atividade das enzimas ligninolíticas

Para promover a indução de Lac e MnP, o fungo imobilizado foi crescido na presença de álcool veratrílico ou 2,5-xilidina. O cultivo na ausência destes indutores foi usado como controle. Nestes cultivos foram utilizados 11 ppm de Mn^{2+} no meio de cultivo e as atividades de MnP e Lac foram determinadas, sendo as atividades máximas apresentadas na Tabela 12. Para avaliação do efeito dos indutores, foram utilizadas concentrações de 1,0 e 2,0 mM de álcool veratrílico, ou 0,5 e 1,0 mM de 2,5-xilidina, adicionados no início dos cultivos.

A atividade máxima de MnP não foi favorecida nem pela adição de álcool veratrílico e nem pela adição de 2,5-xilidina, para ambas concentrações dos indutores, uma vez que a análise estatística mostrou não haver diferença significativa entre os cultivos (Tabela 13). Assim, a adição de álcool veratrílico ou 2,5-xilidina não surtiu efeito indutivo na produção de MnP por *C. subvermispora* imobilizado e cultivado no meio de composição definida. Do mesmo modo, conforme pode ser observado na mesma Tabela 13, a adição de álcool veratrílico também não acarretou em aumento da atividade máxima de Lac. Este comportamento é confirmado pelo trabalho de Ruttimann-Johnson et al. (1993), onde o cultivo submerso de *C. subvermispora* em meio definido suplementado com álcool veratrílico não afetou a produção de Lac. A produção de Lac, no entanto, foi induzida pela suplementação do meio com 2,5-xilidina. Na medida em que a concentração de 2,5-xilidina foi aumentada de 0,5 mM para 1,0 mM houve aumento nos níveis de produção de Lac, atingindo valores máximos de $14,0 \pm 1,0$ UI/L e $22,0 \pm 5,0$ UI/L, respectivamente. Estes níveis de atividade foram 2,8 e 4,4 vezes maiores do que a atividade máxima de Lac encontrada na condição controle ($5,0 \pm 3$ UI/L), sem suplementação. Os resultados alcançados ao se suplementar os cultivos de *C. subvermispora* confirmam o efeito indutivo da 2,5-xilidina na produção de Lac por diferentes fungos ligninolíticos, incluindo

Volvariella volvacea (CHEN et al., 2003), *Trametes versicolor* (COLLINS; DOBSON, 1997; RANCAÑO et al., 2003) e *Pycnoporus cinnabarinus* (EGGERT; TEMP; ERIKSSON, 1996).

Tabela 13. Atividades enzimáticas máximas de manganês peroxidase e lacase verificadas durante os cultivos suplementados ou não com álcool veratrílico e 2,5-xilidina.

Cultivo	MnP (UI/L) *	Lac (UI/L) *
Controle (MD* sem indutor)	108,0 ± 40,0 ^a	5,0 ± 3,0 ^a
Álcool veratrílico 1,0 mM	150,0 ± 60,0 ^a	4,0 ± 1,0 ^a
Álcool veratrílico 2,0 mM	100,0 ± 20,0 ^a	9,0 ± 2,0 ^a
Xilidina 0,5 mM	91,0 ± 16,0 ^a	14,0 ± 1,0 ^b
Xilidina 1,0 mM	100,0 ± 19,0 ^a	22,0 ± 5,0 ^c

*Valores dos desvios são baseados no desvio padrão da duplicata dos cultivos com indutores e sextuplicata para o cultivo controle. Em cada coluna, os valores marcados com letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,01$). MD – meio de composição definida.

No geral, a produção de MnP por *C. subvermispora* não foi afetada nem pela suplementação com álcool veratrílico nem pela suplementação com 2,5-xilidina. Para indução da produção de Lac, a melhor condição foi aquela na qual 1,0 mM de 2,5-xilidina foi adicionada ao meio, demonstrando que em *C. subvermispora* a produção desta enzima pode ser favorecida por este indutor. Estes resultados contradizem os relatos de Fukushima e Kirk (1995), onde o cultivo deste fungo em meio definido suplementado com 2,5-xilidina não aumentou significativamente a atividade de Lac.

5.3.3. Efeito do Tween 80 nas atividades das enzimas ligninolíticas

Tween 80 é descrito como potencializador da excreção de enzimas ligninolíticas em fungos filamentosos, via modificação da permeabilidade da membrana plasmática (ASTHER et al., 1987; UREK; PAZARLIOGLU, 2005). Com o intuito de avaliar o efeito deste surfactante, foram realizados cultivos de *C. subvermispora* utilizando 2,5-xilidina 1,0 mM juntamente com Tween 80 0,05 ou 0,5% v/v no meio de cultivo (adição previamente à

inoculação). Nestes cultivos, avaliou-se a produção de enzimas ligninolíticas e o comportamento exibido pelo fungo quanto a variação de biomassa, açúcares redutores, teor de amônio, pH, condutividade e proteínas totais extracelulares.

Na Figura 14 estão apresentados o perfil de produção de MnP e Lac durante os cultivos não suplementado (controle), suplementado com 2,5-xilidina 1,0 mM, e dois outros variando a concentração de Tween 80 (0,05 e 0,5% v/v) na presença de 2,5-xilidina 1,0 mM. Ao comparar a produção de MnP (Figura 14 A), nota-se claramente que Tween 80, em ambas as concentrações estudadas, favoreceu uma maior atividade dessa enzima em relação à condição controle e ao cultivo suplementado com 2,5-xilidina 1,0 mM apenas. A atividade máxima obtida no cultivo suplementado com 2,5-xilidina 1,0 mM + Tween 0,05% v/v foi de $175,0 \pm 1,0$ UI/L (alcançada aos 9 dias de cultivo); para 2,5-xilidina 1,0 mM + Tween 0,5% v/v, atingiu-se $182,0 \pm 23,0$ UI/L (no mesmo tempo de cultivo). Observa-se que, quando somente 2,5-xilidina 1,0 mM é adicionada ao meio, a maior atividade de MnP ($100,0 \pm 19,0$ UI/L) é atingida aos 6 dias de cultivo, coincidindo com a máxima atividade também no cultivo controle ($108,0 \pm 40,0$ UI/L); para ambos os cultivos, ocorreu uma diminuição brusca da atividade de MnP a posteriori. Portanto, a suplementação com Tween 80 aumentou e prolongou a atividade de MnP durante os 30 dias de cultivo. De fato, em cultivos imobilizados de *P. chrysosporium* em meio definido, ao suplementar o meio de cultivo com Tween 80 houve um aumento da atividade de MnP em relação ao cultivo na ausência desse surfactante (COUTO et al., 2000). Também Urek e Pazarlioglu (2005), em cultivos do mesmo fungo imobilizado em espuma de poliuretano, observaram que ao suplementarem o meio de cultivo com Tween 80 0,05% v/v obtiveram o maior índice de atividade de MnP.

Figura 14. Atividade de MnP (A) e Lac (B) em cultivos de *C. subvermispora* imobilizado em espuma de poliuretano em meio definido suplementado ou não com 2,5-xilidina (1,0 mM) e/ou Tween 80 (0,05% e 0,5% v/v). As barras de erro nesta e nas demais figuras foram calculadas para as duplicatas experimentais dos cultivos com indutor e/ou surfactante e sextuplicata para o cultivo controle. O Controle (MD) é representado pelo cultivo em meio de composição definida sem indutor e sem surfactante.

Com relação à produção de Lac (Figura 14 B), a suplementação com Tween 80 0,05% e 0,5% v/v na presença de 2,5-xilidina 1,0 mM levou a máximos de atividade de $53,0 \pm 18$ UI/L e 61 ± 6 UI/L, respectivamente, alcançados no 21º dia de cultivo. Observa-se que, após o 12º dia de cultivo nos cultivos suplementados com surfactante, foram alcançadas atividades muito superiores àsquelas observadas nos cultivos controle e suplementado apenas com 2,5-xilidina. Ao suplementar o meio de cultivo com diferentes tipos de Tween (80, 60, 40 ou 20), Giese et al. (2004) também obtiveram aumentos na produção de lacases por *Botryosphaeria* sp.

No geral, a suplementação simultânea do meio de cultura com 2,5-xilidina e Tween 80 favoreceu uma maior atividade de ambas as enzimas, MnP e Lac. A variação na

concentração de Tween 80 entre 0,05 e 0,5% v/v, entretanto, não acarretou em benefícios nos níveis de atividade das enzimas avaliadas. Portanto, não há necessidade de se suplementar o meio com uma concentração elevada de surfactante (0,5% v/v) para se aumentar a produção de MnP e Lac por *C. subvermispora*.

Nos cultivos controle, suplementado com 2,5-xilidina 1,0 mM e suplementado com Tween 80 0,05% v/v + 2,5-xilidina 1,0 mM, avaliou-se e não foi encontrada atividade de LiP e nem de CDH em nenhuma das amostras retiradas ao longo dos cultivos anteriormente avaliados. Um estudo relatado na literatura mostrou que *C. subvermispora* cultivado em meio líquido a base de extrato de levedura e celulose produz CDH (HARREITHER et al., 2009). Por outro lado, em relação à atividade de LiP, os nossos resultados estão de acordo com o comportamento relatado por outros autores, ou seja, de que realmente não se detecta a atividade desta enzima em cultivos de *C. subvermispora* (RUTTIMANN et al., 1992; RAJAKUMAR et al., 1996; SOUZA-CRUZ et al., 2004).

5.3.3.1. Variação das concentrações de biomassa e açúcares redutores, amônio, pH, condutividade e proteínas extracelulares durante os cultivos em meio definido suplementados ou não com Tween 80 e/ou 2,5-xilidina

Em relação ao crescimento de micélio, para os cultivos controle e suplementado com 2,5-xilidina 1,0 mM, o pico de máxima concentração ocorreu em 9 dias, com valores de $3,54 \pm 0,27$ g/L e $6,23 \pm 0,84$ g/L, respectivamente, coincidindo com o consumo total de açúcares redutores. O mesmo comportamento foi verificado nos cultivos adicionados simultaneamente de 2,5-xilidina e Tween 80, os quais apresentaram concentração máxima de micélio e exaustão de açúcares redutores aos 6 dias de cultivo (Figuras 15 A e B). Notadamente, também ocorreu uma redução drástica da concentração de amônio aos 6 dias nos cultivos suplementados com 2,5-xilidina e/ou Tween 80 e aos 3 dias no cultivo controle. Logo após, foi observado aumento contínuo na concentração de amônio no meio até o final dos cultivos (Figura 15 C). De acordo com os resultados supramencionados, pode-se inferir que, a partir do momento em que ocorre exaustão da glicose, o fungo passa por um estresse que se reflete na diminuição da concentração de micélio e no aumento da concentração de amônio no meio, os quais provavelmente estão relacionados com a

autólise celular, um comportamento normalmente observado em fungos filamentosos (WHITE et al., 2002). Por exemplo, em cultivos de *Aspergillus nidulans* em quimiostasto, quando houve limitação da fonte de carbono foi verificado aumento do teor de amônio no meio devido à autólise celular; quando o fungo não foi privado da fonte de carbono, entretanto, não houve autólise celular e nem excreção de nitrogênio amoniacal para o meio de cultivo (BAINBRIDGE et al., 1971).

Figura 15. Variação da concentração de biomassa (A), açúcares redutores (B) e amônio (C) ao longo dos cultivos.

Monitorou-se também o pH e a condutividade nos cultivos supramencionados. Conforme apresentado na Figura 16 A, não se detectaram variações elevadas no pH

durante os cultivos, que se manteve em uma faixa de 3,5 a 7,0. Deve se salientar que o meio foi tamponado pela adição de ácido *trans*-aconítico, e que os valores de pH observados em nosso estudo estão dentro dos limites relatados por Mendonça et al. (2008).

Figura 16. Variação do pH (A) e da condutividade (B) ao longo dos cultivos.

Com relação à condutividade (Figura 16 B), observa-se uma diminuição nos 6 primeiros dias de cultivo e logo depois um tênue aumento até o final do experimento, comportamento este que pode estar ligado diretamente com a variação da concentração do íon amônio no meio de cultivo (Figura 15 C). Esta hipótese encontra embasamento no estudo realizado por Colombie e colaboradores (2007), onde a assimilação de nitrogênio amoniacal durante o cultivo de leveduras enológicas levou à diminuição da condutividade do meio de fermentação (COLOMBIÉ; LATRILLE; SABLAYROLLES, 2007). Segundo Eden e Eden (1984), a variação da condutividade observada no meio durante o cultivo de

microrganismos está relacionada com a produção e consumo de eletrólitos no metabolismo microbiano.

A capacidade dos fungos ligninolíticos de acumularem quantidades consideráveis de proteínas extracelulares é relatada na literatura. Galhaup et al. (2002), por exemplo, reportaram que a concentração de proteínas extracelulares atingiu 700 mg/L ao final do cultivo batelada alimentada de *Trametes pubescens* em um reator de mistura de 20 L. O meio empregado para o cultivo submerso foi constituído por glicose (40 g/L), peptona de carne (10 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1 g/L) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2mM), e a alimentação foi feita com uma solução de glicose (320 g/L). Nesse sentido, ao cultivarmos *C. subvermispora* na presença simultânea de Tween 80 e 2,5-xilidina, foi possível observar um maior acúmulo de proteínas no meio. Teores máximos de $137,5 \pm 12,2$ e $150,4 \pm 15,9$ mg/L foram determinados para concentrações de Tween iguais a 0,05 e 0,5% v/v, respectivamente; os valores alcançados nos cultivos controle e suplementado com apenas 2,5-xilidina foram de $52,9 \pm 31,1$ e $89,2 \pm 13,3$ mg/L, respectivamente (Figura 17 A). Portanto, o maior acúmulo de proteínas extracelulares observado na presença de Tween 80 deveu-se provavelmente à ação do surfactante que, de acordo com Asther et al. (1987), altera a estrutura da membrana plasmática da célula e favorece a permeação das proteínas para o meio extracelular.

O teor de proteínas totais excretadas pelo fungo também foi avaliado por meio de absorção de luz na região do Ultra-Violeta (280 nm), conforme apresentado na Figura 17 B. Observa-se que não foi possível estabelecer uma correlação entre a concentração de proteínas totais, determinada pelo método de Bradford, e a absorção de luz em 280 nm. Mesmo exibindo maiores concentrações de proteínas extracelulares, os cultivos suplementados com 2,5-xilidina e Tween 80 não apresentaram maiores valores de absorção de luz a 280 nm. Por outro lado, pontos do cultivo controle com menores concentrações de proteínas totais resultaram em maiores absorbâncias a 280 nm. Tal comportamento provavelmente se deve à presença de compostos que interferem nos métodos supramencionados (ZAIA; ZAIA; LIGHTIG, 1998).

Figura 17. Variação da concentração de proteínas extracelulares (A) e concentração de proteínas extracelulares versus absorbância relativa a 280 nm (B) dos extratos obtidos ao longo dos cultivos.

O estabelecimento de correlações semelhantes àquela discutida no parágrafo anterior também foi proposto para as atividades enzimáticas de MnP e Lac (Figura 18). As hemeperoxidases, manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e peroxidase versátil (VP), absorvem a luz visível numa faixa de comprimento de onda entre 405 e 410 nm; as lacases (Lac), por sua vez, são cuproproteínas que absorvem a luz visível em 610 nm (cobre tipo-I) e em 330 nm (cobre tipo-III); átomos de cobre tipo-II absorvem a luz visível muito fracamente (CAMBRIA et al., 2000). Assim, a partir dos espectros de absorção UV-VIS foram determinadas as absorbâncias nos comprimentos de onda a 405 nm (para quantificação de MnP) e a 610 nm (para quantificação de Lac), procurando-se encontrar uma correlação entre atividade enzimática e absorção de luz visível. Verificou-se que, ao confrontar as atividades de MnP e Lac alcançadas durante os cultivos com as respectivas absorbâncias a 405 e 610 nm, não foi possível estabelecer uma correlação entre estes parâmetros como pode ser visto na Figura 18 A e B, respectivamente. Apesar disso,

muitos trabalhos reportados na literatura dedicados à purificação das enzimas supramencionadas fazem uso deste tipo de análise espectral para caracterizar tais proteínas, qualitativa e quantitativamente (CAMBRIA et al, 2000; HA et al., 2001; MOREIRA et al., 2006).

Figura 18. Absorbância relativa a 405 nm versus atividade enzimática de MnP (A) e absorbância relativa a 610 nm versus atividade enzimática de Lac (B) dos extratos obtidos ao longo dos cultivos.

5.4. Caracterização eletroforética das proteínas extracelulares produzidas por *C. subvermispota* em cultivos selecionados

Foram escolhidos para a pré-caracterização em relação às bandas proteínas, os extratos obtidos dos cultivos imobilizados de *C. subvermispota* em meio de composição complexa ou composição definida (suplementado ou não com Tween 80 0,05% v/v e/ou 2,5-xilidina 1,0 mM). Estes cultivos foram selecionados por apresentarem características particulares de cada condição para a produção tanto de MnP quanto de Lac.

Inicialmente fez-se uma análise comparativa entre as proteínas totais encontradas em cada extrato enzimático obtido dos diferentes cultivos. A Figura 19 A mostra as concentrações de proteínas totais produzidas por *C. subvermispota* em cultivos de 21 dias e 30 dias para as condições de cultivo imobilizada em espuma de poliuretano em meio complexo ou definido sendo este ultimo suplementado com Tween 80 0,05% v/v e/ou 2,5-xilidina 1,0 mM.

Ao avaliar-se o perfil de produção de proteínas no cultivo em meio complexo nota-se que ocorreu um aumento durante todo o período de cultivo (Figura 19 A). Observou-se que inicialmente a concentração de proteínas totais foi de $65,0 \pm 7,1$ mg/L e que entre o 9º e o 18º dia de cultivo ocorreu uma ligeira estagnação da excreção de proteínas em torno de $230 \pm 28,3$ mg/L, e em seguida culminando num máximo de $515 \pm 21,2$ mg/L aos 21 dias de cultivo.

Dentre os cultivos em meio definido suplementado com Tween 80 0,05% + 2,5-xilidina 1,0 mM foi possível observar um maior acúmulo de proteínas no meio, nota-se também que houve uma diminuição de proteínas aos 24 dias de cultivo ($75,3 \pm 13,6$ mg/L) retomando o aumento da concentração ao final do cultivo com máximo de $137,5 \pm 12,2$ mg/L. Em relação às concentrações alcançadas nos cultivos definido sem surfactante e/ou indutor no cultivo suplementado com apenas 2,5-xilidina 1,0 mM foram observados concentrações máximas de $52,9 \pm 31,1$ e $89,2 \pm 13,3$ mg/L aos 24 e 30 dias de cultivo, respectivamente. O maior acúmulo de proteínas extracelulares observado na presença de Tween 80 que provavelmente é responsável pela permeação das proteínas para o meio extracelular (ASTHER et al., 1987). Por fim, é notória maior concentração de proteínas no meio complexo. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de o meio complexo certamente apresentar um maior número de interferentes no método de análise utilizado. De fato, esta hipótese foi confirmada quando se comparou a concentração de proteínas totais destes extratos brutos após uma etapa de

precipitação das proteínas por ácido tricloroacético. Encontrou-se que nos extratos do cultivo em meio complexo a concentração inicial de proteínas totais de 185,2 mg/L e após a precipitação com ácido tricloroacético atingiu 26,4 µg/L e para os extratos em meio definido não foi possível determinar a concentração das proteínas totais após a precipitação com ácido tricloroacético, pois, a concentração de proteínas totais ficou abaixo do nível de detecção do método. Zaia, Zaia e Lightig (1998) relataram as vantagens e desvantagens de diferentes métodos de análise espectrofotométrica de proteínas, chamando a atenção para a presença de compostos que interferem nas determinações quantitativas. Especificamente para o método de Bradford.

Acompanhando-se o perfil cinético da atividade enzimática de manganês peroxidase (MnP) dos cultivos realizados (Figura 19 B), observou-se que não houve efeito indutivo marcante na produção desta enzima por *C. subvermispota* quando o meio definido foi suplementado somente com 2,5-xilidina 1,0 mM, apresentando um perfil semelhante ao meio definido sem o indutor. Conforme apresentado, no cultivo com 2,5-xilidina 1,0 mM apenas, a máxima atividade de MnP foi de $99,5 \pm 20$ UI/L aos 6 dias de cultivo apresentando também um pico com menor atividade aos 24 dias ($67,0 \pm 7,1$ UI/L). Nota-se também que a maior atividade de MnP foi obtida no cultivo em meio definido suplementado com Tween 80 0,05% + 2,5-xilidina 1,0 mM, apresentando um nível elevado de atividade durante todo o cultivo em relação aos demais cultivos. Nesse cultivo o máximo de atividade de MnP foi alcançado no 9º dia ($174,8 \pm 1,4$ UI/L), e após este período apresentou uma queda atingindo $46,6 \pm 15,0$ UI/L aos 30 dias de cultivo. Todavia, o meio complexo não favoreceu a produção de MnP, apresentando a menor atividade enzimática dentre os cultivos analisados com o maior nível de atividade ($46,5 \pm 0,7$ UI/L), aos 6 dias de cultivo. O baixo nível de MnP neste cultivo pode estar aliada à pequena concentração de Mn^{2+} disponível no meio ou uma possível inibição da produção da enzima provocado pela composição do meio complexo.

Figura 19. Perfil de variação da concentração de proteínas totais (A), atividade enzimática de MnP (B) e atividade enzimática de Lac (C) ao longo dos cultivos de *C. subvermispota* imobilizado em espuma de poliuretano em meio complexo (MC) e em meio definido (MD) suplementado ou não com 2,5-xilidina 1,0 mM e/ou Tween 80 0,05% v/v. As barras de erro nesta e na próxima figura foram calculadas para as duplicatas experimentais dos cultivos em meio complexo e em meio definido com 2,5-xilidina 1,0 mM e/ou Tween 80 0,05% v/v, sextuplicata para o cultivo em meio definido (MD) sem 2,5-xilidina e/ou Tween 80.

Em relação à atividade de Lac (Figura 19 C), verificou-se que o meio complexo é o mais favorável na produção desta enzima, com máxima atividade alcançada no 12º dia ($112 \pm 9,1$ UI/L) com concomitante redução até o final do período de cultivo. Este resultado está de acordo com o trabalho de Fukushima e Kirk (1995), que ao cultivarem *C. subvermispora* em meio com farinha de palha de trigo também observaram uma maior produção de Lacs em detrimento do meio de composição definida. Em relação aos níveis de atividade da enzima alcançados nos cultivos em meio definido suplementado com Tween 80 0,05% + 2,5-xilidina 1,0 mM houve uma maior manutenção da atividade de Lac ao longo do cultivo, com máximo de $53,3 \pm 17,68$ UI/L aos 21 dias. Nesse cultivo, observa-se também que após o 12º dia foram alcançadas atividades de aproximadamente 9 e 2,5 vezes maior que àquelas observadas nos cultivos em meio definido não suplementado e suplementado com 2,5-xilidina com atividades máximas de $5,3 \pm 2,9$ e $21,5 \pm 5,0$ UI/L aos 27 e 30 dias de cultivo, respectivamente. Estes dados confirmam a influência do surfactante Tween 80 como potencializador do aumento de atividade enzimática, igualmente verificados nos cultivos de *Botryosphaeria* sp. em meios suplementados com diferentes Tweens (GIESE et al., 2004).

Foram avaliadas também, as atividades específicas para cada condição de cultivo selecionada decidindo-se expressar os resultados em termos de unidade da enzima por grama de micélio fúngico (Figura 20). Nos dois parágrafos anteriores a atividade de MnP e Lac tiveram aumentos nos cultivos, entretanto, pode ser observado que ao referenciar a atividade enzimática máxima com a massa de micélio houve uma redução dos valores obtidos para ambas as enzimas nos respectivos tempos de cultivo. Para as condições em meio definido e em meio definido suplementado com 2,5-xilidina 1,0 mM, nota-se que a princípio, os valores máximos das atividades de MnP foram praticamente iguais (Figura 19 B). Porém, verificou-se que o cultivo em meio definido alcançou uma maior atividade específica de MnP ($31,8 \pm 10,8$ UI/g) em relação ao cultivo suplementado com 2,5-xilidina ($8,7 \pm 9,8$ UI/g). Nota-se também que os valores de atividade específica para MnP no cultivo em meio definido suplementado com Tween 80 0,05% + 2,5-xilidina 1,0 mM foi, de fato, alcançou o maior nível de produção de MnP ($42,3 \pm 0,5$ UI/g) e para Lac foi o cultivo em meio complexo ($24,4 \pm 0,0$ UI/g), estas foram superiores às atividades verificadas para os outros cultivos (Figura 20). Assim, os níveis de atividade de MnP e Lac alcançados durante os diferentes cultivos imobilizados tanto em meio definido (suplementado ou não com Tween 80 0,05% + 2,5-xilidina 1,0 mM) quanto em

meio complexo, confirmaram as observações supramencionadas com relação à produção destas enzimas nas quais, os cultivos realizados em meio de composição definida favoreceram a atividade de MnP em relação à atividade de Lac, enquanto o oposto ocorreu para o cultivo em meio complexo.

Figura 20. Atividade específica dos cultivos de *C. subvermispora* imobilizado em espuma de poliuretano em meio complexo (MC) e em meio definido (MD) suplementado ou não com 2,5-xilidina 1,0 mM e/ou Tween 80 0,05% v/v.

Os cultivos de *C. subvermispora* em meio complexo e definido (suplementado com 2,5-xilidina 1,0 mM e/ou Tween 80 0,05% v/v) tiveram seus perfis de proteínas avaliados por eletroforese desnaturante e nativa (Figura 21). Pode-se notar que as bandas de proteínas reveladas no gel com extrato do cultivo em meio complexo tiveram massas molares (M_{Rs}) entre 12,4 e 115,9 kDa. Já para os géis em que foram usados extratos oriundos dos cultivos em meio definido foram determinadas M_{Rs} de 19 a 116,5 kDa para o cultivo não suplementado, de 19 a 118,3 kDa para o extrato suplementado apenas com 2,5-xilidina 1,0 mM, e de 16,8 a 118,3 kDa para o cultivo com Tween 80 0,05% + 2,5 xilidina 1,0 mM. Ao compararem-se as bandas protéicas reveladas no gel de eletroforese desnaturante dos extratos em meio complexo e definido suplementado ou não com Tween 80 e/ou 2,5-xilidina, pode-se observar um perfil

de produção de proteínas semelhantes para os diferentes extratos. Nota-se também, que no gel onde o extrato suplementado com Tween 80 0,05% + 2,5-xilidina 1,0 mM foi aplicado, apresentou um número de bandas de proteínas ligeiramente maior quando comparados com os outros extratos dos cultivos em meio complexo e definido suplementado ou não com 2,5-xilidina 1,0 mM (Figura 21). Apesar de bandas de proteínas terem sido reveladas nos géis desnaturantes, esperava-se uma melhor resolução e uma menor interferência de contaminantes nos géis obtidos a partir dos extratos dos cultivos em meio de composição definida. Carvalho et al. (2008) verificaram a necessidade de meios mais “limpos” e “concentrados” para que bandas proteicas pudessem ser identificadas em extratos obtidos durante a biodegradação de cavacos de eucalipto por este mesmo fungo. Porém, verificou-se que no presente trabalho, a utilização de um meio mais “limpo” para o cultivo do fungo não eliminou os interferentes, podendo-se supor que o fungo excreta compostos que interferem na caracterização eletroforética das proteínas por ele excretadas.

Para os géis de atividade realizados por eletroforese não desnaturante pode-se observar a capacidade de *C. subvermispora* de excretar diferentes isoenzimas tanto de MnP quanto de Lac (Figura 21). Com relação à produção de MnP pode-se notar que os cultivos em meio definido (suplementados com Tween 80 0,05% v/v e/ou 2,5-xilidina 1,0 mM) apresentaram nitidamente diferentes isoformas da enzima com bandas bem definidas. Já para os géis com extratos oriundos dos cultivos em meio de composição complexa e o do meio definido (sem Tween 80 e/ou 2,5-xilidina), revelaram bandas proteicas difusas e/ou arrastadas que podem corresponder a uma ou mais isoenzima de MnP. Para os géis de atividade de Lac, notam-se diferentes perfis de produção desta enzima. Verificou-se que no gel com extrato a base de meio complexo foi revelada uma banda de proteína difusa a qual pode ser relacionada a duas isoenzimas de Lac. Nos géis com extratos em meio definido suplementados ou não com 2,5-xilidina 1,0 mM e/ou Tween 80 0,05% houve uma diferenciação na apresentação das proteínas quanto à produção de Lac. Observa-se que nos géis com extratos em meio definido suplementado e não com Tween 80 0,05% + 2,5-xilidina 1,0 mM, os perfis de produção de Lac mostraram-se bastante semelhantes com duas bandas proteicas reveladas. No entanto, no gel com o extrato de com 2,5-xilidina 1,0 mM apresentou uma única banda protéica difusa de Lac. Fato que causou estranheza, pois, como 2,5-xilidina é reconhecidamente um indutor de

Lac, esperava-se que diferentes bandas proteicas de Lac seriam reveladas no gel de atividade e isso não pode ser verificado.

Assim, com base nos géis desnaturante e não desnaturante foi possível ilustrar o perfil da produção das enzimas excretadas por *C. subvermispora* em diferentes condições de cultivo. Este perfil confirma os dados relatados na literatura sobre a capacidade do fungo de produzir diferentes isoenzimas de MnP e Lac. Lobos et al. (1994) com cultivos de *C. subvermispora* em meio líquido de composição definida e em cavacos de madeira (*Pinus radiata*) determinaram diferentes isoenzimas de MnP com M_{Rs} iguais a 62,5 kDa (meio líquido) e 56 kDa e 62,5 kDa (meio sólido). Também foram identificadas, em cultivos deste fungo crescido em palha de trigo, duas isoenzimas de Lac com massas molares de 68 e 71 kDa (Fukushima e Kirk, 1995). Em cultivos em cavacos de *Eucalyptus grandis*, identificaram-se proteínas com massas molares de $46,8 \pm 0.6$ e $51,6 \pm 1.0$ kDa, tanto em cultivos suplementados com glicose e milhocina quanto em cultivos não suplementados com estes co-substratos (CARVALHO et al., 2008).

Figura 21. Géis de eletroforese desnaturante revelados com prata (coluna 1) e não desnaturante revelados para atividade de manganês peroxidase com vermelho de fenol (coluna 2) e lacase com ABTS (coluna 3) dos extratos concentrados. Cultivos em meio complexo (MC) e em meio definido (MD) suplementado ou não com 2,5-xilidina 1,0 mM, adicionado ou não de Tween 80 0,05% v/v. Forma de cultivo: micélio imobilizado em espuma de poliuretano. Tipo de inóculo: micélio macerado em água. P: Padrões com massas molares conhecidas.

6. Conclusões

Foi possível estabelecer formas de cultivo de *C. subvermispora* em meios de composição complexa e definida a fim de se obter níveis diferenciados de atividade de manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac). Os cultivos submerso e imobilizado em meio de composição complexa mostraram-se eficientes para produção de Lac em detrimento de MnP, enquanto o cultivo imobilizado em meio definido, por outro lado, induziu a máxima produção de MnP, sendo esta indução bastante seletiva em relação à produção de MnP.

Verificou-se que, em todos os cultivos, houve aumento progressivo da concentração de micélio e pequena variação no pH do meio, que mostrou uma certa estabilidade tanto em meio definido quanto em meio complexo. Para os cultivos em meio definido, a exaustão da fonte de açúcares redutores levou a uma diminuição da concentração de micélio e a um aumento da concentração de amônio no meio, provavelmente devido à ocorrência de autólise celular. No cultivo imobilizado em meio complexo, observou-se aumento considerável da condutividade do meio durante o cultivo, provavelmente devido à secreção de ácidos orgânicos pelo fungo.

Em meio definido, a adição de 11 ppm de manganês ao meio promoveu a maior produção de MnP. Ao suprimir este metal na composição do meio, entretanto, houve estímulo da produção seletiva de Lac. A suplementação do mesmo meio com 2,5-xilidina 1,0 mM, em adição a 11 ppm de Mn^{2+} , induziu a uma maior produção de Lac, enquanto a produção de MnP não foi afetada. Por outro lado, a suplementação com álcool veratrílico 1,0 e 2,0 mM não aumentou significativamente os níveis de MnP nem de Lac. A adição de Tween 80 na concentração de 0,05% v/v, em adição a 11 ppm de Mn^{+2} e 1,0 mM de 2,5-xilidina, aumentou fortemente as atividades de Lac e MnP produzidas pelo fungo, imobilizado em esponja de poliuretano, no meio de cultivo definido.

A produção de MnP e Lac foi influenciada mais pela composição do meio que pela forma de cultivo. Optou-se, em um primeiro momento, em priorizar os estudos com micélio imobilizado em esponja de poliuretano cultivado em meio de composição definida por ser esta a condição que levou a uma produção eficiente e seletiva de MnP, a principal enzima ligninolítica produzida pelo fungo em condições que simulam o processo de biopolpação.

Mesmo nestas condições de cultivo, foi possível induzir uma maior produção de Lac adicionando-se ao meio 2,5-xilidina 1,0 mM e Tween 80 0,05% v/v.

Foi possível através de eletroforese desnaturante determinar bandas proteicas com massas molares relativas (M_{Rs}) de 12,4 a 118,3 kDa para os extratos de diferentes cultivos. Os géis de eletroforese desnaturante sofreram interferência de compostos excretados pelo fungo, dificultando a identificação de bandas bem definidas. Foi possível também, detectar atividade de MnP e Lac nos geis de atividade, inclusive detectou-se a existência de mais de uma banda de atividade.

Referências Bibliográficas

AGUIAR, A.; SOUZA-CRUZ, P.B.; FERRAZ, A. Oxalic acid, Fe^{3+} -reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 873-878, 2006.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Relevance of extractives and wood transformation products on the biodegradation of *Pinus taeda* by *Ceriporiopsis subvermispora*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, p. 182-188, 2008.

AKHTAR, M. et al. An overview of biomechanical pulping research. In: YOUNG, R. and AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley, 1998. p. 309-383.

AKHTAR, M. et al. Biomechanical pulping: a mill-scale evaluation. **Resources Conservation Recycling**, v. 28, p. 241-252, 2000.

ALFENAS, A.C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991. 242p.

ÁLVAREZ, J. M. et al. Expression of genes encoding laccase and manganese-dependent peroxidase in the fungus *Ceriporiopsis subvermispora* is mediated by an ACE1-like copper-fist transcription factor. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 104-111, 2009.

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

ASTHER M. et al. Effect of Tween80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 9, p. 245-249, 1987.

BABIC, J.; PAVKO A, Production of ligninolytic Enzymes by *Ceriporiopsis subvermispora* for decolourization of synthetic dyes. **Acta Chimica Slovenica**, v. 54, p. 730-734, 2007.

BAINBRIDGE, B. W. et al. Biochemical and structural changes in non-growing maintained and autolysing cultures of *Aspergillus nidulans*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 56, p. 371-385, 1971.

BADRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.

BAMINGER, U. et al. A simple assay for measuring cellobiose dehydrogenase activity in the presence of laccase. **Jornal of Microbiological Methods**, v. 35, p. 253-259, 1999.

BAO, W. et al. Oxidative degradation of nonphenolic lignin during lipid-peroxidation by fungal manganese peroxidase. **FEBS Letters**, v. 354, p. 297-300, 1994.

BLANCHETTE, R. A. Delignification by wood-decay fungi. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 29, p. 381-98, 1991.

_____. A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 46, p. 189-204, 2000.

BONNARME P.; JEFFRIES T.W. Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 210-217, 1990.

BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M.G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochem. Biophys. Acta-General Subjects**, v. 1379, p. 381-390, 1998.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREEN, A.; SINGLETON, F.L. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 252-258, 1999.

BROWN, J.; ALIC, M.; GOLD, M. Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: activation by manganese. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 4101-4106, 1991.

BUSWELL J. A.; CAI Y.; CHANG S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and lactase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 81-88, 1995.

CAMARERO, S. et al. 1999. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. **Jornal of Biological Chemistry**, v. 274, p.10324-10330, 1999.

CAMBRIA, M. T. et al. Production, purification, and properties of an extracellular Laccase from *Rigidoporus lignosus*. **Protein Expression and Purification**, v. 18, p. 141-147, 2000.

CARVALHO W.; FERRAZ A.; MILAGRES A. M. F. Clean-up and concentration of manganese peroxidases recovered during the biodegradation of *Eucalyptus grandis* by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 193-198, 2008.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CHEN S. et al. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, p. 143-148, 2003.

COHEN, R.; YARDEN, O.; HADAR, Y. Lignocellulose affects Mn21 regulation of peroxidase transcript levels in solid state cultures of *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3156-3158, 2002.

COLLINS P.; DOBSON A.W. Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3444-3450, 1997.

COLOMBIÉ, S.; LATRILLE, E.; SABLAYROLLES J. M. Online estimation of assimilable nitrogen by electrical conductivity measurement during alcoholic fermentation in enological conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 3, p. 229-235, 2007.

COUTO S. R.; RIVELA I.; MUÑOZ M. R.; SANROMAN A. Stimulation of ligninolytic enzyme production and the ability to decolourise Poly R-478 in semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 159-164, 2000.

CULLEN, D. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 273-289, 1997.

DAINA, S. et al. Degradation of β -5 lignin model dimmers by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 499-505, 2002.

DEKKER R. F. H.; BARBOSA A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 81-88, 2001.

DING J. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and extracellular enzyme secretion in agitated and stationary cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p. 88-93, 2008.

DITTMER, J. K. et. al. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. **FEMS Microbiology Letters**, v. 149, p. 65-70, 1997.

EDEN, R.; EDEN, G. Impedance Microbiology. **Herts: Research Studies Press**, p. 93-98, 1984.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K.E.L. Laccase-producing white-rot fungus lacking lignin peroxidase and manganese peroxidase Enzymes for pulp and paper processing. **American Chemical Society**, v. 655, p. 130-150, 1996.

_____.The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1151-1158, 1996.

ERKURT, E.A.; UNYAYAR, A.; KUMBUR, H. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1429-1435, 2007.

FAISON, B. D.; KIRK, T. K. Factors involved in the regulation of ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 299-304, 1985.

FERRAZ, A.; CORDOVA, A.M.; MACHUCA, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis* **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 59-65, 2003.

FERRAZ, A. et al. Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. **Enzyme and Microbial Technology** v. 43, p. 178-185, 2008.

FU S. Y.; YU H.; BUSWELL J. A. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 147, p. 133-137, 1997.

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

FUKUSHIMA, Y.; KIRK, T.K. Laccase Component of the *Ceriporiopsis subvermispora* Lignin-Degrading System. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 872-876, 1995.

GALHAUP, C. et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 529-536, 2002.

GIANFREDA L, XU F, BOLLAG J-M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, v. 3, p.1-26,1999.

GIESE, E. C. et al. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 463-470, 2004.

HA, H. C. et al. Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 704-711, 2001.

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

HAROLD JR., S. B. Taxonomy of industrially important white-rot fungi. In: YOUNG, R.; AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley, 1998. p. 259-272.

HARREITHER, W. et al. Cellobiose dehydrogenase from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2750-2757, 2009.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 125-135, 1994.

_____. Lignin, humic substances and coal. Biodegradation of lignin. In: HOFRICHTER, M., STEINBÜCHEL, A., editors. **Biopolymers**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2001. v. 1, p. 129-180.

HEIDRONE, F. O. et al. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on wood under biopulping conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 436-442, 2006.

HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. A critical review of cellobiose dehydrogenases. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 93-113, 2000.

HOFRICHTER, M. et al. Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. **FEBS Letters**, v. 434, p. 362-366, 1998.

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

JENSEN, A. K. JR. et al. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of Lignin Peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3679-3686, 1996.

JOHANSSON, T.; NYMAN, P.; CULLEN, D. Differential regulation of *mnp2*, a new manganese peroxidase-encoding from the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* PRL 572. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2077-2080, 2002.

JOHJIMA, T. et al. Direct interaction of lignin and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry**, v. 96, p. 1989-1994, 1999.

KAMITSUJI, H. et al. Direct oxidation of polymeric substrates by multifunctional manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus* without redox mediators. **Biochemical Journal**, v. 386, p. 387-393, 2005b.

KAPICH, A.N.; JENSEN, K.A.; HAMMEL, K.E. Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v. 461, p. 115-119, 1999.

KARAHANIAN, E. et al. Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1443, p. 65-74, 1998.

KAWAI S. et al. New Polymeric Model Substrates for the Study of Microbial Ligninolysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3407-3414, 1995.

KERSTEN, P.J.; KIRK, T.K. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 2195-2201, 1987.

KIRK, T.K.; FARREL, R.L. Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R.; AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, 1998. p. 273-308.

KHINDARIA, A., GROVER, T.A.; AUST, S.D. Oxalate-dependent reductive activity of Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 314, p. 301-306, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARRONDO, L. F. et al. Isoenzyme Multiplicity and Characterization of Recombinant Manganese Peroxidases from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2070-2075, 2001.

LARRONDO, L. F. et al. Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copperactivated apoprotein and complex isoform patterns. **Microbiology**, v. 149, p. 1177-1182, 2003.

LEISOLA, M.S.A. et al. Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 419-424, 1987.

LEONOWICZ A. et al. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. **Fungal Genetic Biology**, v. 27, 175-85, 1999.

LOBOS, S. et al. Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis sybvermispora*. **Microbiology**, v. 140, p. 2691-2698, 1994.

LOBOS, S. et al. Cloning and molecular analysis of a cDNA and the *Cs-mnp1* gene encoding a manganese peroxidase isoenzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Gene**, v. 206, p. 185-193, 1998.

LOBOS, S. et al. Enzymology and molecular genetics of the ligninolytic system of the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Current Sciences**, v. 81, p. 992-997, 2001.

LORENZO M. et al. Improving laccase production employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 109-113, 2002.

LUNDELL, T. et al. Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2623-2629, 1990.

MANCILLA R. et al. Effect of manganese on the secretion of manganese-peroxidase 3 by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Fungal Genetics and Biology**, 2010. In Press.

MANUBENS, A. et al. Differential regulation of genes encoding manganese peroxidase (MnP) in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. **Current Genetic**, v. 43, p. 433-438, 2003.

MANUBENS, A. et al. Manganese affects the production of laccase in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. **FEMS Microbiological Letters**, v. 275, p. 139-145, 2007.

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

MAYER A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, 2006, v. 67, p. 2318-2331.

MENDONÇA R. T. et al. Evaluation of the white-rot fungi *Ganoderma austral* and *Ceriporiopsis subvermispota* in biotechnological applications. **Jornal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1323-1330, 2008.

MESTER, T.; TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 46, p. 51-59, 2000.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, P. R. et al. Molecular characterisation of a versatile peroxidase from a *Bjerkandera* strain. **Journal Biotechnology**, v. 118, p. 339-352, 2005.

MOREIRA, P. R. et al. Purification, kinetics and spectral characterisation of a new versatile peroxidase from a *Bjerkandera* sp. isolate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 28-33, 2006.

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

MURUGESAN, K. et al. Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, p. 939-946, 2006.

NAKAMURA, Y. et al. Lignin-degrading enzyme production by *Bjerkandera adusta* immobilized on polyurethane foam. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 1, p. 41-47, 1999.

OWENS, J. D. Formulation of Culture Media for Conductimetric Assays: Theoretical Considerations **Journal of General Microbiology**, v. 131, p. 3055-3076, 1983.

PAQUET J. et al. Electrical conductivity as a tool for analysing fermentation processes for production of cheese starters. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 391-399, 2000.

PEASE, E.A.; TIEN, M. Heterogeneity and Regulation of Manganese Peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 3532-3540, 1992.

PÉRIÉ, F. H.; SHENG, D.; GOLD M. H. Purification and characterization of two manganese peroxidase isozymes from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1297, p.139-148, 1996.

POGNI, R. et al. Tryptophan-based radical in the catalytic mechanism of versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. **Biochemistry**, v. 44, p. 4267-4274, 2005.

POZDNYAKOVA, N. N.; RODAKIEWICZ-NOWAK, J.; TURKOVSKAYA O.V. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 30, p. 19-24, 2004.

RAJAKUMAR, S. et al. LiP-like genes in *Phanerochaete sordida* and *Ceriporiopsis subvermispora*, white-rot fungi from which lignin peroxide has not been detected. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2660-2663, 1996.

RANCAÑO, G. et al. Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. **Prosses Biochemistry**, v. 39, p. 467-473, 2003.

RÜTTIMANN, C. et al. Ligninolytic enzymes of the white-rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispota*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 16, p. 64-76, 1992.

RÜTTIMANN-JOHNSON, C. et al. Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1792-1797, 1993.

SALAS, C. et al. Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 21, p. 323-333, 1995.

SETHURAMANN, A., AKIN, D. E.; ERIKSSON, K. E. L. Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 27, p. 37-47, 1998.

SCHOEMAKER, H. E.; LEISOLA, M. S. A. Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, v. 13, p.101-109, 1990.

SMITH, A.T.; VEITCH, N.C. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. **Current Opinion in Chemical and Biology**, v. 2, p. 269-278, 1998.

SOUZA-CRUZ P. B. et al. Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 228-234, 2004.

TANAKA, H. et al. Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 384-390, 2009.

TAPIA J.; VICUÑA R. Synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispota* is inhibited by an increase in the pH of the cultures resulting from fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2476-2481, 1995.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, p. 19-26, 1994.

TIEN M.; KIRK T. K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Methods in Enzymology**, v. 161, p. 238-249, 1988.

TIEN, M.; MA, D. Oxidation of 4-Methoxymandelic Acid by Lignin Peroxidase: mediation by veratryl alcohol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 8912-8917, 1997.

TOSVALET, M. et al. Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 368-376, 2007.

TUOMELA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 169-183, 2000.

ÜREK, R. Ö.; PAZARLIOGLU, N. K. Production and stimulation of manganese peroxidase by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 83-87, 2005.

URZÚA, U. et al. Oxidation reactions catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispota*. **FEBS Letters**, v. 371, p. 132-136, 1995.

URZÚA, U.; KERSTEN, P.J.; VICUÑA, R. Manganese Peroxidase-Dependent Oxidation of Glyoxylic and Oxalic Acids Synthesized by *Ceriporiopsis subvermispota* Produces Extracellular Hydrogen Peroxide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p.68-73, 1998.

VALLI, K., WARIISHI, H., GOLD, M. H. Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: Role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. **Biochemistry**, v.29, p. 8535-8539, 1990.

VICENTIM, M.P.; FERRAZ, A. Enzyme production and chemical alterations of *Eucalyptus grandis* wood during biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispota* in cultures supplemented with Mn²⁺, corn steep liquor and glucose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 645-652, 2007.

VICUÑA, R. et al. Culture conditions of *Ceriporiopsis subvermispota* determine the pattern of MnP isoenzymes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOTECHNOLOGY IN THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 6. 1996, Vienna. **Proceedings...** Vienna: Facultas-Universitätsverlag, 1996. v. 6, p. 345-350.

WARIISHI, H.; AKALESWARAN, L; GOLD, M.H. Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. **Biochemistry**, v. 27, p. 5365-5370, 1988.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-Hypoclorite Reaction for Determination of Ammonia. **National Health and Welfare**, v. 38, n. 8, p. 971-974, 1967.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 161-187, 2003.

WHITE S. et al. The autolysis of industrial filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n.1, p. 1-14, 2002.

WONG D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 157, p. 174-209, 2009.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA C. T. B. V.; LICHTIG J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.

ZÁMOCKÝ, M. et al. Cellobiose dehydrogenase: a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotrophic fungi. **Current Protein & Peptide Science**, v.7, p. 255-280, 2006.

Apêndice A- Tabela de estudos envolvendo *C. subvermispora* em diferentes condições de cultivo, meios e níveis de atividade enzimática de MnP e Lac.

Meio de cultivo ^a	Condição de cultivo ^b	Suplemento	Atividade enzimática	Autor e ano de publicação
Definido	Submerso	Mn ⁺² (0-40 ppm) Tartarato de amônio (1-50 mM) Tween 20 (0,05 %)	Lacs (0,3 UI/mL) ³ MnPs (0,6 UI/mL) ⁴	Ruttimman et al., 1992
Definido	Submerso	Tartarato de amônio (1-10 mM) Glicose (0,1-1 %) Mn ⁺² (0-40 ppm)	Lacs (0,4 UI/mL) ¹ MnPs (0,6 UI/mL) ⁴	Ruttimman-Johnson et al., 1993
Complexo	Em meio sólido	-	Lacs (0,2 UI/g) ¹ MnPs (0,6 UI/g) ⁴	Lobos et al., 1994
Definido	Submerso	Tartarato de amônio (1-10 mM) Casaminoácidos (0,03-0,3 %) Glicose (0,1-1 %) Variação do pH (4,5-6,5)	Lacs (0,6 UI/mL) ¹ MnPs (0,8 UI/mL) ⁴	Tapia et al., 1995
Complexo	Submerso	Farelo de trigo (30 g/l) Extrato de levedura (10 g/l)	Lacs (3,9 UI/mL) ^{1, *}	Salas et al., 1995
Definido	Submerso	2,5 – Xilidina (?)	Lacs (1,1 UI/mL) ¹	Fukushima e Kirk, 1995
Definido Complexo	Submerso Em meio sólido	-	MnPs (?) [*]	Urzua et al., 1995
Definido	Em superfície	Tween 80 (0,09 %) Mn ⁺² (35 µM)	MnPs (0,2 UI/mL) ²	Jensen et al., 1996
Complexo	Em meio sólido	Tartarato de amônio (6-60 mmol/Kg) Glicose (11 g/Kg)	Lacs (2,5 UI/g) ¹ MnPs (3,7 UI/g) ⁴	Vicuña et al., 1996
Definido	Submerso	Tartarato de amônio (1-10 mM) Mn ²⁺ (0-11 ppm)	MnPs (1,0 UI/mL) ⁴	Urzua et al., 1998
Definido	Submerso	-	Lacs (0,1 UI/mL) ¹ MnPs (0,1 UI/mL) ⁴	Daina et al., 2002
Definido	Em superfície	MnSO ₄ (0-320 µM) CuSO ₄ (5-100 µM) ZnSO ₄ (5-100 µM) Ácido siríngico	MnPs (0,5 UI/mL) ⁴	Manubens et al., 2003
Complexo	Em meio sólido	-	MnPs (0,1 UI/g) ⁴	Guerra et al., 2003

Continua

Conclusão

Meio de cultivo ^a	Condição de cultivo ^b	Suplemento	Atividade enzimática máxima	Autor e ano de publicação
Complexo	Em meio sólido	-	MnPs (0,6 UI/g) ⁵	Cruz et al., 2004
Complexo	Em meio sólido	-	MnPs (0,6 UI/g) ⁵	Aguiar et al., 2006
Complexo	Em meio sólido	-	Lacs (0,5 UI/g) ¹ MnPs (5,3 UI/g) ¹	Fackler et al., 2006
Complexo	Em meio sólido	Milhocina (0-5 g/Kg) Glicose (0-5 g/Kg) Mn ²⁺ (0-12,4 mg/Kg)	Lacs (0,4 UI/g) ¹ MnPs (1,3 UI/g) ⁵	Vicentim e Ferraz, 2007
Definido Complexo	Superfície Em meio sólido Imobilizado	Sacarose, Glicose -	Lacs (0,3 UI/mL) ¹ MnPs (0,1 UI/mL) ²	Babic e Pavko, 2007
Definido	Submerso	Tartarato de amônio (10 mM) Glicose (1 %) Mn ²⁺ (0-160 ppm) ácido siríngico	Lacs (1800 UI/g) ¹	Manubens et al., 2007
Complexo	Em meio sólido	-	MnPs (0,2 UI/g) ⁵	Aguiar e Ferraz, 2008
Complexo	Em meio sólido	-	Lacs (0,2 UI/g) ¹ MnPs (5,5 UI/g) ¹	Schmutzer et al., 2008
Complexo	Submerso Em meio sólido	Glicose, Peptona de carne -	Lacs (0,08 UI/mL) ¹ MnP (1,0 UI/g) ²	Mendonça et al., 2008
Complexo	Em meio sólido	Glicose e Milhocina	MnPs (0,4 UI/mL) ⁵	Carvalho et al., 2008
Complexo	Em meio sólido	-	MnPs (?) ² Lacs (?) ¹	Tanaka et al. 2009
Definido	Submerso	Mn ²⁺ (0-40 ppm) Tartarato de amônio (1-50 mM) Tween 20 (0,05 %)	MnPs (230 UI/mLg) ²	Mancilla et al. 2010

^a *Meio definido*: A composição exata de todos os componentes é conhecida; *Meio complexo*: A composição exata de um ou mais componentes não é conhecida

^b *Cultivo em superfície*: Cultivo estático em meios líquidos; *Cultivo submerso*: Cultivo agitado em meios líquidos; *Cultivo em meio sólido*: Cultivo na superfície de suportes não inertes; *Cultivo imobilizado*: Cultivo na superfície de suportes inertes.

¹ ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS)

² 2,6-Dimetoxifenol (DMP)

³ Catecol

⁴ Vanililacetona

⁵ Vermelho de fenol

⁶ Siringaldazina