

**CARLA MICHELINE ISRAEL**

**Utilização do Resíduo do Processamento do Palmito para a Produção de  
Enzimas Hidrolíticas por Fungos do Gênero *Polyporus***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre ao Curso de Mestrado em Engenharia Ambiental, Centro de Ciências Tecnológicas, da Universidade Regional de Blumenau – FURB.

Orientadora: Dra. Lorena Benathar Ballod Tavares

Co-Orientadora: Dra. Márcia Brandão Palma

Blumenau

2005

**UTILIZAÇÃO DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DO  
PALMITEIRO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
HIDROLÍTICAS POR FUNGOS DO GÊNERO *Polyporus***

por

**CARLA MICHELINE ISRAEL**

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental na Universidade Regional de Blumenau – FURB.

---

*Profa. Dra. Lorena Benathar Ballod Tavares*

*Orientadora*

---

*Profa. Dra. Márcia Brandão Palma*

*Co-orientadora*

---

*Prof. Dr. Adilson Pinheiro*

*Coordenador do PPGEA*

**Banca examinadora:**

---

*Profa. Dra. Lorena Benathar Ballod Tavares (FURB)*

*Presidente*

---

*Prof. Dr. Agenor Furigo Jr (UFSC)*

*Examinador*

---

*Profa. Dra. Rosete Pescador (FURB)*

*Examinadora*

Blumenau, 31 de março de 2005.

## DEDICATÓRIA

A minha mãe *in memoriam*, por mais que o tempo e a distância insistam em fazer te esquecer, eu sei que o amor verdadeiro jamais morrerá.

Ao meu pai Antonio, por sempre ter sido muito mais que um pai.

A minha mãe do coração Terezinha pela educação.

A minha vó Zita Elizabeth e a minha madrinha Maria pelo amor incondicional que tiveram comigo durante toda a minha vida.

Ao meu amor Uirá, pelo companheirismo, compreensão, apoio e principalmente amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Para realizarmos nossos sonhos e chegarmos à vitória precisamos enfrentar grandes obstáculos, e quando temos por perto pessoas (anjos) que ajudaram para que a realização dos sonhos tornarem-se possível, os desafios se tornam bem menores.

À minha orientadora Dra. Lorena Benathar Ballod Tavares pela amizade, persistência, competência, mas principalmente pelo imenso carinho e grandiosos momentos compartilhados juntos.

À Dra. Márcia Brandão Palma, minha co-orientadora pelo carinho, amizade, sabedoria e postura profissional.

À Ana Karoline pela colaboração no desenvolvimento inicial desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica: Rita, Fernanda, Mariane, Juliana, Ana Paula, Graziela, Priscila, Halex, Flaviana e Estela pela amizade e momentos de alegria compartilhados juntos e à Ivonete por ter tirado as amostras nos finais de semana para mim e por sempre me fazer rir.

Às pesquisadoras do Instituto de Botânica de São Paulo: Adriana Gugliota e Marina Capelari pelo fornecimento dos fungos e a empresa de conservas e alimentos HEMMER pelo fornecimento do resíduo do processamento do palmito.

À Dra. Rita de Cássia Curto Valle pela análise estatística desta pesquisa.

Aos amigos do mestrado, Rosa – pelo carinho, quando cheguei a Blumenau; à Susan pela grande amizade formada; à Gladys, pelos artigos e por sua maturidade; ao Marco Aurélio, Sidney e André pelas caronas ao longo desta jornada.

Ao Professor Dr. Adilson Pinheiro e a Professora Dra. Ivone Pinheiro pelo carinho e ajuda.

À dona Tereza minha eterna gratidão, pela preocupação e carinho, fazendo com que eu me sentisse na minha casa.

Aos amigos dos Serviços Integrados de Patologia.

## SUMARIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>08</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>09</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
2.1. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	18
2.2 RESÍDUOS DA PALMEIRA <i>Euterpe edulis</i> .....	21
2.2.1 Importância econômica da produção do palmito.....	24
2.2.2 O Resíduo do processamento do palmito.....	26
2.3. PROPOSTA ZERI (ZERO EMISSIONS RESEARCH INITIATIVE).....	27
2.3.1. Estratégia do ZERI.....	28
2.3.2. Aplicabilidade Geral do ZERI.....	29
2.4. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	30
2.5. FUNGOS BASIDIOMYCETES.....	34
2.5.1 Potencial de degradação dos Basidiomycetes.....	37
2.5.2.O Gênero <i>Polyporus</i> .....	38
2.5.3 Características das espécies <i>P. tricholoma</i> e <i>P. tenuiculus</i> .....	39
2.6 ENZIMAS PRODUZIDAS POR FUNGOS BASIDIOMYCETES.....	42
2.6.1 Xilanases.....	43
2.6.1.1 Aplicações de Xilanases.....	47
2.6. 2 Celulases.....	48
2.6.2.1 Aplicação das Celulases.....	50
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
3.1 ENSAIOS REALIZADOS.....	51
3.2 FUNGOS UTILIZADOS.....	52
3.3 CONSERVAÇÃO DAS CEPAS.....	52

3.4 PRODUÇÃO DO INÓCULO.....	52
3.5 CULTIVO DOS FUNGOS EM MEIO LÍQUIDO.....	53
3.6 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS EMPREGADOS COMO SUBSTRATOS NA FES.....	53
3.7 CULTIVO EM MEIO SÓLIDO.....	55
3.7.1 Sistema em Tubos.....	55
3.7.2 Sistema em Frascos.....	56
3.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	57
3.8.1 Determinação da velocidade média do Crescimento Micelial Linear em tubos de ensaio.....	57
3.8.2 Determinação da concentração micelial em meio líquido.....	57
3.8.3 Determinação da umidade do meio sólido.....	58
3.8.4 Determinação do pH.....	59
3.8.5 Tratamento das amostras para determinação das atividades enzimáticas e proteínas.....	59
3.8.6 Extração das enzimas.....	60
3.9 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	60
3.9.1 Atividade de Xilanase.....	60
3.9.2 Atividade de Celulases.....	61
3.10 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	62
3.11 RELAÇÃO CARBONO NITROGÊNIO.....	64
3.12 CÁLCULO DO CRESCIMENTO MICELIAL TOTAL.....	64
3.13 CÁLCULO DA VELOCIDADE MÉDIA DE CRESCIMENTO MICELIAL .....	65
3.14 CÁLCULO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA.....	65
3.15 PRODUTIVIDADE MÁXIMA.....	65
3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
4.1 <u>Ensaio I</u> Ensaios em Fermentação Submersa.....	67
4.2 <u>Ensaio II</u> Ensaios de Fermentação em Estado Sólido em Tubos.....	72
4.3 <u>Ensaio III</u> Ensaios em Fermentação Sólida em Frascos.....	85

4.3.1 Atividades Enzimáticas.....	85
4.3.1.1 Atividade de Xilanase.....	85
4.3.1.2 Atividade de Celulases.....	92
4.3.1.2.1 Atividades de Carboximetilcelulase.....	92
4.3.2.2.2 Atividade de Avicelase.....	98
4.4 Concentração das Proteínas Totais.....	103
4.5 Umidade.....	107
4.6 Análise do pH.....	108
4.7 Relação Carbono Nitrogênio.....	110
<b>5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>113</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>129</b>

## RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de palmito gerando, em consequência da sua extração e processamento, toneladas de resíduos ao meio ambiente. Este resíduo por sua vez, é rico em material lignocelulósico que pode ser degradado pelos fungos de podridão branca que utilizam este material pela ação de enzimas, muitas das quais apresentam interesse comercial. Neste estudo o resíduo do processamento do palmito foi empregado para a produção das enzimas xilanase, carboximetilcelulase e avicelase, pelos fungos *Polyporus tricholoma* e *Polyporus tenuiculus*. O substrato para o crescimento dos fungos e produção das enzimas foi constituído por balsa mediana de palmito triturada (20g), suplementada com diferentes concentrações de bagaço de mandioca (6,0; 4,5 e 0g) e farelo de soja (3; 2; 1 e 0 g), com umidade de 70%. A influência dos meios e das espécies na velocidade de crescimento micelial foi avaliada estatisticamente com base nos efeitos principais ( $P < 0,05$ ). As atividades enzimáticas e a concentração das proteínas totais foram determinadas ao longo do tempo de cultivo. A biomassa fúngica foi determinada em cultivo com meio líquido (extrato de malte peptonado) para comparar a produção da enzima xilanase com o crescimento micelial. Neste meio *P. tricholoma* teve alta produção de biomassa em relação ao *P. tenuiculus*, no entanto, a atividade enzimática foi similar. No meio sólido o fungo *P. tricholoma*, também apresentou maior velocidade de crescimento (0,6 cm/dia) em todas as composições chegando a 10 cm de comprimento de micélio no final do experimento e, quanto maior a relação C:N nestes meios, menor foi a velocidade de crescimento. A atividade enzimática de xilanase nos diferentes meios de cultivo apresentaram valores superiores, nos primeiros intervalos de tempo, para ambos os fungos. *P. tenuiculus*, embora tenha mostrado menor velocidade de crescimento, apresentou atividades hidrolíticas superiores em todos os tratamentos. Nos ensaios com maior concentração de bagaço de mandioca, constatou-se que não houve grandes variações da atividade de xilanase ao longo do tempo para o fungo *P. tricholoma*. O mesmo não aconteceu nos cultivos com *P. tenuiculus*, cuja atividade de xilanase foi decrescente ao longo do cultivo. O mesmo foi observado para as atividades de carboximetilcelulase e avicelase. Para estas enzimas a atividade enzimática foi inferior do que a atividade da enzima xilanase, mostrando que, proporcionalmente à produção de xilanase, a indução das celulases foi pequena.

Palavras chaves: *Polyporus*, enzimas, resíduo agroindustrial

## ABSTRACT

Brazil is the world's greatest palm heart producer, generating, as a consequence, of the extraction and processing, tones of residues which are disposed of to the environment. This residue is rich in lignocellulose which can be degraded by the white rot fungi which utilize this material through the action of enzymes, many of which are of commercial interest. In this study, palm heart processing waste was employed in the production of the enzymes xylanase, carboxymethylcellulase and avicelase by the fungi *Polyporus tricholoma* and *Polyporus tenuiculus*. The substrate for the fungal growth and the production of the enzymes was composed of ground palm heart medial sheaths (20g) supplemented by different concentrations of manioc bagasse (6.0; 4.5 and 0g) and soya broth (3; 2; 1 and 0 g), at 70% humidity. The influence of the media and the species on the mycelial growth rate was evaluated statistically based on the principal effects ( $P < 0.05$ ). The enzymatic activity and total protein concentration were determined during the cultivation. The fungal biomass was determined during cultivation in a liquid medium (malt extract with peptone) in order to compare the production of the enzyme xylanase with mycelial growth. In this medium *P. tricholoma* had a high biomass production in relation to *P. tenuiculus*, although the enzymatic activity was similar. In the solid media the fungus *P. tricholoma* also had a higher growth rate in all of the media compositions evaluated and the higher the C:N ratio in the media, the lower the growth rate. The enzymatic activity of xylanase in the different cultivation media gave higher values in the initial time periods for both fungi. *P. tenuiculus*, despite having shown a lower growth rate, gave higher hydrolytic activities for all treatments. In the tests with the highest concentration of manioc bagasse, it was noted that there were no significant variations in the xylanase activity over time for the fungus *P. tricholoma*. This was not the case for the cultivations with *P. tenuiculus*, for which the xylanase activity decreased over time. The same trend was observed for the carboxymethylcellulase and avicelase activity. For these enzymes the enzymatic activity was approximately 10 times less than that of xylanase, demonstrating that, in relation to the production of xylanase, the induction of cellulases was low.

Keywords: *Polyporus*, enzymes, agroindustrial waste

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1</b> Composição nutricional da bainha mediana de palmito em termos de elementos químicos (resultados expressos em material seco a 75° C).....	81
<b>Tabela 4.2</b> Valores médios de umidade (%) do meio durante o cultivo do fungo <i>P. tricholoma</i> em diferentes intervalos de tempo.....	88
<b>Tabela 4.3</b> Valores médios obtidos de proteínas totais, expressos em mg/g, nas fermentações dos tratamentos T1 ao T12 para o fungo <i>P. tricholoma</i> .....	103
<b>Tabela 4.4</b> Valores médios obtidos de proteínas totais, expressos em mg/g, nas fermentações dos tratamentos T1 ao T12 para o fungo <i>P. tenuiculus</i> .....	105
<b>Tabela 4.5</b> Valores médios de umidade (%) do meio durante o cultivo do fungo <i>P. tenuiculus</i> em diferentes intervalos de tempo.....	107
<b>Tabela 4.6</b> Valores médios de pH para o fungo <i>P. tricholoma</i> .....	109
<b>Tabela 4.7</b> Valores médios de pH para o fungo <i>P. tenuiculus</i> .....	109
<b>Tabela 4.8</b> Valores quantificados de relação carbono/nitrogênio no tempo zero, nos 12 tratamentos.....	110

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 2.1</b> Inventário das espécies de <i>Polyporus</i> registradas em Santa Catarina por HENNINGS em 1897 .....	39
<b>Quadro 2.2</b> Inventário das espécies de <i>Polyporus</i> registradas em Santa Catarina por BRESADOLA em 1896.....	39
<b>Quadro 3.1</b> Resumo dos ensaios realizados neste trabalho.....	52
<b>Quadro 3.2</b> Composição química do farelo de soja peletizado (46%) conforme certificado de garantia de Qualidade da Bunge Alimentos.....	56
<b>Quadro 3.3</b> Composição dos meios de cultivo utilizados nos ensaios de crescimento micelial linear e de determinação das atividades enzimáticas....	56

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> Casca de palmito da Palmeira <i>Euterpe edulis</i> .....	23
<b>Figura 2.2</b> Rejeito de palmito produzido na indústria contendo Bainhas medianas e internas.....	24
<b>Figura 2.3</b> <i>Polyporus tricholoma</i> .....	40
<b>Figura 2.4</b> <i>Polyporus tenuiculus</i> .....	41
<b>Figura 2.5</b> Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam. Ac, grupo acetil; Arab, L-arabinofuranose; MeGlcA, ácido 4-O –metil-glucurônico; D-xilose.....	45
<b>Figura 3.1</b> Bainha mediana obtida depois da retirada do palmito para processamento industrial na forma de conserva ácida.....	54
<b>Figura 4.1</b> Crescimento micelial (biomassa) dos fungos <i>P.tricholoma</i> e <i>P.tenuiculus</i> , obtido em cultivo submerso.....	67
<b>Figura 4.2</b> Consumo de glicose dos fungos <i>P.tricholoma</i> e <i>P. tenuiculus</i> .....	69
<b>Figura 4.3</b> Atividade de xilanase dos fungos <i>P.tricholoma</i> e <i>P. tenuiculus</i> ...	70
<b>Figura 4.4</b> Atividade de carboximetilcelulase dos fungos <i>P. tricholoma</i> e <i>P.</i> <i>tenuiculus</i> .....	71
<b>Figura 4.5</b> Cinética de crescimento micelial com diferentes suplementações de resíduos agroindustriais.....	72
<b>Figura 4.6</b> a) Crescimento micelial do tratamento 01 (ausência de N), onde F1 é <i>P. tricholoma</i> e F2 é <i>P. tenuiculus</i> b) Crescimento micelial do tratamento 04, (3g de N), onde F1 é <i>P.</i> <i>tricholoma</i> e F2 é <i>P. tenuiculus</i> .....	73
<b>Figura 4.7</b> Crescimento micelial de <i>P. tricholoma</i> para os Tratamentos T1, T2, T3 e T4 (6,5 g de bagaço de mandioca e 0,1, 2 e 3 de farelo de soja).....	74
<b>Figura 4.8</b> Crescimento micelial de <i>P. tenuiculus</i> para os Tratamentos T1, T2, T3 e T4 (6,5 g de bagaço de mandioca e 0,1, 2 e 3 de farelo de soja).....	74
<b>Figura 4.9</b> Crescimento micelial de <i>P. tricholoma</i> para os Tratamentos T5, T6, T7 e T8 (4,5 g de bagaço de mandioca 0,1, 2 e 3 de farelo de soja).....	75

<b>Figura 4.10</b> Crescimento micelial de <i>P. tenuiculus</i> para os Tratamentos T5, T6, T7 e T8 (4,5 g de bagaço de mandioca e 0,1, 2 e 3 de farelo de soja).....	75
<b>Figura 4.11</b> Crescimento micelial de <i>P. tricholoma</i> para os Tratamentos T9, T10, T11 e T12 (0 g de bagaço de mandioca 0,1, 2 e 3 de farelo de soja).....	76
<b>Figura 4.12</b> Crescimento micelial de <i>P. tenuiculus</i> para os Tratamentos T9, T10, T11 e T12 (0 g de bagaço de mandioca e 0,1, 2 e 3 de farelo de soja).....	76
<b>Figura 4.13</b> Valores analisados estatisticamente para o comprimento de <i>P. tricholoma</i> .....	78
<b>Figura 4.14</b> Valores analisados estatisticamente para o comprimento de <i>P. tenuiculus</i> .....	79
<b>Figura 4.15</b> Média total do comprimento do micélio de <i>P. tricholoma</i> e <i>P. tenuiculus</i> em 10 leituras realizadas.....	81
<b>Figura 4.16</b> Velocidade média de crescimento micelial ao dia, nos 12 tratamentos, para <i>P. tricholoma</i> e <i>P. tenuiculus</i> .....	82
<b>Figura 4.17</b> Valores analisados estatisticamente para a velocidade micelial de <i>P. tricholoma</i> ao dia.....	83
<b>Figura 4.18</b> Valores analisados estatisticamente para a velocidade micelial de <i>P. tenuiculus</i> ao dia.....	84
<b>Figura 4.19</b> a) Crescimento micelial de <i>P. tricholoma</i> no 11° dia de cultivo no T2; b) Crescimento micelial de <i>P. tenuiculus</i> no 11° dia de cultivo no T2 .....	85
<b>Figura 4.20</b> Atividade de xilanase para <i>P. tricholoma</i> nos tratamentos T1 ao T4.....	86
<b>Figura 4.21</b> Atividade de xilanase para <i>P. tricholoma</i> nos tratamentos T5 ao T8.....	86
<b>Figura 4.22</b> Atividade de xilanase para <i>P. tricholoma</i> nos tratamentos T9 ao T12.....	87
<b>Figura 4.23</b> Produtividade Máxima de Xilanase (U/g.dia) nos tratamentos T1 ao T12 para o fungo <i>P. tricholoma</i> .....	89
<b>Figura 4.24</b> Atividade de xilanase para <i>P. tenuiculus</i> nos tratamentos T1 ao T4.....	90

<b>Figura 4.25</b> Atividade de xilanase para <i>P. tenuiculus</i> nos tratamentos T5 ao T8.....	90
<b>Figura 4.26</b> Atividade de xilanase para <i>P. tenuiculus</i> nos tratamentos T9 ao T12.....	91
<b>Figura 4.27</b> Produtividade Máxima de Xilanase (U/g.dia) nos tratamentos T1 ao T12 para o fungo <i>P. tenuiculus</i> .....	91
<b>Figura 4.28</b> Atividade de carboximetilcelulase para <i>P. tricholoma</i> nos tratamentos T1 ao T4.....	93
<b>Figura 4.29</b> Atividade de carboximetilcelulase para <i>P. tricholoma</i> nos tratamentos T5 ao T8.....	93
<b>Figura 4.30</b> Atividade de carboximetilcelulase para <i>P. tricholoma</i> nos tratamentos T1 ao T4.....	94
<b>Figura 4.31</b> Produtividade Máxima de Carboximetilcelulase (U/g.dia) nos tratamentos T1 ao T12 para o fungo <i>P. tricholoma</i> .....	95
<b>Figura 4.32</b> Atividade de carboximetilcelulase para <i>P. tenuiculus</i> nos tratamentos T1 ao T4.....	96
<b>Figura 4.33</b> Atividade de carboximetilcelulase para <i>P. tenuiculus</i> nos tratamentos T5 ao T8.....	97
<b>Figura 4.34</b> Atividade de carboximetilcelulase para <i>P. tenuiculus</i> nos tratamentos T9 ao T12.....	97
<b>Figura 4.35</b> Produtividade Máxima de Carboximetilcelulase (U/g.dia) nos tratamentos T1 ao T12 para o fungo <i>P. tenuiculus</i> (U/g.dia) nos tratamentos T1 ao T12 para o fungo <i>P. tenuiculus</i> .....	97
<b>Figura 4.36</b> Atividade de avicelase para <i>P. tricholoma</i> nos tratamentos T1 ao T4.....	98
<b>Figura 4.37</b> Atividade de avicelase para <i>P. tricholoma</i> nos tratamentos T5 ao T8.....	99
<b>Figura 4.38</b> Atividade de avicelase para <i>P. tricholoma</i> nos tratamentos T9 ao T12.....	99
<b>Figura 4.39</b> Produtividade Máxima de Avicelase (U/g.dia) nos tratamentos T1 ao T12 para o fungo <i>P. tricholoma</i> .....	100
<b>Figura 4.40</b> Atividade de avicelase para <i>P. tenuiculus</i> nos tratamentos T1 ao T4.....	101

<b>Figura 4.41</b> Atividade de avicelase para <i>P. tenuiculus</i> nos tratamentos T5 ao T8.....	101
<b>Figura 4.42</b> Atividade de avicelase para <i>P. tenuiculus</i> nos tratamentos T9 ao T12.....	102
<b>Figura 4.43</b> Produtividade Máxima de Avicelase (U/g.dia) nos tratamentos T1 ao T12 para o fungo <i>P. tenuiculus</i> .....	102
<b>Figura 4.44</b> Atividade específica de Xilanase (U/g de proteína) nas fermentações dos tratamentos T1 ao T6 para o fungo <i>P. tricholoma</i> .....	104
<b>Figura 4.45</b> Atividade específica de Xilanase (U/g de proteína) nas fermentações dos tratamentos T7 ao T12 para o fungo <i>P. tricholoma</i> .....	105
<b>Figura 4.46</b> Atividade específica de Xilanase (U/g de proteína) nas fermentações dos tratamentos T1 ao T6 para o fungo <i>P.tenuiculus</i> .....	106
<b>Figura 4.47</b> Atividade específica de Xilanase (U/g de proteína) nas fermentações dos tratamentos T7 ao T12 para o fungo <i>P.tenuiculus</i> .....	106

# 1 INTRODUÇÃO

Os temas relacionados ao meio ambiente se evidenciam cada vez mais e, no âmbito desta discussão, as ciências ambientais vêm atraindo um interesse cada vez maior da sociedade. Contudo, o tema “meio ambiente” não se restringe apenas a defesa de florestas ou à proteção de uma espécie. A questão é mais complexa e exige mudanças igualmente complexas.

O tradicional processo industrial, além do produto de interesse, gera múltiplas saídas de outros materiais em forma de resíduos e emissões não incorporadas no produto final que, geralmente, são aceitas como efeito normal no processo de fabricação. Porém, nos últimos anos têm se intensificado o aproveitamento de resíduos, especialmente os agroindustriais tais como, polpa e folhas de café, resíduos de frutas, bagaço de mandioca, farelo de soja, bagaço de cana de açúcar, polpa de beterraba, etc. Vários processos biotecnológicos foram desenvolvidos para utilizar esses materiais na produção de álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e fungos, gerando produtos de grande valor econômico. Este pensamento atende a proposta ZERI, “*Zero Emissions Research Initiative*”, que estabelece uma mudança de paradigmas no conjunto das atividades econômicas, particularmente dos processos de produção industrial. A estratégia da proposta ZERI, objetiva a transformação da matéria-prima em bens úteis sem danificar o meio ambiente, colocando os resíduos e emissões como insumos para outros produtos.

Dando aporte a esta proposta, os processos biotecnológicos vêm sendo amplamente considerados como uma alternativa consistente para a geração de bens e serviços, pois uma das formas de transformar os resíduos gerados em produtos

úteis, muitas vezes para a indústria que o produz, consiste em utilizar o seu próprio potencial de reação por meio de bioprocessos.

Dentro deste contexto, os fungos desempenham importante papel no processo de bioconservação, pois podem reduzir a quantidade de resíduos, minimizar a poluição, formar produtos de interesse às indústrias de alimentos, papel, fármacos, entre outros.

Portanto, considerando a importância deste assunto no âmbito da tecnologia ambiental, este trabalho tem por objetivo a utilização da balsa mediana de palmito, resíduo da extração do palmito na indústria de alimentos, suplementado com diferentes concentrações de bagaço de mandioca e farelo de soja, como substrato para o crescimento de duas espécies do gênero *Polyporus*: *tricholoma* e *tenuiculus*, visando à obtenção de enzimas hemicelulolíticas: xilanase (empregada especialmente na indústria de papel) e celulolíticas: carboximetilcelulase e avicelase (utilizadas na indústria de alimentos). Os objetivos específicos deste trabalho são: avaliar a produção das enzimas hidrolíticas para as duas espécies de fungos e analisar o efeito da suplementação dos diferentes resíduos sobre o crescimento dos fungos e a produção das enzimas. Tanto o resíduo como os fungos citados são pouco estudados, portanto, espera-se, com este trabalho contribuir para o conhecimento da potencialidade biotecnológica dos mesmos. Avaliar a produção de enzimas hidrolíticas (xilanase, carboximetilcelulase e avicelase) pelas duas espécies de *Polyporus*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

As atividades agroindustriais no Brasil evoluíram, rapidamente, na safra 2002/03. Neste período é estabelecido mais um recorde, com 120 milhões de toneladas de produtos vindos da agroindústria (CEPA, 2003). Porém o estudo dos impactos causados por este setor sobre o meio ambiente é pouco abrangente no sentido de que é restrita, normalmente, à unidade fabril, deixando de lado outros aspectos importantes e intrínsecos às atividades agroindustriais, necessitando da implantação de um completo planejamento ambiental dessas atividades e das demais que lhe são suportes ou as complementam (SALLES, 1993).

Segundo ABARCA, (1999), o setor agroindustrial não é reconhecido pela sociedade como um setor que afeta o meio ambiente. De acordo com este autor talvez tal fato seja devido à sociedade valorizar mais a contribuição da atividade agroindustrial na produção de alimentos sendo, entretanto, desconhecido, para a maior parte dela, a complexidade dos processos tecnológicos existentes neste tipo de atividade, bem como o montante de subprodutos poluidores que são gerados e depositados no meio ambiente.

Os resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais, sendo, na sua maioria, biomassa lignocelulósica, representam uma fonte abundante e renovável de substratos que podem ser biologicamente convertidos em biomassa microbiana de elevado valor nutricional. Segundo DOELLE, (1996) uma tecnologia de fermentação desenvolvida a partir de materiais lignocelulósicos resultando em múltiplos produtos, sem efluentes poluentes no solo, na água e no ar, é caracterizada como uma “tecnologia integrada”.

Estes resíduos agroindustriais são, em sua maioria, de natureza lignocelulósica (KEREM et al.,1992) e de acordo com SERMANI & PORRI (1989) a utilização de material lignocelulósico para a obtenção de compostos de alto valor econômico, por biotransformação, é um dos mais interessantes campos da pesquisa biotecnológica.

Os principais componentes dos resíduos lignocelulósicos são a celulose, a hemicelulose e a lignina. O teor de nitrogênio é, geralmente, muito baixo. A proporção percentual dos componentes celulose, hemicelulose e lignina, assim como do teor de nitrogênio, depende do tipo de material, idade e estágio vegetativo (RAJARATHNAM et al., 1992).

A celulose constitui o polissacarídeo predominante nos resíduos vegetais, representando entre 30 a 60% do seu peso seco total. Como polímero de D-glucose de elevada massa molar, a celulose é o principal componente das paredes celulares, responsáveis pela sustentação vegetal, possuindo uma estrutura cristalina altamente resistente (RAJARATHNAM et al., 1992).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo formado por duas cadeias ramificadas, compostas de hexoses, pentoses, ácido urônico e açúcares menores, facilmente hidrolisáveis. Representa o segundo maior componente dos resíduos lignocelulósicos, chegando até 40% do seu peso seco (RAJARATHNAM et al., 1992).

A lignina pode representar até 25% de toda a biomassa lignocelulósica produzida no planeta e seu teor nos resíduos vegetais pode atingir até 40% do seu peso seco. Juntamente com a hemicelulose, envolve as fibras celulósicas, desempenhando as funções de cimentante e preservadora (PAULI, 1997). Esta ação é possível devido à estrutura tridimensional deste heteropolissacarídeo de

fenilpropano, onde não existe ligação repetida na construção dos blocos monoméricos. Desta forma a lignina forma uma barreira física que dificulta a atividade de inúmeros organismos produtores de enzimas celulolíticas, limitando os sítios de ataques enzimáticos e impedindo a entrada de enzimas de maior peso molecular, devido ao reduzido tamanho dos capilares da biomassa, restringindo o ataque à superfície externa (RAJARATHNAM et al., 1992).

Os resíduos agroindustriais vêm sendo utilizados ainda de forma experimental, pesquisas realizadas pela Embrapa Florestas mostram aumentos significativos de produtividade com a aplicação de resíduos gerados pela indústria de papel e celulose em plantios de *Eucalyptus grandis*. Pesquisadores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, utilizaram o estipe de *Euterpe edulis* Martius com o objetivo de avaliar o potencial desse material vegetal desprezado na colheita do palmito, como matéria-prima fibrosa, sendo uma alternativa para a produção de polpa celulósica kraft (ANDRADE et al., 2000).

O uso de produtos à base de materiais lignocelulósicos como compensados, chapas duras de fibras, chapa de média densidade e de aglomerado, vem sendo pesquisado na Universidade de Brasília, além disso, tem-se intensificado o estudo sobre o melhor aproveitamento de resíduos florestais e agrícolas, para a produção de painéis a serem usados como móveis, revestimentos de automóveis e forros. O resíduo de bagaço de cana-de-açúcar, também está sendo testado para a produção de painéis aglomerados, como já ocorre em outros países, como Cuba, Colômbia, China, Rússia e Argentina (TEIXEIRA et al., 1997)

No que se refere à biotecnologia ambiental, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de se obter um produto a partir de um resíduo gerado na agroindústria. Como exemplos, citam-se a produção de cogumelos comestíveis em

resíduos lignocelulósicos (TONINI, 2004), antibióticos (VIEIRA, 2005) e outros metabólitos a partir de fungos Basidiomycetes, realizado na Universidade Regional de Blumenau, pelo mesmo grupo de pesquisa deste trabalho.

Dos diversos resíduos agroindustriais com potencialidade para serem utilizados em bioprocessos, a bainha mediana de palmito, que possui alta concentração em material lignocelulósico (TONINI, 2004), ainda é pouco estudada.

## 2.2 RESÍDUOS DA PALMEIRA *Euterpe edulis*

O palmiteiro (*Euterpe edulis*) em sua distribuição geográfica original, forma duas grandes áreas de ocorrência no Domínio da Mata Atlântica assumindo, originalmente, elevados índices de densidade e frequência no estrato médio das formações Ombrofila Densa, na maior parte das formações Estacional Decidual e Estacional Semidecidual e muito esparsamente no Cerrado Brasileiro (REIS et. al., 2000).

*E. edulis* é uma palmeira não estolonífera, cujo porte adulto geralmente varia entre 10 e 20 metros de altura, com estipe de 8 a 15 cm de Diâmetro a Altura do Peito (DAP) e apresentando no ápice um tufo de 10 a 20 folhas pinadas. Seu principal habitat é a Floresta Ombrófila Densa da Encosta Atlântica, da Bahia ao Rio Grande do Sul, onde é uma das espécies mais importantes do estrato médio (REIS et al., 2000).

A exploração de *E. edulis* é uma atividade de importância social nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Entretanto, seu extenso extrativismo fez com que restassem apenas poucos núcleos naturais da espécie, comprometendo sua regeneração natural (FANTINI et al., 1993, apud PAULILO, 2000).

Os dados oficiais sobre a produção e o consumo de palmito no Brasil são escassos e poucos confiáveis. A existência da produção e comercialização clandestina de palmito praticamente inviabiliza uma contabilidade precisa dos números oficiais da produção. As estimativas apontam para um consumo interno de 40 mil toneladas anuais (incluindo todas as espécies), correspondentes a um mercado interno que supera os 400 milhões de dólares, cifra alcançada por poucos produtos no Brasil. (FANTINI et al., 2000).

A espécie é explorada, comercialmente, com significado amparo econômico legal ou, clandestinamente, nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Contudo, a maior parte da atividade está concentrada nos estados de São Paulo (especialmente no Vale do Ribeira), Santa Catarina e Paraná (Litoral Norte).

De acordo com Reis et al (2000), em Santa Catarina, as populações remanescentes e principais áreas de exploração estão concentradas especificamente no litoral norte, na região de Joinville e no Vale do Itajaí. Sendo distribuídas em algumas grandes propriedades na região de Joinville e em grande número de pequenas propriedades rurais (menores que 50 ha), por todo o Vale do Itajaí e também na região do Litoral Norte, que possuem pequenas áreas com populações densas de palmito remanescentes.

A ampliação das áreas com populações naturais da espécie e, obviamente, a ampliação das áreas sob manejo, traz todas as vantagens relacionadas à manutenção de vários processos do dinamismo florestal e das inter-relações entre várias espécies, pois o palmito está entre as espécies de maior importância como fornecedora de alimento para a fauna (REIS et al., 2000).

Segundo este autor, o *E. edulis* é uma espécie bastante freqüente, densa, com uma área de ocorrência bastante extensa no Domínio da Mata Atlântica, conspícua e de grande interesse comercial e caracteriza-se como um forte bioindicador da atual situação da Mata Atlântica. A sua conservação representa uma ação efetiva na busca de um desenvolvimento sustentável: manter a biodiversidade e explorar de forma sustentável os recursos florestais da Mata Atlântica.

A palmeira *E. edulis* produz o palmito que é industrializado, transformando em palmito para conserva. Para a obtenção do palmito há necessidade do corte da árvore e remoção da casca que recobre a bainha do palmito. Este material apresenta uma relação C: N, de 64:1 (TONINI, 2004) e pode reverter-se em substrato para cultivo de fungos. Na Figura 2.1, é apresentada uma foto da casca do palmito (bainha externa) dispensada no meio ambiente, após a extração do palmito e na Figura 2.2 resíduos produzidos na indústria, após o processamento.



**Figura 2.1** – Casca de palmito da Palmeira *Euterpe edulis*  
**Fonte:** Quadros, 2003.



**Figura 2.2** - Rejeito de palmito produzido na indústria contendo bainhas medianas e internas.

**Fonte:** Quadros, 2003.

Neste contexto, a bainha mediana de palmito é um resíduo do processo produtivo que pode ser utilizado dentro dos princípios da proposta ZERI “Zero Emissions Research Initiative”, que será abordada mais adiante.

### 2.2.1 Importância econômica da produção do palmito no Brasil.

O Brasil detém 95 % do mercado de exportação mundial de palmito com receitas médias anuais de 30 milhões de dólares e tendência de expansão permanente. O mercado interno do produto em conserva é estimado como sendo, pelo menos, seis vezes maior do que o internacional, equivalente, portanto, a 180 milhões de dólares, visto que o preço interno e externo do produto é, praticamente, idêntico (BOVI, 1998).

De acordo com os dados do IBGE, a produção anual de palmito é de cerca de 210 mil toneladas, 92 % das quais obtidas somente no estado do Pará (BOVI,1998). De acordo com dados citados por RODRIGUES (2003) a produção de palmito nos estados do sul e em São Paulo, entre 1990 e 2000, apresentaram um

quadro oscilante, com valores da ordem de 27.031 toneladas em 1990, 36.445 toneladas em 1997 e 20.599 toneladas em 2000. Deste último valor, estimam-se em 17.154 toneladas de palmito extrativo e 3.445 toneladas de cultivado.

Cerca de 10% do palmito produzido é exportado, alcançando no mercado internacional preço em torno de 22 dólares por caixa de 24 latas de 0,5 Kg (220 a 280 gramas de produto) (BOVI, 1998). Tais números poderiam ser promissores, considerando, entre outros aspectos, que esse alimento, bastante apreciado por consumidores estrangeiros é exportado para países como Estados Unidos, França, Bélgica, Itália e Japão, além de México e Argentina. A verdade, no entanto, é que quanto mais cresce a “produção” e exportação, maior e mais próxima se torna a ameaça de que o país, dentro de poucos anos, não disponha de volume suficiente para atender à demanda externa e para suprir seu próprio consumo (BOVI 1998).

A utilização da palmeira *E. edulis* por empresas alimentícias catarinenses, nos dias atuais, é regulamentada por uma Portaria Interinstitucional de Santa Catarina de 04 de junho de 1996, que prevê critérios gerais de exploração para espécies não madeiras dentre elas, o palmito. Em todas as situações, o instrumento para realização da exploração é o Plano de Manejo Florestal Sustentável (PMFS), cujo roteiro básico compõe o anexo I da Portaria. A aprovação do PMFS depende de emissão de licença ambiental prévia pelo órgão estadual, a Fundação do Meio Ambiente (FATMA). A autorização para execução e fiscalização é realizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Somente é autorizada a execução do PMFS para propriedades com a área da reserva legal (20 % - Código Florestal) averbada em cartório. Prevê-se ainda a

inclusão de um Termo de Responsabilidade de Manutenção da Floresta Manejada por parte do proprietário (REIS, et al., 2000).

### 2.2.2 O Resíduo do processamento do palmito

O processo de extração do palmito das florestas manejadas se dá pelo corte total da palmeira, onde somente a bainha interna presente no estipe é utilizada para a comercialização do palmito o que significa apenas 1 m de uma palmeira de aproximadamente 15 m de altura. As folhas, o caule e as bainhas externas são descartados nas florestas e as bainhas medianas são descartadas na indústria.

De acordo com LIMA & MARCONDES (2002), o palmito é encontrado nas pontas das palmeiras onde se formam as folhas, sendo constituído por três camadas (bainhas): externa, mediana e o coração do palmito. A camada externa que envolve o palmito é fibrosa, de cor esverdeada ou marrom e não é utilizada na industrialização do palmito. Representa de 25 a 35 % do seu peso seco, dependendo da espécie de palmito. A segunda camada de cor mais clara, e que representa de 25 a 30 %, é a bainha mediana ou semi-fibrosa e, também, não é utilizada na industrialização do palmito. Por fim, tem-se o miolo, também denominado coração do palmito, que contém baixo teor de fibras. Esta parte é que produz o palmito em conserva.

Ainda, de acordo com os mesmos autores, somente o resíduo gerado na indústria produz muitas toneladas em termos de bainha mediana, material que, até o momento, é descartado do processo industrial. Para um lote de 1.000 unidades de 300 gramas de palmito enlatado são obtidos 350 Kg de bainha mediana. Considerando que estes valores sejam obtidos por dia, a cada 20 dias de produção

industrial (atividade mensal) seriam gerados 7.000 Kg de bainha mediana. Em um ano, estes valores representariam 127,75 toneladas.

Portanto, sendo a bainha mediana uma parte semi-fibrosa com os mesmos componentes do palmito, propostas de utilização deste material deveriam ser incentivadas.

### 2.3. PROPOSTA ZERI (ZERO EMISSIONS RESEARCH INITIATIVE)

Em 1994, lançou-se a Proposta ZERI (*Zero Emissions Research and Initiative*) por Gunter Pauli na Universidade das Nações Unidas em Tóquio. ZERI surgiu da consciência de que algo deveria ser mudado na sociedade de modo que esta pudesse continuar satisfazendo suas necessidades por água, alimento, energia, trabalho, moradia entre outros, dentro de um estilo ambientalmente sustentável, através da aplicação da ciência e tecnologia, envolvendo governo, empresas e meio acadêmico. Um importante aspecto, tanto na elaboração como na divulgação do conceito, foi à ênfase na produtividade (HUEBLIN, 2001), que do ponto de vista sistêmico, é resultado da otimização dos processos dentro do sistema.

De acordo com PAULI (1998) o ZERI busca criar um novo paradigma para uma indústria sustentável através do objetivo “*emissões zero*” de gases, líquidos e sólidos. A “emissão zero” atenta para o uso de materiais brutos, não trabalhados, fazendo utilização desses recursos existentes antes de adicionar insumos caros para eliminar impactos ambientais, aumentar a produtividade e criar novos trabalhos.

A emissão zero permite à uma indústria utilizar seu próprio resíduo como material bruto, não trabalhado, ou que outra indústria poderá utilizá-lo, para realizar um total ciclo de insumos – com indústrias se reorganizando em grupos (“clusters”),

tal que o resíduo ou subproduto, sem valor de uma atividade, possa ser convertido num insumo de valor agregado para outras.

O ZERI nasceu das mudanças ocorridas, principalmente, no setor industrial para que este harmonizasse seus sistemas produtivos e sociais com os da natureza. Assim, os fundamentos conceituais de ZERI se baseiam na observação dos sistemas da natureza e da reflexão sobre os sistemas de valores da sociedade (BELLO, 1998).

### 2.3.1. Estratégia do ZERI

Segundo BELLO, (1998), a estratégia de ZERI compreende três linhas de ação:

- A metodologia para gerir a mudança industrial na direção do desenvolvimento sustentável;
- Programa de pesquisa e desenvolvimento para a criação de novos modelos e protótipos industriais;
- Novos empreendimentos em escala empresarial ou reestruturação dos existentes.

As oportunidades para a Metodologia ZERI no Brasil são muitas devido a diferentes fatores:

- Grande produção de biomassa e dos seus resíduos,
- Carência de política para usar melhor esse recurso,
- Carência de tecnologia,
- Carência de empregos e renda,
- Necessidades de desenvolvimento regional em todas as partes do país.

A estratégia ZERI conta com o suporte da academia e do governo e promove uma metodologia formada por cinco passos para promover uma mudança empresarial, (BELLO,1998).

- a) Produtividade Total da Matéria-Prima;
- b) Ciclo de vida dos Materiais;
- c) Agrupamentos Empresariais;
- d) Descobertas Científicas e Inventos Tecnológicos;
- e) Políticas Públicas.

### 2.3.2. Aplicabilidade Geral do ZERI

Quanto à aplicabilidade da proposta ZERI, os pontos de maior questionamento são devido aos problemas dos custos, pois uma produção sem emissão se tornaria muito cara nas condições atuais da economia de mercado. Porém, de acordo com BELLO, (1998), acredita-se que, em menos de 20 anos, ela será padrão de qualidade para tornar-se sustentável.

Em termos de Brasil, o ZERI tem um ótimo potencial de aplicação, visto a magnitude dos recursos naturais, florestas, água, biodiversidade e biomassa, a crescente industrialização, com alto consumo e, conseqüentemente, expansão da agricultura que tem gerado impacto negativo sobre os ecossistemas naturais, no que se refere à produção de resíduos agroindustriais BELLO, (1998).

Resíduos agroindustriais, ricos em materiais lignocelulósicos são amplamente produzidos pela atividade agrícola e industrial. Dentre os resíduos lignocelulósicos produzidos em grande quantidade pela atividade agroindustrial brasileira, pode-se citar: cascas, bagaço de cana, palha e farelo de arroz, palha e farelo de trigo, palha

de bananeira e resíduo de algodão. A maioria destes materiais é parcialmente ou não aproveitada, sendo transformados em poluentes do meio ambiente PAULI (1998).

Dentre as várias possibilidades para utilização destes resíduos, a Fermentação em Estado Sólido (FES) é uma tecnologia amplamente estudada para a produção de enzimas de interesse industrial.

#### 2.4. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

Nas últimas décadas, várias estratégias têm sido desenvolvidas para o aproveitamento da vasta quantidade de resíduos lignocelulósicos gerados, anualmente, pelas atividades agrícolas e florestais e pelas indústrias processadoras de alimentos (BUSWELL et al., 1998).

A FES pode ser definida como uma técnica de crescimento de microrganismos, sobre e no interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida) onde o conteúdo de líquido contido nesta matriz sólida deve ser mantido num nível correspondente à atividade de água, assegurando conveniente crescimento e metabolismo das células, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz (SAUCEDO-CASTANEDA, 1991; KOLICHESKI, 1995; BRAMORSKI, 1997).

A FES tem sido utilizada pelo homem há muitos séculos, muito antes do entendimento dos processos bioquímicos e microbiológicos presentes na produção de alimentos e queijos embolorados NIGAN & SINGH, (1994). Nos últimos anos, este processo tem atraído grande atenção por parte dos pesquisadores devido a muitas vantagens apresentadas sobre a tradicional fermentação submersa (FSm),

tais como: tecnologia simples, baixa possibilidade de contaminação, baixo conteúdo de água e baixo investimento de capital (NOPHARATANA, 1998).

A principal diferença entre FSm e FES é que, na primeira, o substrato é completamente dissolvido e homogêneo enquanto, na segunda, empregam-se substratos insolúveis, com pouco líquido no meio de crescimento.

Segundo os autores MAIORANO, (1990); MENEZES & HENNIES, (1994); NIGAN & SINGH, (1994); KOLICHESKI, (1995); BRAMORSKI, (1997); LU *et. al.*, (1998), algumas vantagens da FES sobre a FSm são listadas a seguir:

- O meio é geralmente simples, consistindo de produtos agrícolas não refinados que podem conter todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo. Isto significa que o pré-tratamento pode ser simplesmente, um cozimento com água para umidificar ou dilatar o substrato, ou a quebra do substrato na superfície para aumentar a acessibilidade aos nutrientes internos ou a moagem de grandes blocos de substrato para partículas menores.
- Tratamento de efluentes e disposição de resíduos é geralmente simples ou minimizados. Geralmente todo o produto é utilizado, principalmente, se é intencionado o uso como suplementação alimentar de animais.
- O custo de esterilização é reduzido, pois se aquece menos água.
- O espaço ocupado pelo equipamento de fermentação é pequeno, considerando-se o rendimento do produto. Utiliza-se menor quantidade de água e o substrato é concentrado.
- Como a maioria das bactérias requer altos níveis de mistura líquida, a FES exclui, ou reduz, sensivelmente, o problema da contaminação bacteriana.
- O meio é facilmente aerado, desde que haja espaço entre as partículas do substrato.

- O resíduo remanescente possui um volume reduzido e este resíduo não apresenta condições para o desenvolvimento de patógenos.
- Geralmente, o único componente necessário a ser adicionado ao meio é água, embora, ocasionalmente, outros nutrientes como fonte de nitrogênio ou minerais possam ser adicionados.
- Torna-se possível à obtenção de esporos que são impossíveis de se obter em cultura submersa.
- Menor custo dos equipamentos
- Exige menor demanda de energia

Uma distinta vantagem da FES, quando comparada à fermentação submersa, de acordo com RAMANA et al., (1993), está na produção de enzimas fúngicas. Isto é observado em termos de produtividade enzimática e recuperação do produto.

Os mesmos autores citados acima apontam algumas desvantagens da FES, a saber:

- Os tipos de microrganismos que podem ser usados são limitados, em função das condições do processo, tais como: baixa concentração de água livre. Os mais utilizados são fungos e algumas leveduras.
- Em operações de grande escala, o calor gerado pelo metabolismo microbiano deve ser removido, o que se torna mais difícil na FES que no processo submerso.
- A transferência de oxigênio entre as partículas do meio pode se tornar um problema, quando se utiliza granulometria do substrato muito elevado.
- Medidas de pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e cálculo de rendimento de produto são mais complexos.

- Controle de temperatura é crítico e, muitas vezes, é necessário controlar a composição da atmosfera no que diz respeito a O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e outros metabólitos voláteis.
- Contrariamente a simplicidade de operação da FES, a heterogeneidade da mistura dificulta o controle de crescimento microbiano e de variáveis como agitação, aeração e concentração de nutrientes e produtos.

De acordo com MITCHELL & LONSANE, (1992) a aplicação comercial da FES pode ser dividida em dois tipos:

1ª) aplicações sócio-econômicas tais como a compostagem de resíduos, valorização de produtos lignocelulósicos e fibras alimentares;

2ª) aplicações economicamente lucrativas, tais como, a produção de enzimas, ácidos orgânicos e alimentos fermentados.

ZADRAZIL & BRUNNERT (1982) e KEREM et al., (1992), comentam que as pesquisas para viabilizar processos para a utilização de resíduos de natureza lignocelulósica têm se voltado para fermentações em estado sólido, conduzidas por fungos, pelo fato deste processo requerer menos energia que um processo de fermentação submersa, tornando-o uma aplicação de interesse sob o ponto de vista econômico.

Citando os mesmos autores acima, a característica própria da FES é sua habilidade em proporcionar um ambiente seletivo a baixas umidades para um organismo micelial que produz uma variedade de enzimas extracelulares e poder crescer em altas concentrações de nutrientes perto da superfície sólida. Estes organismos incluem um grande número de fungos filamentosos e poucas bactérias. Os fungos, de acordo com SMITS et al. (1998), são preferencialmente empregados em fermentação sólida.

O longo “corpo tubular” da hifa dos fungos cresce junto à partícula sólida, usando a fina camada líquida da superfície como fonte de umidade e nutrientes, penetrando nas fendas e no interior do substrato com especial anexação para chegar aos nutrientes mais distantes. O alongamento das extremidades das hifas do fungo produz enzimas ativas para converter o polímero natural em açúcares metabolizáveis. Estas enzimas produzidas durante a FES são de interesse para muitas indústrias agrícolas e alimentícias quando obtidas em grandes quantidades e a um custo reduzido (NOKES et al., 1997).

Fungos pertencentes a sub-classe Basidiomycetes têm sido bastante utilizados na biodegradação dos resíduos agroindustriais e são conhecidos pela capacidade de degradar materiais lignocelulósicos, pela síntese de enzimas hidrolíticas e ligninolíticas que atuam sobre diferentes substratos ricos em celulose, hemicelulose e lignina (DURRANT, 2002).

## 2.5. FUNGOS BASIDIOMYCETES

Os fungos, em particular os Basidiomycetes, são conhecidos, seja pelas suas propriedades nutricionais e medicinais, seja pela sua toxidez. É uma subclasse de grande importância econômica por abranger fungos parasitas, fungos degradadores da madeira e os fungos comestíveis que sustentam a atividade industrial (LACAZ et al, 1970) .

Basidiomycetes são consideradas todas as espécies de fungos que produzem corpos frutíferos facilmente visíveis a olho nu. O filamento dos Basidiomycetes, denominado de hifa é tubular e a massa de hifas recebe a denominação de micélio. A reprodução é realizada por meio da produção de esporos, contudo, qualquer fragmento de hifa possui capacidade de propagação (RAVEN et al., 1978).

Diferenciações morfológicas e fisiológicas do micélio formam os corpos de frutificação conhecidos como basidiocarpos, carpóforos ou cogumelos. No desenvolvimento dos cogumelos, distinguem-se duas fases conhecidas como estágio vegetativo e estágio reprodutivo ou de frutificação. O estágio vegetativo refere-se ao desenvolvimento do micélio e o reprodutivo à formação dos basidiocarpos. Durante a colonização do substrato, enzimas extracelulares são secretadas degradando a matéria orgânica transformando-a em compostos orgânicos solúveis absorvidos pelas hifas. O crescimento do micélio resulta de uma efusão de hifas, gerando uma associação entre hifa e substrato, que proporciona um forte suporte físico necessário a formação dos corpos de frutificação. Quando este estágio é atingido o micélio é considerado como estabilizado e a mudança para o estágio reprodutivo está normalmente condicionada a variação de fatores físicos como o decréscimo de temperatura e aumento de umidade (CHANG, 1989).

O cogumelo é formado pelo estipe ou pé e pelo píleo. O píleo possui, em geral, forma de umbela ou chapéu e apresenta, em sua superfície inferior, um tecido diferenciado, o himênio, formado por lamelas, póros ou tubos através dos quais há a liberação dos esporos (FIDALGO, 1967).

A maioria dos Basidiomycetes pode utilizar os componentes da madeira para o seu crescimento, porque possuem um sistema enzimático que os torna capazes de degradar fontes complexas de carbono como a celulose, a hemicelulose e a lignina, mostrando o importante papel desses fungos no processo de reciclagem da biomassa das florestas.

Os fungos lignocelulolíticos têm recebido atenção especial dos pesquisadores, nas últimas décadas, devido a sua aplicabilidade no tratamento de efluentes (indústrias têxteis e papelaria), na biorremediação e na produção de

antibióticos (BLANCHETTE, 1995; KOTTERMAN et al., 1994; SMÂNIA et al., 1997; ZJAWIONY, 2003). Também vem sendo discutido o papel desses organismos na produtividade das florestas, as quais são estritamente dependentes da reciclagem de nutrientes imobilizados da madeira e, portanto, da dinâmica dos processos da decomposição (RAYNER & BODDY, 1998).

Alguns desses fungos produzem corpos frutíferos comestíveis e de alto valor nutricional, sendo ricos em proteínas, fibras, minerais, vitaminas, apresentando baixo teor de lipídeos e carboidratos (WASSER & WEIS, 1999).

As regiões tropicais e semi-úmidas apresentam características que as tornam áreas propícias ao cultivo de fungos comestíveis, oferecendo, além de condições climáticas favoráveis, atividades agro-florestais que produzem uma enorme quantidade de resíduos lignocelulósicos que podem ser utilizados como excelentes substratos (LOGUERCIO LEITE et al., 1991).

### 2.5.1 Potencial de degradação dos Basidiomycetes

Existem três tipos de fungos que vivem na madeira em decomposição das árvores, que, preferencialmente, degradam um ou mais componentes da madeira: fungos de podridão mole (Actinomycetes), podem eficientemente decompor celulose, porém a degradação da lignina por estes fungos é devagar e incompleta; fungos de podridão marrom (Basidiomycetes) exibem preferência pelos carboidratos, componentes da madeira e fungos de podridão branca (Basidiomycetes) são organismos conhecidos pela completa degradação de lignina e celulose (SZKLARZ et al., 1989).

Os fungos produtores de corpos frutíferos comestíveis e medicinais são aptos para crescer em uma grande variedade de resíduos agrícolas. A utilização de

substratos lignocelulósicos pelos fungos, depende de sua capacidade de secretar enzimas ligninocelulolíticas tais como: celulasas, hemicelulasas, lacases, manganês e lignina peroxidases. Estas enzimas, ao degradarem os compostos lignocelulósicos, liberam nutrientes para o crescimento fúngico (BUSWELL et al. 1996).

A biodegradação da madeira ocorre quando a madeira está exposta ao ambiente criando, assim, condições favoráveis ao crescimento microbiano. A decomposição e o ciclo biogeoquímico são essenciais ao funcionamento e manutenção do ecossistema (BLANCHETTE, 1995).

#### 2.5.2.O Gênero *Polyporus*

*Polyporus* é gênero da subclasse Basidiomycetes pertencentes à ordem Polyporales. Estes fungos possuem a característica de produzir a podridão branca da madeira, crescer em troncos de árvores ou madeira morta e possuem exoenzimas que degradam hemicelulose, celulose e lignina (CABRERA et al.,2002), o que faz esses fungos serem mais utilizados que os outros fungos decompositores na aplicação de certos processos biotecnológicos baseados em materiais lignocelulósicos.

Os fungos *Polyporus*, no Estado de Santa Catarina, foram descobertos pela primeira vez em 1815 por Adalberto de Chamisso, (LOGUERCIO LEITE, 1990). E após, em 1846, Lévillé, publicou estudos dos exemplares depositados no Museu de Historia Natural de Paris, onde incluíram coletas realizadas por Gaudichaud – Beaupre no Brasil Meridional entre 1831 e 1833. As espécies citadas foram: *Lenzites striata* Fr., *Guilleminiana* sp. Nov., *Polyporus fastuosus* Lev., *P. testaceus* sp. Nov., e *Hydnum incanum* sp. Nov.

Friederich Alfred Gustav Jobst Moller, chegou a Blumenau em 1890, realizou suas pesquisas por 20 meses, sendo suas coletas de Basidiomycetes estudadas e publicadas por Bresadola em 1896. (LOGUERCIO LEITE, 1990).

Os primeiros exemplares de *Polyporus* identificados no estado de Santa Catarina estão apresentados nos Quadros 2.1 e 2.2.

**Quadro 2.1** - Inventário das espécies de *Polyporus* registradas em Santa Catarina por HENNINGS em 1897.

<b>Espécies</b>	<b>Local</b>
<i>P. auberianus</i> Mont.	Blumenau
<i>P. senex</i> Nees & Mont.	Blumenau
<i>P. gilvoies</i> Henn.	Santa Catarina
<i>P. blanchettianus</i> Berk. & Mont.	Santa Catarina
<i>P. gilvus</i> (sem autor)	São Francisco

**Fonte:** LOGUERCIO LEITE, 1990.

**Quadro 2.2** - Inventário das espécies de *Polyporus* registradas em Santa Catarina por BRESADOLA em 1896.

<b>Espécies</b>	<b>Local</b>
<i>P. lentus</i> Berk	<i>Blumenau</i>
<i>P. virgatus</i> Berk	
<i>P. blanchettianus</i> Berk. & Mont.	
<i>P. vernicosos</i> Berk.	
<i>P. gilvus</i> Schw.	
<i>P. crispus</i> (Pers.) Fr.	
<i>P. auberianus</i> Mont.	
<i>P. cubensis</i> Mont.	
<i>P. plebejus</i> Berk	

**Fonte:** LOGUERCIO LEITE, 1990.

Com relação aos pesquisadores brasileiros, Furlani em 1988, estudou Aphyllophorales na ilha de Santa Catarina, na localidade do Rio Tavares e Loguércio Leite, realizou trabalhos sobre *Polyporus* em Florianópolis – SC. A espécie *P. tenuiculus*, foi encontrada por Tavares em 2003, no Parque São Francisco de Assis em Blumenau e identificada por Loguércio-Leite em 2003.

### 2.5.3 Características das espécies *P. tricholoma* e *P. tenuiculus*

O fungo *Polyporus tricholoma* Mont. está classificado no grupo *Polyporellus* enquanto o fungo *Polyporus tenuiculus* (Beauv) Fr. está classificado dentro do grupo infragenérico *Favolus* (NUNES, RYVARDEN, 1995).

A distribuição das duas espécies é pantropical, sendo a espécie *P. tricholoma* de origem americana e *P. tenuiculus* originário da Nigéria (LOGUÉRCIO-LEITE, 1992).

- *Polyporus tricholoma* Mont

Características macroscópicas: basidiocarpo anual, solitário, central a excentricamente estipitado, delgado, píleo aplanado a umbonado. Superfície superior lisa, com píleo branco e creme quando fresco, de cor castanha a amarelada, amarela acastanhada, castanha forte, quando seco deflexo. Presença variável de cílios, de cor castanha forte, na margem e pequenos poros, 5-10/mm, circulares a angulares (LOGUÉRCIO-LEITE, 1992). Na figura 2.3, imagem de *P. tricholoma*.



**Figura 2.3** – *Polyporus tricholoma*  
Fonte: BARONI,1998

- *Polyporus tenuiculus* (Bauv) Fr.

Características macroscópicas: basidiocarpo anual, solitário, imbricado ou em pequenos grupos com vários basidiomas originados do mesmo ponto de inserção; flabeliforme, espatulado a dividido ao meio e semicircular; quando fresco mole e quando seco quebradiço e leve. A superfície superior branca quando fresca, ao secar se torna amarela e de margens mais escuras, de tom vermelho amarelado; superfície regular, sem pelos ou asperezas, exceto na parte basal onde podem ocorrer linhas ou estrias radiais, à superfície hímenal apresenta poros angulares a radialmente alargados, 1-2 poros/mm e esporos com 8,0-10,0  $\mu\text{m}$  de largura (LOGUÉRCIO-LEITE,1992). Na figura 2.4, imagem de *P. tenuiculus*.



**Figura 2.4** - *Polyporus tenuiculus*  
**Fonte:** TAVARES, 2003.

Quanto ao enquadramento taxonômico, segundo KIRK, 2001, os fungos *Polyporus* possuem a seguinte classificação:

Reino: Fungi  
Filo: Basidiomycota  
Subclasse: Basidiomycetes  
Classe: Agaricomycetidae  
Ordem: Polyporales  
Família: Polyporaceae  
Gênero: *Polyporus*

Os Basidiomycetes produzem uma ampla gama de produtos naturais que incluem componentes estruturais como atividades anti-tumoral e imunológicas, agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirais, enzimas e reguladores de crescimento e aromas (BRIZUELA et al., 1998), entre os Basidiomycetes, são os fungos políporos, a maior fonte de produtos naturais farmacologicamente ativos, além de sua grande importância para a natureza (ZJAWIONY, 2003).

## 2.6 ENZIMAS PRODUZIDAS POR FUNGOS BASIDIOMYCETES

Os fungos Basidiomycetes destacam-se na biotecnologia pela sua capacidade biodegradadora de resíduos naturais. Isto se deve ao fato de um grande número desses fungos produzirem importantes grupos de enzimas, as hemicelulolíticas, as celulolíticas e as lignolíticas que desempenham um papel fundamental no ciclo do carbono, pela decomposição de resíduos vegetais (URBEN, 2001). Além disso, a aplicação das enzimas em diversos processos do setor produtivo tem merecido destaque nas últimas décadas. Isto se deve ao fato das enzimas atuarem como agentes que melhoram os processos industriais quanto à qualidade e eficiência do produto final, bem como aspectos de ordem econômica e ambiental.

Todos os microrganismos capazes de decompor hemicelulose, celulose e lignina produzem uma série de enzimas com diferentes especificidades, que podem atuar em sinergia (BEGUIN, 1994).

A produção de lignina peroxidase e manganês peroxidase por *Polyporus ostreiformis*, demonstrou sua aplicação no controle da poluição da água degradando tintas no processo biológico de descoloração (DEY, et al., 1994).

A utilização de duas enzimas, piranose 2-oxidase e aldose-2-ulose desidratase, purificadas de *Polyporus obtusus*, possibilitou a síntese do antibiótico cortalcerona em uma via biossintética a partir da D-glicose (KOTHS, et al., 1992).

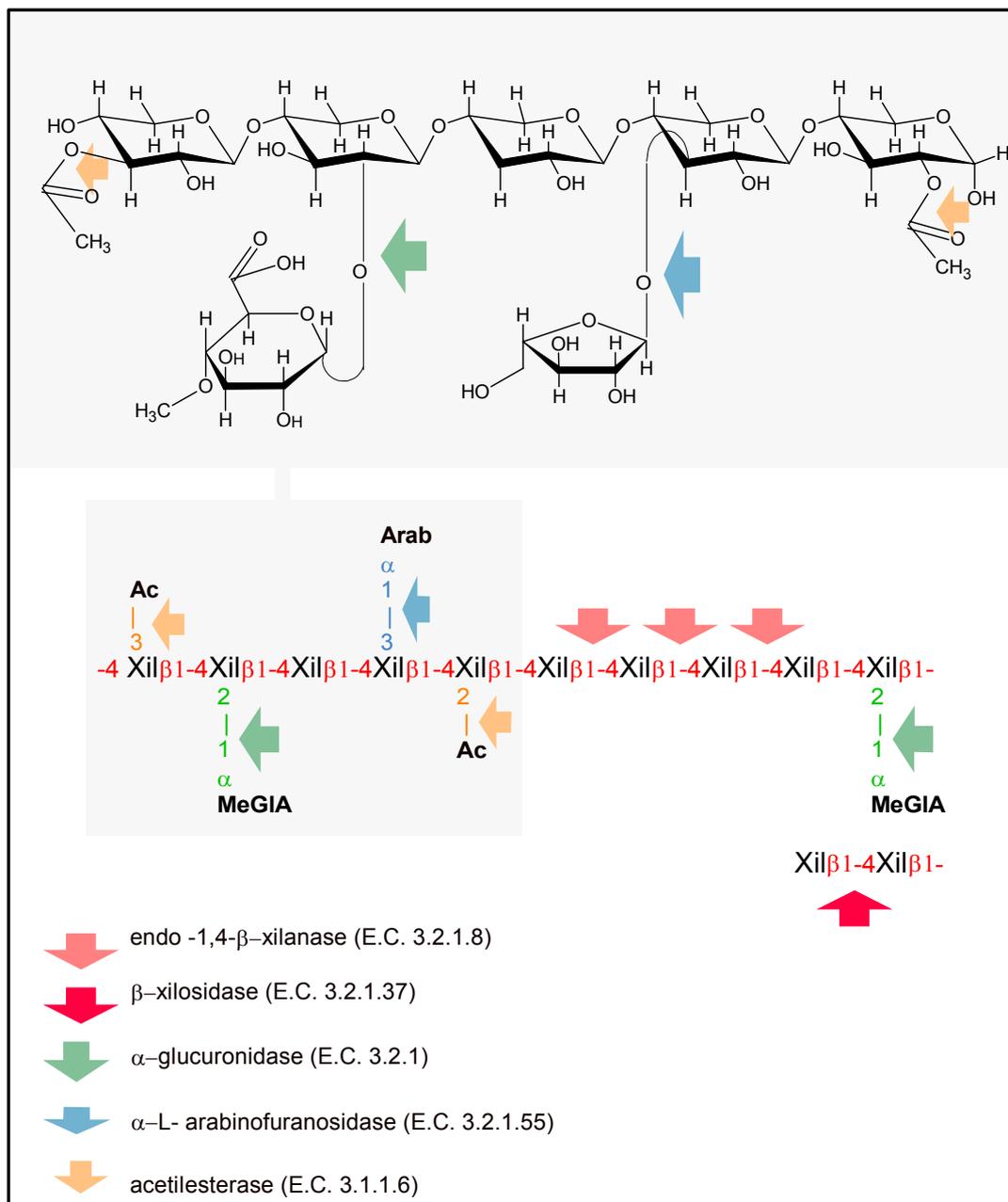
### 2.6.1 Xilanases

A hidrólise da hemicelulose exige um conjunto complexo de enzimas extracelulares, devido a sua estrutura de heteropolissacarídeo ramificado. A xilana é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses, e trata-se de um heteropolissacarídeo composto por ligações  $\beta$  -1,4 de resíduos de D-xilanopiranosil com ramificações arabinosil e/ou acetil, dependendo do vegetal em que se encontra. No caso de madeiras duras como eucalipto na qual a xilana corresponde a 20 a 35% de peso seco da biomassa, o grupo substituinte é o O-acetil-4-O-metilglucoranoxilana, e em madeiras moles, como pinus e vários cereais e gramíneas, é o arabino-4-O-metilglucuranoxilana. Neste caso, a fração de xilana corresponde, em média, a 8% do peso seco da biomassa (HALTRICH et al., 1996).

As hemiceluloses são constituídas de vários polímeros, formados por diferentes resíduos de açúcares, a sua degradação completa necessita de enzimas específicas. A endo  $\beta$  1,4 xilanase (EC 3.2.1.8) forma o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana. Trata-se de uma endo-enzima que degrada, aleatoriamente, a cadeia principal de xilana, liberando xilo-oligossacarídeos (HALTRICH et al., 1996; KULKARNI et al., 1999). A degradação completa desta cadeia principal ocorre por uma ação sinérgica de endo e exo-xilanases ( $\beta$ -xilosidases ou  $\beta$ -D-xilosídeo xilohidrolases), que hidrolisam xilo-oligômeros de baixa massa molecular resultantes. Segundo BIELY (1985), para a hidrólise completa dos heteroxilo-oligômeros, são necessárias ainda, enzimas que hidrolizem os grupos substituintes como  $\alpha$  glucoronidase,  $\alpha$  arabinofuranosidase e acetilesterase, conforme ilustrado na Figura 2.5. As enzimas do complexo xilanolítico podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal (endo-  $\beta$ -1,4 xilanase e  $\beta$ -

xilosidase) e enzimas que degradam as cadeias laterais ( $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e acetilesterase).

Segundo KADOWAKI et al., (1995), o uso conjunto de xilanases e celulasas visando à completa conversão da biomassa celulósica em açúcares, tem sido grandemente estudado e demonstra melhoria na economia total do processamento da biomassa lignocelulósica. Grandes quantidades de xilana são liberadas como efluentes pelas indústrias de papel e celulose e, sua bioconversão, pode ser de significância econômica. Recentemente, o uso de xilanases livre de celulasas, como um sistema de hidrólise seletiva para a retirada de hemicelulose presente no papel e na polpa tem sido sugerida. O uso de xilanases livre de celulasas pode ser valorizado pela possibilidade técnica e econômica do processo (TAVARES, et al., 1997).



**Figura 2.5** – Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam. Ac, grupo acetil; Arab, L-arabinofuranose; MeGlcA, ácido 4-O –metil-glucurônico; D-xilose  
**Fonte:** BIELY, 1985

MISHRA et al., 1990, relataram que a produção de xilanases em larga escala deve se basear em substratos lignocelulósicos que não representam custos elevados na obtenção da enzima, comparando o custo na produção de enzimas em fermentação em meio líquido e em fermentação semi-sólida. PANDEY et al., 1999, analisaram o custo da produção de celulase, verificando que a fermentação em meio

líquido apresenta um custo muito superior, chegando no valor de U\$ 20/Kg, enquanto que na fermentação semi-sólida o custo é de U\$0,2/Kg.

A produção de xilanase por FES vem sendo investigada visando avaliar o efeito dos diversos fatores sobre a produção enzimática, bem como buscar estratégias para a otimização da produção. A escolha do melhor substrato indutor de xilanase, o efeito da fonte de nitrogênio sobre a produção da enzima, os efeitos da atividade de água e umidade do meio, pH, temperatura do cultivo e a influência da aeração dos sistemas são as principais variáveis que influenciam na produção de xilanase por FES e que se encontram descritas em muitos trabalhos (HALTRICH et al.,1996)

A xilanase é uma enzima de grande interesse econômico. Avanços significativos têm sido observados no desenvolvimento da produção de xilanas, visando ampliação das faixas de pH e temperatura, tornando a sua aplicação industrial mais simples e flexível.

Os fungos filamentosos possuem a capacidade de produzir diferentes enzimas do complexo xilanolítico, o que permite hidrolisar, não somente a cadeia principal da xilana, mas também as suas ramificações (HALTRICH et al.,1996). No entanto xilanasas fúngicas estão normalmente associadas à produção de celulasas, o que não é desejável, dependendo do fim ao qual a enzima se destina (KULKARNI et al., 1999).

A utilização de xilana pura, ou de seus derivados de baixa massa molecular, é uma excelente opção para a produção destas enzimas, o que vem sendo feito frequentemente, em pequena escala. Entretanto, para a produção em escalas maiores, a utilização destes materiais, de elevado custo, torna o processo inviável economicamente. Para solucionar esta questão a utilização de resíduos

agroindustriais e de exploração florestal tem sido a utilização mais empregada (PALMA, 2003).

Segundo KULKARNI et al., 1999, estes resíduos são fonte de xilana e xilo-oligômeros, podendo ser utilizados na forma natural, como é o caso das fermentações em estado sólido, ou após pré - tratamentos (químicos, físicos ou enzimáticos), que se fazem necessários para a sua utilização nos cultivos.

#### 2.6.1.1 Aplicações de Xilanases

O grande interesse na produção de xilanases está relacionado à vasta aplicação que esta enzima possui no setor industrial, abrangendo, desde a substituição de etapas de processos correntes, até o estabelecimento de outros inteiramente novos.

O uso de xilanases foi proposto para a clarificação de sucos e vinhos (BECK & SCOTT, 1974; BIELY, 1991), para extração de café, óleos vegetais e amido (BIELY, 1991), para melhorar as necessidades nutricionais de grãos armazenados (LINKO et al., 1989) e para fornecer diferentes texturas a produtos de panificação (McCLEARY, 1986). Muitas dessas aplicações não requerem xilanases purificadas, e a presença de celulasas e/ou pectinases são freqüentemente desejáveis.

Porém, a xilanase, livre de celulase, sem dúvida alguma tem despertado interesse maior, especialmente nas indústrias de celulose e papel, pois o pré-tratamento com esta enzima nos processos de branqueamento tem levado a um menor consumo de branqueadores químicos e a resultados mais favoráveis, utilizando até 30% a menos de cloro do que na fabricação normal (VALCHEVA et al., 2000). Na manufatura do papel, a polpa Kraft é tradicionalmente preparada usando

um descolorante à base de cloro para oxidar e remover a lignina e para conseguir um melhor brilho no produto. Este processo libera compostos clorados que danificam o meio ambiente. Conseqüentemente, tentativas têm sido feitas para remover ou reduzir o nível de cloro que é usado neste processo de branqueamento da polpa, melhorando, inclusive, o brilho da polpa no branqueamento.

Os efluentes originados da produção do branqueamento das polpas Kraft contêm carboidratos, ácidos orgânicos, ácidos resinosos, compostos neutros e produtos da transformação de ligninas, além de uma série de organoclorados derivados. Estes últimos são formados a partir das reações entre a lignina presente nas fibras e o cloro empregado para o branqueamento (DURAN et al., 1997). Desta forma, xilanases têm sido empregada durante o processo de pré-branqueamento da polpa Kraft, com o intuito de diminuir a carga de cloro utilizada na etapa subsequente de branqueamento (VIKARI et al., 1994).

Experiências industriais têm mostrado que a utilização de xilanases é uma alternativa interessante para aumento de níveis de alvura ou capacidade de produção de celulose branqueada.

## 2.6. 2 Celulases

As enzimas conhecidas como celulases hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma porção não carboidrato. A classificação das hidrolases O-glicosídicas (EC 3.2.1.-) conforme a nomenclatura enzimática – Unidade Internacional de Bioquímica - IUB é feita com base na sua especificidade ao substrato. De acordo com esta nomenclatura, o 3 refere-se a hidrolases; 3.2 glicosilases e 3.2.1 glicosidase, isto é enzimas que hidrolisam compostos o - glicosil ou s - glicosil. Uma classificação com base nas similaridades

da seqüência de aminoácidos do domínio catalítico foi proposta (Henrissat, 1991; Henrissat & Bairoch, 1993 apud WULLF, 2002) e atualmente as hidrolases glicosídicas são agrupadas em 87 famílias.

A conversão enzimática de celulose em glicose é uma árdua tarefa, devido a natureza física do substrato. Na sua forma nativa a celulose é composta principalmente de fibras cristalinas insolúveis, nas quais as pontes de hidrogênio mantêm as moléculas unidas. Adicionalmente as fibras são embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina, a qual reduz à acessibilidade as enzimas celulolíticas (BÉGUIN, 1990).

As celulasas são algumas vezes descritas como um grupo complexo de enzimas com ação sinérgica. De acordo com GILKES et al., (1991), este grupo reúne:

Endoglicanases (EC 3.2.1.4) são enzimas que catalisam a hidrólise interna de ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas da celulose. Podem hidrolisar também ligações  $\beta$ -1,4 em D- glicanas que contenham ligações  $\beta$  -1,3. As endoglicanases são também conhecidas como celulasas, endo  $\beta$ -1,4 glicanases e carboximetilcelulasas. Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável sobre carboximetilcelulose (CMC), Avicel (celulose cristalina),  $\beta$  glicana e xilana.

Celulose beta-1,4-celobiosidase (EC 3.2.1.91), conhecida também como exoglicanase, celobiohidrolase,  $\beta$ -1,4 celobiohidrolase ou Avicelase. Catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas na celulose e celotetraose, liberando celobiose das extremidades não redutoras das cadeias.

Beta-glicosidase (EC 3.2.1.21), conhecida como gentobiase, celobiase e amígdalase. Catalisa a hidrólise de resíduos  $\beta$ -D-glicose terminais não redutores, liberando  $\beta$ -D-glicose. Apresenta ampla especificidade por  $\beta$ -D-glicosídeos, podendo hidrolisar também  $\beta$ -D-galactosídeos,  $\alpha$ -L-arabinosídeos,  $\beta$ -D-xilosídeos e  $\beta$ -D-fucosídeos.

Beta-1,3(4)-endo-glicanase (EC 3.2.1.6), conhecida também como  $\beta$ -1,4-endo-glicanase,  $\beta$ -1,3 endoglicanase ou laminarinase. Esta enzima catalisa a hidrólise interna de ligações  $\beta$ -1,3 ou  $\beta$ -1,4 em da glicose D-glicanas. Tem como substrato a laminarina, lichenina e D-glicana. É uma enzima diferente de glicana  $\beta$ -1,3-endo-D-glicosidase (EC 3.2.1.39), embora ambas hidrolisem o substrato laminarina.

#### 2.6.2.1 Aplicação das Celulases

As celulases têm uma ampla variedade de aplicações industriais. São utilizadas como aditivo no preparo de enzimas digestivas, como componente de detergentes, no clareamento e amaciamento de fibras têxteis, no tratamento de águas residuais, na indústria de alimentos para aumentar o rendimento da extração de amido e óleos vegetais e como aditivos de ração animal (BHAT, 1997).

A partir de 1980, as celulases foram introduzidas na indústria têxtil e de detergentes, passando a ser um importante componente do mercado mundial de enzimas, vêm sendo usadas também, muito eficientemente em detergentes enzimáticos biodegradáveis (MITIDIARI et al., 2002). As celulases estão sendo produzidas comercialmente em cultivos submersos, contendo, como fonte de carbono e de indução, a celulose. (BITENCOURT, et.al.,2002).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química pertencente ao Centro de Ciências Tecnológicas da Universidade Regional de Blumenau (FURB).

#### 3.1 ENSAIOS REALIZADOS

São descritos no presente trabalho, três grupos de ensaios que abordam atividades relacionadas com a produção da biomassa e atividade enzimática.

Um resumo das condições de cada ensaio e seus respectivos objetivos são apresentados no Quadro 3.1, a seguir:

**Quadro 3.1** - Resumo dos ensaios realizados neste trabalho.

<b>Ensaio</b>	<b>Sistema</b>	<b>Objetivos</b>
I	Frascos de 500 mL	Estudar os ensaios em meio líquido no que se refere à produção da biomassa e atividade enzimática.
II	Tubos de Ensaio	Avaliar o crescimento micelial nos substratos empregados com as linhagens estudadas.
III	Frascos de 350 mL	Realizar as análises enzimáticas e proteínas totais nos 12 tratamentos compostos por diferentes concentrações de substrato.

### 3.2 FUNGOS UTILIZADOS

Para os diversos ensaios realizados foram utilizados fungos das espécies *Polyporus tricholoma* (CCB 684) e *Polyporus tenuiculus* (CCB 685), fornecidos pelo Instituto de Botânica – São Paulo – SP.

### 3.3 CONSERVAÇÃO DAS CEPAS

Os fungos foram conservados em tubos de ensaio contendo meio de cultura Batata Dextrose-Ágar (BDA) e armazenados em refrigerador a  $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4 PRODUÇÃO DO INÓCULO

Em condições assépticas, aproximadamente 25 mL de meio de cultura BDA, previamente esterilizados em autoclave durante 20 minutos ( $121^{\circ}\text{C}$  e 1 atm), foram vertidos em placas de Petri. Após a solidificação do meio, foram inoculados fragmentos de micélio provenientes dos tubos de ensaios, no centro de cada placa. Estas foram mantidas em estufa com circulação de ar forçada, sob temperatura controlada de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , na ausência de luz, até completo preenchimento da placa pela colônia micelial,  $\pm 20$  dias. Esta placa denominada cultura estoque, foi utilizada para obtenção dos “plugs” (disco – inóculo) de 7mm de diâmetro.

### 3.5 CULTIVO DOS FUNGOS EM MEIO LÍQUIDO

Os fungos foram cultivados em frascos de vidro de 500 mL com perfuração de  $\frac{1}{2}$  polegada no centro da tampa, sendo vedada com papel filtro. Foram adicionados 100 mL de meio de cultivo com a seguinte composição em g/L: 3 de peptona e 30 de extrato de malte. O pH do meio foi ajustado para 4,5 com solução 0,5M de HCl e esterilizado a 121°C por 20 minutos. Após resfriamento, o meio foi inoculado com 5 “plugs” de micélio do fungo *P. tricholoma* e *P. tenuiculus* com 7 mm de diâmetro cada um. Os frascos foram incubados a 25°C durante 12 dias em ambiente sem luminosidade. Em intervalos de 2 dias, o meio foi separado por filtração para determinação de biomassa, consumo de glicose, pH e atividade das enzimas xilanase e carboximetilcelulase do meio.

### 3.6 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS EMPREGADOS COMO SUBSTRATOS NA FES

Foram utilizados como substrato para cultivo das espécies de *Polyporus* em meio sólido, três tipos de resíduos agroindustriais. O primeiro denominado bainha mediana de palmito foi empregado como substrato base (Figura 3.1), após trituração e secagem. Este resíduo foi fornecido pela indústria de conservas alimentícias HEMMER, situada no município de Blumenau (SC).

A bainha mediana foi triturada em picador de forrageira e transferida para o Laboratório de Processamento de Alimentos do Departamento de Engenharia Química da FURB. Em seguida foi acondicionado em bandejas apropriadas para secagem de alimentos. Todo material foi desidratado a 80°C por aproximadamente 24 horas.

Após a desidratação da bainha mediana de palmito, este resíduo foi triturado em liquidificador industrial para obter 0,3 a 1,5 cm de comprimento.



**Figura 3.1** - Bainha mediana obtida depois da retirada do palmito para processamento industrial na forma de conserva ácida.

**Fonte:** Quadros, 2003

O farelo de soja, resíduo da agroindústria de óleo de soja, utilizado como fonte de nitrogênio foi adquirido da empresa Bünge Alimentos, unidade localizada em São Francisco do Sul (SC). O farelo segue as especificações fornecidas pelo laudo da empresa (Quadro 3.2).

O bagaço de mandioca, utilizado como fonte de carbono neste trabalho, foi fornecido pela empresa Hercílio de Féculas, de Ibirama (SC) já desidratado e com a granulometria de 1 a 2 mm.

A quantidade dos resíduos para a composição dos meios nos estudos de avaliação do crescimento micelial linear e de determinação das atividades enzimáticas de xilanase, carboximetilcelulase e avicelase e do pH do meio é apresentada no Quadro 3.3.

**Quadro 3.2** - Composição química do farelo de soja peletizado (46%) conforme certificado de garantia de Qualidade da Bünge Alimentos.

<b>Composição</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Umidade	12,62
Óleo	1,84
Proteína	45,25
Fibra	6,20
Cinzas	5,43
Sílica	0,03
Uréase (mg N/g. min)	0,07

**Quadro 3.3** Composição dos meios de cultivo utilizados nos ensaios de crescimento micelial linear e de determinação das atividades enzimáticas.

<b>Tratamento</b>	<b>Bainha de Palmito</b>	<b>Bagaço de Mandioca</b>	<b>Farelo de Soja</b>
T1	20g	6g	Ausência
T2			1g
T3			2g
T4			3g
T5	20g	4,5g	Ausência
T6			1g
T7			2g
T8			3g
T9	20g	Ausência	Ausência
T10			1g
T11			2g
T12			3g

### 3.7 CULTIVO EM MEIO SÓLIDO

#### 3.7.1 Sistema em Tubos

Estes ensaios foram conduzidos objetivando avaliar a capacidade dos fungos em colonizarem a bainha mediana de palmito juntamente com os outros resíduos empregados como fonte de nitrogênio e carbono.

Os resíduos misturados de acordo com os tratamentos estabelecidos no quadro 3.3 foram umedecidos a 70% com água destilada e colocados em tubos de ensaio com comprimento de  $\pm 15$  cm. Em seguida foram autoclavados e, após o resfriamento, foram levados para a câmara de fluxo laminar, para a inoculação de  $1\text{cm}^2$  de micélio de cada fungo, cultivado em meio BDA. Os tubos permaneceram na estufa à  $25\text{ }^\circ\text{C}$  sem luminosidade. A cada 2 dias foram realizadas medidas do crescimento micelial para realizar a análise de crescimento micelial de cada linhagem. O experimento foi cessado, quando um primeiro tubo foi preenchido até o final pelo micélio, então se deu por encerrado o experimento no 18º dia de cultivo. Este ensaio foi realizado em duplicata.

### 3.7.2 Sistema em Frascos

Os experimentos foram conduzidos em frascos de 350 mL, transparentes, autoclaváveis, cilíndricos, vedados com tampas metálicas, com abertura de  $\frac{1}{2}$  polegada cobertas com papel filtro, sendo todos os ensaios realizados em triplicata. Os frascos receberam a composição dos meios mencionados no Quadro 3.3. Os frascos autoclavados e resfriados a temperatura ambiente, foram conduzidos à câmara de fluxo laminar para serem inoculados com micélio fresco que foram espalhados na superfície superior do substrato de forma a preencher totalmente o mesmo.

Após atingir 50% de colonização do substrato, os frascos foram retirados a cada 5 dias, representando num total de 6 intervalos de tempo, para a determinação da umidade, pH, atividades enzimáticas (xilanase, carboximetilcelulase e avicelase) e proteínas totais.

### 3.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

#### 3.8.1 Determinação da velocidade média do Crescimento Micelial Linear em tubos de ensaio

A velocidade média de crescimento micelial das espécies *P. tricholoma* e *P. tenuiculus* foi obtida através da razão entre a distância total percorrida pelo micélio e o tempo gasto para que ocorresse o crescimento. As avaliações foram feitas em duplicatas. Cada repetição representou a média de 4 medidas de velocidade, obtida através da medida do crescimento micelial utilizando uma régua.

#### 3.8.2 Determinação da concentração micelial em meio líquido

A determinação da concentração micelial em meio líquido foi realizada de acordo com TAVARES (2003) utilizando-se o método da massa seca. O conteúdo de cada frasco foi filtrado com papel filtro (membrana) previamente seco, utilizando bomba de sucção a vácuo. O micélio retido no papel filtro foi colocado em estufa a 80°C até peso constante para posterior determinação da massa. A concentração micelial presente no meio de cultivo foi calculada pela seguinte expressão:

$$X(g/L) = \frac{(M_{st} - M_p)}{V_a} \quad (01)$$

Onde:

X = Concentração de micélio no meio expressa em massa seca por litro (g/L)

Mst = Massa seca total (papel filtro seco + micélio) (g)

Mp = Massa do papel filtro seco (g)

Va = Volume da amostra (L)

### 3.8.3 Determinação da umidade do meio sólido

Para esta determinação utilizou-se a adaptação feita por MAIORANO (1990) do método nº 14004 da A. O . A .C . (Association of Official Analytical Chemistry) de determinação de umidade em cereais. A adaptação resultou no seguinte procedimento utilizado neste trabalho:

Em uma balança semi analítica, previamente tarada, pesou-se aproximadamente 1g de material em balança analítica. Colocou-se esta placa em estufa a 80°C por 24 horas, após a qual foi transferida para um dessecador. Atingida a temperatura ambiente procedia-se a segunda pesagem.

O cálculo da umidade neste trabalho foi feito conforme a Equação 02:

$$U = \frac{100 \times N}{P} \quad (02)$$

Onde:

N = diferença entre as duas pesagens (g);

P = massa da amostra úmida (g);

### 3.8.4 Determinação do pH

**Meio Líquido:** O pH foi medido em todas as amostras diretamente no meio de cultivo, após filtração a vácuo, utilizando um potenciômetro digital (DIGIMED, modelo DM 20).

**Meio Sólido:** Para a determinação do pH foi utilizada a amostra proveniente da secagem para determinação da umidade que foi suspensa em 10 mL de água destilada. Esperou-se 10 minutos com agitação intermitente e procedeu-se a leitura do pH utilizando um potenciômetro digital (DIGIMED, modelo DM 20).

### 3.8.5 Tratamento das amostras para determinação das atividades enzimáticas e proteínas

O meio fermentado proveniente dos frascos foi homogeneizado e a massa foi transferida para uma badeja plástica retangular (15 cm x 10 cm), e levada a uma estufa com circulação de ar forçada (FANEM, modelo 320/8), a 35°C por 24 horas. Este procedimento teve o objetivo de parar a fermentação (MAIORANO,1990).

Após esta secagem, em condições brandas, o meio fermentado seco foi novamente homogeneizado. A amostra foi estocada em freezer até o momento da extração para as seguintes determinações:

- Atividades enzimáticas xilanolíticas;
- Atividades enzimáticas celulolíticas;
- Proteínas totais.

### 3.8.6 Extração das enzimas

**Meio Líquido:** A atividade enzimática foi determinada diretamente no meio de cultivo, após filtração da amostra em papel filtro comum sob vácuo.

**Meio Sólido:** A extração das enzimas do meio sólido foi feita pela incubação de 1 g de amostra com 20 mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0, na temperatura de 30°C, velocidade de agitação de 150 rpm, por 30 minutos. A amostra foi filtrada a vácuo utilizando-se conjunto de filtração Milipore e papel filtro comum

Este filtrado foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas xilanase e celulasas, descrita no item 3.9.1 e 3.9.2.

## 3.9 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

### 3.9.1 Atividade de Xilanase

A atividade de xilanase (EC 3.2.1.8), foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir do substrato xilana “birchwood” (Sigma–St. Louis, USA) (BAILEY et al., 1992). Os açúcares redutores liberados durante a reação foram determinados pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

A solução de xilana foi preparada a partir de 1 g de xilana “birchwood” – Sigma) diluída com 80 mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0. Em seguida, a solução foi fervida, e o volume completado para 100 mL, com o mesmo tampão.

O método consiste em acompanhar a reação de 0,9 mL de xilana a 1% previamente aquecida, com 0,1 mL de extrato enzimático a 50 °C por 5 minutos.

Desta solução, retirou-se 0,5 mL que foram adicionados à 1 mL de DNS. O volume final foi fervido a 100 °C em banho-maria por 5 minutos, sendo a reação paralisada com o esfriamento da solução em banho de gelo. Após diluição com 2 mL de água destilada, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro (METROLAB modelo 325 BD) a 540nm, contra um branco que sofreu o mesmo tratamento. A curva padrão foi feita a partir de xilose (Merck), nas concentrações de 0,2 a 1,0g/L.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de açúcares redutores, expressos como xilose, por minuto a 50°C, sendo a atividade enzimática expressa em g.

### 3.9.2 Atividade de Celulases

As atividades de endo  $\beta$ -1,4 glucanase ou carboximetilcelulase (Cx) (EC 3.2.1.4) e exo  $\beta$ -1-4 glucanase ou avicelase (C1) (EC 3.2.1.74) foram determinadas segundo técnica descrita por TANAKA et al., 1981, utilizando uma solução de carboximetilcelulose 0,44% (Sigma) em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,5 para a atividade da fração Cx e de uma suspensão a 1,1%, no mesmo tampão, de celulose microcristalina (Avicel) para C1. A reação foi iniciada pela adição de 0,1mL do extrato enzimático em 1mL dos substratos, procedendo-se a reação a 50°C por 60 minutos, posteriormente foi adicionado 1mL de DNS, mantendo-se o tubo em água fervente (100°C) por 5 minutos, após esta etapa, os tubos foram imersos em água com gelo e foram adicionados 2 mL de água destilada (MILLER, 1959).

A curva padrão foi feita a partir de glicose (Merck), nas concentrações de 0,2 a 1g/L. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de glicose, por minuto, a 50 °C, sendo a atividade

enzimática expressa em U/g. A leitura de absorvância das amostras foi lida em espectrofotômetro (METROLAB modelo 325 BD) a 540nm, contra um branco que sofreu o mesmo tratamento.

### 3.10 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

O conteúdo de proteínas das amostras foi determinado pelo método proposto por LOWRY et al. (1951).

As proteínas solúveis foram tratadas com um reagente obtido por junção das soluções de tartarato de sódio e potássio e de sulfato de cobre pentahidratado, para obter uma reação “biureto”, em meio alcalino, antes de adicionar o reagente de Folin. A cor final é resultante do complexo “proteína-cobre” e da redução da solução ácida “fosfotungstênio-fosfomolibdeno”.

O reagente de Folin-Ciocalteu, que na sua essência é uma solução ácida de “fosfotungstênio-fosfomolibdeno”, tem a particularidade de ser reduzido pelos fenóis, além de outras substâncias. A redução dos reagentes pelas proteínas deve-se a tirosina e ao triptofano, tendo os outros aminoácidos, relativamente, pouca importância. Contudo a glicina diminui a intensidade da cor, sempre que está em concentrações superiores a 0,5%.

Por ser tratar de fermentação em estado sólido foi necessário extrair as proteínas do meio. Para isso utilizou-se o seguinte procedimento:

- a) Em tubo de ensaio foi pesado 0,1 g de amostra previamente seca (item 3.8.5);
- b) Acrescentou-se 1 mL de NaOH 1N e 1 mL de água destilada;
- c) Os tubos foram levados a um banho de água fervente por 5 minutos;

d) Após este tempo, os tubos foram resfriados e centrifugados por 5 minutos a 4000 rpm;

e) O sólido precipitado de cada tubo foi descartado e reservou-se o sobrenadante para a dosagem da proteína.

Para a dosagem das proteínas totais utilizou-se o seguinte procedimento:

a) Em tubo de ensaio colocou-se 0,5 mL de sobrenadante proveniente da extração da proteína do meio sólido. Este sobrenadante foi diluído conforme a necessidade;

b) Acrescentou-se 2,5 mL da solução D (Solução Alcalina de Cobre-Tartarato);

c) Deixou-se 10 minutos em repouso cronometrados;

d) Acrescentou-se 0,5 mL da solução E (Reagente de Folin-Ciocalteu em uma reação de 1:1);

e) Deixou-se 30 minutos em repouso cronometrados;

f) Procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 750 nm contra um branco feito com água destilada que sofreu o mesmo tratamento.

Calculou-se o teor de proteína através da equação de uma curva padrão feita com soluções de albumina bovina de concentrações conhecidas que foram de 50 – 200mg/L.

A concentração de proteínas totais foi expressa em mg/g através da equação 03:

$$PT = \frac{C \times V}{M} \quad (03)$$

Onde:

PT = concentração de proteínas totais em mg/g;

C = concentração das proteínas totais em mg/L obtida da equação da curva feita com soluções padrões de albumina;

V = quantidade de NaOH e água utilizadas na extração da enzima do meio sólido, em litros;

M = massa da amostra seca (em gramas), utilizada na extração acima referida.

### 3.11 RELAÇÃO CARBONO/NITROGÊNIO

A determinação da relação C:N foram realizadas por meio do método recomendado Laboratório Nacional de Referência Vegetal (1983) - LANARV, no Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau – IPTB/FURB.

A relação C:N foi feita em todos os tratamentos, no intervalo de tempo zero, ou seja antes da inoculação dos fungos.

### 3.12 CÁLCULO DO CRESCIMENTO MICELIAL TOTAL

A partir do comprimento de micélio foram calculadas as médias totais, obtendo-se a média de crescimento micelial total pela equação 04, visando a comparação entre os dois fungos estudados neste ensaio, assim como os tratamentos pesquisados.

$$CT = \frac{C}{10} \quad (04)$$

Onde :

CT = Média total dos tubos (cm)

C = Somatória de todos os valores (cm)

10 = Número de leituras realizadas

### 3.13 CÁLCULO DA VELOCIDADE MÉDIA DE CRESCIMENTO MICELIAL

A velocidade média de crescimento micelial ao dia foi calculada pela equação (05).

$$V_m = \frac{V_f - V_i}{T_f} \quad (05)$$

Onde:

$V_m$  = velocidade média de crescimento micelial (cm/dia)

$V_f$  = medida do crescimento micelial no tempo final (cm)

$V_i$  = medida do crescimento micelial no tempo inicial (cm)

$T_f$  = Tempo final (dias)

### 3.14 CÁLCULO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA

A atividade específica dos cultivos (AE) em frascos foi realizada através da equação (06).

$$AS = \frac{AE}{PT} \quad (06)$$

$AS$  = Atividade enzimática específica (U/mg)

$AE$  = Atividade Enzimática no tempo t (U/g)

$PT$  = Proteínas totais no tempo t (mg/g)

### 3.15 PRODUTIVIDADE MÁXIMA

A produtividade enzimática máxima nos cultivos (PEM) em frascos foi realizada através da equação (07).

$$PME = \frac{AE}{T_{AE}} \quad (07)$$

AE = Atividade Enzimática no tempo t de valor mais elevado (U/g)

T<sub>AE</sub> = tempo t referente ao cultivo com valor mais elevado de AE (dias)

### 3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada nos estudos de crescimento micelial linear pela análise de variância (ANOVA), usando o programa Statística® 6.0. Quando a análise de variância demonstrou efeito sobre o resultado ( $p < 0,05$ ) foi aplicado o teste de Tukey com nível de significância de 5%, para comparação entre médias.

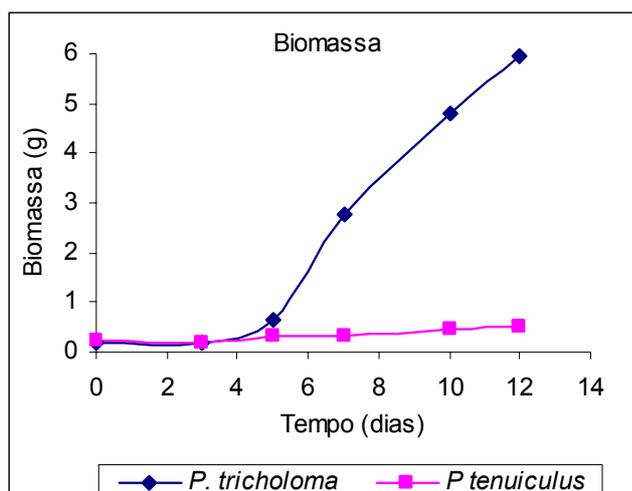
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação dos resultados e respectiva discussão serão abordadas, neste capítulo, em três grupos, conforme o Quadro 3.1, apresentado anteriormente. Os dados experimentais apresentados na forma de tabela encontram – se no Apêndice.

### 4.1 Ensaio I Ensaaios em Fermentação Submersa

Neste grupo foram realizados dois ensaios buscando estabelecer a produção de biomassa e a atividade enzimática de xilanase e carboximetilcelulase das espécies de *Polyporus tricholoma* (CCB 684) e *Polyporus tenuiculus* (CCB 685). Para tanto, utilizou-se um meio padrão contendo peptona e extrato de malte, conforme descrito no item 3.5.

Os dados experimentais estão ilustrados nas Figuras 4.1 e 4.2.



**Figura 4.1** - Crescimento micelial (biomassa) dos fungos *P.tricholoma* e *P.tenuiculus*, obtido em cultivo submerso.

Analisando a Figura 4.1, verifica-se que o fungo *P. tricholoma* apresentou crescimento constante a partir do quinto dia, com valores de 6g/L ao final de 12 dias

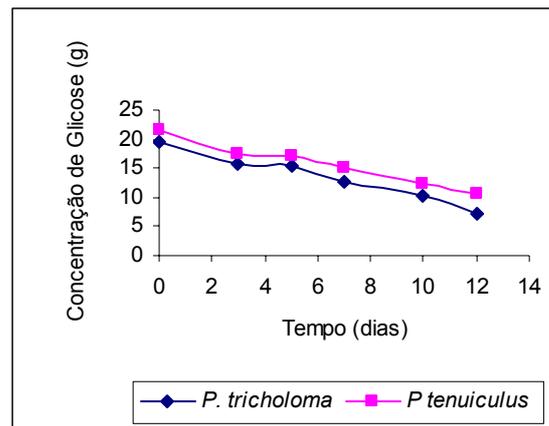
de cultivo. Já o fungo *P. tenuiculus*, diferentemente do *P. tricholoma*, apresentou crescimento não pronunciado, atingindo valores em torno de 0,47g/L, após 12 dias de cultivo nas mesmas condições.

Comparando as duas espécies estudadas, *P. tricholoma* obteve uma concentração celular, aproximadamente, 12 vezes superior, e velocidade média de crescimento micelial de 0,48g/L/dia, enquanto no cultivo de *P. tenuiculus*, a velocidade foi de 0,021g/L/dia. VIEIRA (2005), utilizando à mesma composição do meio de cultura, obteve uma velocidade similar tanto para o fungo *P. tricholoma* quanto para o fungo *P. tenuiculus*.

Quanto ao consumo de glicose no meio de cultivo, constata-se, pela Figura 4.2 que, embora o *P. tenuiculus* tenha apresentado baixa velocidade média de crescimento micelial, o consumo de glicose foi superior ao do *P. tricholoma*, obtendo-se valores de 0,92 g/L/dia. Constatou-se, também, que, ao final dos 12 dias de cultivo de *P. tricholoma* houve um residual de glicose no meio de 7,2 g/L. No cultivo de *P. tenuiculus*, este valor chegou a 10,5 g/L .

Comparando os valores de crescimento micelial e concentração de glicose, constatou-se que *P. tenuiculus* apresentou velocidade de consumo de glicose (0,92g/L.dia) similar ao *P. tricholoma* (1,02g/L.dia), embora tenha apresentado valores de concentração de biomassa inferiores.

SANTOS & TAVARES (2004), constataram que a glicose reduz a velocidade de crescimento micelial radial de *P. tenuiculus*, o mesmo não ocorrendo para *P. tricholoma*, a não ser em elevadas concentrações (80g/L).

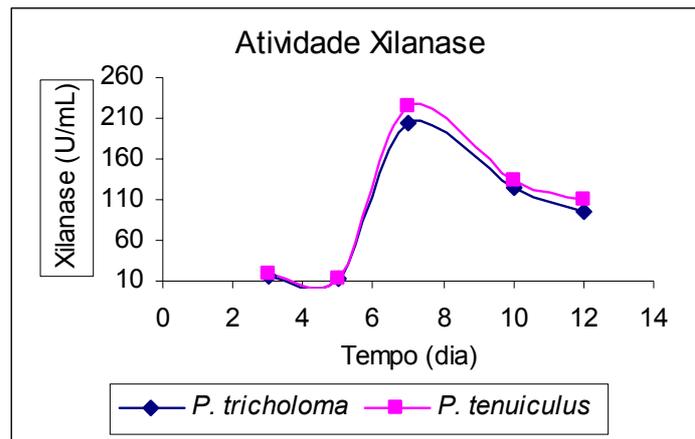


**Figura 4.2** - Consumo de glicose dos fungos *P.tricholoma* e *P.tenuiculus*

O pH do meio de cultura durante os 12 dias de cultivo, para ambos os fungos, manteve-se constante, iniciando-se em 4,5, atingindo o valor máximo de 4,67. Estes resultados são similares aos observados por LIEBL et al., (2004), onde os autores verificaram a capacidade auto reguladora do pH destas linhagens, sendo que o valor de equilíbrio foi constatado como sendo em torno de 5,5 após 20 dias de cultivo. VIEIRA (2005), utilizando o mesmo meio de cultura, chegou a valores de pH de 5,0 para *P. tenuiculus* e 5,9 para *P. tricholoma*.

O pH do meio de cultivo é um dos parâmetros mais críticos que afetam o crescimento e a biossíntese de metabólitos, e que varia com diferentes organismos, condições operacionais e meios de cultivo utilizados (LACROIX, et al., 1985).

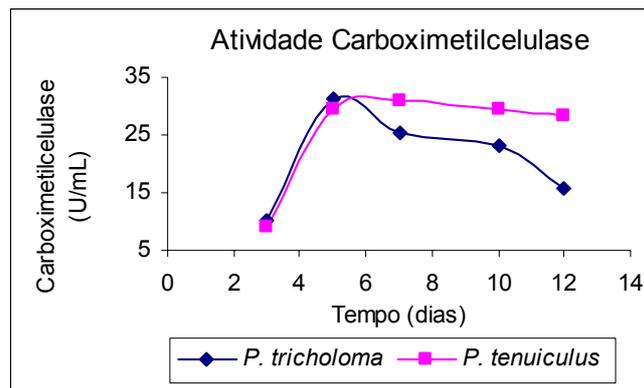
No que se refere as atividades enzimáticas, apresentadas nas Figuras 4.3 e 4.4, constatou-se que, em ambos os cultivos, a atividade máxima de xilanase ocorreu no sétimo dia. No cultivo de *P. tenuiculus* a atividade máxima obtida foi de 225 U/mL, que foi semelhante ao valor máximo obtido no cultivo de *P. tricholoma* que foi de 205 U/mL.



**Figura 4.3** Atividade de xilanase dos fungos *P. tricholoma* e *P. tenuiculus*

A partir desses resultados, há indicativos que o *P. tenuiculus* tem a capacidade de produzir maior atividade enzimática em menor biomassa.

Para a enzima carboximetilcelulase o valor máximo de atividade foi observado entre o quinto e o sétimo dia, obtendo-se valores de 31 U/mL, em ambos os cultivos. Entretanto no cultivo de *P. tenuiculus*, a atividade máxima manteve-se constante, até aos 12 dias, o que não foi observado no cultivo do *P. tricholoma*, que apresentou redução gradativa da atividade. Esta redução pode estar associada as propriedades estruturais e cinéticas da enzima produzida em cada fungo, ou ainda, a variações no conjunto de enzimas que fazem parte do complexo celulolítico de cada espécie (SILVA, 2003).



**Figura 4.4** - Atividade de carboximetilcelulase dos fungos *P. tricholoma* e *P. tenuiculus*

Os resultados mostraram que a atividade de xilanase foi, aproximadamente, seis vezes superior à atividade de carboximetilcelulase. MILAGRES et al., 2001, utilizou o basidiomycete *Poria medula panis* para a produção de enzimas hidrolíticas em meio líquido constituído de palha de trigo (3%). Embora tenham obtido resultados inferiores aos apresentados neste trabalho, também constataram atividade de xilanase superior a de celulase. As atividades máximas para ambas as enzimas, também ocorreram no início do experimento (5º dia), decaindo no final do cultivo. Embora as hidrolases sejam elementos importantes no processo de decomposição de materiais lignocelulósicos, a sua baixa atividade é compensada pela produção de enzimas lignocelulolíticas ou outros componentes não enzimáticos com baixo peso molecular (PRADE, 1995).

Após, alcançado o objetivo na fermentação submersa, que foi a avaliação da produção de biomassa e das atividades hidrolíticas, iniciaram-se os ensaios em fermentação sólida.

## 4.2 Ensaio II Ensaio de Fermentação em Estado Sólido em Tubos

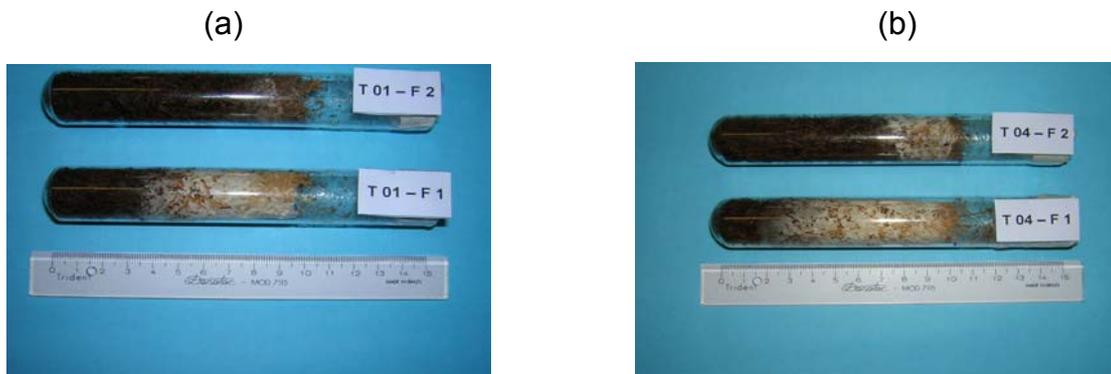
Este ensaio teve por objetivo verificar a cinética de crescimento micelial longitudinal dos fungos *P. tricholoma* e *P. tenuiculus* na fermentação em estado sólido nos diferentes tratamentos apresentados na Quadro 3.2, tendo como substrato principal, a bainha mediana de palmito, ilustrado nas Figuras 4.5 e 4.6.

No decorrer dos 18 dias de experimento foi observada a cinética de crescimento micelial de ambos os fungos. Os valores obtidos estão apresentados nas Figuras 4.7 a 4.12.



**Figura 4.5** - Cinética de crescimento micelial com diferentes suplementações de resíduos agroindustriais.

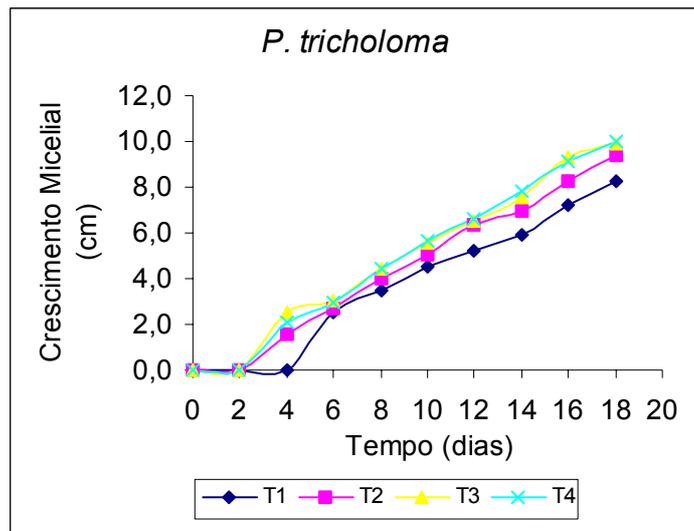
Em todos os tratamentos, observou-se o crescimento micelial superior para o fungo *P. tricholoma* em relação ao *P. tenuiculus*. A variação da cinética de crescimento micelial, em função da mudança de composição dos meios, foi semelhante para ambos, isto é, o aumento do crescimento micelial, foi proporcional ao aumento da concentração de fonte de N orgânico no meio de cultivo.



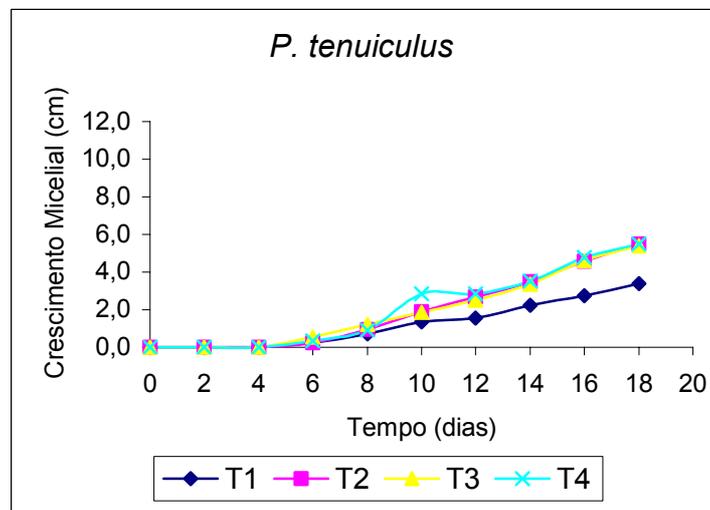
**Figura 4.6** - a) Crescimento micelial do tratamento 01 (ausência de N), onde F1 é *P. tricholoma* e F2 é *P. tenuiculus*  
 b) Crescimento micelial do tratamento 04, (3g de N), onde F1 é *P. tricholoma* e F2 é *P. tenuiculus*

No cultivo de *P. tricholoma* obteve-se um comprimento micelial maior nos tratamentos com fontes de carbono (bagaço de mandioca) e nitrogênio orgânico (farelo de soja) T4, T7 e T8, chegando-se a 10 cm no 18º dia de cultivo. Segundo KUES et al.; 2000, serragem suplementada com farelo de cereais é um substrato que satisfaz a necessidade dos fungos basidiomycetes, para crescerem e frutificarem, além de ajudar a resistir a competidores microbianos. Por outro lado, o aumento na concentração dessas suplementações leva ao maior risco de contaminações bacterianas ou fúngicas indesejáveis (GEZER et al.; 2002).

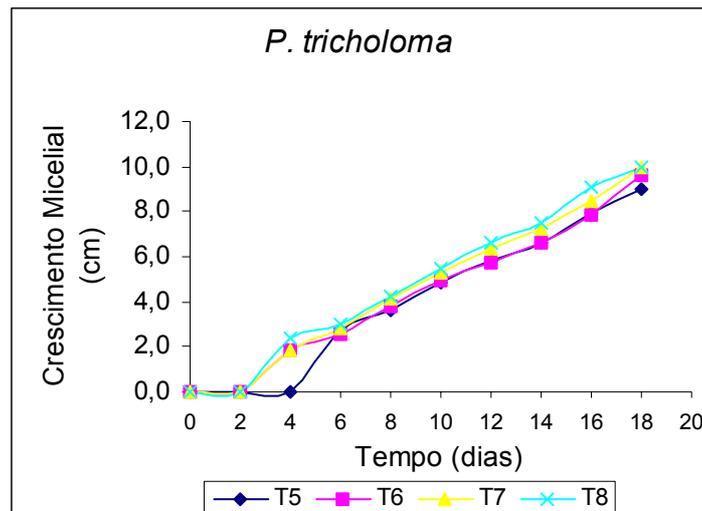
Os ensaios T4, T7 e T8 foram os primeiros a serem totalmente colonizados, porém esse comprimento não significa a produção de biomassa máxima, uma vez que havia um fator limitante para o crescimento do micélio, que foi o espaço e o comprimento do tubo de ensaio.



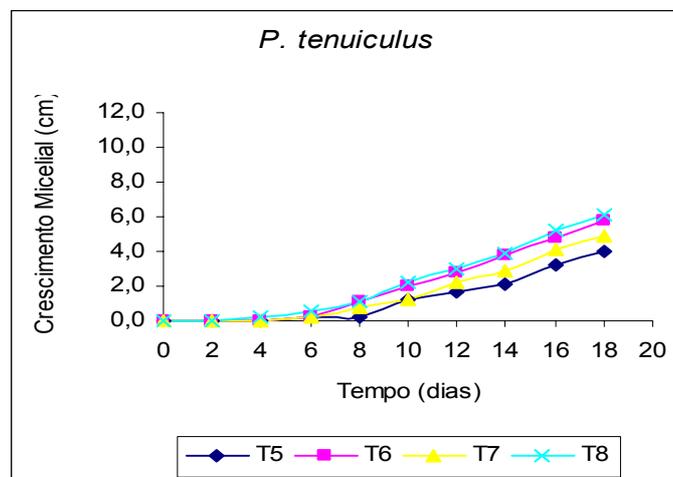
**Figura 4.7** – Crescimento micelial de *P. tricholoma* para os tratamentos T1, T2, T3 e T4 (6,5 g de bagaço de mandioca e 0,1, 2 e 3 de farelo de soja).



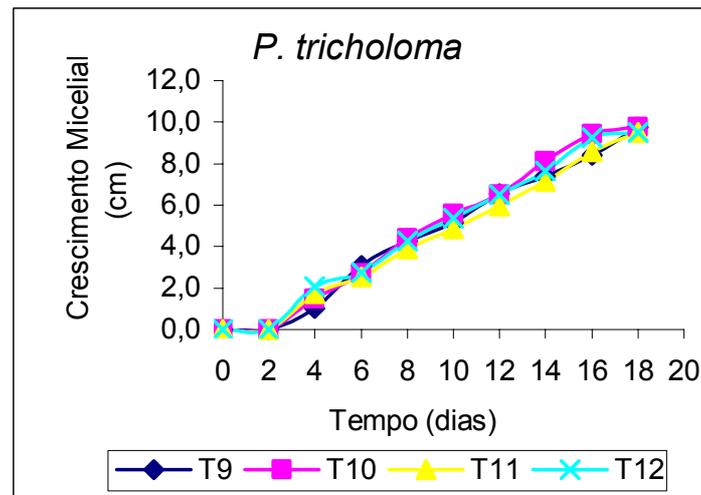
**Figura 4.8** – Crescimento micelial de *P. tenuiculus* para os tratamentos T1, T2, T3 e T4 (6,5 g de bagaço de mandioca e 0,1, 2 e 3 de farelo de soja).



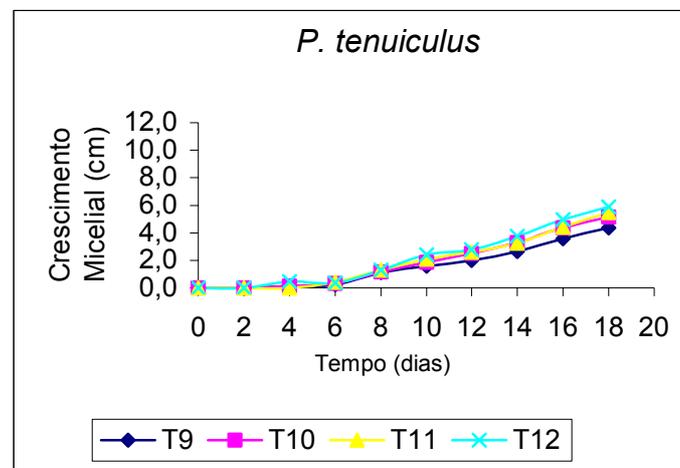
**Figura 4.9** – Crescimento micelial de *P. tricholoma* para os tratamentos T5, T6, T7 e T8 (4,5 g de bagaço de mandioca e 0,1, 2 e 3 de farelo de soja).



**Figura 4.10** – Crescimento micelial de *P. tenuiculus* para os tratamentos T5, T6, T7 e T8 (4,5 g de bagaço de mandioca e 0,1, 2 e 3 de farelo de soja).



**Figura 4.11** – Crescimento micelial de *P. tricholoma* para os tratamentos T9, T10, T11 e T12 (0 g de bagaço de mandioca e 0,1, 2 e 3 de farelo de soja).



**Figura 4.12** – Crescimento micelial de *P. tenuiculus* para os tratamentos T9, T10, T11 e T12 (0 g de bagaço de mandioca e 0,1, 2 e 3 de farelo de soja).

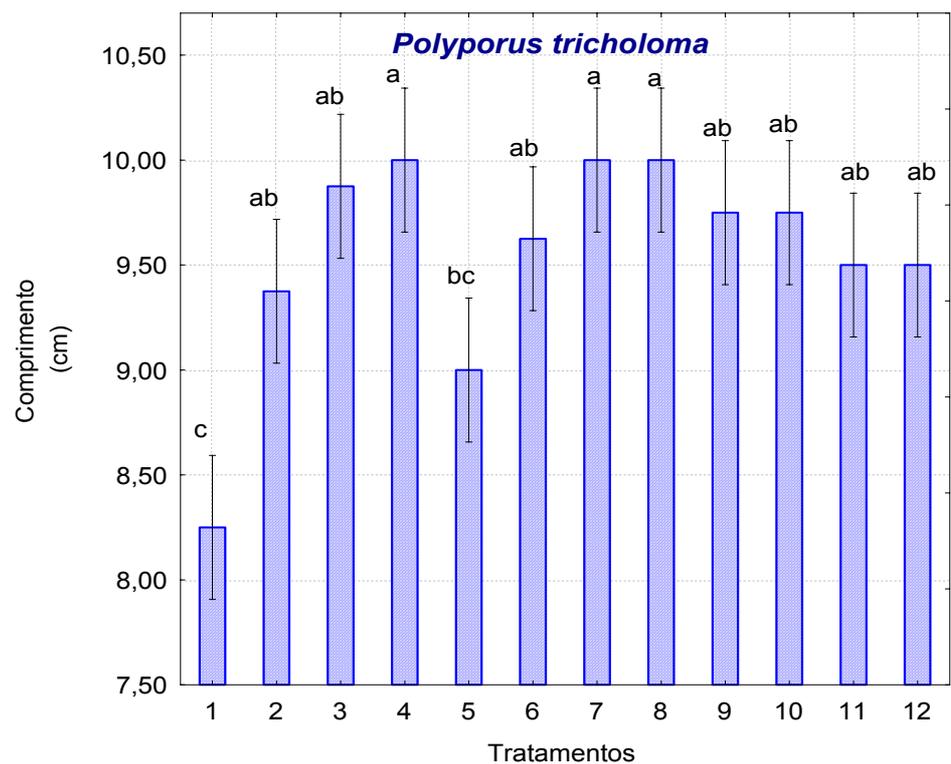
No cultivo de *P. tenuiculus* os tratamentos que levaram a obtenção de comprimento micelial, ligeiramente superior no 18º dia de cultivo foram o T8 (4,5 g de bagaço de mandioca) e T12 (0 g de bagaço de mandioca), chegando a 6,0 cm de comprimento de micélio. A adição de fontes orgânicas de nitrogênio, como soja e

alfafa, tem mostrado aumento no crescimento micelial. KURTZMAN & ZADRAZIL (1984). Além disto, observou-se que, nos cultivos cuja a composição do meio, não possuía fonte de nitrogênio, tendo apenas bagaço de mandioca (fonte de carbono) acrescentado ao substrato base (bainha de palmito), isto é, o T1 e T5, a cinética de crescimento foi mais lenta, mostrando que, na ausência de farelo de soja, é menor o crescimento micelial.

Este resultado indica, portanto, que, para este fungo, o melhor crescimento ocorre em condições com maiores concentrações de fonte de nitrogênio. Resultado semelhante foi obtido por SILVA (2003), que utilizou resíduo de eucalipto, suplementado com farelo de arroz, trigo e soja para o crescimento de *L. edodes* e constatou que o crescimento micelial foi maior quando utilizou-se farelo de soja como suplemento.

Nas Figuras 4.13 e 4.14 está apresentada a análise estatística dos valores calculados do comprimento micelial de *P. tricholoma* e *P. tenuiculus*, respectivamente apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Sendo assim, foi feito teste de Tukey com 5% de probabilidade, que gerou as letras nos gráficos. Para o fungo *P. tricholoma*, os tratamentos que tiveram maior crescimento micelial (4, 7 e 8), com 6,0 e 4,5 g de bagaço de mandioca e 3 e 2 g de farelo de soja no meio de cultivo, não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Os tratamentos 1 e 5, que levaram aos menores crescimentos de micélio, apresentaram diferenças estatísticas entre eles, confirmando o fato de que, na ausência de farelo de soja, quando usado o bagaço de mandioca, menor será o crescimento micelial, pois o tratamento 9 só tem bainha mediana de palmito e é semelhante a outros tratamentos com suplementação.

Segundo SOCCOL (1994), outro fato a ser considerado é a textura do substrato, que interfere no crescimento micelial. Este autor constatou que o substrato preparado apenas com bagaço de mandioca, ficou excessivamente denso e compacto, ocasionando uma queda na produção de micélio.

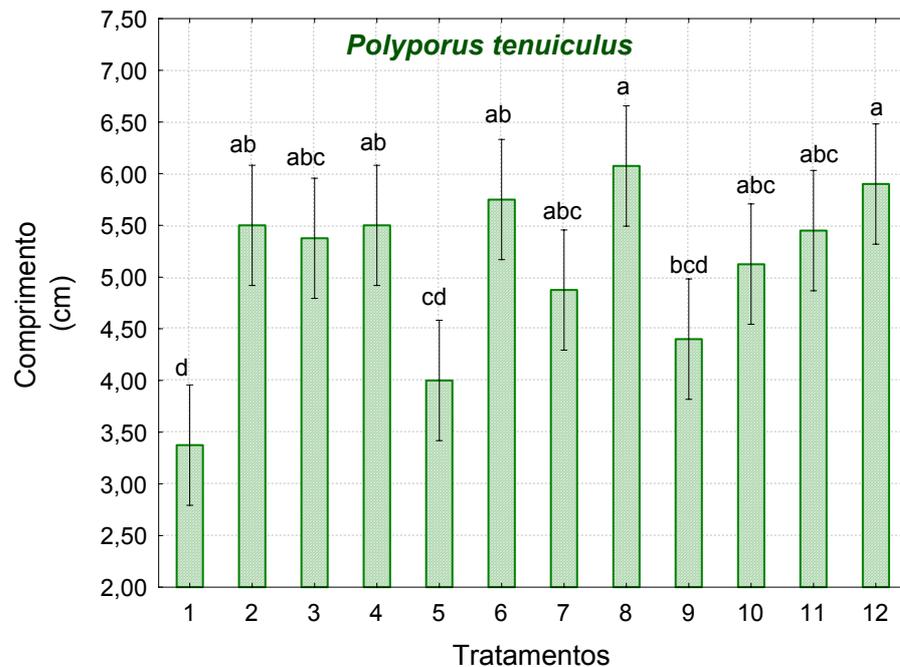


**Figura 4.13** - Valores analisados estatisticamente para o comprimento de *P.tricholoma*.

Dados contendo letras iguais significa que são iguais estatisticamente, mesmo que a média seja diferente.

Para o *P. tenuiculus* os tratamentos 8 e 12, com diferentes concentrações de bagaço de mandioca (4,5 g e 0 g) no meio de cultivo, não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Porém os tratamentos 1, 5 e 9 (sem farelo de soja) apresentaram diferenças estatísticas entre eles, provavelmente, em função das diferentes concentrações de bagaço de mandioca (6,0, 4,5 e 0g) repetindo o

resultando observado no fungo *P. tricholoma*, ou seja, quanto maior a fonte de nitrogênio, maior será o crescimento micelial, como pode-se observar na Figura 4.14.



**Figura 4.14** - Valores analisados estatisticamente para o comprimento de *P. tenuiculus*.

Dados contendo letras iguais significa que são iguais estatisticamente, mesmo que a média seja diferente.

É importante observar também que, o meio de cultivo composto apenas por balsa de palmito (T9) levou a obtenção de crescimento micelial maior que outras condições como os tratamentos T1(6,0g de bagaço de mandioca e 0g de farelo de soja) e T5 (4,5g de bagaço de mandioca e 0g de farelo de soja), como mostrado na Figura 4.13. TONINI (2004) encontrou uma relação de C:N para a balsa mediana de palmito de 64:1. Segundo Park et al., (2001), apud TONINI, 2004, íons minerais são frequentemente reconhecidos como eficientes elementos para o crescimento micelial e produção de metabólitos secundários em fungos.

Na Tabela 4.1 estão apresentados os elementos químicos e suas concentrações na bainha mediana de palmito.

**Tabela 4.1** – Composição nutricional da bainha mediana de palmito em termos de elementos químicos (resultados expressos em material seco a 75° C).

<b>Elemento químico</b>	<b>Valores (g/Kg)</b>
N	8,60
P	0,76
K	41,14
Ca	4,29
Mg	3,47
S	0,74
	Valores (mg/Kg)
Br	79,50
Cu	9,41
Fe	268,9
Mn	787,2
Zn	67,28

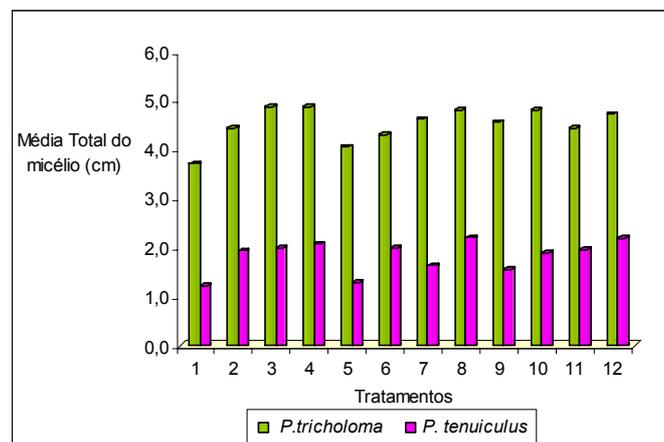
Fonte: TONINI, 2004.

TONINI, (2004) em estudos com *L. edodes*, observou que a velocidade de miceliação diminuiu à medida que é aumentada a concentração de nitrogênio, sendo utilizado em seu trabalho, 142,83 g/L de farelo de soja como fonte de nitrogênio. SILVA et al., (2002) estudaram a velocidade de miceliação de *Lentinula edodes* FEB 14 em farelo de soja disperso em meio contendo bagaço de mandioca. Os autores verificaram que a densidade micelial foi proporcional à concentração de nitrogênio, o mesmo não aconteceu com a velocidade de crescimento micelial que foi inversamente proporcional. Segundo esses autores, altas concentrações de nitrogênio limitam a degradação da lignina presente no substrato.

De acordo com Donogue e Denison (1995 apud ROSSI, 1999) substratos com partículas maiores apresentaram teores mais elevados de O<sub>2</sub> e menores de CO<sub>2</sub>.

Leatham e Stahmann, 1987 apud ROSSI, 1999 observaram que a troca gasosa inadequada é fator inibitório para o crescimento micelial de *L. edodes*. Dessa forma a capacidade de troca do substrato é diminuída com o aumento do bagaço de mandioca que restringe os espaços no seu interior.

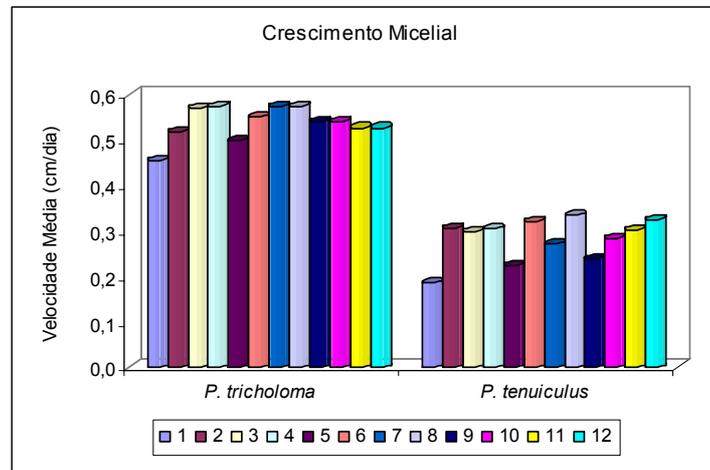
A partir do comprimento do micélio foram calculadas as médias totais, obtendo-se a média de crescimento micelial total, pela equação 04, conforme o item 3.12 do capítulo anterior, visando a comparação entre os dois fungos estudados neste ensaio, assim como os tratamentos pesquisados (Figura 4.15).



**Figura 4.15** – Média total do comprimento do micélio de *P. tricholoma* e *P. tenuiculus* em 10 leituras realizadas.

Pode-se observar na figura 4.16 que a menor média total de comprimento tanto para o fungo *P. tricholoma* (3,7cm) quanto para *P. tenuiculus* (1,2cm) foi no tratamento 1 (sem fonte de nitrogênio e com 6,0g de bagaço de mandioca), ao longo dos 10 pontos que foram realizadas as medições dos tubos (0 ao 18º dia). As maiores médias foram observadas nos tratamentos 3 e 4 (2 e 3g de farelo de soja) para *P. tricholoma* (4,9 cm) e 8 e 12 (4,5 e 0g de bagaço de mandioca) para *P. tenuiculus* (2,2 cm).

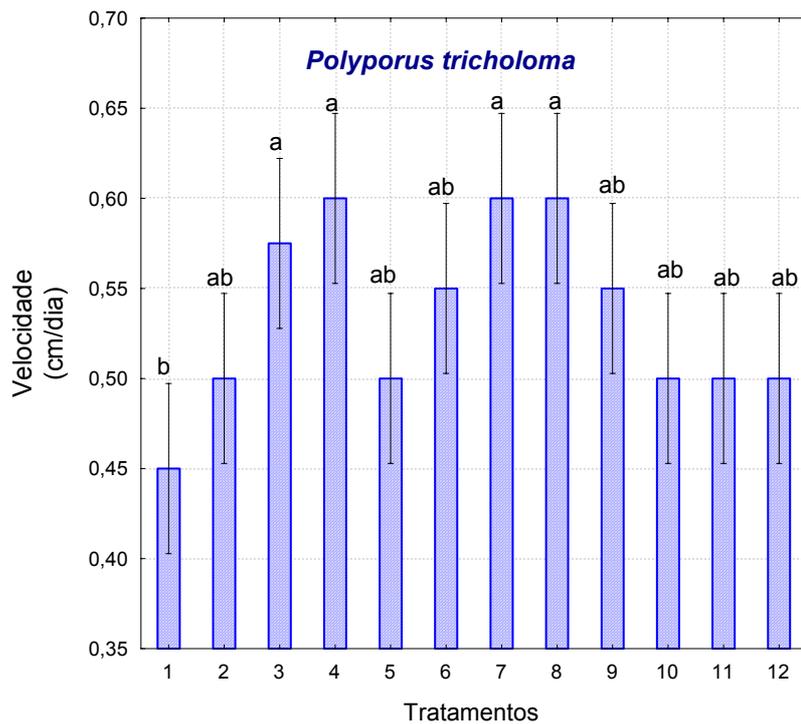
Já a velocidade média de crescimento micelial ao dia, destes ensaios, conforme descrito no item 3.13, está representada na Figura 4.16.



**Figura 4.16** - Velocidade média de crescimento micelial ao dia, nos 12 tratamentos, para *P. tricholoma* e *P. tenuiculus*.

Verificou-se nestes experimentos que, para o cultivo de *P. tricholoma*, a velocidade média de crescimento foi maior nos tratamentos 3, 4, 7 e 8, não apresentando, diferenças estatísticas entre estes tratamentos, como mostrado na Figura 4.17. A velocidade mais lenta ocorreu no tratamento 1, que foi de 0,45 cm de crescimento de micélio por dia.

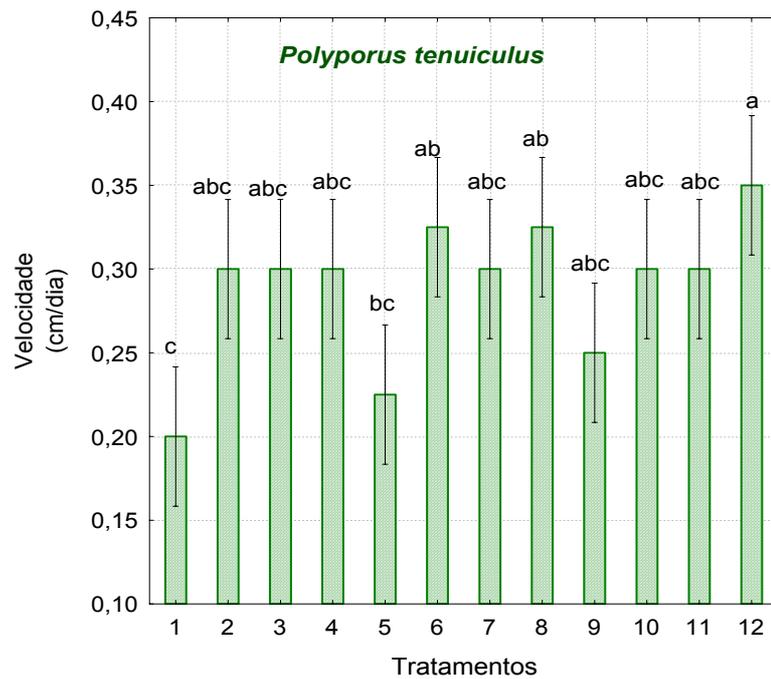
SANTOS & TAVARES (2004), também observaram que *P. tricholoma* cultivado em meio a base de bainha mediana de palmito, apresentou maior velocidade de crescimento micelial radial quando comparado ao *P. tenuiculus*. No trabalho desses autores, valores similares de velocidade média de crescimento micelial foram obtidos.



**Figura 4.17** - Valores analisados estatisticamente para a velocidade média micelial de *P. tricholoma* ao dia.

Dados contendo letras iguais significa que são iguais estatisticamente, mesmo que a média seja diferente.

Para o *P. tenuiculus* a maior velocidade média de crescimento micelial ocorreu nos tratamentos 8 e 12, obtendo-se 0,325 e 0,350 cm de crescimento de micélio ao dia, respectivamente. Porém esses tratamentos apresentaram diferenças estatísticas entre eles, mostrados na Figura 4.18. As menores velocidades médias de comprimento ocorreram nos tratamentos 1, 5 e 9, todos sem fonte de nitrogênio, com 0,2, 0,22 e 0,25 cm de comprimento de micélio ao dia, respectivamente.



**Figura 4.18** - Valores analisados estatisticamente para a velocidade micelial de *P. tenuiculus* ao dia.

Dados contendo letras iguais significa que são iguais estatisticamente, mesmo que a média seja diferente.

Estes resultados, podem ser comparados aos apresentados no trabalho de SANTOS (2000), que avaliou o cultivo de outro fungo basidiomycetes, *Pleurotus*, utilizando palha de bananeira e casca de arroz como substrato, obtendo velocidades médias de 0,2 a 0,6 cm/dia de crescimento de micélio.

Os ensaios em tubos permitiram constatar que, a semelhança do observado nos experimentos do Ensaio I, o *P. tricholoma* apresenta maior velocidade de crescimento, comparativamente ao *P. tenuiculus*.

### **4.3 Ensaio III Ensaio em Fermentação Sólida em Frascos**

Estes ensaios tiveram por objetivo avaliar a produção das enzimas, xilanase, carboximetilcelulase e avicelase, bem como a concentração de proteínas totais no meio. Foram analisados, comparativamente aos 12 tratamentos pesquisados, os dois fungos estudados. A umidade e o pH foram monitorados ao longo do tempo.

A Figura 4.19 mostra o crescimento micelial nos frascos, onde foi retirada amostra para a realização das determinações acima descritas.



**Figura 4.19** – a) Crescimento micelial de *P. tricholoma* no 11º dia de cultivo no T2;  
b) Crescimento micelial de *P. tenuiculus* no 11º dia de cultivo no T2.  
T2 (6,0 g de bagaço de mandioca e 2 g de farelo de soja).

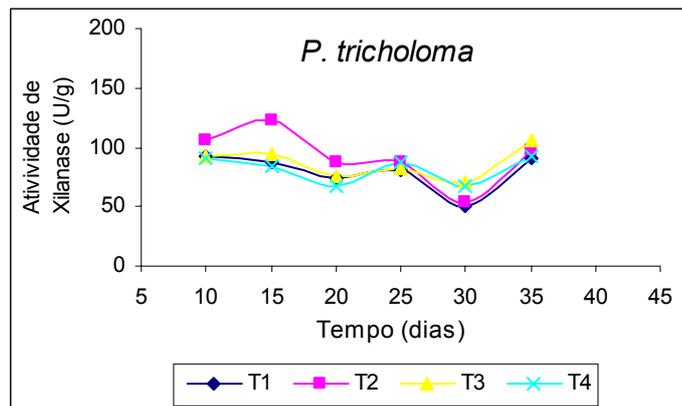
#### 4.3.1 Atividades Enzimáticas

##### 4.3.1.1 Atividade de Xilanase

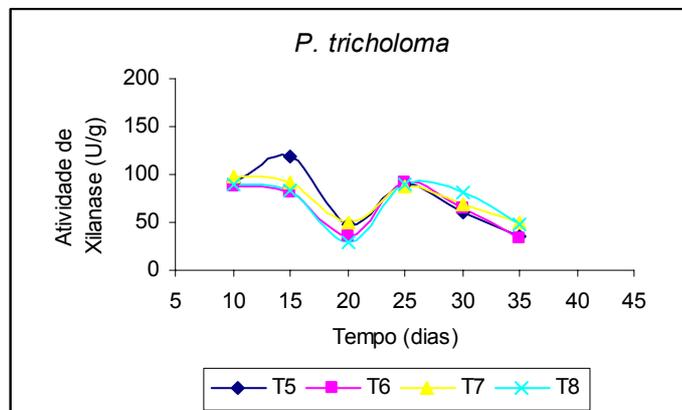
A comparação entre a produção de xilanase obtida nos cultivos realizados nos frascos para o fungo *P. tricholoma* está ilustrada nas Figuras 4.20 a 4.22.

Pode-se observar que o cultivo com *P. tricholoma*, nas condições do T2 (6,0 g de bagaço de mandioca e 2g de farelo de soja), levou a maior atividade enzimática

em 15 dias de cultivo, obtendo-se 123 U de xilanase. Já a menor atividade ocorreu no tratamento 8 (4,5g de bagaço de mandioca e 3 g. de farelo de soja), em 20 dias de cultivo alcançando 29 U de xilanase no meio.



**Figura 4.20** - Atividade de xilanase para *P. tricholoma* nos tratamentos T1 ao T4 (6,0g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3g de farelo de soja).



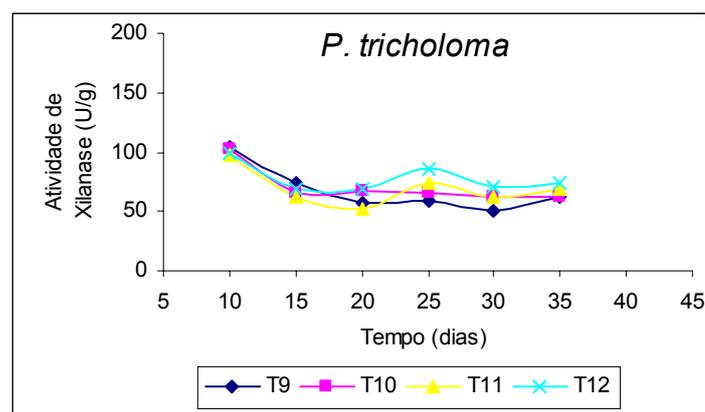
**Figura 4.21** - Atividade de xilanase para *P. tricholoma* nos tratamentos T5 ao T8 (4,5g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3g de farelo de soja)

Observa-se, ainda, na Figura 4.21, que houve uma queda de atividade enzimática no intervalo 3, coincidindo com uma redução da umidade dos meios, para 30 e 35%, conforme apresentado na Tabela 4.2, essa redução da umidade pode ser devido a um problema operacional no experimento.

Tabela 4.2 – Valores médios de umidade (%) do meio durante o cultivo do fungo *P. tricholoma* em diferentes intervalos de tempo.

Tempo (dias)	T 01	T 02	T 03	T 04	T 05	T 06	T 07	T 08	T 09	T 10	T 11	T 12
0	72,97	69,81	68,61	74,08	61,05	67,72	71,07	70,51	68,61	68,61	68,61	70,37
10	73,59	65,58	71,24	70,76	73,69	72,23	72,77	71,57	75,99	74,53	75,23	74,1
15	69,76	71,00	71,15	73,87	72,8	74,23	71,64	69,27	69,19	75,79	74,07	76,64
20	60,24	61,73	62,32	63,83	34,99	35,68	33,64	33,21	69,7	69,94	76,99	75,15
25	77,29	75,33	74,5	74,67	77,15	72,01	75,12	68,64	67,46	74,46	77,78	73,6
30	78,82	76,17	71,07	75,44	72,99	75,09	73,23	75,04	64,11	67,28	77,03	66,54
35	75,62	72,08	74,77	74,41	71,93	73,11	74,39	77,06	75,94	71,32	71,78	74,41

Este resultado é confirmado por PALMA (2003) que relata que trabalhos na forma de planejamento experimental mostraram que, dentre os fatores avaliados, a umidade do substrato, apresentou-se como uma variável de grande importância para a produção enzimática.



**Figura 4.22** - Atividade de xilanase para *P. tricholoma* nos tratamentos T9 ao T12 (0g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)

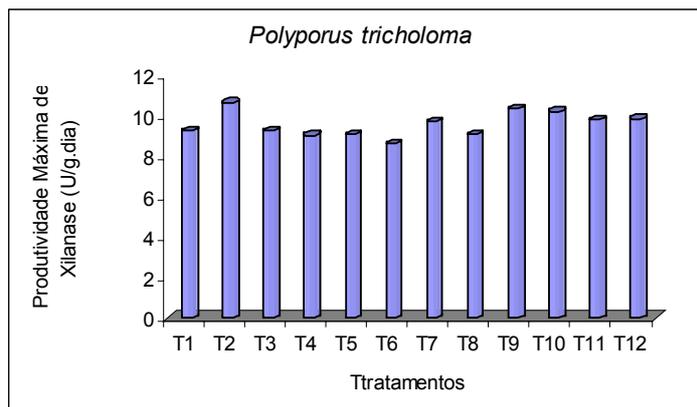
Estes resultados indicam que, para a maioria dos tratamentos, as maiores atividades de xilanase foram obtidas no início dos experimentos.

Maiores concentrações de bagaço de mandioca com a presença de farelo de soja em 35 dias de cultivo, foi a condição que levou à atividade enzimática semelhante à atividade do início do cultivo. Entretanto nos cultivos com ausência de bagaço de mandioca, como mostrado na Figura 4.22 o aumento da atividade enzimática no final do cultivo não foi tão expressivo quanto nos primeiros quatro tratamentos T1, T2, T3 e T4 (6,0 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3g de farelo de soja).

Tal como a atividade total, a produtividade máxima de xilanase, foi ligeiramente superior no tratamento T2 (6,0 g de bagaço de mandioca e 1g de farelo de soja) e, o maior valor obtido, ocorreu no 10º dia dos cultivos.

A Figura 4.23 mostra os valores médios de produtividade máxima de xilanase obtidos nos diferentes tratamentos.

Constata-se que os tratamentos sem bagaço de mandioca (9, 10,11 e 12) mostraram produtividade máxima similares entre si e superiores aos demais tratamentos com exceção do T2, mostrando que a balsa mediana de palmito é um substrato de composição satisfatória, em termos de fonte de carbono e fibras para a produção de xilanase.



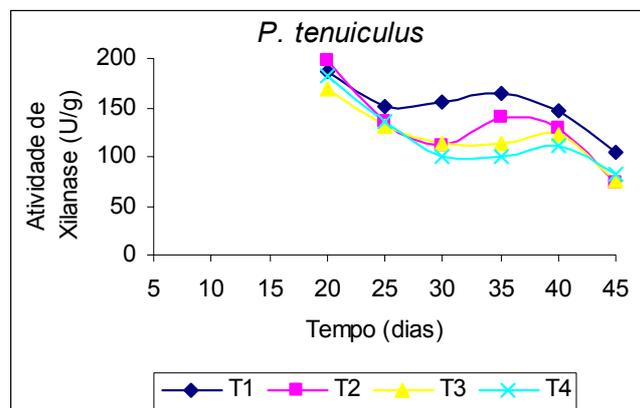
**Figura 4.23** - Produtividade Máxima de Xilanase (U/g.dia) nos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P. tricholoma*.

No cultivo de *P. tenuiculus* a atividade de xilanase também foi maior no tratamento T2 (6,0 de bagaço de mandioca e 1g de farelo de soja), no 20º dia, cujo meio de cultivo, chegou a 197,4 U/g. A menor atividade ocorreu no T12 (0g de bagaço de mandioca e 3g de farelo de soja), no 40º dia, obtendo-se 43,3 U/g de xilanase, conforme ilustrado nas Figuras 4.24, 4.25 e 4.26.

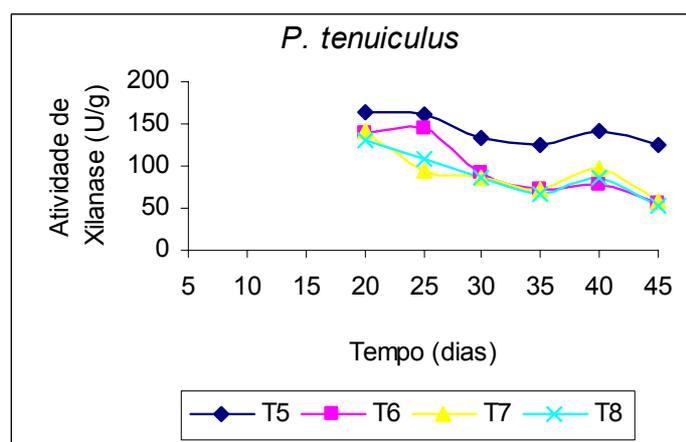
Assim como nos cultivos de *P. tricholoma*, os cultivos do *P. tenuiculus*, levaram à obtenção das maiores atividades enzimáticas no início dos experimentos. Entretanto, estas atividades foram superiores em relação às obtidas com *P. tricholoma*. Além disso, para todos os tratamentos, a atividade de xilanase foi reduzindo no final do cultivo, como mostrado nas Figuras 4.24 a 4.26. Este resultado pode ser explicado pelas conclusões do trabalho de DARE et al.; 1988, que descrevem que *L. edodes*, que também é um fungo de podridão branca, é altamente ativo na produção de xilanases durante a fase vegetativa, ou seja, no início do cultivo.

Ao comparar os tratamentos com diferentes fontes de carbono T1 ao T4 (6,0g de bagaço de mandioca) com T5 ao T8 (4,5g de bagaço de mandioca) e T9 ao T12 (0g de bagaço de mandioca), pode-se observar, que, dos tratamentos T1 ao T4 o

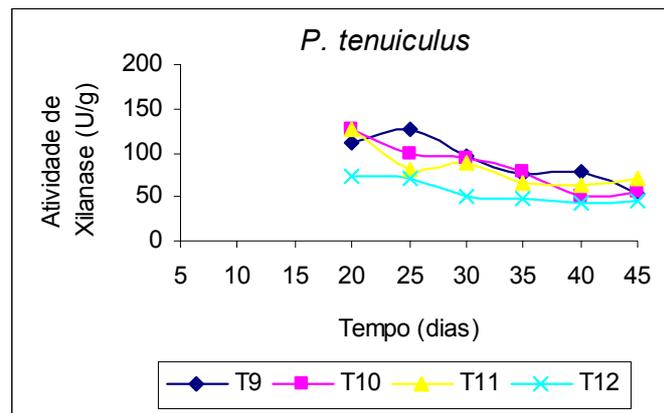
que levou a maior atividade enzimática foi o tratamento 1. Comparando os tratamentos T5 ao T8, na Figura 4.25 observa-se que a maior atividade enzimática ocorreu no tratamento T5. Na análise da Figura 4.26, verifica-se que a maior atividade obtida foi no tratamento T9. Pode-se concluir, assim, que, quanto maior a concentração de bagaço de mandioca, na ausência de farelo de soja, maior será a atividade de xilanase.



**Figura 4.24** - Atividade de xilanase para *P. tenuiculus* nos Tratamentos T1 ao T4 (6 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)

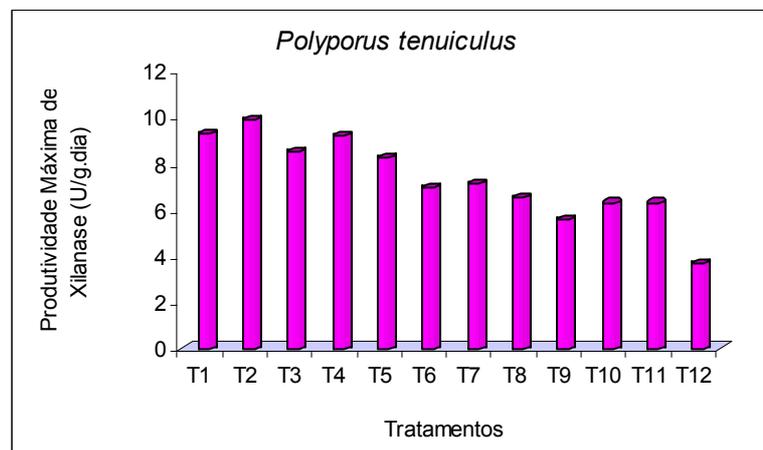


**Figura 4.25** - Atividade de xilanase para *P. tenuiculus* nos tratamentos T5 ao T8 (4,5 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)



**Figura 4.26** - Atividade de xilanase para *P. tenuiculus* nos Tratamentos T9 ao T12 (0g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)

A produtividade máxima desta enzima foi maior no tratamento 2 (6,0 de bagaço de mandioca e 1g de farelo de soja) e menor nos tratamentos sem fonte de carbono ( 9, 10, 11 e 12), como mostrados na Figura 4.27.



**Figura 4.27** - Produtividade Máxima de Xilanase (U/g.dia) nos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P. tenuiculus*.

Ao comparar os dois fungos utilizados neste trabalho pode-se observar que o *P. tenuiculus*, apesar de ter uma velocidade de crescimento micelial mais lenta, conforme discutido no ensaio II, teve a atividade de xilanase superior, para todos os tratamentos avaliados. SILVA (2003) obteve resultados diferentes aos deste trabalho, utilizando resíduo de eucalipto para a produção de enzimas em nove linhagens de *L. edodes*. Verificou-se neste trabalho, que a linhagem que apresentou um crescimento micelial intenso, foi também a que apresentou maior atividade de enzimas hidrolíticas. Estas enzimas são de fundamental importância para o crescimento micelial durante a fase vegetativa, pois são responsáveis, pela despolimerização da celulose e hemicelulose. Os açúcares formadores destes polímeros constituem a fonte de carbono necessária para a atividade metabólica (BUSWELL et al.; 1995).

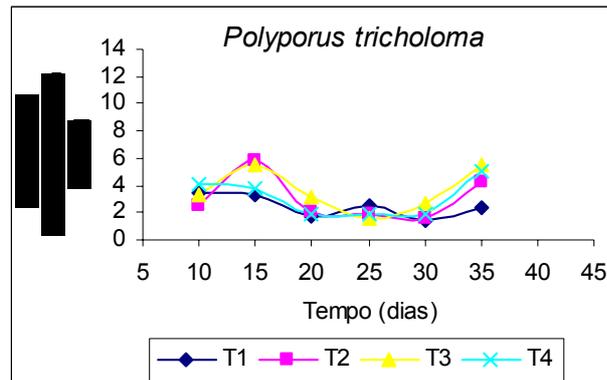
A atividade enzimática para ambos os fungos foi maior no início do cultivo, decaindo, no final da fermentação. SILVA (2003) teve resultados inferiores de xilanase (20U/g) aos encontrados nesta pesquisa, em trabalho com *Lentinula edodes*, que também é um basidiomycetes que causa a podridão branca da madeira.

#### 4.3.1.2 Atividade de Celulases

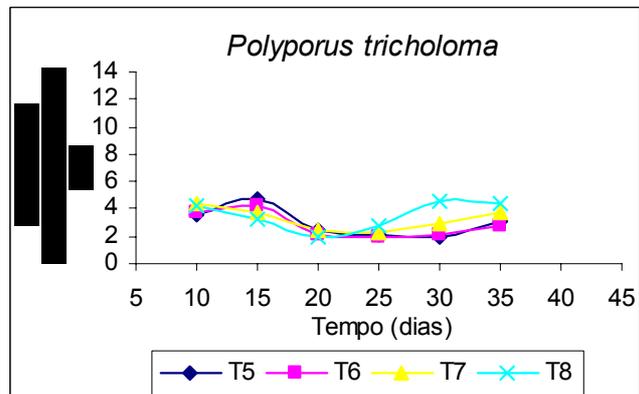
##### 4.3.1.2.1 Atividade de Carboximetilcelulase

No cultivo de *P. tricholoma*, pode-se observar nas Figuras 4.28 a 4.30 que este, produziu a maior atividade enzimática nos tratamentos T10 (1g de farelo de soja), e T12 (3g de farelo de soja), no 10º dia de cultivo, obtendo-se 6,1 U/g nos dois tratamentos. SILVA (2003) verificou que a concentração de farelo de soja usados

nos preparos dos meios de cultivo teve influência na atividade de carboximetilcelulase, pois quanto maior a concentração de farelo, maior a atividade enzimática.



**Figura 4.28** - Atividade de carboximetilcelulase para *P. tricholoma* nos tratamentos T1 ao T4 (6 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)

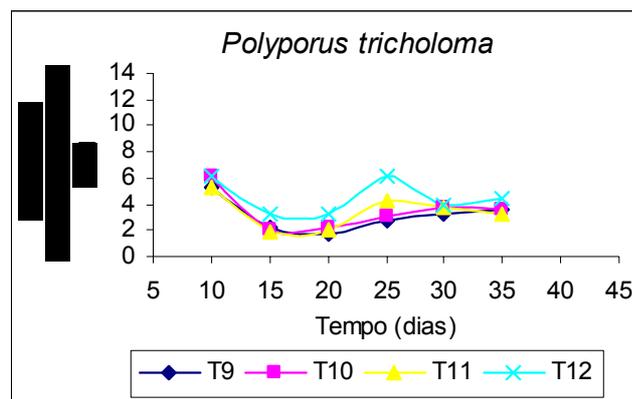


**Figura 4.29** - Atividade de carboximetilcelulase para *P. tricholoma* nos tratamentos T5 ao T8 (4,5 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)

A menor atividade de carboximetilcelulase ocorreu no tratamento T1, no 30 ° dia de cultivo com 1,4 U/g.

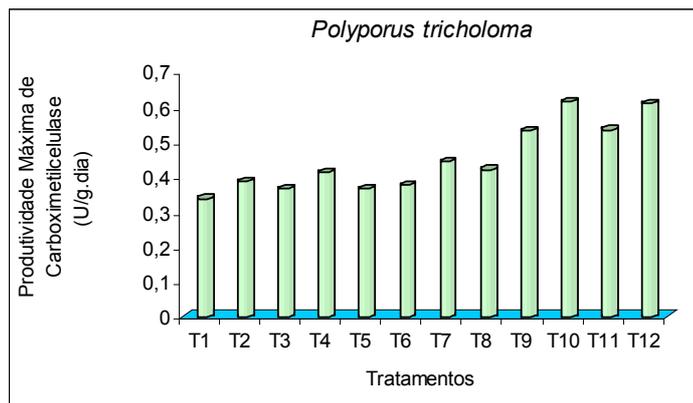
Diferentemente da atividade de xilanase, a produção da enzima carboximetilcelulase foi melhor quando a quantidade de bagaço de mandioca foi diminuída na composição do meio (tratamentos 9,10,11 e 12), como mostrado na Figura 4.30. Este fato pode estar relacionado à conclusão do trabalho de BEGUIN (1990), que afirma que existem dois tipos de mecanismos que controlam a síntese e secreção de celulases. Na maioria dos organismos, a produção de celulases é reprimida na presença de altas concentrações de fonte de carbono prontamente metabolisáveis.

No cultivo com meio composto apenas por balsa mediana de palmito (T9), observou-se a atividade enzimática superior aos tratamentos anteriores, no início do processo.



**Figura 4.30** - Atividade de carboximetilcelulase para *P. tricholoma* nos tratamentos T9 ao T12 (0 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)

A produtividade máxima de carboximetilcelulase ocorreu no T10 (ausência de bagaço de mandioca e 1g de farelo de soja) e T12 (ausência de bagaço de mandioca e 3g de farelo de soja), coincidindo com as melhores condições para obtenção da atividade enzimática, conforme mostrado na Figura 4.31.

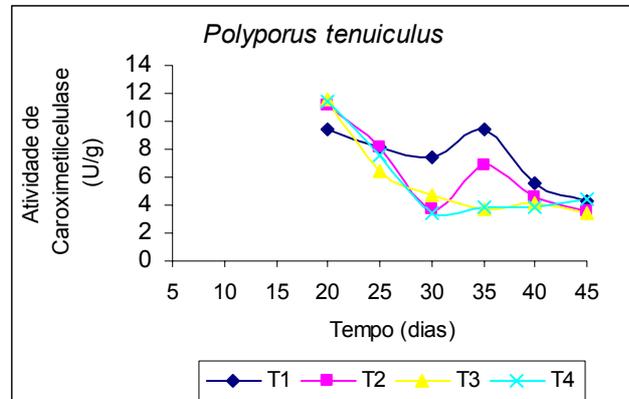


**Figura 4.31** - Produtividade Máxima de Carboximetilcelulase (U/g.dia) nos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P. tricholoma*.

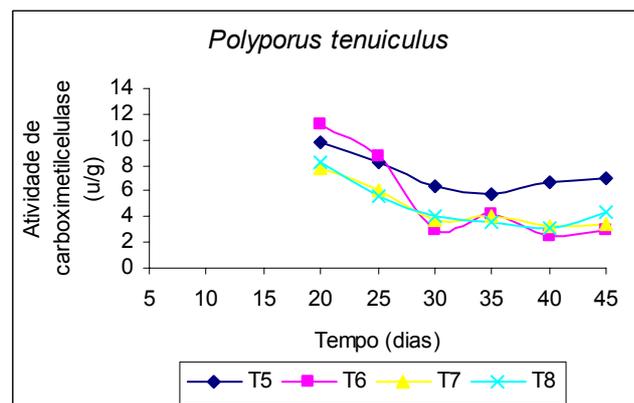
No cultivo de *P. tenuiculus* a atividade de carboximetilcelulase foi superior no T3 (6g de bagaço de mandioca e 2g de farelo de soja) obtendo-se 11,6 U/g, e inferior no T6 (4,5g de bagaço de mandioca e 1g de farelo de soja), onde foram obtidos 2,5 U/g. Pode-se observar, com esses resultados, que as maiores atividades de carboximetilcelulase de *P. tenuiculus*, diferentemente do *P. tricholoma*, ocorreram nos tratamentos iniciais (T2, T3, T4 e T6) e no primeiro intervalo de amostragem, conforme mostrado nas Figuras 4.32 a 4.34.

A maior atividade de carboximetilcelulase foi obtida nas condições dos tratamentos com maior concentração de bagaço de mandioca, o que foi também observado para atividade de xilanase produzida por este fungo.

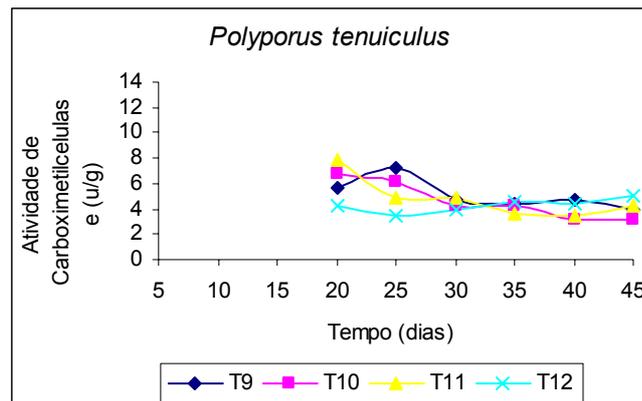
MATSUMOTO (1988) estudou *L. edodes* cultivado sobre serragem e verificou que as atividades de carboximetilcelulase e xilanase, aumentaram nos primeiros estágios de desenvolvimento, atingindo altos níveis durante o amadurecimento do corpo de frutificação.



**Figura 4.32** - Atividade de carboximetilcelulase para *P. tenuiculus* nos tratamentos T1 ao T4 (6 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)



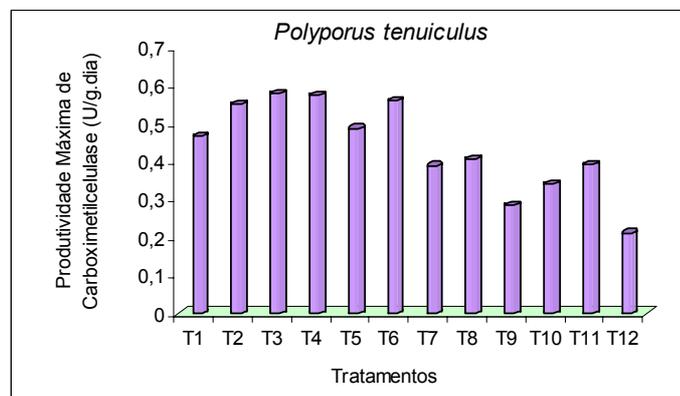
**Figura 4.33**- Atividade de carboximetilcelulase para *P. tenuiculus* nos tratamentos T5 ao T8 (4,5 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)



**Figura 4.34** - Atividade de carboximetilcelulase para *P. tenuiculus* nos tratamentos T9 ao T12 (0 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)

SILVA (2003) teve a atividade de carboximetilcelulase dez vezes inferior a atividade de xilanase, resultado similar foi observado neste trabalho.

A produtividade máxima de carboximetilcelulase foi obtida nos tratamentos T3, T4 e T6, como mostrado na Figura 4.35, chegando a valores de 0,6 (U/g.dia).



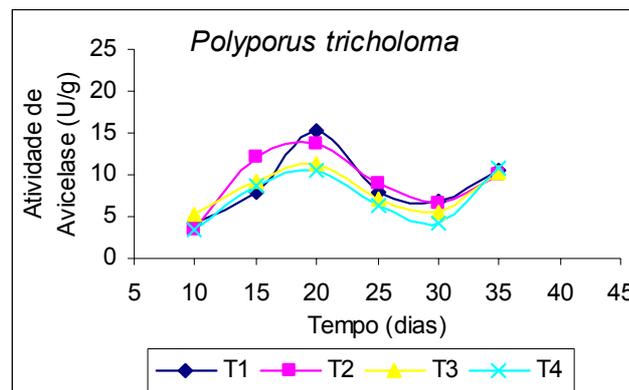
**Figura 4.35** - Produtividade Máxima de Carboximetilcelulase (U/g.dia) nos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P. tenuiculus*.

Ao comparar a produção de carboximetilcelulase pelos dois fungos, pode-se concluir que o *P. tenuiculus* produz mais atividade enzimática em relação ao *P.*

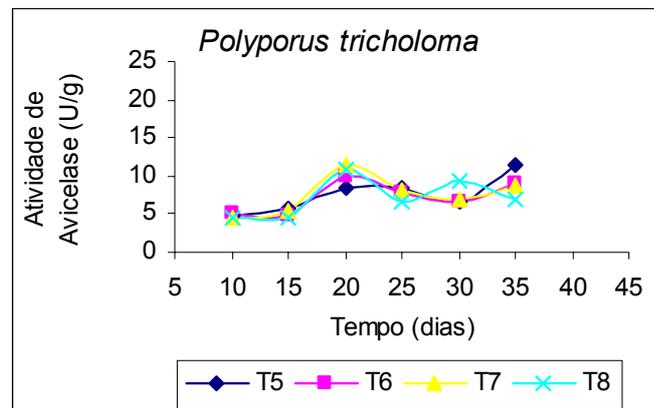
*tricholoma*. O mesmo foi observado na fermentação submersa, para esta enzima, conforme mostrado na Figura 4.4.

#### 4.3.2.2.2 Atividade de Avicelase

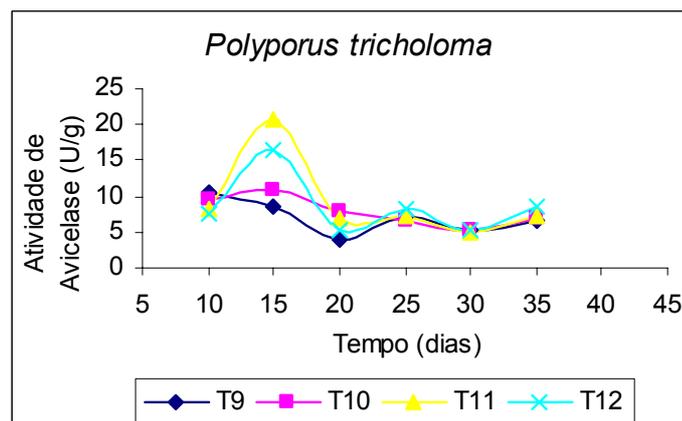
Os resultados de atividade enzimática de avicelase estão representados nas Figuras 4.36 a 4.38.



**Figura 4.36** - Atividade de avicelase para *P. tricholoma* nos tratamentos T1 ao T4 (6 g de bagaço de mandioca 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)



**Figura 4.37** - Atividade de avicelase para *P. tricholoma* nos tratamentos T5 ao T8 (4,5 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)

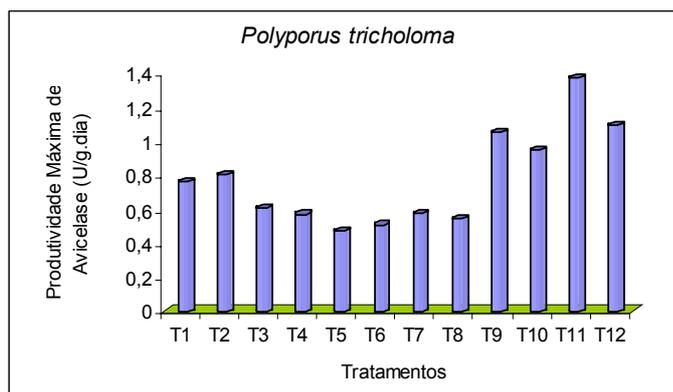


**Figura 4.38** - Atividade de avicelase para *P. tricholoma* nos tratamentos T9 ao T12 (0g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)

Pelas figuras acima, pode-se constatar que a atividade de avicelase aumentou nos tempos finais, em todos os tratamentos, à exceção dos quatro últimos (T9, T10, T11 e T12) (0g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3g de farelo de soja), mantiveram-se praticamente constante.

Foram obtidos valores máximos de avicelase de 15 U/g e mínimos de 3,5 U/g.

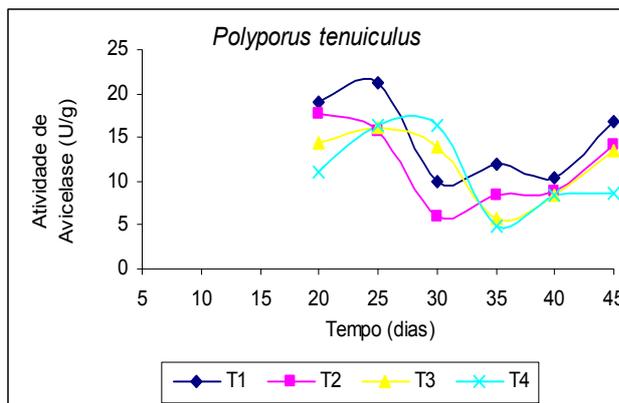
A produtividade máxima de avicelase para o fungo *P. tricholoma* ocorreu conforme a atividade da enzima sendo, também, superior nas condições dos tratamentos finais (T9 ao T12) das fermentações mostrados na Figura 4.39.



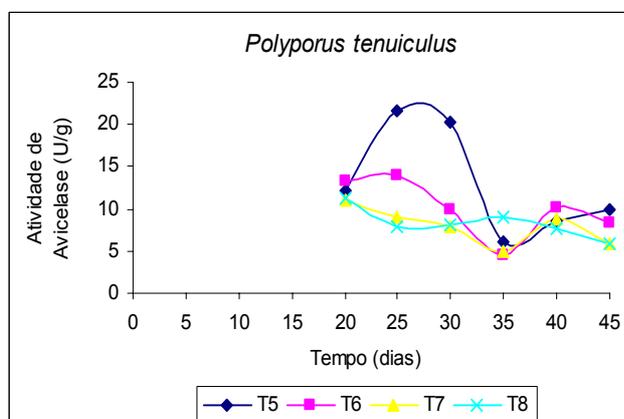
**Figura 4.39** - Produtividade Máxima de Avicelase (U/g.dia) nos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P. tricholoma*

Pode-se observar também que, as maiores atividades de avicelase produzidas pelo *P. tenuiculus*, foram obtidas nas condições dos tratamentos, T1, T2, T3 e T4 (6,0 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 de farelo de soja). Comparando os resultados obtidos nos cultivos cujos tratamentos continham a mesma quantidade de bagaço de mandioca, pode-se perceber que na ausência de farelo de soja, T1 e T5, obteve-se a maior atividade enzimática, nos primeiros dias de cultivo, como mostra as Figuras 4.40 a 4.42.

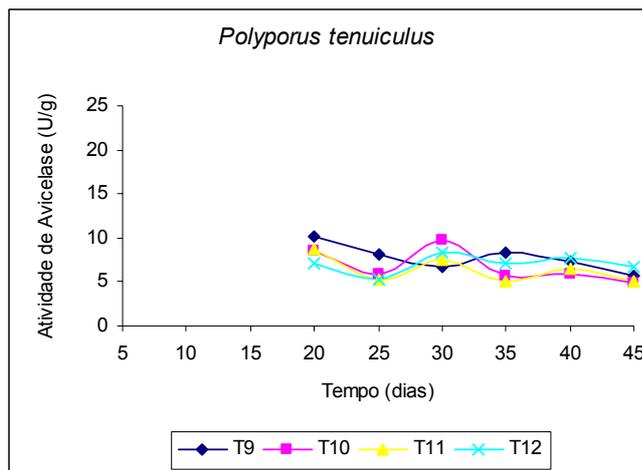
Quanto à produtividade máxima de avicelase para o fungo *P. tenuiculus*, observa-se na Figura 4.43, que os tratamentos com ausência de bagaço de mandioca, apresentaram os menores valores.



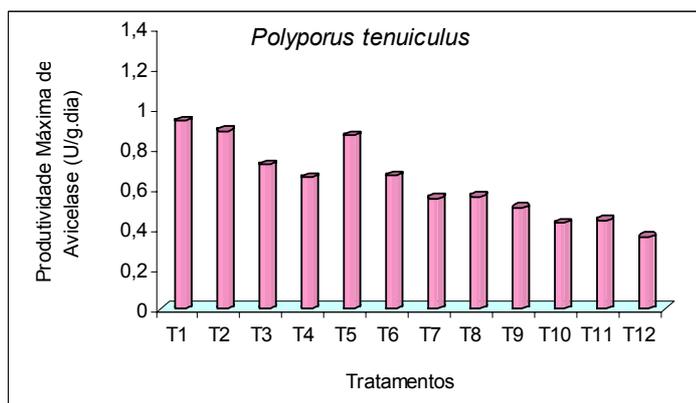
**Figura 4.40** - Atividade de avicelase para *P. tenuiculus* nos tratamentos T1 ao T4 (6 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)



**Figura 4.41** - Atividade de avicelase para *P. tenuiculus* nos tratamentos T5 ao T8 (4,5 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)



**Figura 4.42** - Atividade de avicelase para *P. tenuiculus* nos tratamentos T9 ao T12 (0 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja)



**Figura 4.43** - Produtividade Máxima de Avicelase (U/g.dia) nos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P. tenuiculus*.

#### 4.4 Concentração das Proteínas Totais

A determinação da concentração das proteínas totais foi realizada neste trabalho com o objetivo de analisar a atividade específica das enzimas produzidas no meio de cultivo nos diferentes tratamentos.

Observa-se nas Tabelas 4.3 e 4.4, os valores médios de proteínas totais para *P. tricholoma* e *P. tenuiculus*. A maior concentração de proteínas no meio de cultivo para ambos os fungos foi encontrada nos tratamentos sem bagaço de mandioca (T9, T10, T11 e T12), cuja relação C:N, no tempo zero, foi de aproximadamente 50:1.

Em relação aos outros tratamentos, a presença do bagaço de mandioca apresentou menor concentração de proteínas totais especialmente quando o fungo *P. tricholoma* foi cultivado.

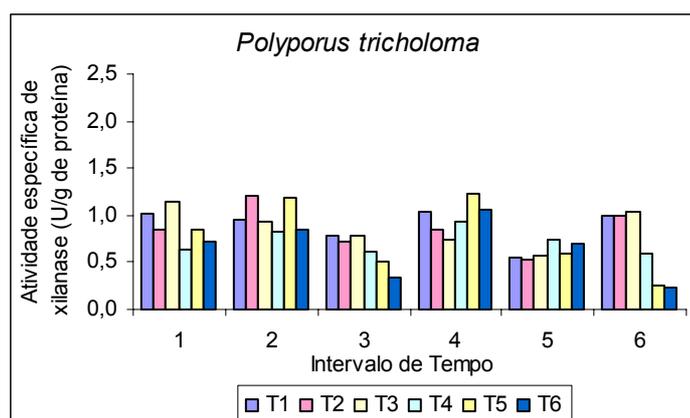
**Tabela 4.3** – Valores médios obtidos de proteínas totais, expressos em mg/g de meio, nas fermentações dos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P. tricholoma*.

Tempo (dias)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
0	66,7	68,7	104,3	51,3	75,9	94,1	94,2	87,2	134,4	109,4	121,5	115,0
10	91,9	124,4	91,1	143	106,7	120,6	103	111,7	155,6	144,3	156,5	174,3
15	92,0	101,9	102,4	100,9	98,7	95,7	83,3	109,4	114,4	122,0	124,1	141,9
20	95,2	119,4	98,0	116,9	94,6	104,4	118,9	95,7	118,1	129,3	128,0	139,6
25	85,2	103,1	111,3	95,6	76,7	88,9	88,1	97,6	115,9	102,2	112,8	154,6
30	93,9	103,3	126,1	97,2	102,0	94,6	126,5	130,2	108,3	124,8	132,0	145,7
35	91,7	99,8	101,9	152,8	138,1	141,9	155,9	143,5	147,0	155,6	170,6	190,7

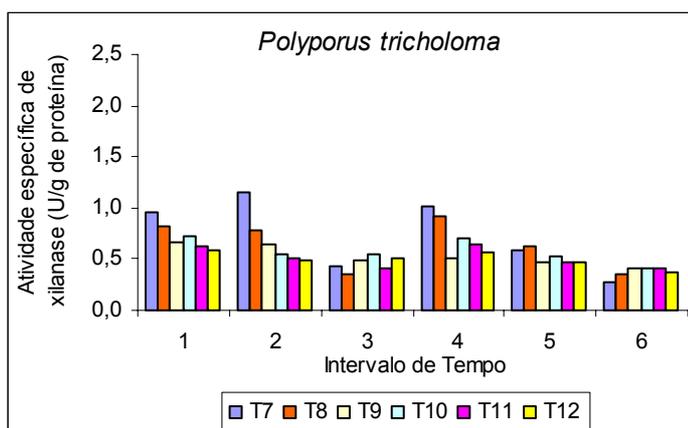
**Tabela 4.4** – Valores médios obtidos de proteínas totais, expressos em mg/g de meio, nas fermentações dos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P. tenuiculus*.

Tempo (dias)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
0	66,7	68,7	104,3	51,3	75,9	94,1	94,2	87,2	134,4	109,4	121,5	115,0
20	106,9	119,4	96,3	127,0	153,9	129,3	136,5	131,1	109,1	141,7	139,6	128,5
25	166,4	165	155,2	185,8	180,3	147,4	146,7	147,0	157,0	146,1	166,1	138,3
30	127,5	113,1	116,9	126,7	133,6	155,7	154,4	127,4	138,9	123,7	120,2	143,0
35	150,3	181,4	165,4	148,6	139,7	128,7	140,9	138,9	133,7	160,4	139,6	134,1
40	95,8	98,6	92,4	115,4	97,2	103,1	94,1	94,6	103,0	119,6	114,8	160,7
45	57,0	73,0	60,0	70,6	110,6	94,6	92,0	98,9	82,4	95,9	104,1	148,9

Os valores das atividades específicas de xilanase, isto é, atividade por concentração total de proteínas no meio, está mostrado nas Figuras 4.44 e 4.45.



**Figura 4.44** – Atividade específica de Xilanase (U/g de proteína) nas fermentações dos tratamentos T1 ao T6 (T1 ao T4: 6,0 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja e T5 e T6: 4,5 g de bagaço de mandioca e 0 e 1g de farelo de soja) para o fungo *P. tricholoma*.

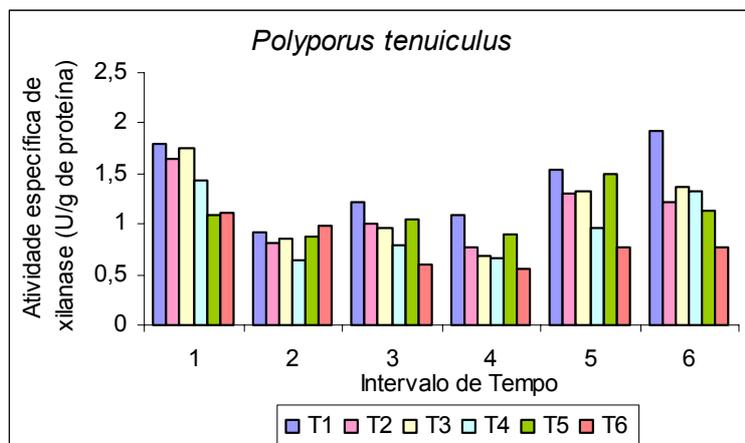


**Figura 4.45** – Atividade específica de Xilanase (U/g de proteína) nas fermentações dos tratamentos T7 ao T12 (T7 ao T8: 4,5 g de bagaço de mandioca e 2 e 3 g de farelo de soja e T9 ao T12: 0 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja) para o fungo *P. tricholoma*.

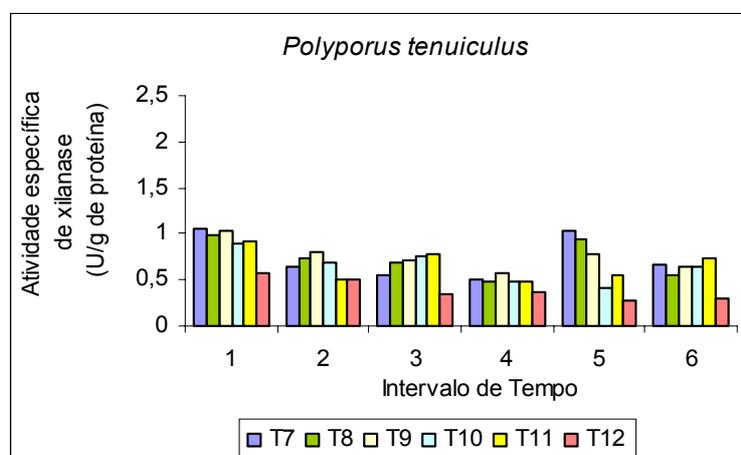
As atividades específicas de xilanase para o *P. tricholoma* foi superior nos tratamentos T2 (6,0 de bagaço de mandioca e 1g de farelo de soja), T5 (4,5 de bagaço de mandioca e 0 g de farelo de soja) e T7 (4,5 de bagaço de mandioca e 2g de farelo de soja) todos no mesmo, com 1,2 de U/g de proteína. Os tratamentos T9 ao T12, apesar de terem tido a atividade enzimática superior ao T7, tiveram a específica inferior, isto vem a confirmar que a adição de bagaço de mandioca como fonte de carbono induz a atividade enzimática.

As atividades específicas de xilanase estão mostradas nas Figuras 4.46 e 4.47.

As atividades específicas de xilanase para o *P. tenuiculus* foi superior nos tratamentos T2 (6,0 de bagaço de mandioca e 1g de farelo de soja) e T3 (6,0 de bagaço de mandioca e 2 g de farelo de soja) nos 20 dias de cultivo, com 1,8 de U/g de proteína, o que vem ao encontro dos resultados observados na atividade total de xilanase, onde maiores concentrações de carbono levam o *P. tenuiculus* a maior atividade enzimática.



**Figura 4.46** – Atividade específica de Xilanase (U/g de proteína) nas fermentações dos tratamentos T1 ao T6 (T1 ao T4: 6,0 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja e T5 e T6: 4,5 g de bagaço de mandioca e 0 e 1g de farelo de soja) para o fungo *P. tenuiculus*.



**Figura 4.47** – Atividade específica de Xilanase (U/g de proteína) nas fermentações dos tratamentos T7 ao T12 (T7 ao T8: 4,5 g de bagaço de mandioca e 2 e 3 g de farelo de soja e T9 ao T12: 0 g de bagaço de mandioca e 0, 1, 2 e 3 g de farelo de soja) para o fungo *P. tenuiculus*.

#### 4.5 Umidade

Os perfis de variação de umidade em função do tempo dos cultivos para ambos os fungos estão mostrados nas Tabelas 4.2 e 4.5, onde se pode observar que a umidade manteve-se em torno de 60 a 75% para os dois fungos. Teores de umidade acima de 80% no substrato, poderiam levar a contaminação bacteriana, acompanhado de contaminação fúngica por *Coprinus* e *Pluteus* (BANO et al., 1987).

Para o *P. tricholoma* ocorreu um acentuado declínio da umidade no intervalo 3 dos tratamentos T5 ao T8, ficando a umidade em torno de 35%, resultado que talvez explica que a baixa atividade enzimática de xilanase para este fungo, no intervalo de tempo citado anteriormente.

Como água é essencial para a colonização do substrato, assim como para aumentar e agilizar a degradação da lignina, ZADRAZIL & KURTZMAN (1982) recomendam um teor inicial de umidade do substrato entre 65 e 75%.

**Tabela 4.5** – Valores médios de umidade (%) do fungo *P. tenuiculus* em diferentes intervalos de tempo.

Tempo (dias)	T 01	T 02	T 03	T 04	T 05	T 06	T 07	T 08	T 09	T 10	T 11	T 12
0	68,61	68,60	69,81	68,61	68,61	67,72	68,61	68,61	68,61	68,61	68,61	70,37
20	71,84	71,10	69,83	68,00	70,34	68,14	71,11	70,39	72,81	72,99	69,37	73,26
25	73,19	68,60	69,32	69,85	73,58	70,23	72,20	73,23	74,87	69,07	73,01	69,07
30	71,92	71,30	69,99	73,16	75,45	67,97	71,28	69,28	72,28	65,49	63,76	65,29
35	70,14	70,30	67,31	69,08	70,74	69,58	65,95	67,35	71,47	68,49	62,20	65,49
40	69,45	66,60	62,22	67,81	65,32	66,05	66,33	63,97	66,40	62,61	61,40	60,97
45	61,25	63,50	66,27	57,41	66,93	62,75	62,59	66,58	64,10	60,29	63,79	72,66

Segundo Sato et al., 1982, apud PALMA, 2003 nos cultivos em estado sólido, o teor de umidade deve variar de 30 a 80%, dependendo das características de retenção de água da matéria-prima.

A umidade é um fator crítico para o crescimento dos fungos em substrato sólido. Como a quantidade de água é sempre limitada, ao contrário da fermentação submersa, onde há um grande excesso, o controle do nível de umidade é essencial para a otimização do processo em fermentação sólida.

Um alto teor de umidade diminui a porosidade, a difusão de oxigênio, a eliminação de dióxido de carbono e aumenta o risco de contaminação por bactérias. Por outro lado um baixo teor de umidade pode levar a um menor crescimento (LONSANE et al., 1985).

#### 4.6 Análise do pH

As Tabelas 4.6 e 4.7 descrevem a variação do pH ao longo dos cultivos, nos diferentes experimentos realizados, para *P. tricholoma* e *P. tenuiculus* mostrando não ter havido variações bruscas devido, possivelmente, a boa capacidade tamponante do substrato conforme relatado por LONSANE et al. 1985, para os cultivos sólidos, de modo geral.

Segundo SANTOS, 2000, o crescimento micelial implica na secreção de exoenzimas, polissacarídeos, antibióticos e ácidos orgânicos, os quais reduzem o pH.

BARBOSA (1997) relata que os fungos de podridão branca apresentam melhor crescimento em pH ácido em torno de 4,0 e 5,0. Entretanto, algumas espécies apresentam crescimento semelhante em meio de cultivo alcalino em relação ao meio ácido.

**Tabela 4.6** – Valores médios de pH para o fungo *P. tricholoma*

Tempo (dias)	T 01	T 02	T 03	T 04	T 05	T 06	T 07	T 08	T 09	T 10	T 11	T 12
-----------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

0	6,34	6,41	6,38	6,40	6,37	6,41	6,44	6,40	6,44	6,39	6,38	6,37
10	5,98	6,02	6,01	6,16	5,96	6,00	6,07	6,06	5,13	5,18	5,34	5,72
15	5,15	5,24	5,37	5,57	5,23	5,35	5,68	5,58	5,77	5,33	5,82	6,19
20	5,13	5,15	5,32	5,49	5,18	5,30	5,59	5,57	5,85	5,76	5,89	5,88
25	5,50	5,62	5,77	5,59	5,32	5,74	5,77	5,90	5,81	5,80	6,03	5,65
30	5,73	5,76	5,72	5,91	5,66	5,67	5,78	5,84	6,18	6,00	6,10	5,85
35	5,76	6,00	6,01	5,77	5,78	5,82	5,72	5,93	6,05	6,10	6,12	5,99

**Tabela 4.7** - Valores médios de pH para o fungo *P. tenuiculus*

Tempo (dias)	T 01	T 02	T 03	T 04	T 05	T 06	T 07	T 08	T 09	T 10	T 11	T 12
0	6,34	6,41	6,38	6,40	6,37	6,41	6,44	6,40	6,44	6,39	6,38	6,37
20	5,26	5,34	5,47	5,56	5,28	5,44	5,68	5,68	5,32	5,30	5,55	5,60
25	5,41	5,56	5,60	5,51	5,33	5,61	5,73	5,79	5,38	5,68	5,77	5,57
30	5,72	5,70	5,80	5,72	5,60	5,58	5,73	5,67	5,46	5,51	5,65	5,50
35	6,00	5,80	5,80	5,72	5,79	5,73	5,72	5,68	5,66	5,54	5,63	5,58
40	5,90	5,79	5,73	5,77	5,80	5,75	5,85	5,81	5,71	5,69	5,72	5,65
45	5,92	5,81	5,81	5,78	5,87	5,79	5,84	5,83	5,89	5,83	5,88	5,57

Segundo Zadrazil 1978 apud SANTOS, 2000, algumas espécies de fungos possuem uma característica auto-reguladora de pH do substrato, ou seja, a tendência é de que se estabilize no valor de pH ótimo, independente do valor de pH inicial, isso ocorre dependendo do substrato e do microrganismo.

TAVARES (2004) constatou que os fungos *P. tricholoma* e *P. tenuiculus* apresentaram esta característica.

#### 4.7 Relação Carbono Nitrogênio

Conforme descrito no item 3.11, foi realizada a análise da relação C:N de todas as variações de composição de meio (tratamentos), antes do início dos cultivos. Estes valores estão representados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Valores quantificados de relação carbono/nitrogênio no tempo zero, nos 12 tratamentos.

Relação Carbono/ Nitrogênio	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
C:N	106:1	64:1	45:1	54:1	82:1	66:1	44:1	41:1	72:1	50:1	51:1	50:1

O carbono é um elemento majoritário dos substratos e a forma em que se apresenta, irá influenciar no crescimento do fungo. Segundo KURTZMAN & ZADRAZIL (1984), os resíduos vegetais apresentam a maior quantidade de carbono nos polissacarídeos e na lignina da parede celular e essa quantidade varia em função do tipo de substrato. Na medida em que o carbono é retirado dos compostos vai sendo metabolizado pelo fungo que o libera, posteriormente, na forma de CO<sub>2</sub>, em proporções equivalentes a 50% do peso do substrato.

A madeira, substrato natural de crescimento de fungo de podridão branca, não apresenta elevados teores de nitrogênio, o que leva a presumir que suas exigências em relação a esse nutriente não sejam muito elevadas. No entanto, o nitrogênio é um fator de crescimento muito importante para todos os organismos, estando envolvidos na degradação de ácidos nucleicos e proteínas KURTZMAN & ZADRAZIL (1984). Segundo MAZIERO (1990), o excesso de nitrogênio inibe a degradação da lignina, retardando ou até cessando o crescimento micelial.

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Considerando os resultados obtidos durante a condução dos experimentos deste trabalho, pode-se concluir que:

Na fermentação submersa (meio líquido), *P. tricholoma* mostrou produção de biomassa muito superior (12 vezes) ao obtido para *P. tenuiculus*, porém a atividade de xilanase foi similar em ambos os fungos.

Com relação a fermentação sólida, a balsa mediana de palmito demonstrou potencial como substrato para o crescimento micelial dos fungos *P. tricholoma* e *P. tenuiculus*.

Em meio sólido o fungo *P. tricholoma*, também apresentou maior velocidade de crescimento micelial em relação ao *P. tenuiculus* em todos os tratamentos avaliados no ensaio II. Nos tratamentos testados o comprimento do micélio alcançou 10 cm e, quanto maior a relação C:N nos meios, menor foi a velocidade de crescimento.

As atividades enzimáticas de xilanase nos meios de cultivo do sistema sólido apresentaram valores máximos, nos primeiros intervalos de tempo, para ambos os fungos. *P. tenuiculus*, embora tenha mostrado menor velocidade de crescimento, apresentou atividades hidrolíticas superiores em todos os tratamentos. Nos ensaios com maior concentração de bagaço de mandioca, constatou-se que não houve grandes variações da atividade de xilanase ao longo do tempo para o fungo *P. tricholoma*. O mesmo não aconteceu nos cultivos com *P. tenuiculus*, cuja atividade de xilanase foi decrescente ao longo do cultivo. O mesmo foi observado para as atividades de carboximetilcelulase e avicelase. Para estas enzimas a atividade enzimática foi inferior do que a atividade da enzima xilanase, mostrando que, proporcionalmente à produção de xilanase, a indução das celulases foi pequena.

Com os resultados obtidos neste trabalho, sugere-se investigar o metabolismo de *P. tenuiculus*, devido a sua capacidade de produzir atividade enzimática superior em relação ao outro fungo do mesmo gênero.

Deve-se dar continuidade aos estudos, visando a ampliação de escala de produção de enzimas hidrolíticas utilizando reatores de coluna.

Sugere-se também ampliação dos estudos com o resíduo do processamento do palmito com outra suplementação nutricional, uma vez que os fungos *P. tricholoma* e *P. tenuiculus* se adaptaram facilmente a esse substrato.

Pesquisas sobre a obtenção de enzimas oxidativas devem ser estimuladas com estes fungos uma vez que os mesmos causam a podridão branca da madeira.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABARCA, C. D. G. **Agroindústria e meio ambiente na experiência brasileira**. COPPE/UFRJ, 1999. Disponível em: <http://www.produto.ufrj.br/abepro/enegep96/2/a>. Acesso em: 10/09/2003.

ANDRADE, A. M., NUNES, W. H., ABREU, H. S., SOUSA E.L. Polpação Kraft do estipe de *Euterpe edulis* Martius (Palmitreiro). **Floresta e Ambiente**, v. 07, n. 01p. 227 – 237, jan/dez. 2000.

BANO, Z., RAJARATHNAM, S., NAGARAJA, N. **Some aspects on the cultivation of *Pleurotus flabellatus* in Índia**. Mushroom Science X (Part II) Proceedings of the Tenth International Congress on the Science and cultivation of Edible Fungi. França. P. 597-608, 1987.

BAILEY, M.J., BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratoy Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity. **Journal of Biotechnology**. n.23, p. 257 – 270, 1992.

BARBOSA, M. C. S.; SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; TODESCHINI, M. L.; TONIAL, T.; FLORES V. **Prospect for producion of *Pleurotus sajor – caju* ro cassava fibrous waste . advances in Solid state Fermentation FMS – 97**. Montpellier, France: Edites By ROUSSOUS, S; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT and VINIEGRA - , G. Kluwer Academic Publishers

BARONI, P. *Polyporus tricholoma* Mont., 1998. Endereço Eletrônico: <http://www.cortland.edu/nsf/8426poly.HTML>. Acesso em 22/02/2004.

BECK, C. I., SCOTT,D. Enzymes in Foods - for Better or Worse. **Adv. Chem. Ser.** 136: 1, 1974.

BEGUIN, P .E., HUBERT, J. P. The Biological Degradation of Cellulose. **Fems Microbiol Rev**, v. 13, p. 25 – 28, 1994.

BEGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 219 – 248, 1990.

BELLO, C.V.V. **ZERI: Uma proposta para o Desenvolvimento Sustentável, com enfoque na qualidade ambiental voltada ao setor industrial**. 1998. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.

BHAT, M. K., BHAT, S. Cellulose degradating enzymes and their Potencial Industrial Application. **Biotechnol adv**, v.15, n 3-4, p. 586 – 620,1997.

BIELY, P., Microbial Xylanolitic **Systems. Trends in Biotechnology**, 3: 286-295,1985.

BIELY, P., Biotechnological potencial and production of xylanolytic systems free of cellulases. **ACS Symp. Ser.** 460: 408,1991.

BITTENCOURT, L. R. SILVEIRA, M. M. DILLON, J. P. Produção de celulasas de *Penicillium echinulatum* em cultivos submersos contendo sorbitol ou glicerol. In: **SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA**, 5., 2002, Brasília (DF). **Anais..** Brasília (DF), 2002.

BLANCHETTE, R. A. Degradation of the lignocellulose complex in wood. **Can. J. Bot.**, v. 73 (suppl. 1), p. 999 – 1010, 1995.

BOVI, M. L. A. Cultivo da Palmeira Real Australiana Visando a Produção de Palmito. Instituto Agrônômico. **Boletim Técnico**, 172.1998. Campinas.

BRAMORSKI, A. **Caracterização do crescimento e produção de metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agroindustriais**, 1997, Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

BRIZUELA, M. A.; GARCIA, L., PEREZ,L., MANSUR, M. .Basidiomicetos: nueva fonte de metabólitos secundários. **Revista Iberoamericana de micologia**. n.15, p. 69-74, 1998.

BUSWELL, J. A., CAI,Y.J., CHANG,S.T.,PEBERDY, J.F.,FU, S.Y.,YU,H. S.Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, n. 12: p. 537 – 542, 1998.

BUSWELL, J. A., CAI, Y., CHANG,S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and lacase procustion by *lentinula (Lentinus) edodes*. Fems Microb Lett, v. 128, p. 81-88, 1995.

CABRERA, G. M., ROBERTI, M.J., WRIGHT, J,E., SELDES, A. M. Cryptoporic and isocryptoporic acids from the fulgal cultures of *Polyporus arcularius* and *P. ciliatus*. **Phytochemistry**, n.61: p. 189-193, 2002.

CEPA/SC – Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina, 2003. Endereço Eletrônico: <http://www.icepa.com.br>. Acesso em 02/12/2004.

DARE, P. H., CLARK, T. A., CHU-CHOU, M. Consumption of substrate components by de cultivated mushroom *Lentinula edodes* during growth and fruiting on softwood and hardwood-based media. Process Biochem. p. 156 – 160, 1988.

DEY,S.;MAITI, T.K.; BHATTACHARYA, B.C. Production of some extracelular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Polyporus ostreiformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.11, p. 4216-4218,1994.

DOELLE, H. W. Joint venture capital investment for clean technologies and their problems in developing countries. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. n.12: p. 445 – 450, 1996.

DURAN, N.; ESPOSITO E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos. In: MELO I. S.; AZEVEDO J. L., eds. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa – CNPMA. 1997. 440 p..

DURRANT, L. R., SILVA E. R., VICENTE, N. E. V., RANZANI, M. R. T. C., Produção de Resíduos Agroindustriais por lignocelulases fúngicas. 5., 2002, Brasília (DF). **Anais**.. Brasília (DF), 2002.

FANTINI, A. C.; RIBEIRO, R. J.; GURIES, R. P. Produção de Palmito (*Euterpe edulis*) Martius – (Arecaceae) na Floresta Ombrófila Densa: Potencial Problemas e possíveis soluções. Itajaí, 2000. Editores: Maurício Sedrez dos Reis & Ademir Reis. **Euterpe edulis Martius – (Palmitreiro) Biologia, Conservação e Manejo**. Herbário Barbosa Rodrigues.

FIDALGO, O. FIDALGO, M. E. **Dicionário Micológico**, v 2, São Paulo: Instituto de Botânica, 1967, 23.

GEZER, E. D., YILDIZ, S., YILDIZ, U. D.; TEMIZ, A. Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. **Process Biochem**, v. 38, p. 301-306, 2002.

GILKES, N. R., LANGSFORD, M. L.; KILBURN, D. G.; MILLER, R. C. Jr.; WARREM, R. A. J. Mode of action and substrate specificities of cellulases from cloned bacterial genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 16, p. 10455-10459, 1991.

HALTRICH, D., NIDETZKY, B., KULBE, K. D., STEINER, W., ZUPANCIC, S. Production of Fungal Xylanases. **Bioresource Technology**. V. 58 p. 137 – 161, 1996.

HUEBLIN, H., J., **Modelo para a aplicação da metodologia ZERI sistema de aproveitamento integral da biomassa de árvores de reflorestamento**. 2001, p. dissertação (Mestrado em Tecnologia). - Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná, Curitiba, 2001.

KADOWAKI, M. K., PACHECO, M. A. C., PERALTA, R. M. Xylanase Production by *Aspergillus isolates* Grown on Com Cob. **Revista de Microbiologia**. V. 26, n. 3, p. 219-223, 1995.

KEREM, Z., FRIESEM, D., HADAR, Y. Lignocelullose Degradation During Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 58,n.4, p.1121-1127, 1992.

KIRK, P.M. et al. **Dictionary of the fungi**. 9. ed. Netherlands: CAB International, 2001. 624p.

KOLICHESKI, M. B. **Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido Utilizando como Substrato Bagaço de Maça**. 1995, 115 f. Dissertação de Mestrado– Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

KOTHS, K.; HALENBECK, R.; MORELAND, M. Synthesis of the antibiotic cortalcerone from d-glucose using pyranose 2-oxidase and a novel fungal enzyme, aldose-2-ulose dehydratase. **Carbohydrate Research**, v. 232, p.59-75, 1992.

KOTTERMAN, M.; HEESSELS, E. JONG & J. A. FIELD. The physiology of anthracene biodegradation by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 179-186. 1994.

KUES, U., LIU, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 141-152. 2000.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology**, v. 23, p. 411-456. 1999.

KURTZMAN, JR.R.H. & ZADRAZIL, F. **Physiological and taxonomic considerations for cultivation of *Pleurotus mushrooms***. Em Tropical Mushrooms, Hong Kong. The Chinese Univ. Press., Chang, S. T.& Quimio, T. H. 493 p.1984.

LACAZ, C. S., MINANI, P. F., PURSHIO, A. O grande mundo dos fungos. Ed. Universidade de São Paulo. 248 p. 1970.

LIEBL, M., VIEIRA, G.R.T., TAVARES, L. B. B. Atividade antibacteriana em extratos de fungos do gênero *Polyporus*. Dados não publicados. (2004).

LIMA, L.R.; MARCONDES, A. A. **Farinha de Palmito**. Projeto apresentado a EPAGRI/ Estação experimental de Itajaí (SC). 2002.

LINKO, M. POUTANEN, K., VIKARI, L. New developments in the application of enzymes for biomass processing. In: Enzymes systems for lignocellulose degradation. Coughlan, M. P., Ed. **Elsevier Applied Science**. London. 331 p., 1989.

LOGUERCIO LEITE, C. El género *Polyporus* (Polyporaceae) em la isla de Santa Catarina, Santa Catarina, Brazil. **Boletín Soc. Argentina de Botánica**, v. 28, p. 27 – 36, 1992.

LOGUERCIO LEITE, C. Contribution to a Biogeographical study of the Austroamerican xylophilous polypores (Aphylophorales) from Santa Catarina Island, SC., Brazil. **Mycotaxon**. v. XLI (1), p. 161 – 166, 1991.

LOGUERCIO LEITE, C. Revisão histórica sobre fungos Poliporóides (Aphylophorales) xilófilos de Santa Catarina, Brasil. **Insula**. n. 20, p. 3 -10, 1990.

LOPEZ, J.L.C. et al. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients of growth and metabolic production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 270-277, 2003.

LONSANE, B.K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentations. *Enzyme and Microbial technology*, 7:258:265, 1985.

LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, M. Y.; MADDOX, I.S.; BROOKS, J. D. Application of a multi-layer packed-bed reactor to citric acid production in solid state fermentation Systems: a review. *Process Biochemistry*, 33 (2): 117-123, 1998.

MAIORANO, A. E. **Produção de Pectinase por Fermentação em Estado Sólido.** 1990, 262 f. Tese . – Universidade de São Paulo. Escola Politécnica, São Paulo, 1990.

MATSUMOTO, T. Changes in activities of carbohydrases, phosphorylase, proteinases and phenol oxidases during fruiting of *Lentinula edodes* in sawdust cultures. *Tottori Mycological Institute*, v.26, p.46-54, 1988.

MAZIERO, R. **Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus spp.*** Dissertação de Mestrado, USP, São Paulo, 136p. 1990.

McCLEARY, B. V. Enzymatic modification of plant polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 8: 349, 1986.

MENEZES, T.J. B. ;HENNIES, P. T. Sistema Celulolítico de *Aspergillus niger* em Substrato Sólido de Bagaço de Cana de Açúcar Tratado. **Coletânea ITAL**, 24 (1): 61-74, 1994.

MILAGRES, A. M. F., SALES, R. M. Evaluating the basidiomycetes *Poria medula panis* and *Wolfiporia cocos* for xylanase production. **Enzyme and microbial technology**, n.28: p. 522-526, 2001.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagente for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n.3, p. 426- 428,1959.

MISHRA, C., LEATHAM, G. F. Recovery and Fractionation of the Extracellular Degradative Enzymes from *Lentinula edodes* Cultures Cultivated on a Solid Lignocellulosic Substrate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 69, n.1, p.8-15, 1990.

MITCHELL, D. A., LONSANE, B. K., Solid Substrate Cultivation. **Elsevier Applied Science**, London, p.1-16, 1992.

MITTIDIARI, S. SCHRANK, A. VAINSTEIN, M. H., Produção de Enzimas Hidrolíticas para Formulação de Detergentes Biodegradáveis. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. , 5., 2002, Brasília (DF). **Anais**. Brasília (DF), 2002.

NIGN,P. ,SINGH, D. Solid-State (substrate) Fermentation System and their Applications in Biotechnology. **Journal Basic Microbiology**. v. 34, n.6, p.405-423, 1994.

NOKES, S. E., RIDDER, E.R.; KNUTSON, B.L. Production of Hemicellulolytic enzymes (Xilanases) using solid state Fermentation of *Trichoderma longibrachiatm*, 1997. Disponível em: < <http://asae.org./meetings/am97/abstracts/975081.html>>. Acesso em:20/08/2004.

NUNES, M.; RYVARDEN, L. **Polyporus (Basidiomycotina) and related genera**. Oslo: Groenland Grafic, 1995, 85p.

NOPHARATANA, M. **Mass Transfer in Solid State Fermentation at Microscopic Level**. 1998. Disponível em: <<http://student.uq.edu.au/~s190821/work.html>>. Acesso em: 10/09/2003.

PALMA, M. B., **Produção de Xilanases em *Thermoascus aurantiascus* Cultivo em Meio Sólido**. 2003, Tese - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PAULI, G. **Upzing**. Porto Alegre: L&PM, 1998.

PAULI, G. Upzing, How to create more income, creae more jobs and eliminate pollution. **Special advanced edition for the Third World Congress on Zero Emissions**. 1997.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C. R., NIGAM, P. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 1, jul, p. 149-162,1999.

PAULILO, M. T. S. Ecofisiologia de plântulas e plantas jovens de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaeae): Comportamento em relação à variação de radiação solar. Itajaí , 2000. Editores: Maurício Sedrez dos Reis & Ademir Reis. ***Euterpe edulis* Martius – (Palmitero) Biologia, Conservação e Manejo. Herbário Barbosa Rodrigues.**

PRADE, R. A. Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnology. Biotechnol Gen Eng Rev*, v. 13, p. 101-131,1995.

QUADROS, K. E. [*Euterpe edulis*]. Blumenau, il. color. 2003.

RAJARATHNAM,S.;SHASHIREKA, M. N. , BANO, Z. Biopotentialites of the basidiomacromycetes. ***Advances in Applied Microbiology***, v.37, p.223-361, 1992.

RAMANA, MURTHY, M.V., KARANTH, N, G., RAGHAVA RAO, K.S.M.S. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Fermentation. ***Advances in Applied Microbiology***. v.38,p.99-147, 1993.

RAVEN, P., EVERT, R., CURTIS, H. *Biology of Plants*. Traduzido por Patrícia Voyeux, Irene Rizzini, C. T. Rizzini, Vera L. B. de Souza, Beatriz Rizzini. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978.

RAYNER, A . D. M; BODDY,Fungal decomposition of wood, its biology and ecology. **John Wiley & Sons, Chichester etc.** 587 p. 1998.

REID, I. D. Biodegradation of lignin. ***Can. J. Bot.*** 73 (Suppl. 1): 1011-1018. 1995.

REIS, M. S. GUERRA, M.P. NODARI, R.O. RIBEIRO R. J., REIS A. Distribuição Geográfica e Situação Atual das Populações na Área de Ocorrência de *Euterpe edulis Martius*. **Revista Sellowia**. N.49-52, p. 324 – 335,2000.

ROSSI, I. H. **Suplementação de bagaço de cana para cultivo axênico do cogumelo Shiitake [*Lentinula edodes (Berk.) Pegler*]**. 1999. 120p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1999.

SALLES, L. S. **Elementos para o Planejamento Ambiental do Complexo Agroindustrial Sucroalcooleiro no Estado de São Paulo: Conceitos, Aspectos e Métodos**. 1993. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

SANTOS, V.M. C. S. **Contribuição ao estudo da produção de *Pleurotus spp.* em resíduos lignocelulósicos**. Dissertação de Mestrado. 2000. 141p. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

SANTOS, F. & TAVARES, L. B. B. **Resíduo do processamento do palmito como substrato para caracterização biológica e frutificação de fungos basidiomycetes**. Anais do III Fórum Anual de Iniciação Científica (FAIC). Universidade Regional de Blumenau, 2004.

SAUCEDO-CASTANEDA, G. Controle du Metabolisme de Schwanniomyces Castelli Cultive sur Support Solid. Montpellier, These, (Doctorat). Université Montpellier II. 1991. 212p

SERMANNI, G. G.; PORRI, A. **The potentiality of solid state biotransformation of lignocellulosic materials**. Chimica oggi. Março: 15 – 19, 1989.

SILVA, E. M. DA. **Análise do crescimento Micelial e das atividades lignocelulolíticas produzidas durante o cultivo de *Lentinula edodes* em resíduo de *Eucalyptus saligna***. 2003. 81 p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2003.

SILVA, E. M; MILAGRES, A. D. Estudo das atividades de Mn peroxidase produzida durante degradação de resíduos agroindustriais por *Lentinula edodes*. Anais do VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa. Universidade Estadual de Maringá. 2002.

SMÂNIA, E. F. A; A. SMÂNIA ; C. LOGUERCIO-LEITE; GIL M. L. Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 70, p. 57-59. . 1997.

SOCCOL, C. R. **Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e basidiomacomicetos do gênero *Pleurotus***. 1994. 228 p. Tese, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1994.

SMITS, J. P., RINZEMA, A. TRAMPER,J.,VAN SONSBECK, H.M.,HAGE, J.C.,KAYNAK, A., KNOL,W.The influence of Temperature on Kinetics in Solid State Fermentation. **Enzyme and Microbial Tecnology**. V. 22, p.50 57,1998.

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

TANAKA, T.; TANIGUCHI, M. A; MATSUMO, R.; KAMIKUBO, T. Purification and properties of cellulases from *Eupenicillium javanicum*. **Journal Fermentation Technology**, 59 (3): 177-183,1981.

TAVARES, Lorena Benathar Ballod. Proposta de Geração de Trabalho e Renda para a Agricultura Familiar Catarinense por meio da Produção de Cogumelos Nativos. **Relatório de projeto de pesquisa**, Blumenau, 2003. 1 CD-ROM.

TAVARES, V.B., GOMES, E., SILVA, R. Characterization of a Cellulase-Free Xylanase Producing *Bacillus* sp. For Biobleaching of Kraft Pulp. **Revista de Microbiologia**. V. 28, p. 179 – 182, 1997.

TEIXEIRA, D. E., COSTA, A. F., SANTANA, M. A. E. Aglomerados de bagaço de cana-de-açúcar: resistência natural ao ataque de fungos apodrecedores. *Scientia Forestalis*.

V. 52, p.29-34, dez.1997.

TONINI, R. C. G.; **Utilização da Bainha Mediana de Palmito (*Euterpe edulis* Mart. – Arecaceae) como substrato para cultivo de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler**, 2004. 125p.; Dissertação de Mestrado. Faculdade Regional de Blumenau – FURB, Blumenau 2004.

URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.

VALCHEVA, E., VELEVA, S., VALCHEV, I., DIMITROV, I. **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, 71(2): 231-238.2000.

VIEIRA, G. R. T.; **Estudo das condições de cultivo “in vitro” de *Polyporus tricholoma* Mont para incrementar a produção de substâncias antibacterianas**. 2005. 121p.; Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2005.

VIIKARI, L., KANTELINEN, A., SUNDQUIST, J., LINKO, M. Xylanases in bleaching: From na idea to the industry. **FEMS microbial. Rev.** 13: 335-350, 1994.

WASSER, P. S.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.1, p.31-62, 1999.

WULFF, N.A., **Caracterização Enzimática das Celulases XF-810, XF-818 e XF-2708 de *Xylella fastidiosa* e purificação da proteína XF-818 expressos em *Escherichia coli***. 2002 Tese - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo 2002.

ZADRAZIL, F., BRUNNERT, H. Solid State Fermentation of Lignocellulose Containing Plant Residues with *Sporotrichum pulverulentum* Nov. And *Dichomitus squalens* (Karst.) Reid. **European J. Applied Microbiology Biotechnonology**. v. 16, p.45-51, 1982.

ZADRAZIL, F. & KURTZMAN, JR.R.H. **The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics** em Chang, S. T.& Quimio, T. H. Tropical Mushrooms, Hong Kong, the Chinese Univ. Press. 493 p. 227-278.1982.

ZJAWIONY, J. K. Biological active compounds from Aphyllophorales (Polypore) fungi. **Journal of Natural Products**. V.61, p.1053-1071, 2003.

## APÊNDICE

### Grupo I: Ensaios em Meio Líquido

O presente ensaio teve por finalidade estabelecer a produção de biomassa e a atividade enzimática de xilanase e carboximetilcelulase em fermentação submersa.

**Tabela A1** - Valores de produção de biomassa e consumo de glicose em fermentação submersa.

Tempo (dia)	Produção de Biomassa		Consumo de Glicose	
	<i>P. tricholoma</i>	<i>P.tenuiculus</i>	<i>P. tricholoma</i>	<i>P.tenuiculus</i>
0	0,20	0,24	19,48	21,50
3	0,19	0,17	15,84	17,47
5	0,65	0,32	15,24	17,158
7	2,78	0,34	12,54	15,216
10	4,78	0,47	10,35	12,30
12	5,94	0,47	7,18	10,45

**Tabela A2** - Valores de atividade de Xilanase e Carboximetilcelulase em fermentação submersa.

Tempo (dia)	Atividade de Xilanase		Atividade de Carboximetilcelulase	
	<i>P. tricholoma</i>	<i>P.tenuiculus</i>	<i>P. tricholoma</i>	<i>P.tenuiculus</i>
3	16,41	18,28	10,09	9,18
5	13,52	12,09	31,34	29,42
7	204,96	224,85	25,51	30,79
10	125,43	133,27	23,27	29,42
12	94,16	109,46	15,71	28,21

## Grupo II: Ensaios em Meio Sólido em Tubos

Este ensaio teve por objetivo acompanhar a cinética de crescimento micelial em fermentação sólida com diferentes suplementações de resíduos agroindustriais.

**Tabela A3** – Valores médios obtidos em cm (dia) nas leituras de crescimento micelial do fungo *P. tricholoma* nos 12 tratamentos, em fermentação sólida em 18 dias de cultivo.

Tempo (dia)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,0	1,6	2,5	2,1	0,0	1,9	1,9	2,4	1,0	1,5	1,8	2,1
6	2,5	2,7	3,0	3,0	2,8	2,6	2,8	3,0	3,1	2,7	2,6	2,8
8	3,5	4,0	4,5	4,4	3,6	3,8	4,1	4,2	4,3	4,4	3,9	4,3
10	4,5	5,1	5,6	5,7	4,9	5,0	5,3	5,5	5,2	5,6	4,9	5,4
12	5,2	6,3	6,5	6,7	5,8	5,7	6,4	6,6	6,6	6,5	6,0	6,5
14	6,0	7,0	7,6	7,8	6,6	6,6	7,3	7,5	7,4	8,1	7,1	7,7
16	7,3	8,3	9,3	9,1	7,9	7,9	8,5	9,1	8,4	9,4	8,6	9,3
18	8,3	9,4	9,9	10,0	9,0	9,6	10,0	10,0	9,8	9,8	9,5	9,5

**Tabela A4** – Valores obtidos em cm nas leituras de crescimento micelial do fungo *P. tenuiculus* nos 12 tratamentos, em fermentação sólida em 18 dias de cultivo.

Tempo (dia)	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,5
6	0,3	0,2	0,6	0,3	0,2	0,2	0,2	0,5	0,3	0,3	0,4	0,4
8	0,7	1,0	1,2	0,9	0,2	1,1	0,8	1,1	1,1	1,2	1,3	1,3
10	1,4	1,9	1,9	2,8	1,2	2,0	1,2	2,2	1,6	1,9	2,1	2,4
12	1,6	2,7	2,5	2,9	1,7	2,7	2,3	2,9	2,0	2,5	2,6	2,8
14	2,3	3,5	3,4	3,5	2,1	3,8	2,9	3,8	2,6	3,3	3,2	3,8
16	2,8	4,6	4,6	4,8	3,3	4,7	4,1	5,2	3,6	4,4	4,4	4,6
18	3,4	5,5	5,4	5,5	4,0	5,7	4,9	6,1	4,4	5,1	5,4	5,9

**Tabela A5** - Média total da velocidade de comprimento micelial dos fungos nos tratamentos utilizados na fermentação sólida.

Tratamentos	<i>P. tricholoma</i>	<i>P. tenuiculus</i>
1	3,7	1,2
2	4,4	1,9
3	4,9	2,0
4	4,9	2,1
5	4,1	1,3
6	4,3	2,0
7	4,6	1,6
8	4,8	2,2
9	4,6	1,6
10	4,8	1,9
11	4,4	2,0
12	4,7	2,2

**Tabela A6** - Velocidade média de comprimento micelial ao dia dos fungos nos tratamentos utilizados na fermentação sólida.

Tratamentos	<i>P. tricholoma</i> (cm)	<i>P. tenuiculus</i> (cm)
1	0,5	0,2
2	0,5	0,3
3	0,6	0,3
4	0,6	0,3
5	0,5	0,2
6	0,6	0,3
7	0,6	0,3
8	0,6	0,3
9	0,5	0,2
10	0,5	0,3
11	0,5	0,3
12	0,5	0,3

### GRUPO III: Ensaios em Fermentação Sólida em Frascos

Este ensaio teve por objetivo a produção das enzimas: xilanase, carboximetilcelulase e avicelase, bem como a análise das proteínas, determinação da umidade e pH dos meios, foram analisados, comparativamente aos 12 tratamentos pesquisados e os dois fungos estudados nesta pesquisa.

**Tabela A7** – Valores médios de atividade de xilanase (U/g) de *P. tricholoma* nos 12 tratamentos em 6 intervalos de tempo.

Intervalos de Tempo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
1	92,7	106,7	92,6	90,5	90,9	86,6	97,3	90,5	103,8	102,2	98,2	99,2
2	88,1	12,03	93,9	83,7	117,8	81,2	92,3	84,0	74,1	65,9	62,5	68,1
3	74,6	86,6	76,4	67,1	48,3	35,6	49,1	29,0	56,6	68,0	52,6	68,9
4	80,4	87,2	81,8	87,2	90,5	91,5	87,0	88,7	59,3	66,0	73,7	86,3
5	50,3	53,9	70,5	66,6	59,6	64,8	69,6	81,1	50,2	62,9	62,4	70,4
6	90,0	98,3	106,7	91,7	35,7	33,0	49,8	46,9	62,1	62,7	69,1	73,3

**Tabela A8** – Valores médios obtidos de atividade específica de xilanase (U/g de proteína) nas fermentações dos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P. tricholoma*.

Intervalos de Tempo	T1	T2	T3	T4	T5	T7	T8	T9	T10	T11	T12
1	1,0	0,9	1,1	0,6	0,9	1,0	0,8	0,7	0,7	0,6	0,6
2	1,0	1,2	0,9	0,8	1,2	1,2	0,8	0,6	0,5	0,5	0,5
3	0,8	0,7	0,8	0,6	0,5	0,4	0,3	0,5	0,5	0,4	0,5
4	1,0	0,9	0,7	0,9	1,2	1,0	0,9	0,5	0,7	0,6	0,6
5	0,5	0,5	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5
6	1,0	1,0	1,0	0,6	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4

**Tabela A9** – Valores médios obtidos de produtividade máxima de xilanase (U/g.dia) nas fermentações dos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P. tricholoma*.

T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
9,3	10,7	9,3	9,1	9,1	8,7	9,7	9,1	10,4	10,2	9,8	9,9

**Tabela A10** – Valores médios de atividade de xilanase (U/g) de *P. tenuiculus* nos 12 tratamentos em 6 intervalos de tempo.

Intervalos de Tempo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
1	186,0	197,4	169,9	183,3	165,0	138,6	142,4	130,1	111,1	125,9	125,9	73,5
2	151,5	135,5	130,3	135,3	159,8	143,7	94,6	109,2	127,4	100,0	81,9	70,7
3	156,4	110,7	112,3	100,0	133,9	91,6	85,1	86,4	95,4	94,1	89,8	49,7
4	164,1	139,1	112,7	99,8	125,2	71,6	71,6	67,3	75,6	78,0	66,5	49,0
5	147,3	127,8	122,5	110,6	140,8	78,9	97,2	86,7	79,0	50,6	62,9	43,3
6	103,9	74,2	76,0	83,3	125,7	55,8	57,9	53,7	51,9	55,6	70,1	44,9

**Tabela A11** – Valores médios obtidos de atividade específica de xilanase (U/g de proteína) nas fermentações dos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P.tenuiculus*

Intervalos de Tempo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
1	1,8	1,7	1,8	1,4	1,1	1,1	1,1	1,0	1,0	0,9	0,9	0,6
2	0,9	0,8	0,8	0,6	0,9	1,0	0,6	0,7	0,8	0,7	0,5	0,5
3	1,2	1,0	1,0	0,8	1,0	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,3
4	1,1	0,8	0,7	0,7	0,9	0,6	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,4
5	1,5	1,3	1,3	1,0	1,5	0,8	1,0	0,9	0,8	0,4	0,5	0,3
6	1,9	1,2	1,4	1,3	1,1	0,8	0,7	0,6	0,6	0,6	0,7	0,3

**Tabela A12** – Valores médios obtidos de produtividade máxima de xilanase (U/g.dia) nas fermentações dos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P.tenuiculus*.

T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
9,3	9,9	8,5	9,2	8,2	6,9	7,1	6,5	5,5	6,3	6,3	3,7

**Tabela A13** – Valores médios de atividade de carboximetilcelulase (U/g) de *P. tricholoma* nos 12 tratamentos em 6 intervalos de tempo.

Intervalos de Tempo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
1	3,4	2,5	3,3	4,1	3,6	3,8	4,4	4,2	5,3	6,1	5,3	6,1
2	3,3	5,8	5,5	3,8	4,8	4,3	3,7	3,3	2,3	2,1	1,8	3,2
3	1,7	2,0	3,2	1,9	2,5	2,1	2,5	2	1,7	2,3	2,1	3,2
4	2,5	1,9	1,6	1,9	2,1	2	2,3	2,8	2,8	3	4,3	6,1
5	1,4	1,6	2,6	1,9	1,9	2,1	3	4,5	3,3	3,7	3,8	3,9
6	2,3	4,3	5,5	5	3,1	2,8	3,8	4,4	3,6	3,6	3,3	4,5

**Tabela A14** – Valores médios obtidos de produtividade máxima de carboximetilcelulase (U/g.dia) nas fermentações dos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P.tricholoma*.

T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,6	0,5	0,6

**Tabela A15** – Valores médios de atividade de carboximetilcelulase (U/g) de *P. tenuiculus* nos 12 tratamentos em 6 intervalos de tempo.

Intervalos de Tempo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
1	9,4	11,1	11,6	11,5	9,8	11,2	7,8	8,3	5,7	6,8	7,9	4,2
2	8,1	8,1	6,5	7,6	8,2	8,7	6	5,6	7,3	6,1	4,8	3,4
3	7,5	3,7	4,7	3,4	6,4	2,9	3,7	4,1	4,7	4,3	4,9	4
4	9,4	6,8	3,7	3,9	5,8	4,2	4	3,6	4,4	4,2	3,6	4,6
5	5,6	4,6	4,2	3,8	6,7	2,5	3,2	3,1	4,7	3,1	3,5	4,4
6	4,3	3,6	3,5	4,4	7	2,9	3,5	4,3	4	3,1	4,3	5

**Tabela A16** – Valores médios obtidos de produtividade máxima de carboximetilcelulase (U/g.dia) nas fermentações dos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P.tenuiculus*.

T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
0,5	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,2

**Tabela A17** – Valores médios de atividade de Avicelase (U/g) de *P. tricholoma* nos 12 tratamentos em 6 intervalos de tempo.

Intervalo de Tempo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
1	4,2	3,4	5,3	3,5	4,7	5,1	4,4	4,5	10,5	9,5	8,1	7,7
2	7,9	12,1	9,1	8,6	5,7	4,7	5,5	4,4	8,4	10,7	20,6	16,4
3	15,3	13,6	11,2	10,6	8,5	9,8	11,5	10,9	4,1	7,9	6,9	5,2
4	7,9	9,0	7,2	6,3	8,5	7,9	8,1	6,5	7,4	6,7	7,3	8,1
5	6,8	6,6	5,6	4,2	6,6	6,5	7,0	9,4	5,2	5,1	4,8	5,2
6	10,6	10,0	10,3	10,9	11,5	9,1	8,6	7,0	6,5	6,9	7,1	8,4

**Tabela A18** – Valores médios obtidos da produtividade máxima de avicelase (U/g.dia) nas fermentações dos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P. tricholoma*.

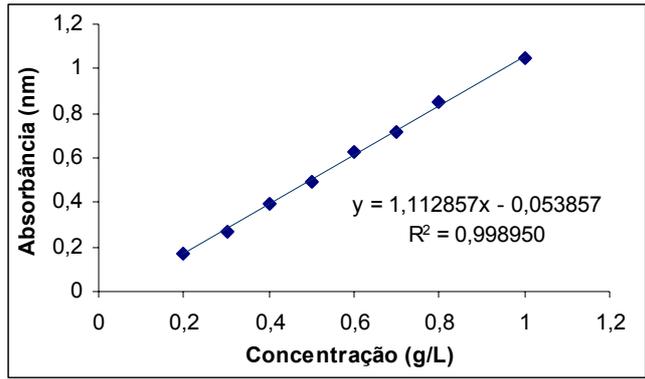
T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
0,8	0,8	0,6	0,6	0,5	0,5	0,6	0,5	1,0	0,9	1,4	1,1

**Tabela A19** – Valores médios de atividade de Avicelase (U/g) de *P. tenuiculus* nos 12 tratamentos em 6 intervalos de tempo.

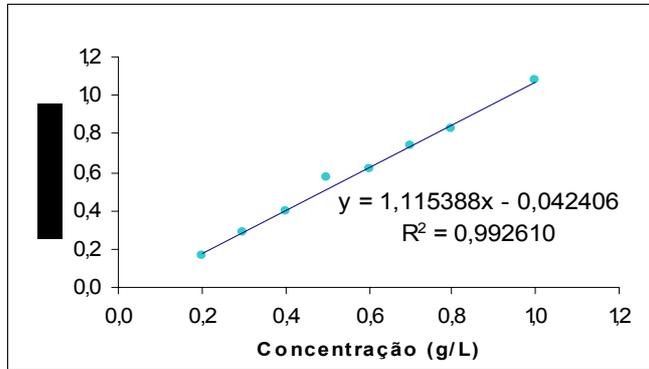
Intervalo de Tempo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
1	19,0	17,7	14,4	11,1	12,1	13,3	11	11,2	10,1	8,5	8,8	7,2
2	21,2	15,8	16,2	16,4	21,6	14,0	9,1	7,8	8,2	5,9	5,3	5,2
3	9,9	5,9	13,9	16,3	20,3	10,0	7,8	8,2	6,8	9,7	7,6	8,4
4	11,9	8,5	5,8	4,8	6,1	4,6	5	8,9	8,4	5,7	5,0	7,2
5	10,5	8,8	8,4	8,3	8,6	10,2	8,8	7,6	7,3	5,8	6,5	7,7
6	16,9	14,1	13,5	8,7	10,0	8,4	5,9	5,8	5,7	4,8	5,1	6,7

**Tabela A20** – Valores médios obtidos de produtividade máxima de avicelase (U/g.dia) nas fermentações dos tratamentos T1 ao T12 para o fungo *P. tenuiculus*.

T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
0,9	0,9	0,7	0,7	0,8	0,7	0,5	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4



**Figura A1** – Curva Padrão de Glicose



**Figura A2** – Curva Padrão de Xilose