

Ana Paula de Aguiar

**SELEÇÃO DE ESPÉCIES DE BASIDIOMICETOS
PRODUTORAS DE LIGNINASES PARA
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DAS ENZIMAS
SOBRE CORANTES AROMÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São
José do Rio Preto, como requisito para obtenção do
título de mestre em Engenharia de Alimentos (Área
de concentração Ciência e Tecnologia de
Alimentos).

Orientadora: Prof^a Dr^a Eleni Gomes

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Boscolo

São José do Rio Preto, SP

Junho/2006

Ana Paula de Aguiar

**SELEÇÃO DE ESPÉCIES DE BASIDIOMICETOS
PRODUTORAS DE LIGNINASES PARA
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DAS ENZIMAS
SOBRE CORANTES AROMÁTICOS**

**BANCA EXAMINADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE**

Profa. Dra. Eleni Gomes

Orientadora

Profa. Dra. Valquíria Barco Damiano

2º Examinador

Profa. Dra. Érika Barbosa Neves Graminha

3º Examinador

São José do Rio Preto, 30/06/2006

*Dedico a Deus e aos meus pais
Waldemar e Vera, que me
apoiaram em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, por me apoiarem em mais esta etapa, por acreditarem na minha capacidade, pelo suporte financeiro e por me amarem sempre.

À Profa. Dra. Eleni Gomes, por ter orientado este trabalho que muito contribuiu na minha formação, pela paciência e confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva, pelo esclarecimento de dúvidas e pela agradável convivência.

Ao meu irmão Rogério, pelo incentivo.

À Gisele, pela amizade e ajuda nos acabamentos dessa dissertação.

À Natália pela amizade e companheirismo.

À Heloisa, pela disponibilidade em me ajudar a resolver os problemas sempre com muita disposição e alegria

Aos meus companheiros de laboratório Alexandre, Aline, Ana Flávia, Andréia, Caio, Carol, Dênis, Eduardo, Èrika, Fabiana, Maira, Maricy, Marcelo, Patrícia, Paula, Viviane, Solange, Roberto, Rodrigo pelos agradáveis momentos de aprendizado e de risadas.

Aos funcionários do instituto pela ajuda e a atenção.

Aos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos vocês, muito obrigada!

RESUMO

A degradação da lignina ocorre através de um processo oxidativo que envolve enzimas extracelulares como as ligninases (MnP, LiP e lacase) produzidas, principalmente por fungos basidiomicetos. Os caminhos atuais da biotecnologia indicam que tais fungos denominados “de fungos de degradação branca” sejam eficientes na degradação de corantes sintéticos. Foram estudadas cinco linhagens de basidiomicetos quanto a produção das ligninases em de fermentação em estado sólido (FES). Todos os fungos analisados (*Inonotus rickii*, *Dacryopinax elegans*, *Pycnoporus sanguineus*, *Chaetocalathus liliputianus* e *Lentinus strigellus*) mostraram-se bons produtores de MnP. Nenhum dos microrganismos apresentaram níveis significantes de LiP. As espécies *L. strigellus* e *P. sanguineus* produziram quantidades consideráveis de lacase. Esses dois últimos fungos foram selecionados em função de sua capacidade de produção de MnP e lacase, e o farelo de trigo foi o melhor meio para a produção das duas enzimas. A MnP e lacase produzida tanto por *L. strigellus* quanto por *P. sanguineus* apresentaram pH ótimo ácido. A temperatura ótima para a MnP de ambos os fungos foi de 40°C. Para a lacase de *L. strigellus* a temperatura ótima ficou entre 50°C e 55°C, para a de *P. sanguineus* entre 60°C e 70°C. A MnP produzida pelos dois fungos mantiveram-se estável em toda a faixa de pH estudada. A lacase de *L. strigellus* apresentou estabilidade em pH 7,0 e a de *P. sanguineus*, 7,5. A temperatura de estabilidade para a MnP de *L. strigellus* ficou entre 15°C e 25°C e para a enzima de *P. sanguineus* entre 35°C e 45°C. Todos os corantes estudados sofreram descoloração por essas enzimas, especialmente o Laranja II (cerca de 74%), Azul Cibacron 3GA (cerca de 85%), Azul Brilhante Remazol R (cerca de 87%) e o Cristal Violeta (cerca de 65%).

ABSTRACT

Lignin degradation occurs through an oxidative process that involves extracellular enzymes such as ligninases (MnP, LiP and laccase) produced specially by basidiomycete fungi. Current biotechnological studies indicate that these fungi, known as “white rot fungi”, may be efficient on the degradation of synthetic dyes. Five strains of basidiomycetes were studied regarding the production of ligninases through solid state fermentation (SSF). All of the fungi tested (*Inonotus rickii*, *Dacryopinax elegans*, *Pycnoporus sanguineus*, *Chaetocalathus liliputianus* e *Lentinus strigellus*), proved to be good MnP producers. None of the microorganisms produced significant amounts of LiP. The species *L. strigellus* e *P. sanguineus* produced considerable amounts of laccase. These last two were selected due to their ability to produce MnP and laccase, and wheat bran was the best medium for the production of both enzymes. MnP and laccase from *L. strigellus* and *P. sanguineus* acted optimally in acid pH. Optimum temperature for MnP activity from both fungi was 40°C. Optimum temperature for laccase from *L. strigellus* was between 50°C e 55°C, and from *P. sanguineus* was between 60°C e 70°C. MnP from both fungi maintained stability through the whole pH range studied. Laccase from *L. strigellus* was stable in pH 7,0 and from *P. sanguineus* in pH 7,5. MnP from *L. strigellus* remained stable in temperatures between 15°C and 25°C and from *P. sanguineus* between 35°C e 45°C. The enzymes were effective in the decoloration of all the dyes tested, specially Orange II (approximately 74%), Cibacron Blue 3GA (approximately 85%), Remazol Brilliant Blue R (approximately 87%) and Crystal Violet (approximately 65%).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fenóis precursores da lignina.	3
Figura 2: Estrutura representativa da lignina	4
Figura 3: Ciclo catalítico genérico das Peroxidases.	12
Figura 4: Ciclo de oxidação catalítica da Lacase.....	13
Figura 5: Fórmula estrutural do corante Laranja II.....	36
Figura 6: Fórmula estrutural do corante Crisofenina.....	36
Figura 7: Fórmula estrutural do corante Vermelho Reativo 120.	37
Figura 8: Fórmula estrutural do corante Azul Cibacron 3GA.	37
Figura 9: Fórmula estrutural do corante RBBR.....	38
Figura 10: Fórmula estrutural do corante Cristal Violeta.	38
Figura 11: Fórmula estrutural do corante Azure B.	39
Figura 12: Fórmula estrutural do corante Azul de Metileno.....	39
Figura 13: Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de ligninases por <i>Inonotus rickii</i>	43
Figura 14: Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de ligninases por <i>Chaetocalathus liliputianus</i>	45
Figura 15: Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de ligninases por <i>Dacryopinax elegans</i>	47
Figura 16: Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de ligninases por <i>Lentinus strigellus</i>	48
Figura 17: Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de ligninases por <i>Pycnoporus sanguineus</i>	50
Figura 18: Produção de ligninases pelas cinco linhagens de basidiomicetos.	55
Figura 19: Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre a produção de ligninases pelo fungo <i>Lentinus strigellus</i>	57

Figura 20: Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre a produção de ligninases pelo fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	59
Figura 21: Efeito do pH sobre a atividade das ligninases produzidas por <i>Lentinus strigellus</i>	63
Figura 22: Efeito do pH sobre a atividade das ligninases produzidas por <i>Pycnoporus sanguineus</i>	65
Figura 23: Efeito da temperatura sobre a atividade das ligninases produzida por <i>Lentinus strigellus</i>	67
Figura 24: Efeito do pH sobre a atividade das ligninases produzidas por <i>Pycnoporus sanguineus</i>	68
Figura 25: Efeito do pH na estabilidade das ligninases produzidas por <i>Lentinus strigellus</i>	70
Figura 26: Efeito do pH na estabilidade das ligninases produzidas por <i>Pycnoporus sanguineus</i> .	71
Figura 27: Efeito da temperatura sobre a estabilidade das ligninases produzidas por <i>Lentinus strigellus</i>	73
Figura 28: Efeito da temperatura sobre a estabilidade das ligninases produzidas por <i>Pycnoporus sanguineus</i>	74
Figura 29: Relação entre a concentração e a absorbância dos corantes Laranja II e Crisofenina.	80
Figura 30: Relação entre a concentração e a absorbância dos corantes Reactive Red 120 e Azul Cibacron 3GA	81
Figura 31: Relação entre a concentração e a absorbância dos corantes Azul Brillhante Remazol R e Cristal Violeta.....	82
Figura 32: Relação entre a concentração e a absorbância dos corantes Azure B e Azul de Metileno.	83
Figura 33: Descoloração dos corantes Laranja II, Azul Cibacron 3 GA e RBBR.....	103
Figura 34: Descoloração dos corantes RBBR, Azul Cibacron 3GA e Cristal Violeta	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre os tipos de degradação.....	10
Tabela 2: Conversão da atividade de MnP em U/mL.....	51
Tabela 3: Resumo das características físico-químicas das ligninases.....	75
Tabela 4: Comprimento de onda (nm) de absorção máxima e concentração ótima dos corantes.....	79
Tabela 5: Atividade das ligninases MnP e lacase.....	84
Tabela 6: Taxa de descoloração do corante Laranja II.....	86
Tabela 7: Taxa de descoloração do corante Crisofenina.....	88
Tabela 8: Taxa de descoloração do corante Vermelho Reativo 120.....	90
Tabela 9: Taxa de descoloração do corante Azul Cibacron 3GA.....	92
Tabela 10: Taxa de descoloração do corante Azul Brilhante Remazol R.....	95
Tabela 11: Taxa de descoloração do corante Cristal Violeta.....	97
Tabela 12: Taxa de descoloração do corante Azure B.....	99
Tabela 13: Taxa de descoloração do corante Azul de Metileno.....	101
Tabela 14: Resumo dos melhores resultados de descoloração.....	102

SUMÁRIO

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	3
<i>1.1.1 Composição da madeira</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2 Decomposição da madeira</i>	<i>5</i>
1.1.2.1 Degradação branca	7
1.1.2.2 Degradação macia	8
1.1.2.3 Degradação marrom	9
<i>1.1.3 Mecanismo de ação das enzimas Ligninolíticas</i>	<i>10</i>
1.1.3.1 Manganês Peroxidase (MnP)	11
1.1.3.2 Lignina Peroxidase (LiP)	11
1.1.3.3. Lacase	13
<i>1.1.4 Produção de ligninases por fermentação em estado sólido (FES)</i>	<i>14</i>
<i>1.1.5 Características físico-química das ligninases</i>	<i>18</i>
<i>1.1.6 Aplicações biotecnológicas das ligninases</i>	<i>22</i>
1.1.6.1 Aplicação das ligninases na remoção de corantes	23
2 OBJETIVOS	30

3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 MICRORGANISMOS.....	31
3.2 ESTUDO DAS LIGNINASES	31
3.2.1 Inóculo.....	31
3.2.2 Cultivo para a produção das enzimas.....	31
3.2.3 Medida de atividade enzimática.....	32
3.2.3.1 Manganês peroxidase (MnP)	32
3.2.3.2 Lignina peroxidase (LiP).....	33
3.2.3.3 Lacase.....	33
3.2.3.4 Expressão das unidades enzimáticas.....	34
3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS LIGNINASES.....	34
3.3.1 Determinação do pH ótimo.....	34
3.3.2 Determinação da temperatura ótima.....	35
3.3.3 Determinação da estabilidade frente às variações de pH.....	35
3.3.4 Determinação da estabilidade térmica	35
3.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DAS ENZIMAS SOBRE CORANTES AROMÁTICOS	35
3.4.1 Laranja II	36
3.4.2 Crisofenina	36
3.4.3 Vermelho Reativo 120.....	37
3.4.4 Azul Cibacron 3GA	37
3.4.5 Azul Brilhante Remazol R.....	38
3.4.6 Cristal Violeta.....	38
3.4.7 Azure B	39

3.4.8 Azul de Metileno	39
3.4.9 Comprimento de onda e concentração dos corantes.....	40
3.4.10 Temperatura e pH	40
3.4.11 Tempo de incubação.....	40
3.4.12 Mistura de reação	40
3.4.13 Ensaios com substratos enzimáticos.....	41
3.4.14 Ensaios enzimáticos	41
3.4.15 Cálculo da descoloração	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 PRODUÇÃO DE LIGNINASES EM FARELO DE TRIGO PARA SELEÇÃO DAS LINHAGENS.	42
4.1.2 <i>Inonotus rickii</i>	42
4.1.3 <i>Chaetocalathus liliputianus</i>	44
4.1.4 <i>Dacryopinax elegans</i>	46
4.1.5 <i>Lentinus strigellus</i>	46
4.1.6 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	49
4.3 PRODUÇÃO DE LIGNINASES NOS DIFERENTES SUBSTRATOS.....	56
4.3.1 <i>Lentinus strigellus</i>	56
4.3.2 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	58
4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS LIGNINASES.....	62
4.4.1 Determinação do pH ótimo para a atividade das enzimas.....	62
4.4.1.1 <i>Lentinus strigellus</i>	62
4.4.1.2 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	64
4.4.2 Determinação da temperatura ótima para a atividade das enzimas.....	66

4.4.2.1 <i>Lentinus strigellus</i>	66
4.4.2.2 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	66
4.4.3 <i>Efeito do pH sobre a estabilidade das ligninases</i>	69
4.4.3.1 <i>Lentinus strigellus</i>	69
4.4.3.2 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	69
4.4.4 <i>Efeito da temperatura sobre a estabilidade das ligninases</i>	72
4.4.4.1 <i>Lentinus strigellus</i>	72
4.4.4.2 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	72
4.5 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DAS ENZIMAS SOBRE OS CORANTES AROMÁTICOS	78
4.5.1 <i>Comprimento de onda e concentração dos corantes</i>	78
4.5.2 <i>Ensaio enzimáticos</i>	84
4.5.3 <i>Ensaio de descoloração</i>	84
4.5.3.1 <i>Laranja II</i>	84
4.5.3.2 <i>Crisofenina</i>	87
4.5.3.3 <i>Vermelho Reativo 120</i>	89
4.5.3.4 <i>Azul Cibacron 3GA</i>	91
4.5.3.5 <i>Azul Brilhante Remazol R</i>	93
4.5.3.6 <i>Cristal Violeta</i>	96
4.5.3.7 <i>Azure B</i>	98
4.5.3.8 <i>Azul de Metileno</i>	100
5 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

1 INTRODUÇÃO

Ligninases são enzimas que degradam a lignina por um processo oxidativo e são produzidas principalmente por basidiomicetos denominados de fungos de “degradação branca”. Estes microrganismos lignocelulolíticos são decompositores extremamente importantes na degradação da madeira. A lignina é um polímero amorfo bastante abundante na biosfera e a sua decomposição faz parte do processo de ciclagem biogeoquímica da biomassa, e é essencial para o equilíbrio dos ecossistemas florestais.

O complexo ligninolítico é constituído pelas enzimas manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e lacase, sendo estas enzimas produzidas em diferentes combinações entre si, dependendo da linhagem fúngica. De acordo com a literatura a presença de atividade de MnP e lacase apontam ser a forma mais comum de expressão dessas enzimas dentre os basidiomicetos (PELAEZ et al., 1995; NERUD; MISURCOVA, 1996).

A produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES), utilizando resíduos agroindustriais como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, palha de arroz, entre outros, é um crescente campo da biotecnologia. O Brasil é um país de economia agrícola com grande produção desses resíduos e a utilização destes em FES torna-se uma alternativa pela grande disponibilidade e baixo custo. Com isso têm recebido maior atenção dos pesquisadores como promissor processo na produção de enzimas para aplicação na biodegradação de compostos tóxicos.

Quase todas as enzimas ligninolíticas são ativas em pHs baixos e seus ótimos variam entre as espécies de microrganismos. E a caracterização das enzimas é um passo importante para que se conheça suas propriedades de atividade ótima de atuação e de estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O conhecimento destas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em diferentes processos (KASHYAP et al., 2001).

As atividades industriais cresceram muito nos últimos anos, gerando novos problemas devido ao descarte de resíduos tóxicos provenientes de subprodutos gerados pela indústria nos rios ou em solos. A produção desses resíduos tóxicos é atualmente um problema e um dos assuntos mais importantes em relação ao controle de poluição ambiental, o que tem levado os pesquisadores a buscar novas ferramentas para diminuir ou eliminar a toxicidade desses efluentes.

Do ponto de vista ambiental, a indústria têxtil apresenta uma grande fonte de poluição, dado ao elevado consumo de corantes aromáticos, gerando efluentes com elevados níveis de toxicidade ao ambiente. Os corantes sintéticos tem sido cada vez mais utilizados também por diversas indústrias como a papelreira, fotográfica, cosmética, farmacêutica e alimentícia, em razão da fácil utilização, custos, estabilidade e variação de cores. Os corantes são um dos principais contaminantes detectados nos efluentes industriais e uma pequena porção destes é o suficiente para que seus efeitos sejam visíveis, sendo também potencialmente carcinogênicos.

Dentre os processos biotecnológicos de tratamento de efluentes, com o emprego de enzimas, pode-se citar as enzimas ligninolíticas como a MnP, LiP e lacase. Estas têm demonstrado sua capacidade de descolorir os corantes mediante a polimerização ou degradação dos mesmos.

Dentro desse contexto, fungos basidiomicetos denominados de “degradação branca” têm sido estudados com muito interesse devido a sua capacidade de descoloração desses corantes e, portanto, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados. Essa capacidade das enzimas ligninolíticas dos fungos em degradar corantes sintéticos está relacionada, por similaridade estrutural desses compostos (grupos aromáticos), com a capacidade do mesmo em degradar a lignina. Constituindo assim, uma possível alternativa para o uso na bioremediação de resíduos industriais.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Composição da madeira

A lignina é sintetizada a partir de três precursores fenilpropanóides monoméricos derivados do ácido chiquímico (Figura 1): álcool *p*-cumaril, álcool coniferil e álcool sinapil. É uma molécula extremamente complexa, um biopolímero aromático de alta massa molar, de estrutura irregular (conseqüência do seu mecanismo de biossíntese), amorfo, tridimensional e heterogêneo (Figura 2) (HARTLEY; FORD, 1985).

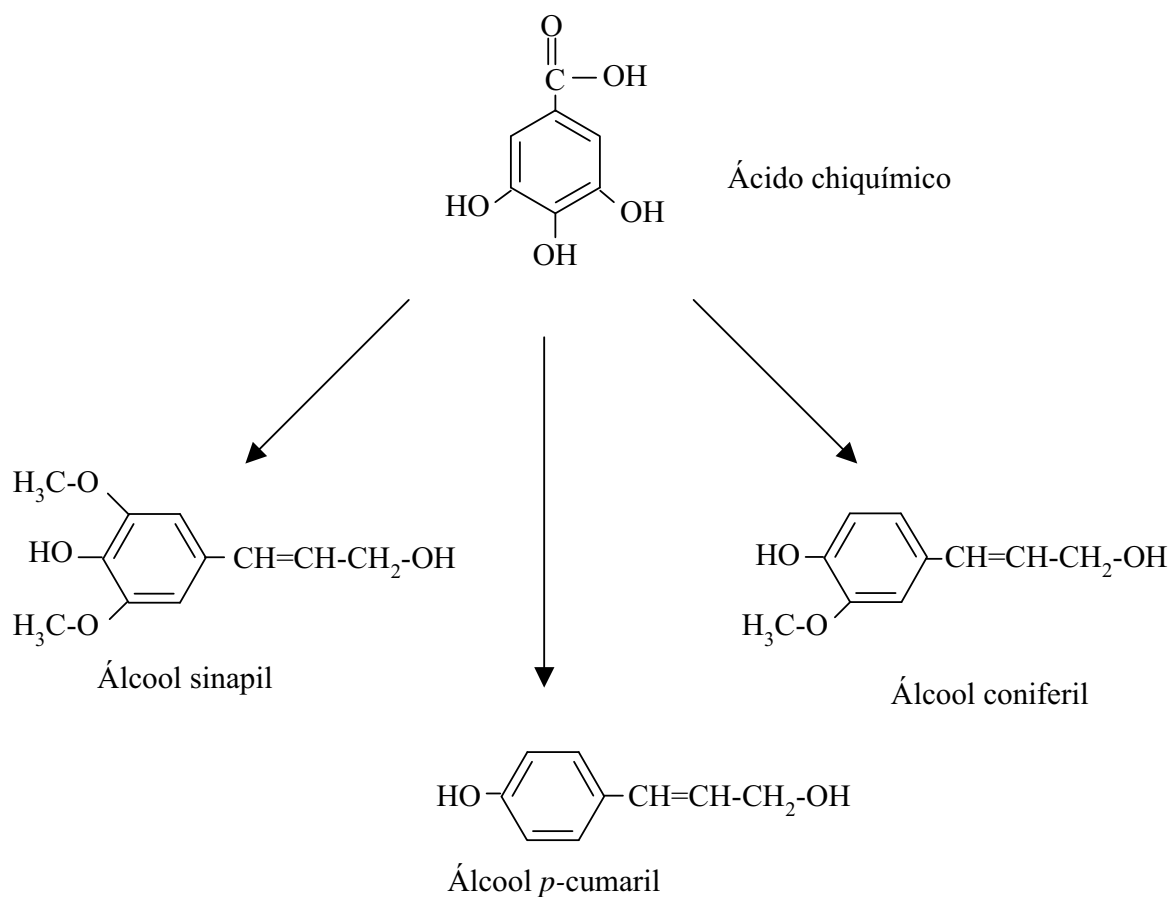


Figura 1: Fenóis precursores da lignina.
Fonte: Adaptado (Carvalho, 2005).

A glicose fotossintetizada é convertida em ácido chiquímico. A biossíntese das unidades de construção da lignina se dá através de várias etapas de transformação do ácido chiquímico, até resultar nos aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) precursores dos lignóis (BOUDET, 2000).

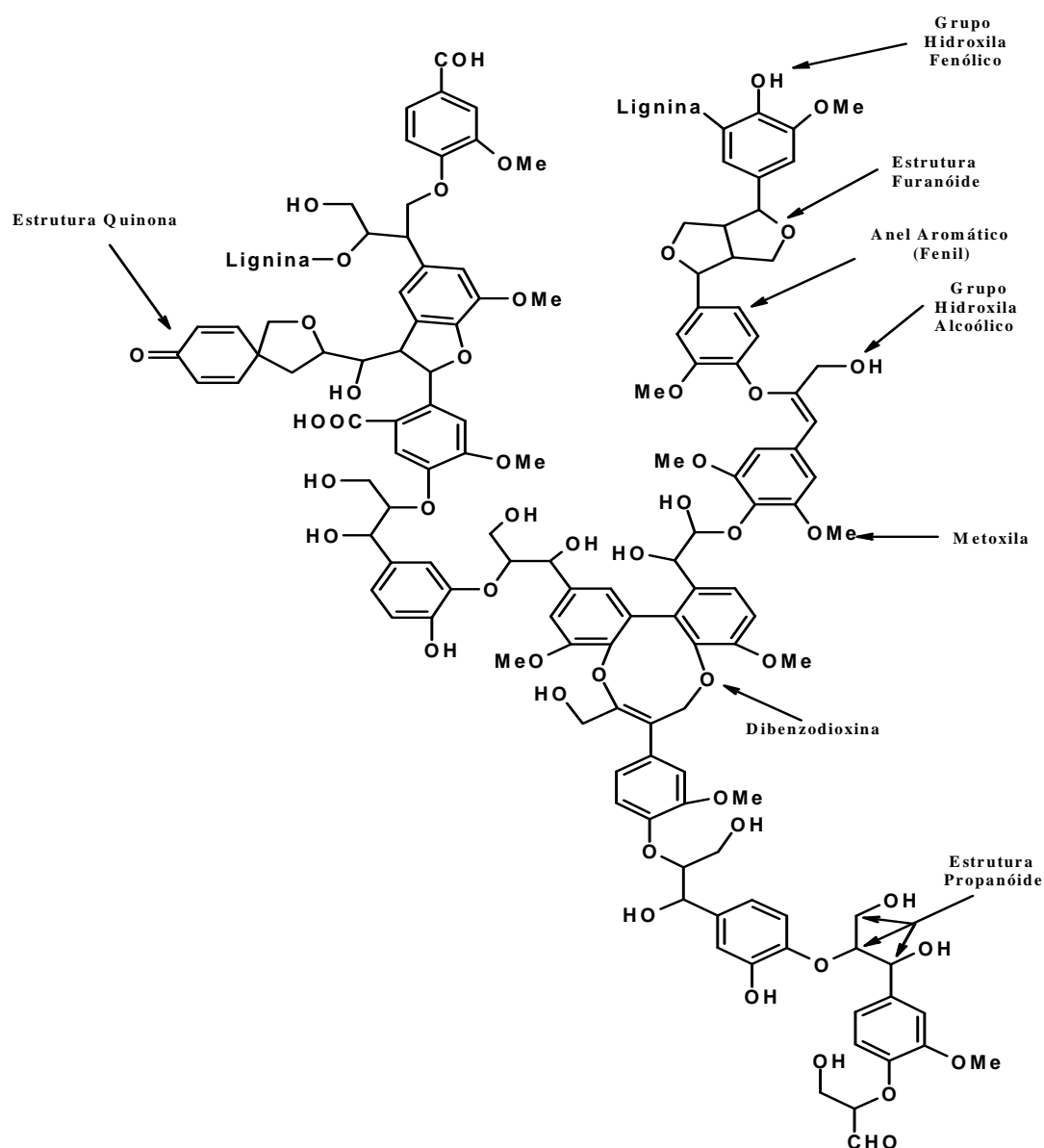


Figura 2: Estrutura representativa da lignina
Fonte: Adaptado (ADLER, 1977).

O material lignocelulósico compreende a 95% da biomassa do planeta Terra. A lignina forma o componente essencial da madeira de gimnospermas e angiospermas, não sendo restrita a plantas arborescentes, mas também é encontrada nas folhagens e raízes de todas as plantas vasculares, inclusive em variedades herbáceas. É um constituinte da parede celular possuindo múltiplas funções essenciais para a vida das plantas, principalmente conferindo-lhe rigidez (SARKANEN; LUDWING, 1971; BOUDET, 2003).

A estrutura química da lignina varia de espécie para espécie e pode ser dividida em três categorias: lignina de madeira macia ou gimnospermas, lignina de madeira dura ou angiospermas e lignina de gramíneas (SARKANEN; HERGERT, 1971).

As ligninas aparecem em plantas superiores, em diferentes composições: madeiras macias de 25 a 35%, madeiras duras de 18 a 25% e gramíneas de 10 a 30% (GOLDSTEIN, 1976). As ligninas de madeira macia geralmente contêm 80% de álcool coniferil, 14% de álcool p – cumaril e 6% de álcool sinapil. As ligninas de madeira dura, por outro lado, contêm quantidades similares de álcoois coniferil e sinapil e uma menor quantidade de álcool p-cumaril. Já as ligninas encontradas em gramíneas contêm uma maior quantidade de álcool p-cumaril que as ligninas presentes na madeira macia e na madeira dura (ANDER; ERIKSSON, 1977; BOUDET et al., 2000).

1.1.2 Decomposição da madeira

A decomposição da madeira é parte integrante do processo de ciclagem biogeoquímica da biomassa, e é essencial para o equilíbrio e a persistência dos ecossistemas florestais (RENVALL, 1995). Com a morte ou derrubada da árvore, o tronco é colonizado por grande número de fungos saprofíticos, representados principalmente pelos basidiomicetos classificados em duas grandes

ordens: *Agaricales* e *Aphylophorales* e em suas muitas famílias. No decorrer da decomposição, ocorrem alterações estruturais e químicas na madeira (MONTGOMERY, 1982).

Os basidiomicetos lignocelulolíticos crescem inicialmente dentro da madeira, colonizando-a, e suas hifas formam uma rede, nem sempre visível a olho nú, mais ou menos extensa, preenchendo o lúmen das células, passando de uma célula a outra através de poros da parede celular e em alguns casos destruindo a lamela média. Após certo período de tempo, que pode durar uns dias ou até muitos anos, variável de espécie para espécie e com condições ambientais, os basidiocarpos (corpos de frutificação) emergem. Os basidiomicetos lignocelulolíticos são extremamente importantes como decompositores e principais responsáveis pela reciclagem do carbono. Degradam os componentes da madeira, tais como, celulose, hemicelulose e lignina, a partir dos quais obtêm energia para seu crescimento e reprodução (BONONI,1997).

A estrutura básica das paredes celulares vegetais é formada por quatro componentes principais: celulose, polissacarídeos não celulolíticos (PNC), proteínas e polifenóis (McDOUGALL et al., 1996). De acordo com a espécie do vegetal, a composição química da madeira apresenta 30-75% de celulose, 10-45% de hemicelulose e 15-30% de lignina (CHAHAL, 1985).

Quando microrganismos atacam a madeira, tem início um processo ordenado de ações degradativas extracelulares (enzimáticas e não-enzimáticas) que alteram o substrato. A taxa e a extensão da degradação microbiana pode ser grandemente influenciada pela composição da matriz de lignocelulose, além de extratos de madeira presentes (ZACCHI et al., 2000).

O processo de decomposição microbiana da madeira está diretamente ligado ao potencial enzimático dos microrganismos, pois requer a presença de enzimas específicas como ligninases, pectinases, hemicelulases e celulases, cuja produção é uma propriedade inerente a diversos

microrganismos habitantes de florestas, diferindo no tipo e na quantidade em que são produzidas (Da SILVA et al., 1997; SZAKACS; TENGEDY, 1997; LECHNER; PAPINUTTI, 2006).

Os fungos degradadores da madeira podem ser divididos em três grupos de acordo com a morfologia da degradação que produzem: degradação branca, macia e marrom. Os fungos degradadores da madeira são taxonomicamente diversos e a maioria deles pertence à subdivisão *Basidiomycotina*. Os Basidiomicetos de degradação branca são os mais eficientes organismos degradadores de lignina, sendo capazes de mineralizar lignina, eventualmente até gás carbônico e água (KIRK; FARREL, 1987; ORTH et al., 1993; TUOR et al., 1995; COUTO; SANROMÁN, 2006).

1.1.2.1 Degradação branca

Os basidiomicetos causadores de degradação branca na madeira produzem decomposição seletiva da lignina na parede celular, deixando a celulose praticamente intacta (BLANCHETTE, 1991; BLANCHETTE et al., 1994). Entretanto, esses fungos variam consideravelmente, de acordo com o tipo de ataque à lignina e aos polissacarídeos da madeira (DURÁN; ESPÓSITO, 1997). Além disso, demonstram velocidades diferentes na remoção da lignina (KIRK; FARREL, 1987). Muitos colonizam o lúmen celular e causam erosão da parede pela presença das hifas (GILBERTSON, 1980). Com base nessas propriedades, os fungos de degradação branca podem ser divididos em dois subgrupos: a) fungos que degradam simultaneamente todos os componentes, aproximadamente a mesma velocidade; b) fungos que preferencialmente degradam lignina. Esses últimos, que degradam seletivamente a lignina, criam áreas localizadas de degradação típicas (ERIKSSON, 1990). Os fungos referidos como degradadores não seletivos ou simultâneos, em ecossistemas florestais, são os decompositores mais comuns das angiospermas do que das gimnospermas (GILBERTSON, 1980).

Todos os basidiomicetos degradam os três principais componentes da madeira, ou seja, celulose, hemicelulose e lignina, embora em diferentes velocidades e extensão. Baseado nesse conceito têm-se dividido os fungos de degradação branca em classes de degradadores simultâneos da lignina com polissacarídeos ou degradadores seletivos. Esta classificação não têm se mostrado muito adequada, pelo fato de que os fungos de degradação branca podem apresentar ambos comportamentos, quando estão atuando no mesmo substrato ou atacam a lignina e polissacarídeos seqüencialmente (ERIKSSON et al., 1990).

A identificação dos fungos de degradação branca é baseada nas características das morfológicas e fisiológicas das hifas. A maioria dos basidiomicetos tem hifas dicarióticas com conexões específicas entre os septos do micélio (BLANCHETTE, 1991).

1.1.2.2 Degradação macia

A degradação macia foi assim chamada, originalmente, para descrever um tipo de ataque à madeira em ambientes úmidos, por fungos dos grupos dos ascomicetos e deuteromicetos. Essa degradação é caracterizada por ser suave, de aparência úmida e que sob condições de secagem pode lembrar a degradação do tipo marrom. Duas formas de decomposição macia são conhecidas. A degradação macia do Tipo I gera cavidades na camada secundária das células da parede da madeira, abertas por penetração fina das hifas (ADASKAVEG et al., 1990). A formação de cavidades segue a orientação de microfibrilas na parede secundária. No Tipo I, células da parede da madeira podem também ser degradadas adjacientemente às hifas causando erosão, sendo a parede secundária degradada gradualmente. A lamela-média não é erodida e persiste mesmo em um avançado estágio da decomposição. Essa característica distingue o tipo II de degradação macia da forma não seletiva da degradação branca, pois os decompositores brancos erodem e podem destruir completamente a lamela-média (BLANCHETTE, 1995).

Os fungos de degradação macia preferencialmente colonizam e degradam madeiras duras, especialmente as de alta umidade. Em madeiras moles, a velocidade da degradação macia é geralmente mais lenta que a dos fungos de degradação branca e marrom. Embora estes normalmente metabolizem os polissacarídeos da madeira, são capazes de alguma transformação da lignina (ESLYN et al., 1975).

1.1.2.3 Degradação marrom

Também denominada de degradação parda, a degradação marrom é realizada por basidiomicetos que causam um ataque difuso e primeiramente sobre a celulose. Os fungos de degradação marrom produzem porosidade e erosão nas células da parede da madeira, devido a uma quebra rápida do suporte celulósico (ERIKSSON et al., 1990). Produzem tipicamente uma quebra extensiva dos polissacarídeos da madeira e deixam a maioria da lignina intacta. Logo, a madeira degradada por esses fungos tem um aspecto amarronzado e de aparência frágil. A madeira decomposta é marrom e consiste principalmente de lignina quimicamente modificada por desmetilação, mas não degradada. Uma característica que distingue a degradação marrom dos outros tipos é a sua capacidade de despolimerizar a celulose, durante o processo de decomposição, causando perdas substanciais nas propriedades de resistência da madeira (DANIEL; NILSSON, 1989; BLANCHETTE, 1995; BLANCHETTE, 1991). O mecanismo pelo qual os fungos de degradação marrom modificam a lignina é ainda desconhecido, já que não produzem enzimas ligninolíticas. Acredita-se que moléculas pequenas (glicoproteínas), que quelam ferro, poderiam estar participando das transformações da lignina via produção de radicais hidroxila (BACKA et al., 1992; DURÁN, 1996).

Os fungos de degradação marrom predominantemente atacam madeiras macias, enquanto os de degradação branca são eficientes no ataque a madeiras duras (RAYNER; BODDY, 1988).

Tabela 1: Comparação entre os tipos de degradação.

TIPO DE DEGRADAÇÃO	FUNGOS	MORFOLOGIA DA DEGRADAÇÃO
Branca	Basidiomicetos	Seletivos: degradam preferencialmente a lignina Não seletivos: degradam simultaneamente todos os componentes da madeira na mesma velocidade
Macia	Ascomicetos e Deuteromicetos	Tipo I: geram cavidades nas células da parede da madeira por penetração das hifas Tipo II: causa erosão, na qual a parede secundária é degradada gradualmente, mas a lamela média não é destruída.
Marrom	Basidiomicetos	Apresentam a capacidade de despolimerizar os polissacarídeos da parede celular (hemicelulose e celulose), deixando a lignina modificada, mas não degradada.

1.1.3 Mecanismo de ação das enzimas Ligninolíticas

A atividade de fenol oxidases extracelulares, indicando a presença de enzimas ligninolíticas, foi descoberta na década de 30 em fungos de degradação branca (ERIKSSON, 1990). Logo depois foi demonstrado que as reações eram catalisadas por oxidoreduases do tipo lacases e peroxidases. A habilidade para oxidar compostos fenólicos, especificamente, tem sido utilizada como critério de identificação para fungos de degradação branca verdadeiros. Em seguida o isolamento e caracterização de lacases, duas peroxidases, chamada lignina peroxidase e manganês peroxidase, foram evidenciadas na quebra da lignina (NIKU-PAAVOLA et al., 1995).

1.1.3.1 Manganês Peroxidase (MnP)

A MnP (EC. 1.11.1.13), assim como a lignina peroxidase, requer H_2O_2 para sua atividade e contém um grupo heme. A ação dessa enzima depende de Mn^{2+} que é oxidado pela enzima a Mn^{3+} , que por sua vez oxida substratos orgânicos, como fenóis e radicais fenóxi (KUWAHARA et al., 1984).

O ciclo catalítico da MnP (Figura 3) é iniciado com a ligação do H_2O_2 com o ferro presente na enzima, formando o complexo ferro-peróxido. A clivagem subsequente da ligação peróxido de oxigênio-oxigênio requer a transferência de dois elétrons do grupo heme resultando na formação de uma MnP com complexo Fe^{4+} orto-porfirina-radical. A ligação dioxigênica é quebrada heteroliticamente e uma molécula de água é expelida. A redução subsequente da enzima procede-se com a oxidação do manganês. O íon de Mn^{2+} monoquelado atua como um doador de um elétron para a porfirina intermediária e é oxidado à Mn^{3+} . Ocorre então novamente a oxidação no sítio ativo da enzima pela da oxidação de outra Mn^{2+} e a liberação de outra molécula de água (HOFRICHTER, 2002).

A forma Mn^{3+} mantém-se estável pela da quelação com ácidos orgânicos. O Mn^{3+} oxida fenóis monoméricos e diméricos, incluindo componentes fenólicos de lignina (HOFRICHTER, 2002), catalisa clivagem $C\alpha-C\beta$, oxidação do $C\alpha$ e clivagens alquilaril de estruturas lignolíticas (TUOR et al., 1992).

1.1.3.2 Lignina Peroxidase (LiP)

No ano de 1983, dois grupos relataram a descoberta da enzima extracelular degradadora de lignina em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* (GLEND et al., 1983; TIEN; KIRK, 1983). A enzima, primeiramente chamada de ligninase, é uma glicoproteína, que contém ferroprotoporfirina IX (heme) como grupo prostético e requer H_2O_2 para sua atividade catalítica.

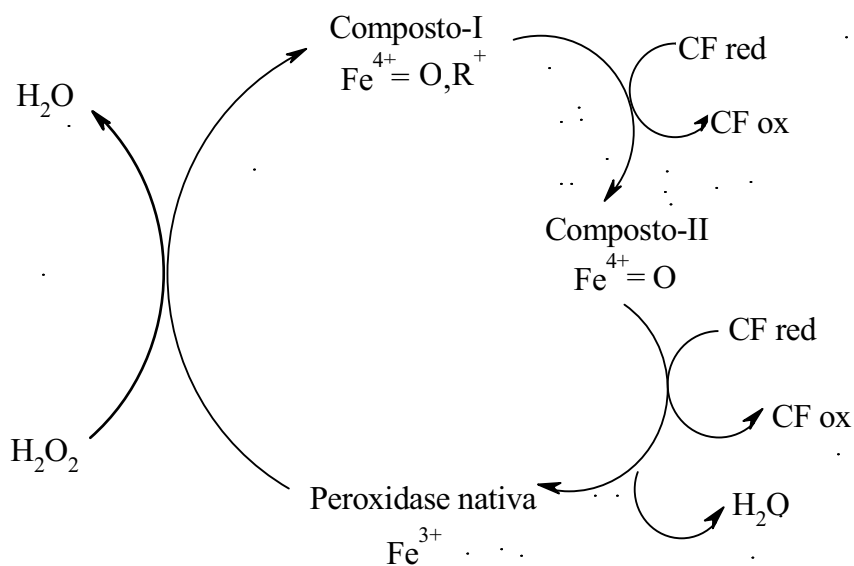


Figura 3: Ciclo catalítico genérico das Peroxidases.
(CF= Composto fenólico)
Fonte: Adaptado (Rosatto et al., 2001)

A LiP (EC. 1.11.1.14) oxida a lignina e outros compostos derivados da mesma, além de compostos não fenólicos, pela retirada de um elétron de um núcleo aromático, criando um radical instável que passa por numerosas transformações levando a desestruturação da molécula de substrato (RODRIGUEZ; DURÁN, 1988). A ação dessa enzima resulta em: oxidação de álcoois benzílicos, quebra de cadeias aromáticas, desmetilação, rearranjos intramoleculares e quebra de anéis em compostos não fenólicos relacionados à lignina (GOLD et al., 1989). O álcool veratrílico tem papel importante na catálise da LiP: é o redutor preferido pela enzima, produzido pelo fungo de degradação branca após lignólise, e aparentemente protege a enzima contra a inativação pelo excesso de peróxido de hidrogênio. Na presença de peróxido de hidrogênio, a LiP oxida o álcool veratrílico a veratraldeído, reação comum em ensaios de atividade da LiP (DURÁN; ESPÓSITO, 1997).

1.1.3.3 Lacase

Lacase (EC. 1.10.3.2.) é uma fenol oxidase que catalisa a oxidação de uma série de compostos aromáticos (Figura 4) e substâncias inorgânicas com redução concomitante do oxigênio da água (DURÁN et al., 1994). É uma enzima despolimerizante de lignina que, por processo oxidativo remove moléculas de fenil-propano mais externos à cadeia, gerando radicais fenoxilos. Esses radicais atuam em reações não catalíticas, como acoplamento radical-radical, desprotonação, desprotonação a ataques nucleofílicos pela água, levando a reações de polimerização, quebras alquílicas e oxidações nos carbonos e desmetilações. Alguns intermediários aromáticos de baixo peso molecular acabam sendo também liberados resultando na despolimerização da lignina (TIEN; KIRK, 1988).

Em geral, as lacases exibem quatro átomos de cobre, que são distribuídos em diferentes sítios de ligação e são classificados em três tipos: Cobre tipo 1, 2 e 3, caracterizando-se por propriedades específicas no mecanismo de catalise da enzima (MCGUIRL; DOOLEY, 1999). De acordo com Call e Mücke (1997), o cobre do tipo 1 está envolvido na captura e transferência de elétrons. Os cobres do tipo 2 e 3 estão envolvidos na ligação com o oxigênio.

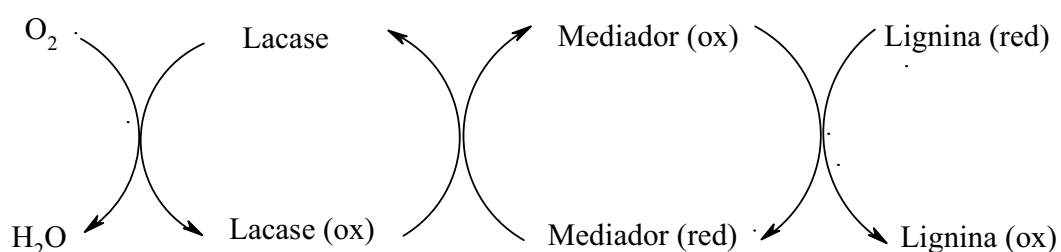


Figura 4: Ciclo de oxidação catalítica da Lacase
Fonte: Adaptado (Balakshin et al., 2001)

1.1.4 Produção de ligninases por fermentação em estado sólido (FES)

A produção de enzima é um crescente campo da biotecnologia. A maioria dos fabricantes de enzimas as produzem por técnicas de fermentação submersa (FSM). Contudo, nas últimas décadas tem aumentado a tendência em direção à utilização da fermentação em estado sólido (FES) para esse fim. A FES é conhecida desde tempos antigos (aproximadamente 2600 a.C.). Esta técnica reproduz um processo microbiológico natural como compostagem e ensilagem. Em aplicações industriais, este processo natural pode ser utilizado e manipulado de forma controlada para obtenção de um produto desejado (COUTO; SANROMÁN, 2005a).

A FES pode ser definida como o processo fermentativo que ocorre na ausência ou próximo da ausência de água livre entre partículas de um substrato sólido natural como fonte de carbono e energia, ou ainda esse substrato pode servir apenas como suporte inerte (PANDEY et al, 2000a). Este processo é conhecido desde tempos antigos nos países asiáticos mas foi praticamente ignorado nos países ocidentais depois de 1940. Típicos exemplos de FES são as tradicionais fermentações japonesas “koji”, indonesa “tempeh” e francesa “blue cheese” (COUTO; SANROMÁN, 2005a).

O processo de FES tem mostrado ser particularmente adequado para a produção de enzimas por fungos filamentosos, visto que reproduzem condições naturais de desenvolvimento de tais microrganismos (PANDEY et al., 1999).

A seleção de um substrato adequado para realizar um cultivo sólido é essencial, visto que cada grupo de fungos tem capacidade diferenciada de ataque a esses materiais e, portanto, diferente capacidade de obtenção de carbono e outros nutrientes disponíveis do crescimento. Além disso, a disponibilidade e o custo são também critérios de grande importância (COUTO; SANROMÁN, 2005a).

Uma ampla gama de materiais sólidos usados em FES pode ser classificada em duas grandes categorias: materiais inertes, que somente atuam como um lugar de apoio para os microrganismos não fornecendo nutrientes para o crescimento microbiano e materiais não inertes, que não somente atuam como um suporte, mas também proporcionam o crescimento do microrganismo (RALPH, 1976; DURAND et al., 1993). Este último, devido ao seu papel duplo, é também chamado de substrato-suporte. Esses materiais geralmente contêm resíduos de amido, celulose, hemicelulose e pectina e são subprodutos agrícolas lignocelulósicos ou agro-industriais do processamento de frutas e cana-de-açúcar (PANDEY, 1992).

A economia brasileira é uma das mais importantes economias agrícolas do mundo, com produção de café, cana-de-açúcar, soja, mandioca e frutas. Quase todos esses produtos são exportados e contribuem para o desenvolvimento da economia do país. Contudo, esta grande produção é responsável pela geração de muitos resíduos causando sérios problemas ambientais (PANDEY; SOCCOL, 1998; PANDEY et al., 2000b). A utilização destes resíduos em bioprocessos tornou-se uma alternativa pela sua grande disponibilidade e baixo custo (PANDEY et al., 2000b; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Recentemente, a FES tem recebido mais atenção dos pesquisadores, como promissor processo na biorremediação e biodegradação de compostos tóxicos, desintoxicação de resíduos agro-industriais e biotransformação de resíduos de colheitas para enriquecimento nutricional. Há uma grande tendência da utilização eficiente de resíduos agro-industriais como polpa e casca de café, casca de mandioca, bagaço de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de beterraba doce, polpa de maçã e batatas não aproveitadas para consumo (PANDEY; SOCCOL, 1998; PANDEY et al., 2000a). Existem várias publicações descrevendo bioprocessos que têm sido desenvolvidos utilizando essas matérias-primas para produção de grandes quantidades de produtos de alto valor como o etanol, metabólitos biologicamente ativos (antibióticos, alcalóides,

fatores de crescimento vegetal), ácidos orgânicos, biopesticidas (micopesticidas e bioerbicidas), proteína de célula única (SPC), cogumelos, aminoácidos, biosurfactantes, biocombustíveis, compostos aromáticos e enzimas (PANDEY, 1992; PANDEY et al., 2000a; MEDEIROS et al., 2000; SCHMIDT, et al., 2001; PANDEY, 2003).

Inúmeros trabalhos têm reportado utilizando FES e basidiomicetos com diferentes propósitos. A capacidade degradativa do fungo *Rigidoporus lignosus* foi investigada por meio de FSM e FES utilizando-se serragem de *Hevea* durante 20 dias. Os autores observaram que a biodegradação da lignina por FES foi aproximadamente três vezes maior que em FSM, devido a maior produção de MnP e lacase (entre o sexto e o 16º dia de cultivo), principais ligninases produzidas por este fungo (GALLIANO et al., 1990).

Dois basidiomicetos isolados, *Polyporus* BH₁ e *Polyporus* BW₁, foram cultivados em FES em bagaço a 85% de umidade por 45 dias para a produção da enzima LiP. A atividade máxima foi entre 13 e 18 dias para ambas as espécies atingindo 50 U/g (BH₁) e 60 U/g para a linhagem BW₁ (NIGAM et al., 1987).

Lang e colaboradores (1998) estudaram a produção das enzimas MnP e lacase dos fungos *Pleurotus* sp e *Dichomitus squalens* em palha de trigo como substrato para FES. As atividades de MnP foram mais altas que a de lacase em ambos os fungos. *Pleurotus* sp produziu 1,0 U/mL de MnP entre a 5ª e a 8ª semanas e 0,4 U/mL de lacase entre a 6ª e a 7ª semanas de cultivo, respectivamente. Já o fungo *D. squalens* apresentou dois picos de produção de MnP, sendo um na 5ª (3,0 U/mL) e outro na 8ª (2,5 U/mL) semana de fermentação. A máxima produção de lacase foi na 3ª semana (0,2 U/mL).

Fujian e outros (2001) compararam a produção de LiP e MnP de *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 (ATTC 34541) em fermentação submersa e fermentação em estado sólido, constatando que o processo de FES proporcionou maior produção das duas ligninases.

Pleurotus ostreatus e *Pleurotus sajor-caju* foram investigados por suas habilidades em produzir enzimas ligninolíticas, como a LiP e a lacase em resíduo agrícola de bananeira (folhas e pseudocaule) por FES. A produção dessas enzimas foram estudadas durante o crescimento dos microrganismos por um período de 40 dias. As folhas da bananeira foram o substrato mais adequado para a produção das enzimas comparado com o pseudocaule, para ambas as linhagens. As atividades máximas das enzimas produzidas por *Pleurotus ostreatus* foram 0,1U/mg e 1,7 U/mg, em 15 e 20 dias para LiP e lacase, respectivamente. Já o fungo *Pleurotus sajor-caju* apresentou picos de produção de lacase (1,6 U/mg) e LiP (0,4 U/mg) em 10 e 20 dias de fermentação (REDDY et al., 2003).

No trabalho de Boer e colaboradores (2004) os autores compararam a produção de ligninases de *Lentinula edodes* CCB-42 em relação ao tempo de cultivo e a umidade do meio em FES utilizando sabugo de milho moído. As atividades de LiP e lacase foram negligenciadas com atividades menores que 8 U/g e 16 U/g, respectivamente. Já a atividade máxima de MnP foi de 2600 U/g, 2000 U/g e 1470 U/g, respectivamente em culturas com 75%, 80% e 83% de umidade obtidos depois de 12 dias de cultivo.

Dois espécies fúngicas *Phylosticta* spp. MPS-001 e o deuteromiceto *Aspergillus* spp. MPS-002 foram cultivadas em resíduos da bananeira (material lignocelulósico) para a produção de duas ligninases em um período de 40 dias. A máxima produção de LiP (2,2 U/mg) e lacase (2,4 U/mg) por *Phylosticta* spp. MPS-001 e por *Aspergillus* spp. MPS-002 foi 2,8 U/mg e 1,8 U/mg para LiP e lacase, respectivamente. Para ambos os fungos o melhor tempo de cultivo para a produção das duas enzimas foi em 20 dias (SHAH et al., 2005).

A produção de lacase por *Trametes hirsuta* foi estudada em dois bioreatores de FES, um de bandeja e outro de imersão idealizado pelos autores, utilizando cubos de esponja de nylon e semente de uva como suportes inertes e não inerte, respectivamente. A maior produção da enzima

obtida (18 U/mL) deu-se em semente de uva, no reator de bandeja, em 14 dias de cultivo (COUTO et al., 2006).

O fungo *Phanerochaete chrysosporium* foi submetido ao cultivo por FES em resíduos lignocelulósicos de *Achras zapota* (uma planta produzida na Índia) para a avaliação da biotransformação da mesma e produção das enzimas LiP e MnP num período de 28 dias a 37°C e 60% de umidade. Os autores observaram que as máximas atividades das duas enzimas ocorreram no sétimo dia de fermentação, sendo de 2,1 U/mL e 1,2 U/mL, respectivamente (KUMAR et al., 2006).

Silva e colaboradores (2005) cultivaram nove linhagens do fungo basidiomiceto *Lentinula edodes* em frasco erlenmeyer utilizando resíduos de eucalipto (casca, ramos e folhas da árvore) e farelo de arroz a 26°C por 30 dias e umidade final de 70%. Observaram que a atividade de MnP estava presente no meio de cultura em todas as linhagens, enquanto que a lacase não foi detectada em algumas linhagens (1, 2 e 4). Com exceção de uma linhagem, todas mostraram-se boas produtoras de MnP, com atividade máxima de 286,2 U/Kg.

Lechner e Papinutti (2006) estudaram a produção de MnP e lacase pelo fungo *Lentinus tigrinus*, em meio contendo palha de trigo (77%) suplementado com farinha de trigo (20%) e carbonato de cálcio, em sacos de polipropileno com umidade ajustada para 74% por 110 dias. Foi observado que a lacase alcançou o pico de atividade em 20 dias (30 U/g) e dois picos de atividade de MnP foram observados em 20 e 90 dias (0,75 U/g).

1.1.5 Características físico-químicas das ligninases

A caracterização físico-química de uma enzima é um passo importante para se estabelecer as melhores condições de utilização da mesma. O estudo dos efeitos do pH e da temperatura indicam as condições de atividade máxima e determinam a faixa de pH e temperatura nas quais a

enzima se mantêm estáveis. O conhecimento destas propriedades permite avaliar o seu potencial de aplicação em um determinado processo, além disso, permite controlar a velocidade do processo variando estes parâmetros no meio reacional (MARTINS, 2003).

Quase todas as enzimas ligninolíticas são ativas em pHs baixos. Seus ótimos diferem entre as espécies de microrganismos. *P. chrysosporium* degrada melhor a lignina em pH 4,0 com decréscimo da atividade a valores de pHs mais baixos (KIRK et al., 1978).

Em outro estudo a degradação da lignina por *P. chrysosporium* e *Pleurotus sajor-caju* foi maior em valores de pH abaixo de 3,0 (BOYLE et al., 1992). Já a LiP produzida pelo fungo *Irpex lacteus*, apresentou pH ótimo de 3,5 (ROTHSCHILD et al., 2002) e a LiP produzida por *P. chrysosporium* e estudada por Archibald (1992), apresentou pH ótimo de 4,5. O fungo de degradação branca *Bjerkandera* sp. BOS55 secreta sete isozimas de LiP, sendo que duas delas a LiP-2 e LiP-5, caracterizadas por Have e colaboradores (1998), apresentaram pH ótimo 2,5 e 3,0, respectivamente.

Os fungos *Gloeophyllum striatum* e *Phellinus rimosus* produziram MnP com pH ótimo de 6,0, as quais foram estáveis entre pH 5,0 a 6,0 e 6,0 a 7,0, respectivamente. A temperatura ótima para atividade de MnP produzida por *G. striatum* foi 30°C e a mesma foi estável a 40°C. A enzima produzida por *P. rimosus* mostrou atividade ótima em temperatura de 25°C, mantendo-se estável numa faixa entre 10°C a 40°C (BONFÁ, 2003). Carvalho (2005), também caracterizou a MnP produzida por *Lentinus* sp e verificou que o pH ótimo foi 3,0 e temperatura ótima de 55°C. A enzima foi estável em valores de pH entre 6,0 e 7,0. A MnP manteve 100% de atividade original a 40° e 50°C, por 1h.

Estudos com os fungos *Panus tigrinus* e *Pleurotus ostreatus* mostraram que a faixa de pH para a atividade ótima da enzima MnP ficou entre os valores de pH 2,6 e 4,5 (MALTSEVA et al., 1991; SARKAR et al., 1997). A faixa de pH ótima para a atividade da enzima LiP, descrita por

Wensenberg e outros (2003), foi de 2,0 a 5,0. Para a lacase, os mesmos autores relataram a faixa de pH ótimo entre 2,0 e 8,5.

Boer e colaboradores (2006) estudaram as características físico-químicas da MnP de *Lentinus edodes*. A enzima apresentou pH ótimo de 4,5, mantendo-se estável entre os pHs 4,0 a 6,0. A temperatura ótima e temperatura de estabilidade foram 40°C e 45°C, respectivamente.

Para a lacase de *P. noxius*, o pH ótimo foi de 4,6 (BUCHALA; LEISOLA, 1987). Périe e outros (1998) caracterizaram duas isoformas de lacase produzida por *Dichomitus squalens*. As duas lacases exibiram pH ótimo de 3,0, com maior estabilidade quando incubadas em pH 6,0. Ambas isoformas mantiveram 90% da atividade quando incubadas a 75°C por 10 minutos. Wensenberg e outros (2003) relataram pH ótimo na faixa ácida para atividade de lacase de *Coriopsis polyzona*. Essa enzima apresentou grande estabilidade em pH 6,0. A 70°C, a estabilidade térmica foi acentuadamente reduzida.

Ryan e colaboradores (2003) caracterizaram a lacase de *Sclerotium rolfsii*. A enzima demonstrou ser muito ativa em pH ácido, mostrando pico em pH 2,4 e um rápido declínio em pH 6,0 utilizando-se o ABTS como substrato. A temperatura ótima de atividade foi de 62°C. O estudo da estabilidade revelou que a enzima foi altamente estável em pH 4,5 e a 18°C.

A lacase de *Lepista sordida* foi caracterizada por Cavallazzi e colaboradores (2004). A temperatura ótima foi de 45°C, apresentando alta atividade em pH 3,5 com um segundo pico em pH 6,0, sugerindo a presença de duas isozimas. Não foi detectada atividade em pHs acima de 6,5.

O pH ótimo para a lacase pode variar de acordo com o substrato utilizado. A enzima produzida pelo fungo *Coriolus hirsitus* apresentou pH ótimo de 2,5 e 4,0, para a oxidação do ABTS e 2,6 dimetoxifenol (DMP), respectivamente. A temperatura ótima foi de 45°C (SHIN; LEE, 2000). A Lacase produzida por um basidiomiceto não identificado apresentou pH ótimo de 4,0 para atividade sobre o ABTS e pH 6,0 quando utilizado o guaiacol como o substrato

(JORDAAN et al., 2004). Hakala e colaboradores (2005) caracterizaram a enzima produzida pelo fungo *Physisporinus rivulosus* e relataram que os pHs ótimos para oxidação do ABTS e DMP foram 2,5 e 3,0, respectivamente, enquanto que a oxidação da seringaldazina e guaiacol foi ótima em pH 3,5.

Os pHs ótimos da lacase de *Pycnoporus coccineus*, utilizando-se o ABTS e DMP, foram 3,5 e 3,5 a 4,0, respectivamente. A estabilidade em relação ao pH foi estudada na faixa entre pH 2,5 a 10,0, observando que depois de uma hora de incubação 90 a 100% da atividade foi preservada nessa faixa de pH. A temperatura ótima para a oxidação do DMP foi observada em torno de 60°C e a enzima tem meia vida de 8 e 2 horas a 50°C e 60°C, respectivamente (JAOUANI et al., 2005).

A especificidade e afinidade da lacase pelo substrato pode variar com as mudanças no pH. Para substratos cuja oxidação não envolva troca de prótons, a atividade da lacase normalmente diminui a medida que o pH aumenta. Entretanto para substratos cuja oxidação envolve troca de prótons, assim como o fenol, o perfil de atividade do pH da lacase pode exibir um ótimo cujo valor depende da enzima e não do substrato. Para fenóis, o pH ótimo fica em torno de 3 a 7 para as lacases fúngicas e pode aumentar para 9 em lacases de plantas. A diferença deste perfil de atividade do pH é atribuído ao balanço de dois efeitos opostos: um gerado pela diferença de potencial redox entre a redução do substrato e o cobre tipo 1 da lacase, o qual está correlacionado a transferência de elétrons e é favorecida para substrato fenólico com pH alto, e outro gerado por uma ligação de ânion hidróxido ao cobre tipo 2 ou 3 da lacase, a qual inibe a atividade em pH alto (XU et al., 1996; XU, 1997; GIANFREDA et al., 1999; JAOUANI et al., 2005).

1.1.6 Aplicações biotecnológicas das ligninases

Fungos ligninolíticos têm sido estudados com muito interesse devido a sua capacidade de modificar ou degradar a lignina. As enzimas envolvidas nesse processo tornaram-se alvo de inúmeras pesquisas visando sua aplicação biotecnológica.

Na indústria de papel e celulose, os processos de obtenção e clarificação de polpas, produzem uma grande quantidade de resíduos danosos ao ambiente. Esses efluentes contêm uma série de organoclorados formados a partir das reações entre a lignina e o cloro empregado para o branqueamento (FULTHORPE; ALLEN,1995). Ligninases como a LiP e MnP podem promover a degradação desses compostos se aplicadas ao tratamento dos resíduos (DURÁN et al., 1994; FEIJOO et al., 1997; SATYENDRA; MODI, 1999; BHAT, 2000).

Sob outro contexto, a degradação da lignina transforma o substrato lignocelulósico em alimento de alta qualidade para ruminantes, melhorando a digestibilidade desses materiais. A celulose e a hemicelulose presentes na palha de trigo, por exemplo, são nutrientes excelentes para a alimentação de ruminantes. No entanto, a lignina presente nesse material, além de ser indigesta a estes animais, ela não permite a disponibilização dos nutrientes citados acima, portanto faz-se necessário uma deslignificação dos mesmos, na qual as ligninases podem ser usadas (EL-NASSER et al., 1997).

A lacase também pode ser aplicada na indústria de alimentos para a estabilização das características organolépticas de vinhos (MINUSSI et al.,2002).

De acordo com Petersen e outros (1996), produtos a base de óleo podem ser desoxigenados pela adição de lacase, melhorando o aroma. Muitos alimentos como temperos de saladas, maionese e condimentos são preparados com óleos vegetais de soja. A soja contém ácido linoléico, o qual reage com o oxigênio dissolvido produzindo compostos voláteis indesejáveis, os quais podem ser degradados pela lacase.

Quando a enzima lacase é adicionada à massa de pão, esta pode exercer efeito de oxidação nos constituintes da massa, resultando no aumento do volume, na melhoria da estrutura e maciez do miolo do pão, bem como, no aumento da resistência, estabilidade e maleabilidade da massa (SI, 1994).

1.1.6.1 Aplicação das ligninases na remoção de corantes

Nas últimas décadas, os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e freqüentes. As causas são variadas e envolvem praticamente todas as atividades humanas. O desmedido crescimento populacional contribui significativamente para a contaminação ambiental em função da quantidade de resíduos produzidos. A atividade industrial, que cresce acompanhando as necessidades e o consumismo que caracteriza nossa sociedade, contribui com grandes volumes de efluentes de natureza diversa, os quais geralmente carregam compostos químicos de caráter tóxico (KUNZ et al., 2002).

Dentro deste contexto, pode-se destacar o setor têxtil que gera grandes volumes de efluentes altamente coloridos devido à presença de corantes que não se fixam na fibra durante o processo de tingimento. Estima-se que entre 10-20% dos corantes utilizados são descartados como efluentes causando sérios problemas de contaminação ambiental. A diminuição da capacidade fotossintética de cursos de água que recebem diretamente estas águas residuárias torna-se um agravante, além do fato desses corantes apresentarem capacidade mutagênica e carcinogênica (RODRÍGUEZ et al., 1999).

A composição química desses compostos é bastante diversificada e reage com compostos inorgânicos para formar polímeros e outros produtos de difícil degradação (ROBINSON et al., 2001). Deste modo, resíduos de corantes poderiam ser altamente nocivos quando presentes em qualquer organismo vivo. A inativação destes rejeitos normalmente é realizada por reações de

hidrólise de seus grupos funcionais, que torna o corante quimicamente inerte. Alguns autores têm demonstrado que estes compostos na forma não hidrolisada apresentam alta estabilidade hidrolítica em meio neutro, permitindo um tempo de vida de 50 anos em ambientes aquáticos, causando expressiva preocupação quanto aos aspectos ecológicos (MATSUI et al., 1984; WEBER; STICKNEY, 1993).

Esses corantes não são normalmente removidos por sistemas convencionais de tratamento, portanto, o emprego deles deve ser controlado e os efluentes tratados antes de serem liberados no ambiente aquático e terrestre (CAPALASH; SHARMA, 1992).

Até a metade do século XIX, todos os corantes eram derivados de folhas, ramos, raízes, frutos ou flores de várias plantas e substâncias extraídas de animais. Embora a indústria de corantes têxteis tenha se originado na Europa desde o século XVI, o primeiro corante sintético foi descoberto apenas em 1856 na Inglaterra por William Henry Perkin. Com a intensa inovação tecnológica ao redor de 1915, a Alemanha manteve o monopólio sobre a produção até a Segunda Guerra Mundial. Hoje a indústria de corantes dos Estados Unidos é a maior fonte exportadora destes produtos (GUARATINI; ZANONI, 2000; WESENBERG et al., 2003).

A importância dos corantes para a civilização humana é evidente e bem documentada. Os corantes sintéticos têm sido cada vez mais utilizados pelas indústrias têxtil, papelreira, fotográfica, cosmética, farmacêutica e alimentícia, em razão da fácil utilização, custos, estabilidade e variação de cores comparando-se com os naturais (BALAN; MONTEIRO, 2001; EICHLEROVÁ, 2005a).

Existe uma variedade de mais de 10000 corantes com uma produção anual de mais de 7×10^5 toneladas no mundo inteiro e, 10% dos materiais corados e corantes, são perdidos nos efluentes industriais (FU; VIRARAGHAVAN, 2001). Os corantes são os principais contaminantes detectados nos efluentes industriais e, uma pequena porção destes na água (10-50

mg/L), é suficiente para que seus efeitos sejam visíveis, como a alteração na transparência e solubilidade de gases na água (CHUNG; STEVENS, 1993; CAMPOS et al., 2001).

Os azo corantes constituem uma grande classe de corantes sintéticos e são caracterizados pela presença de um ou mais grupamentos (-N=N-) ligados a sistemas aromáticos. Estes representam cerca de 60% dos corantes atualmente utilizados no mundo, principalmente no tingimento de fibras têxteis (KUNZ et al., 2002). Estes corantes contendo a função azo-aromáticos têm atraído grande atenção, pois constituem o maior grupo de corantes orgânicos produzidos mundialmente e, a biotransformação destes corantes, pode ser responsável pela formação de aminas, benzidinas e outros compostos intermediários com potencialidade carcinogênica (CHAGAS; DURRANT, 2001).

As pesquisas de degradação de compostos químicos têm mostrado vários microrganismos extremamente versáteis em degradar substâncias recalcitrantes. Os caminhos atuais da biotecnologia indicam fungos basidiomicetos denominados “da podridão branca da madeira” como eficientes na degradação de grande variedade de compostos e eficientes na descoloração, com alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados. Estudos demonstram que a capacidade destes fungos em degradar corantes sintéticos está relacionada, por similaridade estrutural desses compostos, com a capacidade do mesmo em degradar a lignina por meio do seu complexo enzimático ligninolítico (CHET et al., 1985; KIRK, FARREL, 1987; DAVIS; BURNS, 1990).

Fungos de degradação branca são conhecidos por produzir as enzimas MnP, LiP e lacase que são eficientes na biodegradação de corantes. Alguns deles produzem as três enzimas, enquanto outros produzem somente uma ou duas delas, dependendo do fungo (LEONOWICS et al., 2001). Segundo Young e Yu (1997) a descoloração do “Acid Orange-74” por *P. chrysosporium* chega a 90% e é catalisada pela LiP. Para o fungo *Trametes versicolor*, o segundo

mais estudado depois do *P. chrysosporium*, a degradação ocorre por ação da lacase (SCHLOSSER et al., 1997). Tekere e outros (2001) estudaram diferentes linhagens de fungos de degradação branca para a descoloração de corantes e nenhuma delas apresentou atividade de LiP, estando presente as atividades de lacase e MnP. Analisando o grau de descoloração de corantes, os autores verificaram uma boa descoloração pelo isolado DSPM95 e *T. versicolor*, sendo que o isolado DSPM95, foi o que apresentou melhor taxa de descoloração de corante associado à alta atividade de MnP e lacase.

O fungo *Pleurotus pulmonarius* descoloriu, *in vivo*, corantes sintéticos estruturalmente diferentes (azo, antraceno, trifenilmetano, heterocíclico e polimérico). Segundo os autores, a capacidade da cultura fúngica em descolorir os corantes foi associada a alta produção de lacase pela linhagem (TYCHANOWICZ et al., 2004).

Linhagens de *Phellinus gilvus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus sanguineus* e *Pleurotus sajor-caju* foram avaliadas quanto ao potencial de descoloração em cultura líquida tendo como única fonte de carbono o corante “indigo blue – CI Vat Blue I”. A descoloração teve início no primeiro dia de cultivo observando-se uma diminuição significativa no espectro de absorvância. Ao final de quatro dias, a descoloração foi de 100% quando usado *P. gilvus*. O uso de *P. chrysosporium* levou uma redução de 70%; de *P. sanguineus*, a 91% e de *P. sajor-caju*, 94% (BALAN; MONTEIRO, 2001).

Arora e Chander (2004) empregaram os basidiomicetos *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia brevispora*, *Phlebia fascicularia* e *Phlebia floridensis* na descoloração de vários corantes e constataram que as espécies de *Phlebia* foram mais eficientes na degradação dos corantes analisados que *P. chrysosporium*. “Coracryl pink” foi totalmente descolorido por todas as linhagens de *Phlebia* em 2 horas, enquanto que *P. chrysosporium* levou 3 horas. “Reactive Red”

foi mais eficientemente descolorido (100% em 3h) por *P. brevispora* do que por *P. chryso sporium*, que descoloriu 44,3%, no mesmo tempo de reação.

Em outro trabalho também foram utilizados fungos basidiomicetos para a biodescoloração de corantes comercialmente empregados por várias indústrias. Todas as linhagens testadas descoloriram significativamente o “Poly R 478”. O corante “Coracryl green” foi 100% descolorido pelas linhagens *Dichomitus squalens*, *Irpex flavus*, *Phlebia fascicularia* e *Phlebia floridensis* (CHANDER et al., 2004).

Couto e colaboradores (2004) avaliaram o efeito do pH na descoloração *in vitro* de quatro corantes estruturalmente diferentes (“Indigo Carmine”, “Methyl Orange”, “Bromophenol Blue” e “Poly R-478”), por *Trametes hirsuta*, constatando que em pH 4,0 houve maior remoção da cor dos corantes “Indigo Carmine” (100%) e “Methyl Orange” (70%) em 5 horas e “Poly R-478” (21%) em 7 horas. O corante “Bromophenol Blue” foi totalmente degradado em 2 h em pH 4,0 e 5,0.

No estudo com *Lentinus edodes*, Boer e seus colaboradores (2004) compararam o tempo de produção de MnP com a habilidade de descoloração de dois corantes sintéticos “Poly R 478” e “Remazol Brilliant Blue R” (RBBR). A descoloração máxima foi concomitante com o pico de produção de MnP de 2600 U/g em 12 dias de cultivo a 75 % de umidade.

Couto e Sanromán (2005b) avaliaram a capacidade do fungo *Trametes hirsuta* de descolorir o corante “Lissamine Green B” nas condições *in vitro* e *in vivo*. A descoloração *in vitro* foi de 66% em 12 horas, obtida com extrato enzimático de culturas com 21 dias de fermentação. Os autores observaram a máxima descoloração *in vivo*, a qual foi 96%, em 2,5 horas.

Os fungos *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinsum* e *Pleurotus calypratus* foram utilizados para o estudo de descoloração dos corantes “Orange G” e “Remazol Brilliant Blue R”. Todas as linhagens descoloriram ambos os corantes em 14 dias. *I. resinsum* removeu 95% do

“Orange G” e 98% do “Remazol Brilliant Blue R”, *D. squalens* promoveu 95% de descoloração do “Orange G” e 90% do RBBR e *P. calyptratus* removeu 91% da cor do “Orange G” e 78% da cor do “Remazol Brilliant Blue R”. No mesmo estudo, verificaram que a descoloração do “Orange G” por *I. resinsum* e *P. calyptratus* foi promovida pela lacase e a descoloração do RBBR foi efetuada pela MnP. Para *D. squalens* a lacase e a MnP cooperaram no processo de descoloração (EICHLEROVÁ et al., 2005a).

Goméz e outros (2005) analisaram a habilidade do fungo *Corioloopsis rigida* em descolorir três corantes diferentes estruturalmente. Os resultados mostraram 100% de descoloração do “Indigo Carmine”, depois de 4 horas de tratamento, enquanto “Methyl Green” e “Methyl azo” foram mais resistentes, mostrando 90% a 80% de descoloração, respectivamente, depois de um dia. Os autores observaram também que a linhagem estudada produz principalmente lacase.

Kamida e colaboradores (2005) empregaram os fungos basidiomicetos comestíveis *Pleurotus sajor-caju* (CCB 020) (F2) e *Pleurotus sajor-caju* (PSC 94/03) (F6) na descoloração de efluente líquido contendo corante índigo coletado da estação de tratamento de uma indústria têxtil. Os fungos foram inoculados em bagaço de cana-de-açúcar contendo o efluente, sendo a descoloração total observada aos 14 dias de incubação. Os autores verificaram também que as linhagens apresentaram atividade em todo o período de incubação estudado, com pico de produção de lacase e MnP no 9° e 12° de cultivo, respectivamente, para ambas as linhagens.

Couto e outros (2005) observaram a descoloração do “Sella Solid Red” e “Luganil Green” na presença de três mediadores o ABTS, HBT e RBBR e verificaram que os três compostos foram adequados como sistema de mediador para a lacase, observando uma descoloração de 88% em 10 minutos para o corante “Sella Solid Red” e de 49% para o “Luganil Green” em 20 minutos.

O fungo de degradação branca *Trametes versicolor* foi selecionado para a avaliação do potencial de descoloração dos corantes “Reactive Blue 4” e “Reactive Red 2” em reator contínuo. Os dois corantes apresentaram uma diminuição entre 70% a 85% no espectro de absorbância pelo fungo estudado (NILSSON et al., 2006).

Couto e Sanromán (2006a) analisaram a descoloração *in vitro* do “Nickel II”, “Lissamine Green B” e “Acid Black 48” utilizando-se extrato bruto produzido por *Trametes hirsuta* em pH 3,0 e 5,0. Em pH 5,0 houve pouca redução da cor dos corantes, entretanto o pH 3,0 houve descoloração de 60%, 35% e 50%, para os respectivos corantes. Os autores citados acima relatam que a principal enzima produzida pela linhagem de *Trametes versicolor* estudada, dependendo do resíduo empregado para o cultivo, foi a lacase, e que a melhor atuação em pH ácido se deve ao fato das espécies de *Trametes* secretarem lacases ácido estáveis. Afirmaram também, que a diferença na porcentagem de descoloração indicou a especificidade da enzima em relação aos corantes diferentes estruturalmente.

Couto e Sanromán (2006b) estudaram o efeito do mediador redox ácido violúrico na descoloração de dois corantes recalcitrantes “Acid Red 97” e “Acid Green 26” pelo extrato bruto de lacase obtida de culturas de *Trametes hirsuta*. O mediador foi mais eficiente na concentração de 2mM e 5mM na descoloração do “Acid Red 97” (90%) sendo três vezes maior que na ausência deste. Para o “Acid Green 26” a presença do ácido não influenciou na descoloração demonstrando ser resistente degradação com 26% de descoloração.

Kariminiaae-Hamedani e colaboradores (2007) estudaram a descoloração de corantes azo e antraquinona por uma nova linhagem isolada (L-25), sendo a MnP a principal enzima produzida por este fungo. A eficiência da remoção foi entre 84,9% a 99,6% dentre os corantes em 14 dias de cultivo utilizando uma concentração inicial de 40 mg/L do corante.

2 OBJETIVOS

- a) Estudar a produção das ligninases (MnP, LiP e lacase) por cinco espécies de fungos basidiomicetos *Inonotus rickii*, *Chaetocalathus liliputianus*, *Dacryopinax elegans*, *Lentinus strigellus* e *Pycnoporus sanguineus* em farelo de trigo.
- b) Avaliar a viabilidade do uso de resíduos agrícolas como farelo de trigo, bagaço de cana e palha de arroz como substratos para o crescimento e produção de ligninases pelas linhagens de basidiomicetos selecionadas como melhores produtoras das enzimas.
- c) Caracterizar os extratos enzimáticos brutos produzidos pelas linhagens quanto ao pH e temperatura ótimos para as atividades das enzimas, e quanto à estabilidade das mesmas frente às variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato.
- d) Avaliar o potencial de ação das soluções enzimáticas brutas dos fungos *Lentinus strigellus* e *Pycnoporus sanguineus* sobre os corantes aromáticos com diferentes estruturas químicas (Laranja II, Crisofenina, Vermelho Reativo 120, Azul Cibacron 3GA, Azul Brilhante Remazol R, Cristal Violeta, Azure B e Azul de Metileno).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foram utilizados os fungos basidiomicetos *Inonotus rickii*, *Chaetocalathus liliputianus*, *Dacryopinax elegans*, *Lentinus strigellus* e *Pycnoporus sanguineus* isolados por Xavier-Santos (2003). Os fungos foram coletados sobre troncos e galhos de árvores em decomposição, em dois trechos de mata remanescente da Estação Ecológica do Noroeste Paulista, nos municípios de São José do Rio Preto e Mirassol – SP.

Os isolados foram obtidos como culturas puras a partir de esporos ou por fragmento micelial. As culturas estão sendo mantidas pelo método Castellani (1939), em óleo mineral e em N₂ líquido. (XAVIER-SANTOS, 2003).

3.2 Estudo das ligninases

3.2.1 Inóculo

As linhagens fúngicas foram cultivadas em placas de Petri sobre o meio PDA (Potato Dextrose Agar) da Oxoid, por 2 semanas a 27°C. Cortes da cultura miceliada foram utilizadas como inóculo.

3.2.2 Cultivo para a produção das enzimas

Os substratos utilizados para o cultivo das linhagens foram os resíduos agrícolas lignocelulósicos, farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e palha de arroz. Primeiramente, as cinco linhagens fúngicas foram cultivadas somente em farelo de trigo e posteriormente, as melhores produtoras foram cultivadas, além do farelo de trigo, em bagaço de cana-de-açúcar e palha de arroz.

Os substratos foram lavados em água destilada e secos a 65°C por 2 dias. Após a secagem os materiais foram transferidos para erlenmeyers de 250 ml, esterilizados em autoclave, hidratados e suplementados até 70% de umidade com uma solução de sulfato de amônio a 1% e de sulfato de magnésio a 0,01%. A inoculação dos substratos foi feita por transferência de 1/8 da cultura previamente miceliada em meio PDA em placa de Petri (15 cm), para cada 5g de substrato a ser fermentado. A incubação foi feita a 27°C durante 5 semanas. Foram feitas três repetições das fermentações.

A cada sete dias, o material fermentado de um frasco erlenmeyer, foi suspenso em água destilada (8 mL/g de substrato fermentado), macerado e agitado por uma hora a 100 rpm, filtrado à vácuo e centrifugado a 10000xg, a 10°C. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta para os testes de atividade enzimática.

3.2.3 Medida de atividade enzimática

3.2.3.1 Manganês peroxidase (MnP)

A atividade de MnP na solução enzimática bruta foi determinada a 30°C numa mistura de reação composta de 0,8 mL de tampão lactato de sódio pH 3,0 (0,05M), 0,1 mL de solução de MnSO₄ a 0,5mM e 0,1 mL da solução enzimática bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (40 µM) e a absorbância medida a 270nm. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um µmol de Mn⁺³ por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $8,1 \times 10^3$ /mol/cm (GLENN et al., 1986; AITKEN; IRVINE, 1990). A atividade da MnP foi expressa em unidade de enzima por grama de substrato lignocelulotítico (U/g). A reação de atividade enzimática foi realizada em triplicata e os dados apresentados correspondem a média das reações.

3.2.3.2 Lignina peroxidase (LiP)

A atividade de LiP na solução enzimática bruta foi determinada a 30°C numa mistura de reação composta de 0,8 mL de tampão tartarato dissódico em pH 3,0 (0,05 M), 0,1 mL de solução de álcool veratrílico a 40mM e 0,1 mL da solução enzimática bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,2 mM) e o aumento da absorbância, devido à oxidação do álcool veratrílico, medido a 310 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1µmol de veratraldeído por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $9,3 \times 10^3$ /mol/cm (TIEN; KIRK, 1988). A atividade da LiP foi expressa em unidade de enzima por grama de substrato lignocelulotítico (U/g). A reação de atividade enzimática foi realizada em triplicata e os dados apresentados correspondem a média das reações.

3.2.3.3 Lacase

A atividade de lacase foi determinada a 30°C usando 2,2''-azino-bisetilbenthiazolina (ABTS) como substrato, em mistura contendo 0,8 mL de tampão acetato de sódio pH 5,0 (0,1M), 0,1 mL de solução de ABTS a 0,03% (p/v) e 0,1mL da solução enzimática bruta (BUSWELL et al., 1995). A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1µmol de ABTS por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $3,6 \times 10^4$ /mol/cm para o ABTS oxidado (BOURBONNAIS; PAICE, 1988). A atividade da lacase foi expressa em unidade de enzima por grama de substrato lignocelulotítico (U/g). A reação de atividade enzimática foi realizada em triplicata e os dados apresentados correspondem a média das reações.

3.2.3.4 Expressão das unidades enzimáticas

As atividades enzimáticas foram expressas em U/g de material fermentado e os cálculos foram feitos de acordo com a equação abaixo.

$$U \text{ (U/mL)} = [(Abs/E)/V_{Ez}/t]$$

$$U/g = U/mL \times Va$$

Onde:

E = coeficiente de extinção molar

V_{Ez} = volume de enzima utilizado

T = tempo de reação

Va = volume de água adicionado ao meio fermentado

3.3 Caracterização físico-química das ligninases

Foi realizada a caracterização de MnP e lacase produzidas pelos microrganismos estudados, quanto ao pH e temperatura ótimos de atividade enzimática. Foi feita também, a determinação da estabilidade das enzimas frente às variações de pH e temperatura. Para este experimento o *Lentinus strigellus* foi cultivado por uma semana e o *Pycnoporus sanguineus* por uma e duas semanas nas mesmas condições descritas no item 2.2.2.

3.3.1 Determinação do pH ótimo

O comportamento da atividade de MnP e lacase em função do pH foi estudado realizando a reação em pH variando de 2,5 a 7,0 e 2,0 a 7,0, respectivamente. Os tampões utilizados foram: Citrato-NaOH (pH 2,5 a 5,5) e Bis Tris-HCL (pH 5,5 a 7,0), para a MnP e Citrato-NaOH (2,0 a 3,0), Acetato (pH 3,0 a 5,5) e Citrato-fosfato (pH 5,5 a 7,0), para a Lacase, em concentração de 0,2M.

3.3.2 Determinação da temperatura ótima

O efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas foi avaliado incubando-se as misturas de reação em temperaturas de 25° a 70°C em pH determinado como ótimo.

3.3.3 Determinação da estabilidade frente às variações de pH

A estabilidade em diferentes valores de pH quando em ausência de substrato, foi avaliada incubando-se os extratos enzimáticos brutos em pH variando de 2,0 a 10,5 em tampões: Citrato-NaOH (pH 2,0 a 3,0), Acetato (pH 3,0 a 5,5), Citrato-fosfato (5,5 a 7,0), Tris-HCL (pH 7,0 a 8,5) e Glicina-NaOH (pH 8,5 a 10,5) a 25°C por 24 horas na proporção de 1mL de tampão para cada mL enzima bruta. Após esse período, foram tomadas as amostras para determinação da atividade enzimática residual, nas condições de pH e temperaturas ótimos.

3.3.4 Determinação da estabilidade térmica

As soluções enzimáticas foram incubadas por uma hora, em ausência de substrato, em temperaturas que variaram de 30°C a 75°C em intervalos de 5°C. Após esse período, foram tomadas amostras das soluções incubadas para realização dos ensaios de atividade enzimática nas condições ótimas de pH e temperatura.

3.4 Avaliação da ação das enzimas sobre corantes aromáticos

Os extratos enzimáticos obtidos pelas culturas de *Lentinus strigellus* e *Pycnoporus sanguineus*, em meio de farelo de trigo, no mesmo período de fermentação descrito (2.3) foram avaliados quanto a capacidade de descorar os corantes: Laranja II, Crisofenina, Vermelho Reativo 120, azul Cibacron 3GA, Azul Brilhante Remazol R, Cristal Violeta, Azure B e Azul de Metileno cujas propriedades químicas são mostrados nas figuras de 5 a 12.

3.4.1 Laranja II

Sinônimos: Acid Orange A, 4-(2-Hydroxy-1-naphthylazo), benzenesulfonic acid sodium salt, Tropaeolin 000 No. 2 e Acid Orange 7.

Fórmula Molecular: $C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$

Peso Molecular: 350.32

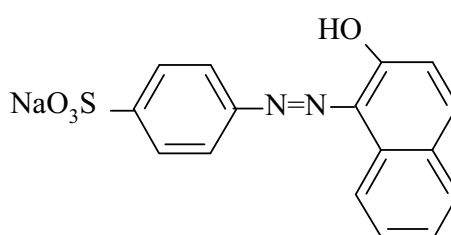


Figura 5: Fórmula estrutural do corante Laranja II.

3.4.2 Crisofenina

Sinônimos: Direct Yellow 12, Crisofenina

Fórmula Molecular: $C_{30}H_{26}N_4Na_2O_8S_2$

Peso Molecular: 680.66

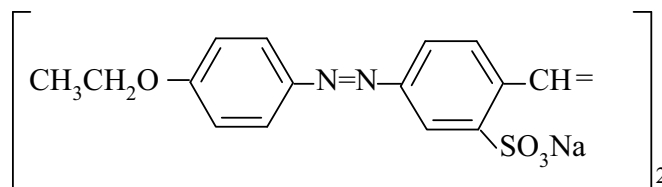


Figura 6: Fórmula estrutural do corante Crisofenina.

3.4.3 Vermelho Reativo 120

Fórmula Molecular: $C_{44}H_{24}Cl_2N_{14}Na_6O_{20}S_6$

Peso Molecular: 1469.98

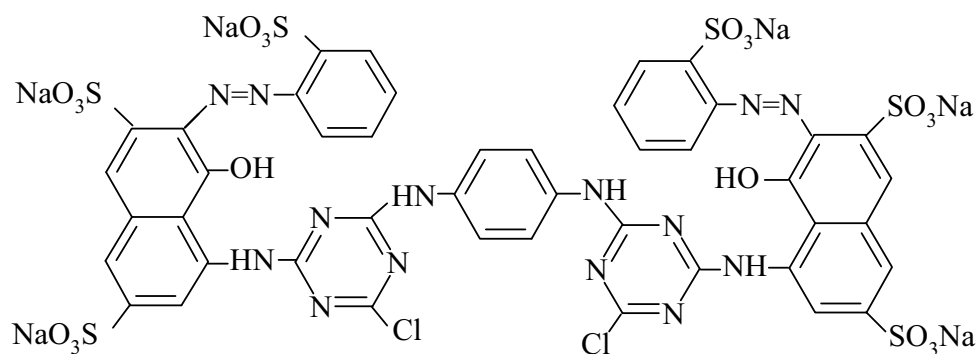


Figura 7: Fórmula estrutural do corante Vermelho Reativo 120.

3.4.4 Azul Cibacron 3GA

Fórmula Molecular: $C_{29}H_{20}ClN_7O_{11}S_3$

Peso Molecular: 774.16

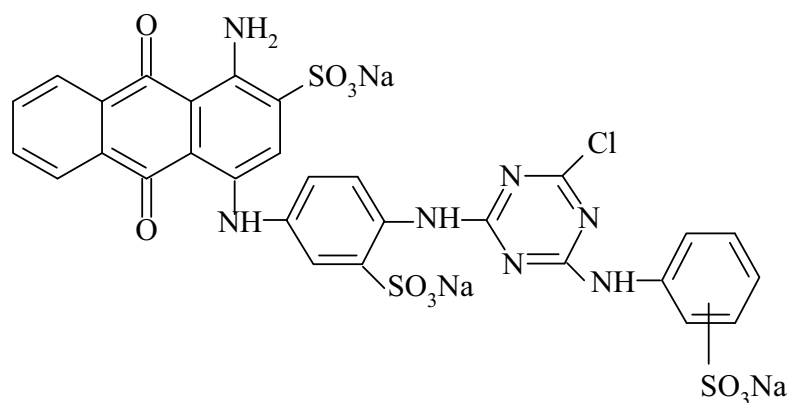


Figura 8: Fórmula estrutural do corante Azul Cibacron 3GA.

3.4.5 Azul Brillhante Remazol R

Fórmula Molecular: $C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$

Peso Molecular: 626,56

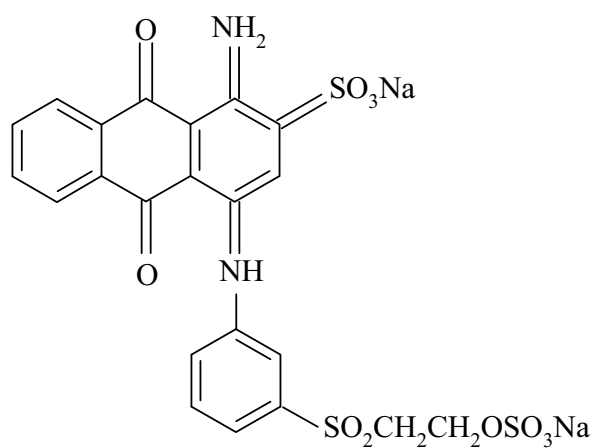


Figura 9: Fórmula estrutural do corante RBBR

3.4.6 Cristal Violeta

Fórmula Molecular: $C_{25}H_{30}ClN_3$

Peso Molecular: 407.98

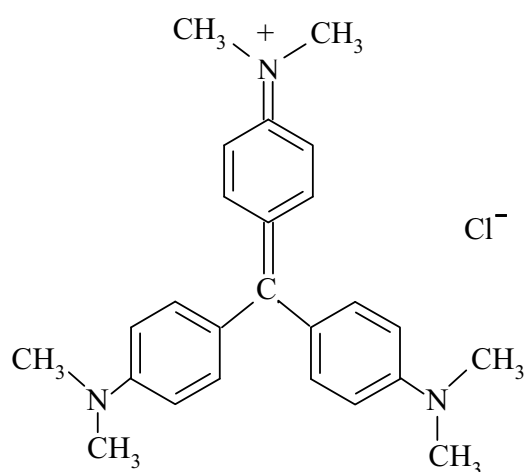


Figura 10: Fórmula estrutural do corante Cristal Violeta.

3.4.7 Azure B

Fórmula Molecular: $C_{15}H_{16}ClN_3S$

Peso Molecular: 305.83

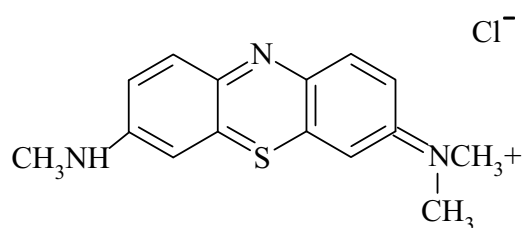


Figura 11: Fórmula estrutural do corante Azure B.

3.4.8 Azul de Metileno

Fórmula Molecular: $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$

Peso Molecular: 373.90

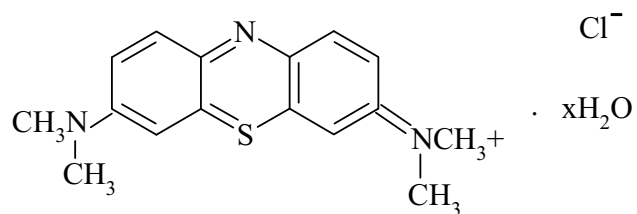


Figura 12: Fórmula estrutural do corante Azul de Metileno.

3.4.9 Comprimento de onda e concentração dos corantes

Antes dos ensaios de descoloração cada corante foi submetido a uma varredura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda (λ) entre 200 e 800 nm para identificação do λ de maior absorbância. Utilizando-se o comprimento de onda de absorção máxima de cada corante, foram realizados os testes para verificação da concentração do corante mais adequada para leitura no espectrofotômetro.

3.4.10 Temperatura e pH

A temperatura utilizada para os ensaios de descoloração foi de 25°C e os pH testados foram o ácido (tampão acetato pH 3,5) e o neutro (tampão tris-HCl pH 7,0).

3.4.11 Tempo de incubação

As amostras da mistura de reação foram incubadas durante 30 minutos, 6, 24 e 48 horas nos experimentos de descoloração em presença e em ausência dos substratos das ligninases.

3.4.12 Mistura de reação

Nos ensaios de descoloração foram utilizados: 0,8 mL do corante a ser testado na concentração previamente definida (item 3.4.9), 0,1 mL de solução enzimática bruta, 0,1 mL de tampão a ser testado (item 3.4.10) a 0,5 M (pH 3,5 ou 7,0) e 0,01 mL de peróxido de hidrogênio 40 μ M. Foram feitos dois controles para cada ensaio de descoloração. No primeiro substituiu-se a enzima por água e no segundo, manteve-se o volume da enzima, tampão e substituiu-se o corante por água.

3.4.13 Ensaio com substratos enzimáticos

Foi testada a influência dos substratos das enzimas utilizados nos ensaios enzimáticos de MnP e lacase sobre descoloração dos corantes. A mistura de reação continha: 0,7 mL de corante, 0,1 mL solução enzimática bruta, 0,1 mL de tampão, 0,01 mL de peróxido de hidrogênio 40 μ M e 0,1 mL dos substratos sulfato de manganês (0,5 mM) ou ABTS (0,03% p/v).

3.4.14 Ensaio enzimático

Simultaneamente aos experimentos de descoloração, foram realizados os testes de atividade enzimática de MnP e lacase para quantificar a enzima presente no extrato bruto no momento da descoloração. A atividade foi determinada no pH e temperatura ótimos de cada enzima de acordo com a metodologia.

3.4.15 Cálculo da descoloração

Os cálculos para quantificação do grau de descoloração foram feitos a partir da relação de porcentagem feita entre as absorbâncias dos controles e reação.

$$P \text{ absR} = 100 \times \text{Abs R} / \text{Abs C}$$

Onde:

P absR = Porcentagem de absorção da reação de descoloração

Abs R = Absorbância da reação de descoloração

Abs C = Absorbância do controle

% Descoloração = 100 – P absR

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de ligninases em farelo de trigo para seleção das linhagens.

Foram testadas as atividades de ligninases (MnP, LiP e lacase) em meio contendo farelo de trigo, cultivado com cinco espécies de fungos basidiomicetos: *Inonotus rickii*, *Chaetocalathus liliputianus*, *Dacryopinax elegans*, *Lentinus strigellus* e *Pycnoporus sanguineus*, por cinco semanas.

4.1.2 *Inonotus rickii*

A produção das ligninases em fermentação em estado sólido pelo fungo *Inonotus rickii* no substrato farelo de trigo apresenta-se ilustrada na Figura 13-A. Observando-se os dados, pode-se verificar que os maiores valores de atividades de MnP foram encontrados na primeira (1049 U/g), segunda (1020 U/g) e terceira semanas (1045 U/g) de fermentação, havendo uma decréscimo de produção na quarta e quinta semanas.

A análise das atividades de LiP apresentados na Figura 13-B, indica que o pico de atividade ocorreu na terceira semana de cultivo (269 U/g), mas sendo encontrado ainda na quarta semana uma atividade considerável da enzima (220 U/g).

Quanto à lacase (Figura 13-C) as maiores produções foram detectadas na primeira (511 U/g) e na terceira (498 U/g) semanas de fermentação. Nos demais períodos de cultivo amostrados observou-se atividades bem inferiores a estas, sendo aproximadamente 50% menor que a do pico.

Para este microrganismo, a produção enzimática para os três tipos de ligninases estudados (MnP, LiP e lacase), ficou em torno da terceira semana, possivelmente indicando ser este o período com o melhor tempo de cultivo (3ª semana) para se obter uma produção das três enzimas.

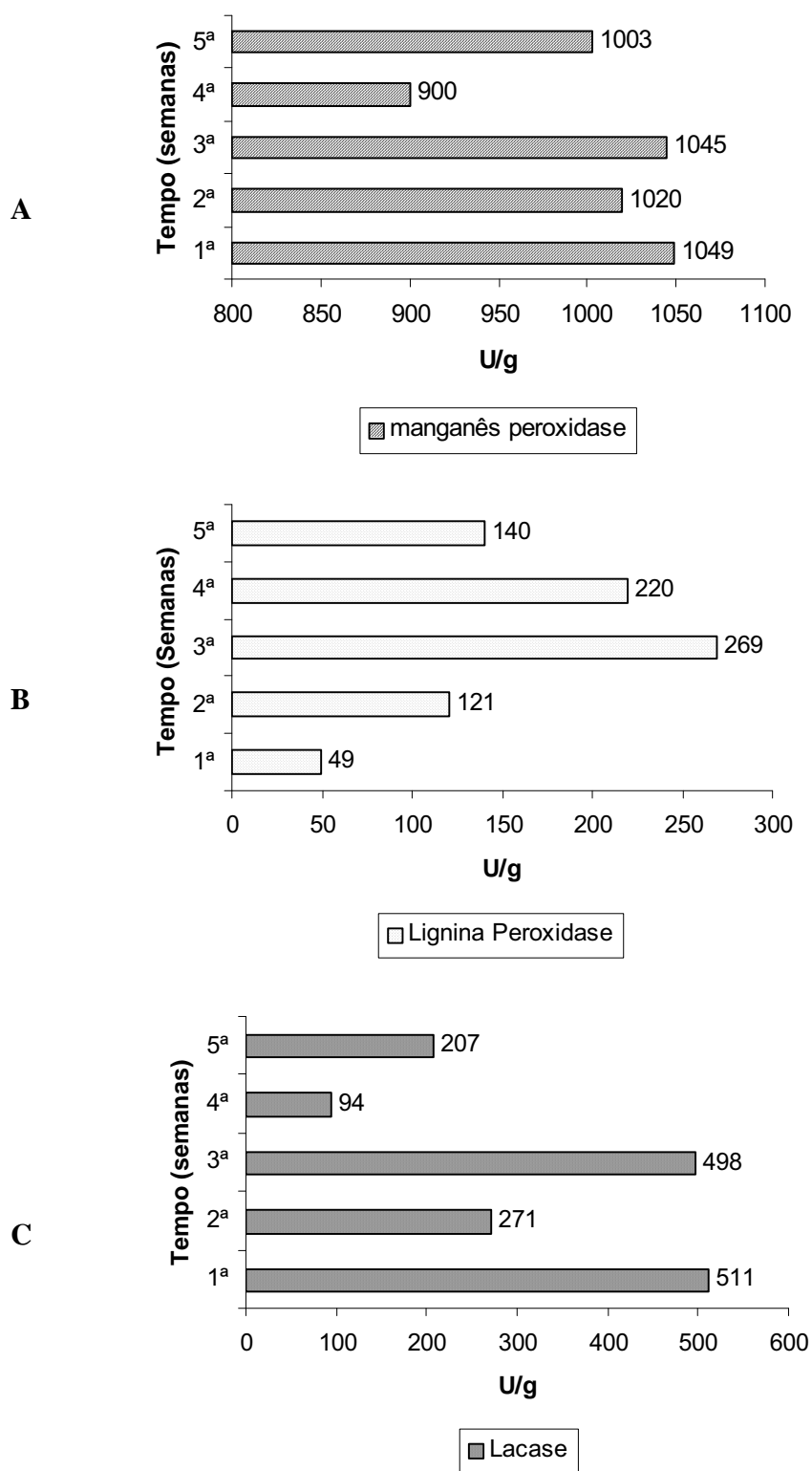


Figura 13: Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de ligninases por *Inonotus rickii*. (A) atividade de MnP; (B) atividade de LiP e (C) atividade de Lacase.

Os dados indicam que *Inonotus ricki*, produz as três enzimas sendo um ótimo produtor de MnP.

4.1.3 *Chaetocalathus liliputianus*

A Figura 14 mostra a produção de ligninases por *Chaetocalathus liliputianus*, em fermentação em estado sólido no substrato farelo de trigo.

Analisando-se a produção de MnP (Figura 14-A), verifica-se dois picos de atividade da enzima na terceira (1877 U/g) e na quinta semanas (1863 U/g). Os valores encontrados na segunda (1426 U/g) e quarta (1453 U/g) semanas também se mostraram significativos, enquanto que na primeira semana, a atividade foi bem inferior (848 U/g).

Na Figura 14-B, verifica-se que a produção de LiP foi maior na primeira semana (308 U/g). Nas semanas posteriores houve um decréscimo da atividade enzimática até a terceira semana, sendo que na quarta semana ocorreu um aumento e, novamente, na quinta semana houve um decréscimo enzimático.

A produção de lacase mostrada na Figura 14-C apresenta também dois picos de atividade, sendo um na segunda semana (108 U/g) e o outro na quarta semana (105 U/g). Nas demais semanas a produção foi bem inferior (1ª sem. = 53 U/g e 5ª sem. = 11 U/g), sendo que na terceira semana não foi detectada nenhuma atividade.

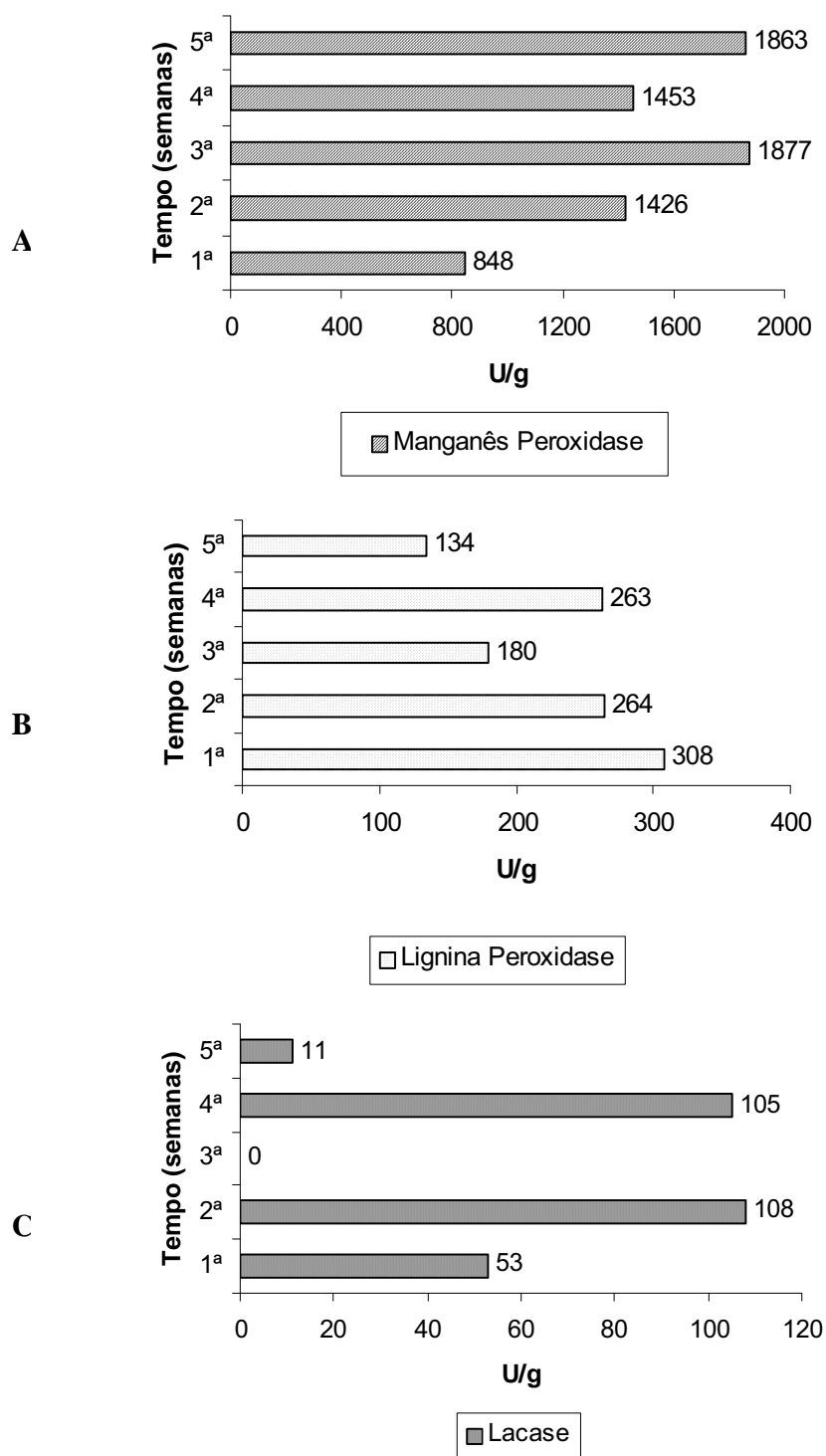


Figura 14: Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de ligninases por *Chaetocalathus liliputianus*.
 (A) atividade de MnP; (B) atividade de LiP e (C) atividade de Lacase.

4.1.4 *Dacryopinax elegans*

A produção de ligninases pela espécie *Dacryopinax elegans* em fermentação em estado sólido tendo como substrato o farelo de trigo, é mostrada na Figura 15.

Pode-se observar na Figura 15-A uma ótima produção de MnP. A atividade da enzima manteve-se em torno de 3000 U/g ao longo do período fermentativo estudado, com pico de atividade na primeira semana (3846 U/g), decrescendo nas duas semanas seguintes (3673 U/g e 3371 U/g, respectivamente) e voltando a aumentar na quarta semana (3481 U/g). A segunda maior produção da enzima foi na quinta semana (3686 U/g).

A análise da Figura 15-B, mostra a produção de LiP com maior atividade na primeira semana (586 U/g) e um decréscimo gradativo com o decorrer do tempo de cultivo (452 U/g, 321 U/g, 301 U/g e 220 U/g, respectivamente para segunda, terceira, quarta e quinta semanas).

Para a lacase (Figura 15-C), o pico de atividade foi na segunda semana (442 U/g) caindo na terceira semana (299 U/g), não sendo detectada a atividade da enzima nas duas últimas semanas.

4.1.5 *Lentinus strigellus*

A Figura 16 ilustra a produção de ligninases pela espécie *Lentinus strigellus*, em fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo.

A Figura 16-A mostra a atividade de MnP que sofreu pouca variação no decorrer do período de 5 semanas de cultivo, com média de atividade em torno de 1600 U/g. A atividade na primeira semana foi 1584 U/g, aumentando na segunda semana para 1870 U/g. O pico de atividade desta enzima foi na terceira semana com uma produção de 1932 U/g.

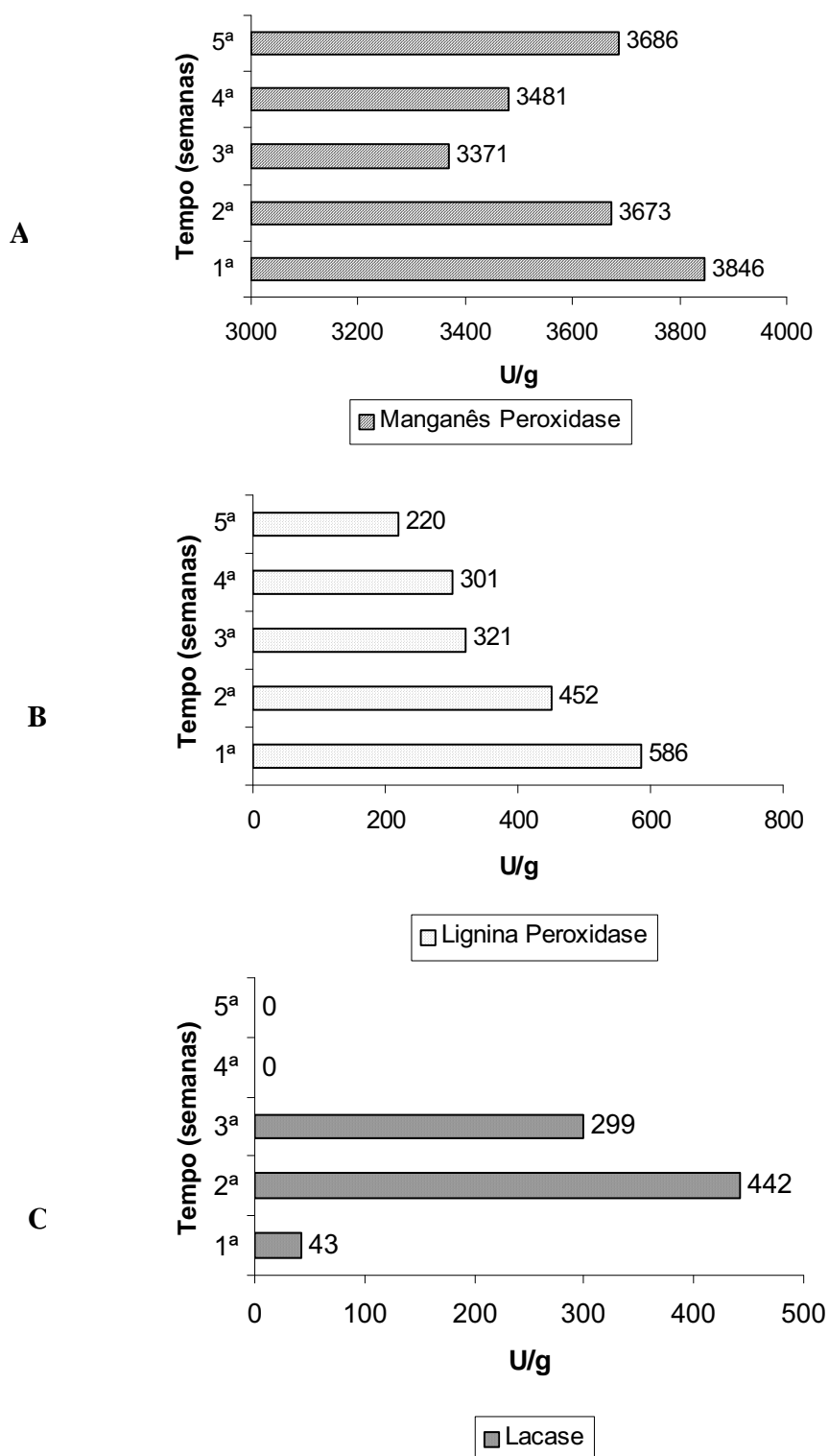


Figura 15: Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de ligninases por *Dacryopinax elegans* (A) atividade de MnP; (B) atividade de LiP e (C) atividade de Lacase.

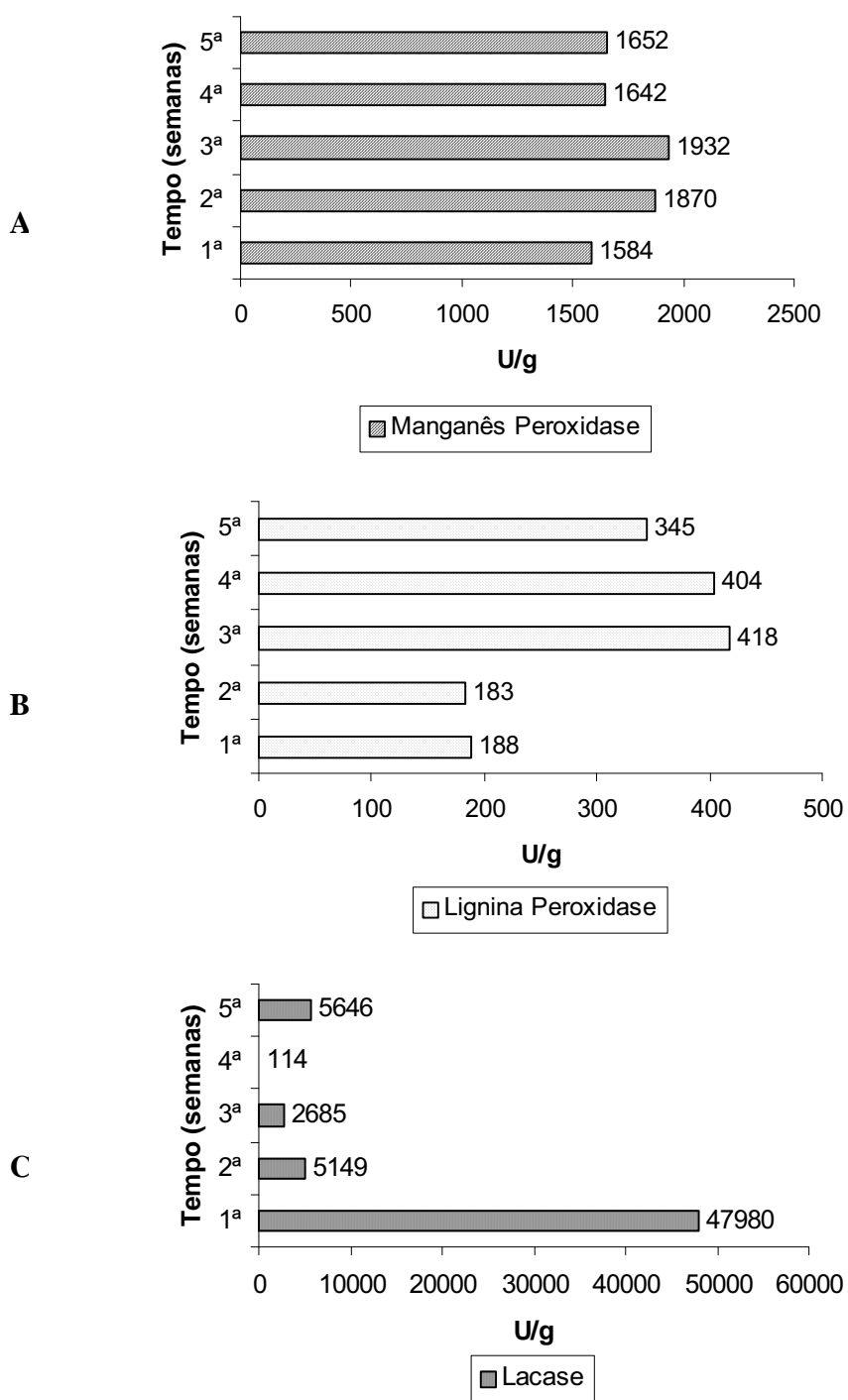


Figura 16: Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de ligninases por *Lentinus strigellus*. (A) atividade de MnP; (B) atividade de LiP e (C) atividade de Lacase

A atividade de LiP (Figura 16-B) iniciou com 188 U/g na primeira semana de cultivo e diminuindo para 183 U/g na segunda semana. A maior atividade foi de 418 U/g obtida na terceira semana, coincidindo com o máximo de produção de MnP. A partir daí houve uma diminuição (404 U/g e 345 U/g, respectivamente) na quarta e quinta semana.

Observando a Figura 16-C verifica-se uma ótima produção de lacase. Sendo que a mais expressiva atividade foi obtida na primeira semana (47980 U/g) do processo. As demais semanas tiveram uma brusca redução da atividade (5149 U/g, 2685 U/g, 114 U/g e 5646 U/g).

4.1.6 *Pycnoporus sanguineus*

Pode-se observar na Figura 17 a produção de ligninases em farelo de trigo em fermentação em estado sólido pelo fungo *Pycnoporus sanguineus*.

A produção da enzima MnP está demonstrada na Figura 17-A, onde verifica-se o pico de atividade de 2306 U/g primeira semana de cultivo. Nas demais semanas a produção não se alterou muito (1680 U/g, 1834 U/g, 1949 U/g e 1639 U/g de atividade, respectivamente, na segunda, terceira, quarta e quinta semanas).

Na Figura 17-B pode ser vista a atividade de LiP que iniciou com 226 U/g, aumentando para 313 U/g na segunda semana e atingindo atividade máxima de 407 U/g na terceira semana. Na quarta (300 U/g) e na quinta semana (195 U/g) houve decréscimo na produção.

Quanto a lacase (Figura 17-C) houve uma ótima produção da enzima. Já na primeira semana, a atividade atingiu 66173 U/g, aumentando para 81386 U/g na segunda semana. O primeiro pico de atividade com 93226 U/g foi na terceira semana, diminuindo para 51120 U/g na quarta semana e voltando a aumentar na quinta semana determinando o segundo pico de atividade de 97880 U/g.

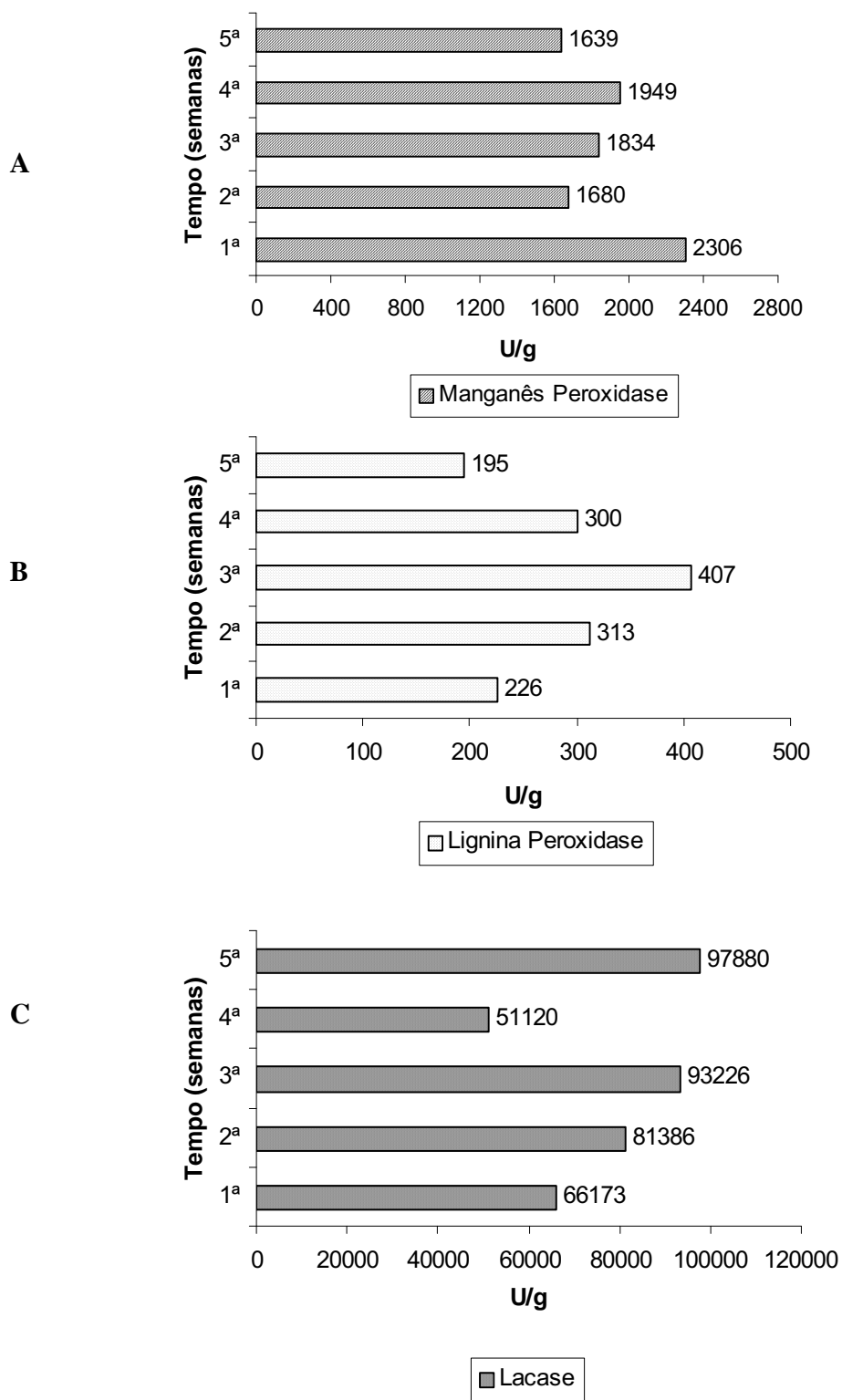


Figura 17: Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de ligninases por *Pycnoporus sanguineus*. (A) atividade de MnP; (B) atividade de LiP e (C) atividade de Lacase

Apesar dos resultados terem sido apresentados e discutidos anteriormente sendo a enzima expressa em unidade por grama de substrato sólido seco, a conversão em unidades por mililitros de solução enzimática é possível, visto que foi obtido um determinado volume de solução de enzima bruta após a suspensão do material em água. Essa conversão se faz necessária para a comparação com outros dados da literatura, os quais, são em sua grande maioria, expressos em U/mL.

Os dados apresentados mostraram que as cinco espécies de basidiomicetos estudadas: *Inonotus rickii*, *Dacryopinax elegans*, *Pycnoporus sanguineus*, *Chaetocalathus liliputians* e *Lentinus strigellus* são excelentes produtoras de MnP, visto que produziram 131,2 U/mL (1049 U/g), 480,8 U/mL (3846 U/g) e 288,3 U/mL (2306 U/g) em sete dias de cultivo, 234,6 U/mL (1877 U/g) e 241,6 U/mL (1932 U/g) em 21 dias de cultivo, respectivamente. Isso pode ser confirmado pela comparação com dados da literatura.

Tabela 2: Conversão da atividade de MnP em U/mL.

Fungo	U/g	U/mL
<i>Inonotus ricki</i>	1049	131,2
<i>Chaetocalathus liliputianus</i>	1877	234,6
<i>Dacryopinax elegans</i>	3846	480,6
<i>Lentinus strigellus</i>	1932	241,6
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	2306	288,3

Hatvani e Mécs (2001) mostram que *Lentinus edodes* produziu 1,5 U/mL de MnP, tendo usado como substrato uma mistura de resíduo de maltagem (do processo de fabricação da cerveja), serragem de carvalho e perlito (vidro vulcânico utilizado para aerar o meio) por sete dias de cultivo. No trabalho realizado por Fujian e outros (2001), foi desenvolvido um perfil de produção

de MnP em condições ótimas utilizando-se meio contendo palha explodida em vapor e farelo de trigo, sendo a atividade máxima atingida de 1,3 U/mL em cinco dias de cultivo.

Arora e colaboradores (2002) avaliaram a produção de MnP por sete linhagens de basidiomicetos pela de fermentação em estado sólido utilizando palha de trigo como substrato em um período de 32 dias de cultivo. A produção mais significativa de MnP foi 29,8 U/mL (238 U/g) obtida pelo *Phlebia radiata*. O fungo de degradação branca *Pleurotus ostreatus* foi cultivado em palha de trigo para a produção de MnP. Os autores observaram que o pico de atividade da enzima foi 0,006 U/mL no sétimo dia de cultivo (SHRIVASTAVA et al., 2005).

No caso da lacase, houve uma ótima produção somente nas espécies *Lentinus strigellus* e *Pycnoporus sanguineus*, indicando que são excelentes produtores desta enzima. Para o fungo *L. strigellus* observou-se uma maior produção no sétimo dia de cultivo com 5997,5 U/mL. A atividade mostrou ser pouco estável, e rapidamente a produção da enzima foi reduzida em 89% do valor máximo. Já para o *P. sanguineus* verificou-se quantidades ainda maiores da enzima na quinta semana de fermentação atingindo 12235 U/mL (97880 U/g). Ao contrário da espécie *L. strigellus*, os níveis de atividade enzimática pelo *P. sanguineus* mantiveram-se elevados ao longo dos 35 dias de cultivo.

Os resultados apresentados para a lacase são superiores que os mostrados pela literatura. Couto e outros (2000) avaliaram a produção de lacase por fermentação em estado sólido pelo fungo *P. chrysosporium* sobre partículas de poliuretano, tendo como atividade máxima 0,1 U/mL (0,8 U/g) no sexto dia de cultivo. No trabalho de Souza e colaboradores (2004), os autores observaram que *Pleurotus pulmonarius* produziu 2500 U/mL (20000 U/g) em meio de farelo de trigo a 85% de umidade em 12 dias de fermentação.

Em outro trabalho, também com o fungo *Pleurotus pulmonarius*, foi estudada a produção de lacase por FES utilizando-se espiga de milho. Foram comparadas duas suplementações do meio

de cultura: uma com glicose e tartarato de amônio e outra com compostos fenólicos (ácido ferúlico, 2,5-xilidina e álcool veratrílico). A melhor produção foi observada para o meio contendo os compostos fenólicos obtendo 430 U/mL (3440 U/g), e para o outro meio, a produção foi menor 180 U/mL (1440 U/g), ambos em seis dias de cultivo (TYCHANOWICZ et al., 2004).

O potencial da polpa de coco como matéria prima para a produção de lacase pelo fungo de degradação branca *Trametes hirsuta* foi investigado. A atividade máxima da cultura controle obteve 0,01 U/mL (0,08U/g) em 24 dias de cultivo. Já o meio suplementado com sulfato de cobre a produção aumentou para 0,05 U/mL (0,4 U/g) em 22 dias de fermentação (COUTO; SANROMÁN, 2005b). Meza e outros (2005) estudaram a produção de lacase por *Pycnoporus cinnabarinus* em uma coluna com bagaço de cana-de-acúcar e a influência da adição de vapor de etanol como indutor da enzima. A máxima atividade de lacase foi 90U/g na concentração 7 gm^{-3} em 14 dias de cultivo.

Em todas as linhagens não foram detectados níveis de LiP muito significativos, durante as três repetições dos experimentos, mostrando que essas linhagens não são boas produtoras desta enzima.

Diferentes fungos de degradação branca produzem diferentes combinações das enzimas do complexo ligninolítico: alguns produzem LiP e MnP, outros MnP e lacase, ou LiP e lacase e ainda, fungos que não produzem LiP nem MnP, mas somente lacase e outras enzimas (HATTAKKA, 1994; BALAN; MONTEIRO, 2001). A presença de atividade de MnP e lacase, de acordo com os resultados obtidos em outras pesquisas, apontaram ser a produção combinada destas duas enzimas a forma mais comum de expressão dentre os fungos de degradação branca (PELAEZ et al., 1995; NERUD; MISURCOVA, 1996). Além disso, sugerem que a atividade de MnP e/ou lacase podem ser suficientes na degradação da lignina em alguns fungos (NERUD, 1996). Em outro estudo de enzimas ligninolíticas com outros fungos de degradação branca

também concluem que alta atividade de LiP é dependente das condições da cultura e/ou da linhagem relacionada (NERUD; MISURCOVA, 1996).

Pesquisas com várias espécies de *Ganoderma* detectaram genes que codificam a LiP, porém nenhum autor detectou a atividade da enzima pelas linhagens, demonstrando que essas espécies tem potencial genético, mas a produção de LiP em alguns fungos de degradação branca necessitam de indução do meio de cultura (D'SOUZA et al., 1999; VARELA et al., 2000; SILVA et al., 2005).

4.2 Estudo da produção de ligninases pelas linhagens selecionadas.

Dentre as linhagens de basidiomicetos testadas, as espécies *Lentinus strigellus* e *Pycnoporus sanguineus* foram selecionadas para os estudos posteriores nos quais outros resíduos agrícolas foram avaliados como substrato. Pela análise da Figura 18, pode-se observar que todos os fungos mostraram-se produtores de MnP. Nenhum dos microrganismos utilizados no trabalho apresentaram níveis significantes de LiP. Apenas as espécies *L. strigellus* e *P. sanguineus* produziram boa quantidade de lacase. O critério de seleção destes basidiomicetos foi o de escolher aquele fungo que produziu simultaneamente o maior número de enzimas do complexo ligninolítico. Portanto, as espécies escolhidas para os estudos posteriores foram *L. strigellus* e *P. sanguineus*.

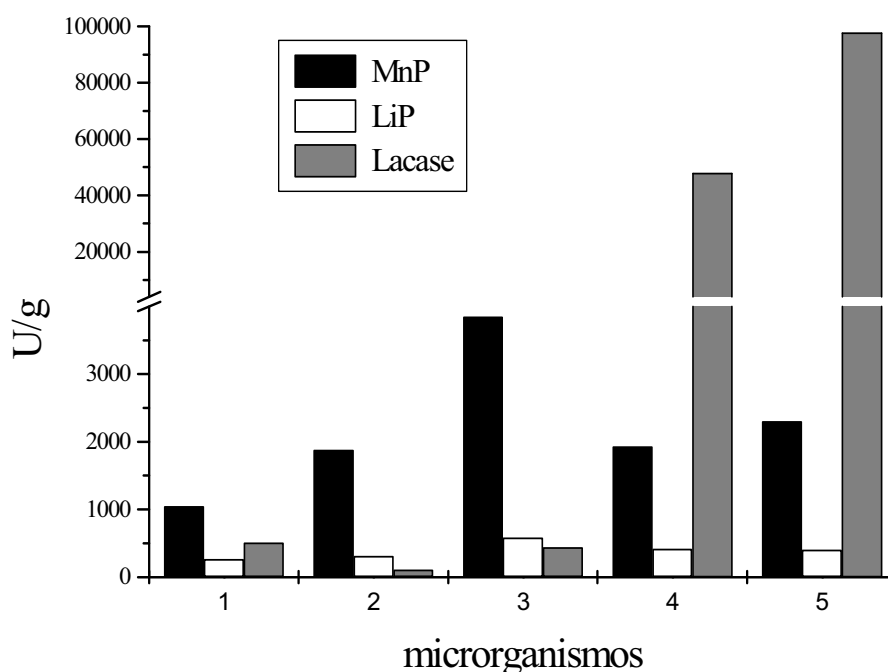


Figura 18: Produção de ligninases pelas cinco linhagens de basidiomicetos.

Legenda: 1) *Inonotus rickii*; 2) *Chaetocalathus liliputianus*; 3) *Dacryopinax elegans*; 4) *Lentinus strigellus* e 5) *Pycnoporus sanguineus*.

4.3 Produção de ligninases nos diferentes substratos

Foi avaliada a produção de ligninases (MnP e lacase) em bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e palha de arroz, pelas duas linhagens selecionadas, (*Lentinus strigellus* e *Pycnoporus sanguineus*). O processo de fermentação foi realizado por cinco semanas.

4.3.1 *Lentinus strigellus*

A Figura 19 ilustra a produção de ligninases em fermentação sólida, pela espécie *L. strigellus*, nos diferentes substratos.

Analisando-se os dados da Figura 19-A, pode se verificar que a atividade de MnP foi maior em farelo de trigo, com pico de produção na primeira semana de fermentação (1943 U/g), porém, uma segunda melhor atividade aparece na quarta semana (557 U/g). A atividade máxima em palha de arroz foi coincidente com o primeiro pico obtido em farelo de trigo, embora com menor atividade da enzima (476 U/g). Em bagaço de cana-de-açúcar, a produção de MnP foi baixa (284 U/g), na segunda semana.

A análise da atividade de lacase (Figura 19-B), mostra que a maior produção foi detectada em farelo de trigo em amostras coletadas na primeira semana de fermentação (35148 U/g). O mesmo aconteceu para a palha de arroz, sendo a maior atividade revelada na primeira semana (8820 U/g). Em meio constituído por bagaço de cana-de-açúcar a melhor atividade foi observada na segunda semana (550 U/g), entretanto, ao ser comparada esta atividade com os demais substratos utilizados, esta produção mostrou-se não significativa.

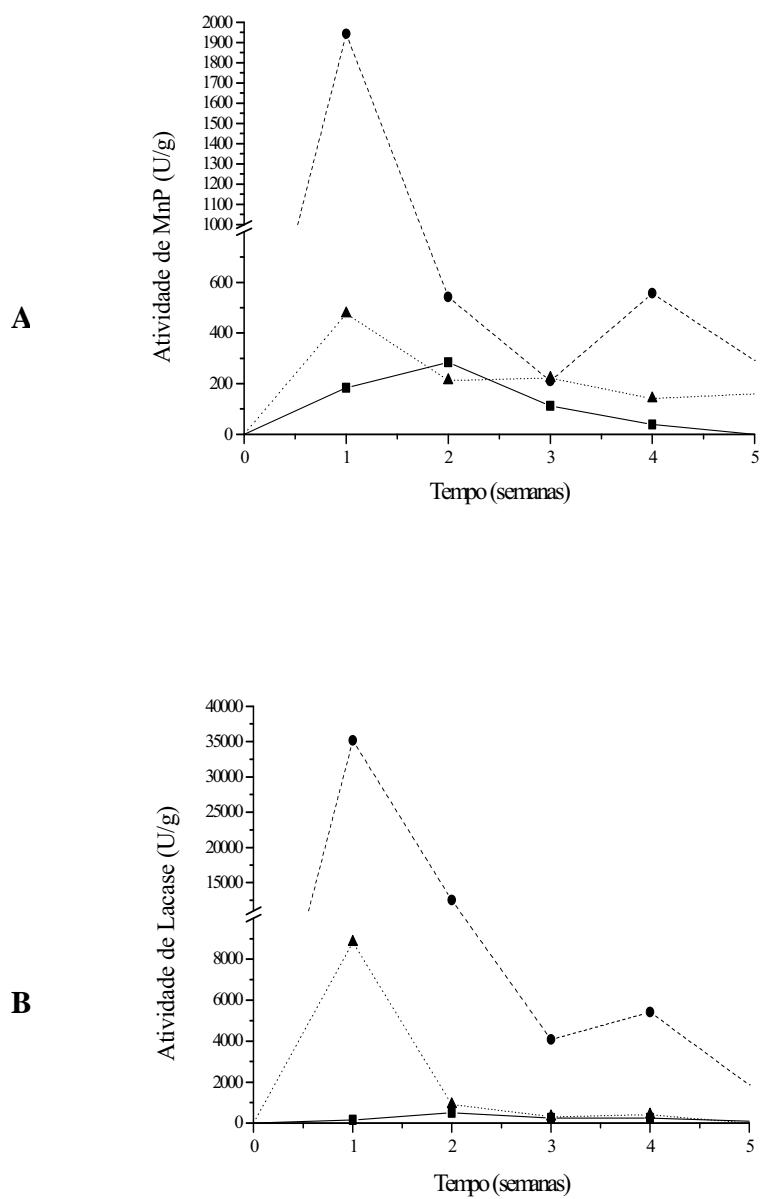


Figura 19: Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre a produção de ligninases pelo fungo *Lentinus strigellus*.

(A) Atividade de MnP; (B) Atividade de Lacase

Legenda: —■— Cana-de-açúcar; ---●--- Farelo de trigo;▲.... Palha de arroz

4.3.2 *Pycnoporus sanguineus*

A produção de ligninases em fermentação em estado sólido pela espécie *P. sanguineus*, é mostrada na Figura 20. Pode-se observar que a atividade enzimática de MnP (Figura 20-A), foi maior em farelo de trigo, sendo o pico de produção na primeira semana (1099 U/g). Entretanto, uma produção razoável da enzima também foi obtida em meio de palha de arroz (575 U/g) nesse mesmo período de fermentação. Em meio constituído por bagaço de cana-de-açúcar a atividade de MnP foi muito baixa (237 U/g).

Pode-se verificar na Figura 20-B que a produção de lacase manteve-se constante entre a segunda, terceira e a quarta semana, sendo este último o melhor pico de atividade (97360 U/g). Já as atividades nos meios palha de arroz (3949 U/g) e bagaço de cana-de-açúcar (11850 U/g) não foram expressivas como no meio contendo farelo de trigo.

Em relação às atividades máximas das enzimas, *L. strigellus* apresentou pico de produção de MnP no mesmo período que *P. sanguineus*, apesar disso, a atividade enzimática do primeiro foi aproximadamente 43% maior que o segundo. No caso da lacase ocorreu o inverso, para o *P. sanguineus* a produção foi quase três vezes maior comparando-se com a espécie *L. strigellus*, no entanto, em períodos de cultivos diferentes.

Ao comparar os resultados obtidos de atividade enzimática das ligninases dos dois fungos nos substratos utilizados, os resultados indicaram que o farelo de trigo foi um ótimo indutor de ligninases, pois foi o meio de cultivo que possibilitou uma produção significativa de MnP e lacase pelos fungos estudados. A elevada habilidade do farelo de trigo em induzir a produção de lacase pode ser relacionada com a abundância de estruturas fenólicas que este composto possui, já que estruturas com anéis aromáticos são conhecidos como indutores dessa enzima (ZILLY et al., 2001). A palha de arroz, entretanto, também levou à produção considerável das enzimas.

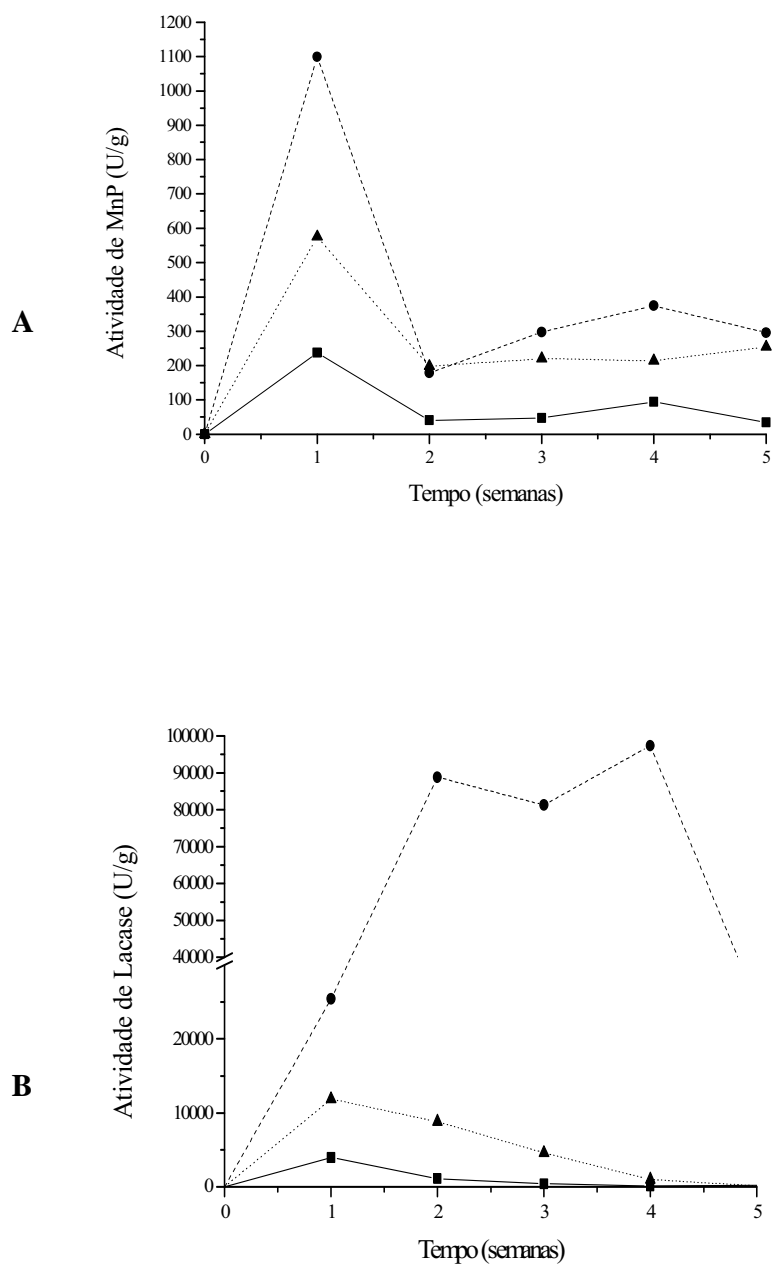


Figura 20: Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre a produção de ligninases pelo fungo *Pycnoporus sanguineus*.

(A) Atividade de MnP e (B) Atividade de Lacase

Legenda: —■— Cana-de-açúcar; ---●--- Farelo de trigo;▲.... Palha de arroz

Os resultados obtidos permitem concluir que *L. strigellus* e *P. sanguineus* são ótimos produtores de MnP, tendo produzido 242,9 U/mL (1943 U/g) e 137,4 U/mL (1099 U/g), em sete dias de cultivo, respectivamente. Comparando-se com dados de outros autores, a boa produção por esses fungos é ainda mais evidente. Gonçalves e outros (1998) analisaram sete linhagens de *Panus tigrinus* quanto à produção de MnP por fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar, sendo que a maior atividade (0,01 U/mL) foi observada somente em duas linhagens FTPT- 4743 e FTPT-4744, num processo de 10 dias. Em outro trabalho, Kapich e colaboradores (2004), investigaram a produção da ligninase MnP pelo microrganismo *P. chrysosporium* ME-446, utilizando-se de um meio líquido suplementado com farelo de trigo de diferentes regiões geográficas (África do Sul, Espanha, Alemanha e Finlândia). A atividade máxima foi obtida pelo farelo de trigo da Espanha (0,58 U/mL), em dois dias de cultivo. Urek e Pazarlioglu (2004), avaliaram o tempo de produção de MnP por outra linhagem de *P. chrysosporium* em FES utilizando espuma de poliestireno como suporte inerte, sendo observado o pico de atividade (0,421 U/mL) no sexto dia de cultivo.

A produção descrita nesse trabalho, só encontra semelhança com o dados de Boer e outros (2004), onde foram analisados meios de cultura com diferentes teores de umidade (75%, 80% e 83%). O fungo *Lentinus edodes* produziu, respectivamente à concentração de água citada anteriormente 2600 U/g, 2000 U/g e 1470 U/g de MnP, em 12 dias de cultivo, nas respectivas umidades.

Em relação a lacase, também houve uma boa produção tanto para *L. strigellus* (4393 U/mL), quanto para o *P. sanguineus* (12170 U/mL) em farelo de trigo. Os resultados são confirmados ao se comparar com dados da literatura. Segundo Arora e Gill (2001), o farelo de trigo foi indutor das lacases produzidas por *D. flavida*, *P. brevispora*, *P. radiata* e *P. sanguineus*.

Couto e colaboradores (2002) estudaram a produção de lacase pelo fungo *Trametes versicolor* na condição de fermentação em estado sólido onde foram analisados vários substratos, dentre eles, partículas de poliuretano (suporte inerte), palha de trigo, palha de cevada, fragmentos de serragem e farelo de cevada como suporte não inerte. Sendo este último o meio que possibilitou níveis de atividade máxima (1,15 U/mL) em 18 dias de cultivo.

Gómes e outros (2005) estudaram a produção de lacase por *Coriolopsis rigida* em casca de castanha e farelo de cevada por fermentação em estado sólido, em meios com e sem suplementação com sulfato de cobre. Os autores verificaram atividades de 0,96 U/mL em 12 dias de fermentação para o meio contendo casca de castanha com sulfato de cobre e 18 U/mL em meio de farelo de cevada também enriquecido com sulfato de cobre em 25 dias de cultivo.

Resíduos da fruta kiwi foram utilizados como substrato para a otimização da produção de lacase por uma linhagem de *Trametes hirsuta*, sendo obtido a maior atividade (5,4 U/mL) em meio contendo uma concentração 0,150 g/L de amônio e 2,5 g de resíduo de kiwi pré-tratado em 13 dias de cultivo (ROSALES et al., 2005).

Vikineswary e colaboradores (2006) estudaram a viabilidade do aproveitamento de resíduos agro-industriais como substrato para a produção de lacase pelo fungo *P.sanguineus* em FES. Utilizaram três agro-resíduos: “Hampas” (subproduto gerado da palmeira *Metroxylon sagu* depois da extração do amido), OPFPt (bagaço do processamento do óleo da palmeira) e serragem da madeira de seringueira. A atividade máxima da enzima utilizando “hampas” e “OPFPt” como substrato foi 7,6 U/g e 7,5 U/g respectivamente, em 11 dias de cultivo. Já a produção em serragem de seringueira foi menor (5,7 U/g) nas mesmas condições de fermentação.

Em outro trabalho, Couto e Sanromán (2006) analisaram o potencial da casca e da semente de amendoim suplementado com sulfato de cobre (2mM) para a produção de lacase por *Trametes hirsuta* em FES em erlenmeyer durante 30 dias a 30°C e 90% de umidade. O melhor meio foi a

semente de amendoim, sendo a atividade máxima da enzima (0,0042 U/mL) observada no 14º dia de cultivo.

4.4 Caracterização físico-química das ligninases

A caracterização da MnP produzida pelos dois fungos foi realizada a partir das soluções enzimáticas brutas extraídas na primeira semana de cultivo. Os ensaios para lacase de *L. strigellus* e *P. sanguineus* foram realizados com soluções enzimáticas brutas obtidas na primeira e na segunda semanas de fermentação, respectivamente.

4.4.1 Determinação do pH ótimo para a atividade das enzimas

4.4.1.1 *Lentinus strigellus*

Na Figura 21-A pode-se observar que a MnP produzida por *L. strigellus* apresentou a maior atividade na faixa de pH compreendida entre 2,5 e 4,5 com máximo em pH 3,0. A partir do pH 4,5 observou-se um declínio na atividade desta enzima, até a redução de 50% da atividade em pH 7,0.

Para a lacase de *L. strigellus* a faixa de pH ficou entre 2,0 e 3,0, tendo o pico da atividade em pH 2,5. Sendo que, a partir do pH 3,5 houve uma queda acentuada na atividade desta enzima, chegando a uma redução de 90% da atividade em pH 4,5. Não foi encontrada atividade em pH maior do que 5,0 (Figura 21-B).

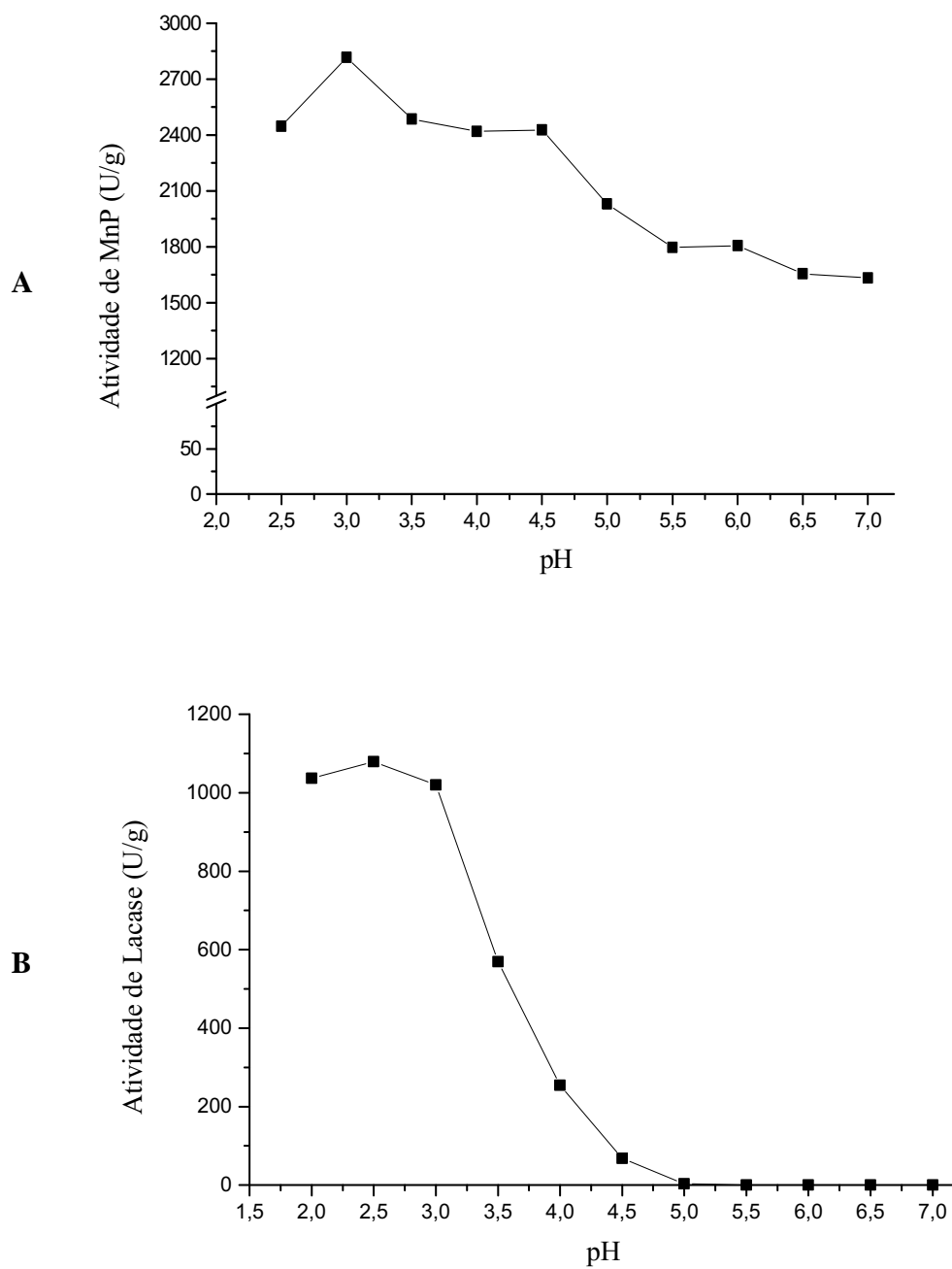


Figura 21: Efeito do pH sobre a atividade das ligninases produzidas por *Lentinus strigellus*. Tampões utilizados para MnP: Citrato-NaOH (pH 2,5 a 5,5) e Bis Tris-HCl (pH 5,5 a 7,0) e para Lacase Citrato-NaOH (pH 2,0 a 3,0), Acetato (pH 3,0 a 5,5) e Citrato-fosfato (pH 5,5 a 7,0).

(A) Atividade de MnP e (B) Atividade de Lacase

4.4.1.2 *Pycnoporus sanguineus*

A Figura 22-A representa a atividade de MnP produzida por *P. sanguineus*, a qual apresentou pH ótimo em 3,5. Porém, esta enzima manteve uma atividade considerável entre uma ampla faixa de pH (2,5 e 5,5).

A lacase produzida pelo fungo *P. sanguineus* (Figura 22-B) também mostrou máxima atividade em pH ácido (3,0), havendo um decréscimo da atividade da enzima a partir deste valor de pH, chegando a uma redução de aproximadamente 85% em pH 5,5. Não foi detectada atividade em pH maior que 6,0.

Pode-se observar que para as enzimas de ambos os fungos, *L. strigellus* e *P. sanguineus*, os perfis de atividade tanto das MnPs quanto das lacases, apresentaram algumas semelhanças entre si quando submetidos às variações de pH. As MnPs de *L. strigellus* e a de *P. sanguineus* apresentaram ambas pH ácido (3,0 e 3,5), com declínio da atividade até pH 7,0 e 7,5, respectivamente. As lacases também mostraram pH ótimo ácido, não sendo mais encontrada atividade nos pHs 5,0 e 6,0, respectivamente.

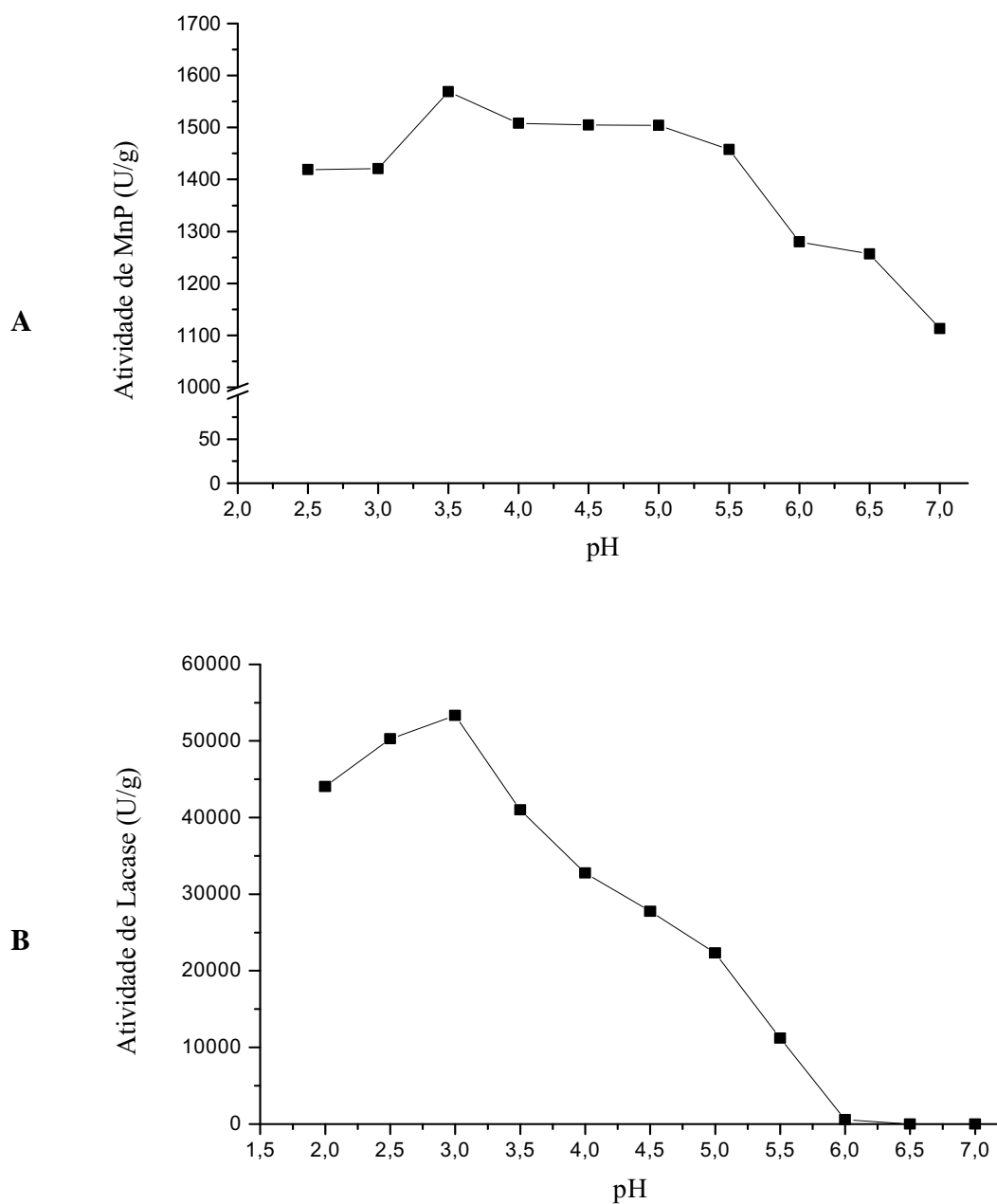


Figura 22: Efeito do pH sobre a atividade das ligninases produzidas por *Pycnoporus sanguineus*. Tampões utilizados para MnP: Citrato-NaOH (pH 2,5 a 5,5) e Bis Tris-HCl (pH 5,5 a 7,0) e para Lacase Citrato-NaOH (pH 2,0 a 3,0), Acetato (pH 3,0 a 5,5) e citrato-fosfato (pH 5,5 a 7,0)
(A) Atividade de MnP e (B) Atividade de Lacase

4.4.2 Determinação da temperatura ótima para a atividade das enzimas

4.4.2.1 *Lentinus strigellus*

A MnP produzida pela linhagem *L. strigellus* teve um aumento gradativo da atividade enzimática entre a temperatura de 25°C e 40°C, sendo o pico de atividade observado em 40°C. A 70°C a enzima ainda apresentou 54 % de sua atividade (Figura 23-A).

Na Figura 23-B observa-se que a máxima atividade de lacase de *L. strigellus* ficou entre 50 e 55°C. A 60°C foi observada ainda 70% da atividade. A atividade da enzima não foi expressiva nas temperaturas abaixo de 50°C e acima de 60°C.

4.4.2.2 *Pycnoporus sanguineus*

Observando a Figura 24-A, verifica-se um aumento da atividade de MnP produzida por *P. sanguineus* a partir de 30°C, chegando à máxima atividade na temperatura de 40°C. A 70°C a enzima ainda manteve 59% de atividade.

Quanto a lacase de *P. sanguineus* (Figura 24-B), a faixa de temperatura ótima foi encontrada entre 60°C a 70°C, apresentando acima dessa temperatura uma queda de atividade até uma redução de 80% da atividade da enzima a 85°C.

Analisando-se os dados obtidos, verifica-se que as MnPs produzidas tanto por *L. strigellus* quanto por *P. sanguineus* tiveram temperatura ótima de 40°C e ambas conservaram mais de 50% da atividade a 70°C. Para as lacases observa-se comportamentos diferentes para as duas linhagens estudadas, pois para o fungo *L. strigellus* não foi detectada atividade significativa fora da faixa ótima da enzima. Já para a espécie *P. sanguineus*, a lacase manteve uma ampla faixa de atividade com relação à temperatura. Entretanto, as duas lacases apresentaram atividades ótimas acima de 55°C.

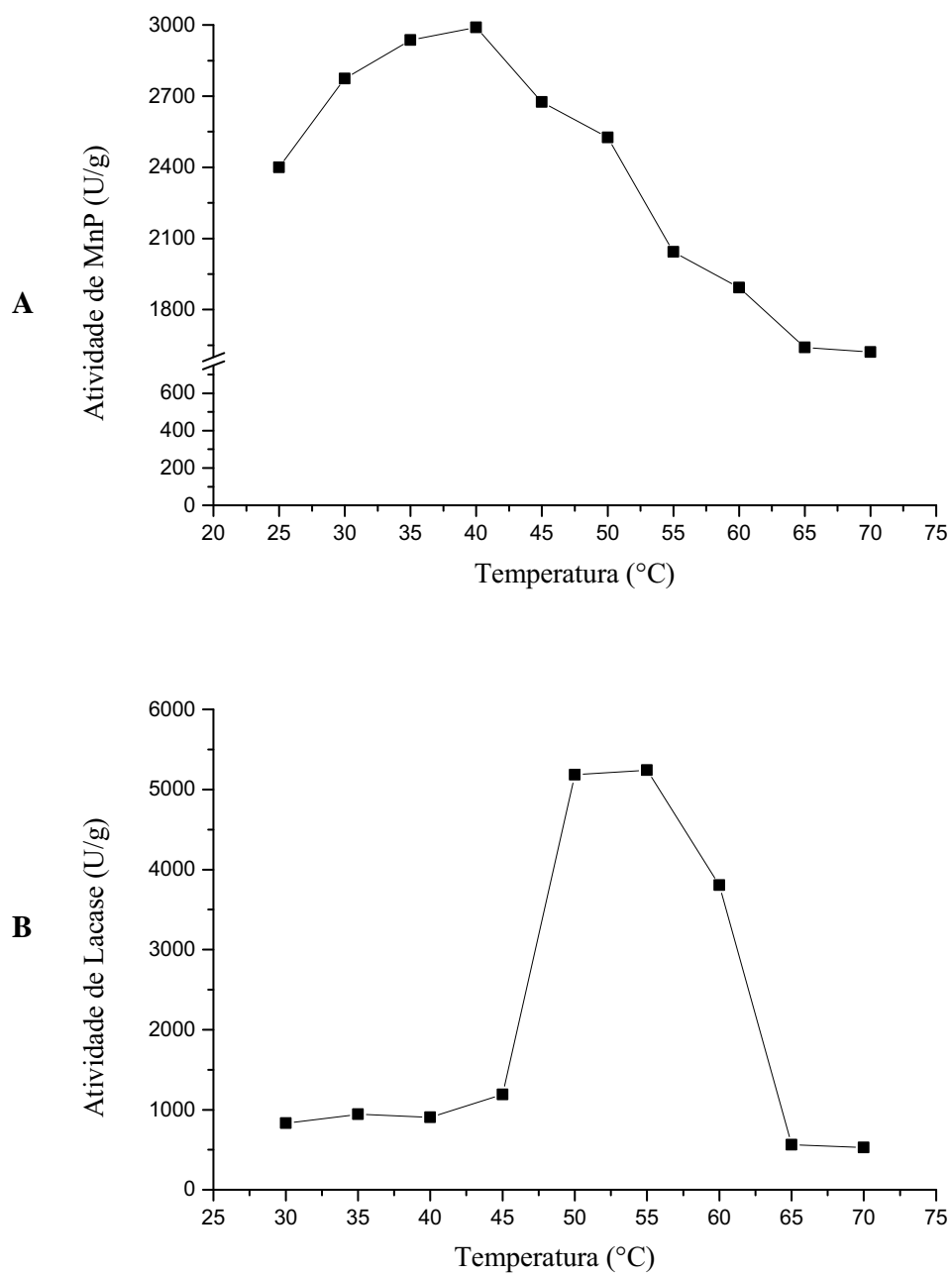


Figura 23: Efeito da temperatura sobre a atividade das ligninases produzida por *Lentinus strigellus*.

(A) Atividade de MnP e (B) Atividade de Lacase

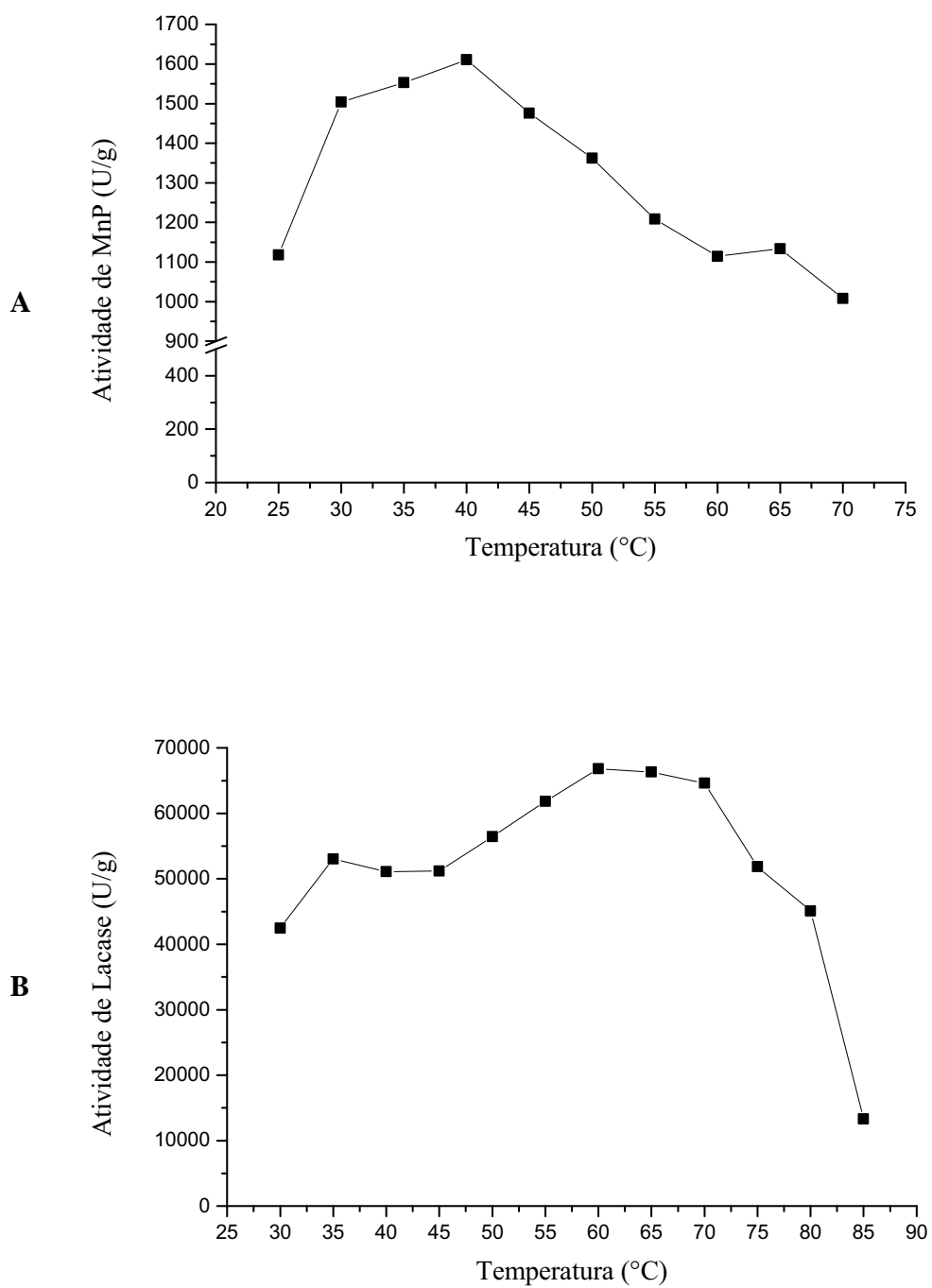


Figura 24: Efeito do pH sobre a atividade das ligninases produzidas por *Pycnoporus sanguineus*. (A) Atividade de MnP e (B) Atividade de Lacase

4.4.3 Efeito do pH sobre a estabilidade das ligninases

4.4.3.1 *Lentinus strigellus*

As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com o pH e temperatura ótimos para cada uma das enzimas das linhagens fúngicas estudadas.

Analisando-se a Figura 25-A referente à estabilidade da enzima MnP produzida por *L. strigellus* frente à variação de pH após 24h a 25°C, verifica-se que a enzima mostrou-se estável praticamente ao longo de toda a faixa de pH estudada, porém com uma ativação em pH entre 2,5 a 4,0.

A lacase da espécie *L. strigellus* (Figura 25-B) apresentou a estabilidade máxima em pH neutro (7,0), preservando em 80% a atividade original na faixa de pH entre 5,5 a 8,0.

4.4.3.2 *Pycnoporus sanguineus*

Quanto à estabilidade com relação à variação de pH da MnP produzida pela linhagem *P. sanguineus* também observou-se 100% da atividade enzimática em toda a faixa de pH estudada, sendo observada uma ativação da enzima em pH 3,5 (Figura 26-A).

Já para a lacase da linhagem *P. sanguineus* observou-se um aumento gradativo da estabilidade a partir do pH 3,0, e com máxima estabilidade na faixa de pH entre 7,5 a 8,0 (Figura 26-B).

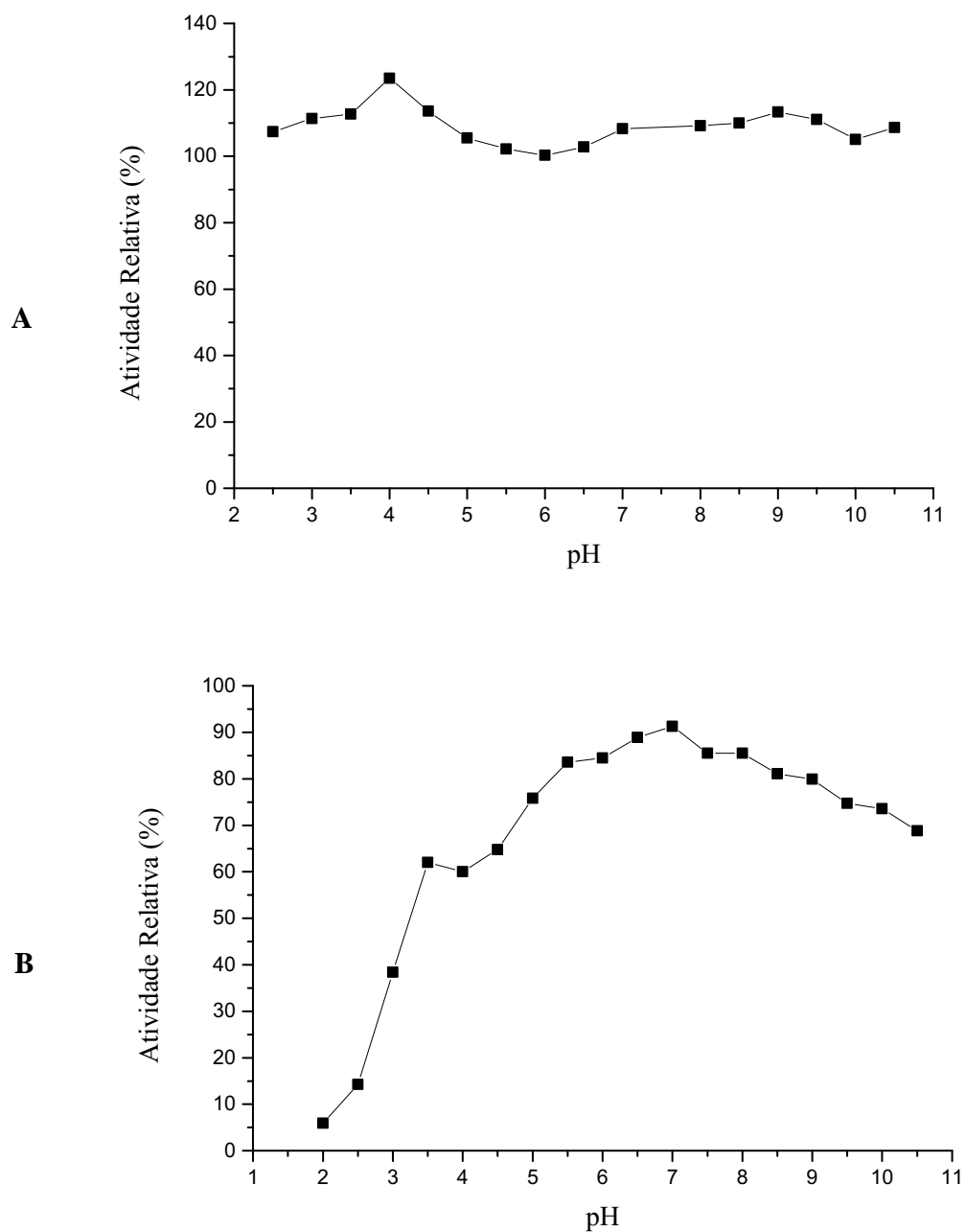


Figura 25: Efeito do pH na estabilidade das ligninases produzidas por *Lentinus strigellus*. Tampões: Citrato-NaOH (2,0 a 3,0), Acetato (3,0 a 5,5), Citrato-fosfato (5,5 a 7,0), Tris-HCl (pH 7,0 a 8,5) e Glicina-NaOH (pH 8,5 a 10,5). (A) Atividade de MnP e (B) Atividade de Lacase

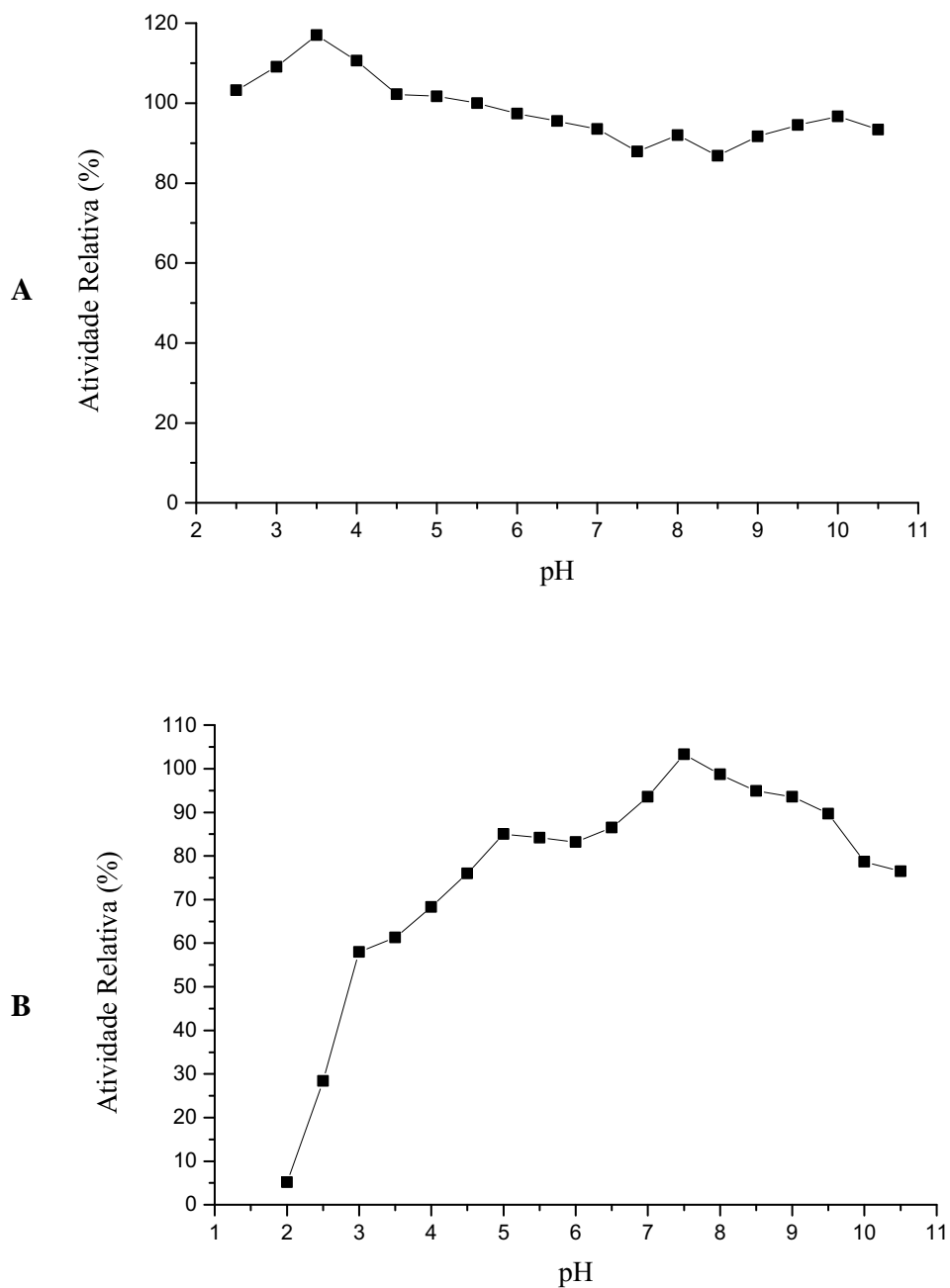


Figura 26: Efeito do pH na estabilidade das ligninases produzidas por *Pycnoporus sanguineus*. Tampões: Citrato-NaOH (2,0 a 3,0), Acetato (3,0 a 5,5), Citrato-fosfato (5,5 a 7,0), Tris-HCl (pH 7,0 a 8,5) e Glicina-NaOH (pH 8,5 a 10,5). (A) Atividade de MnP e (B) Atividade de Lacase

4.4.4 Efeito da temperatura sobre a estabilidade das ligninases

4.4.4.1 *Lentinus strigellus*

Pode-se observar na Figura 27-A que a MnP produzida pelo fungo *L. strigellus* preservou mais de 80% de sua atividade original quando mantida em temperatura entre 30° e 40°C por uma hora em ausência de substrato. A característica de termoestabilidade da enzima pode ser confirmada pela preservação de 70% de sua atividade inicial mesmo após 1 hora a 70°C.

A lacase da espécie *L. strigellus* apresentou mais de 90% de sua atividade original a 45°C, havendo um decréscimo gradativo da estabilidade entre 50° e 65°C até inativação a 70°C (Figura 27-B).

4.4.4.2 *Pycnoporus sanguineus*

A enzima MnP de *P. sanguineus* sofreu ativação ao ser incubada entre 15°C a 30°C e manteve 80% de atividade até 75°C (Figura 28-A). A lacase produzida dessa linhagem foi estável em temperaturas entre 30°C e 45°C, preservando 50% de sua atividade a 65°C, sendo inativada a 75°C (Figura 28-B).

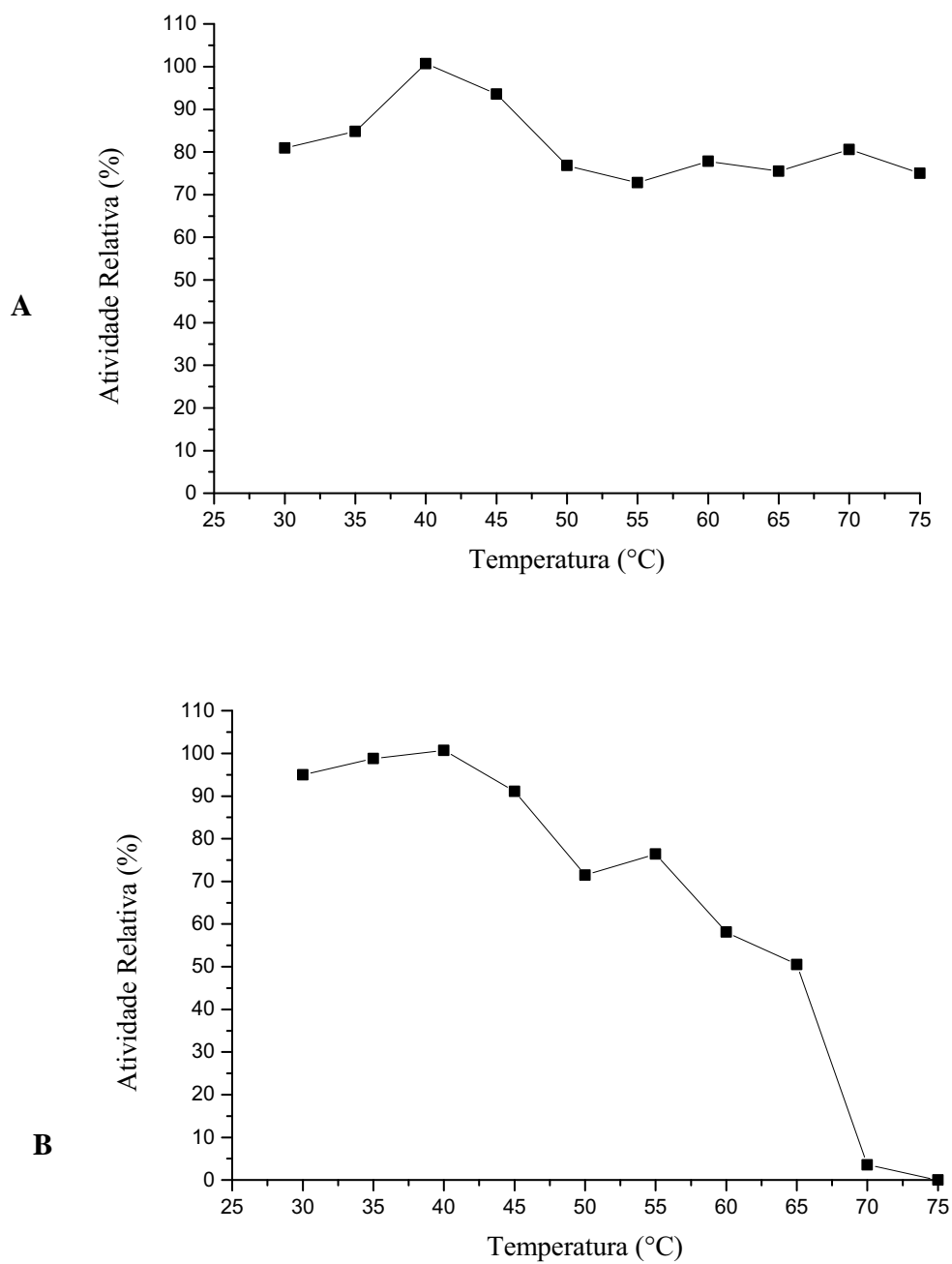


Figura 27: Efeito da temperatura sobre a estabilidade das ligninases produzidas por *Lentinus strigellus*.
(A) Atividade de MnP e (B) Atividade de Lacase

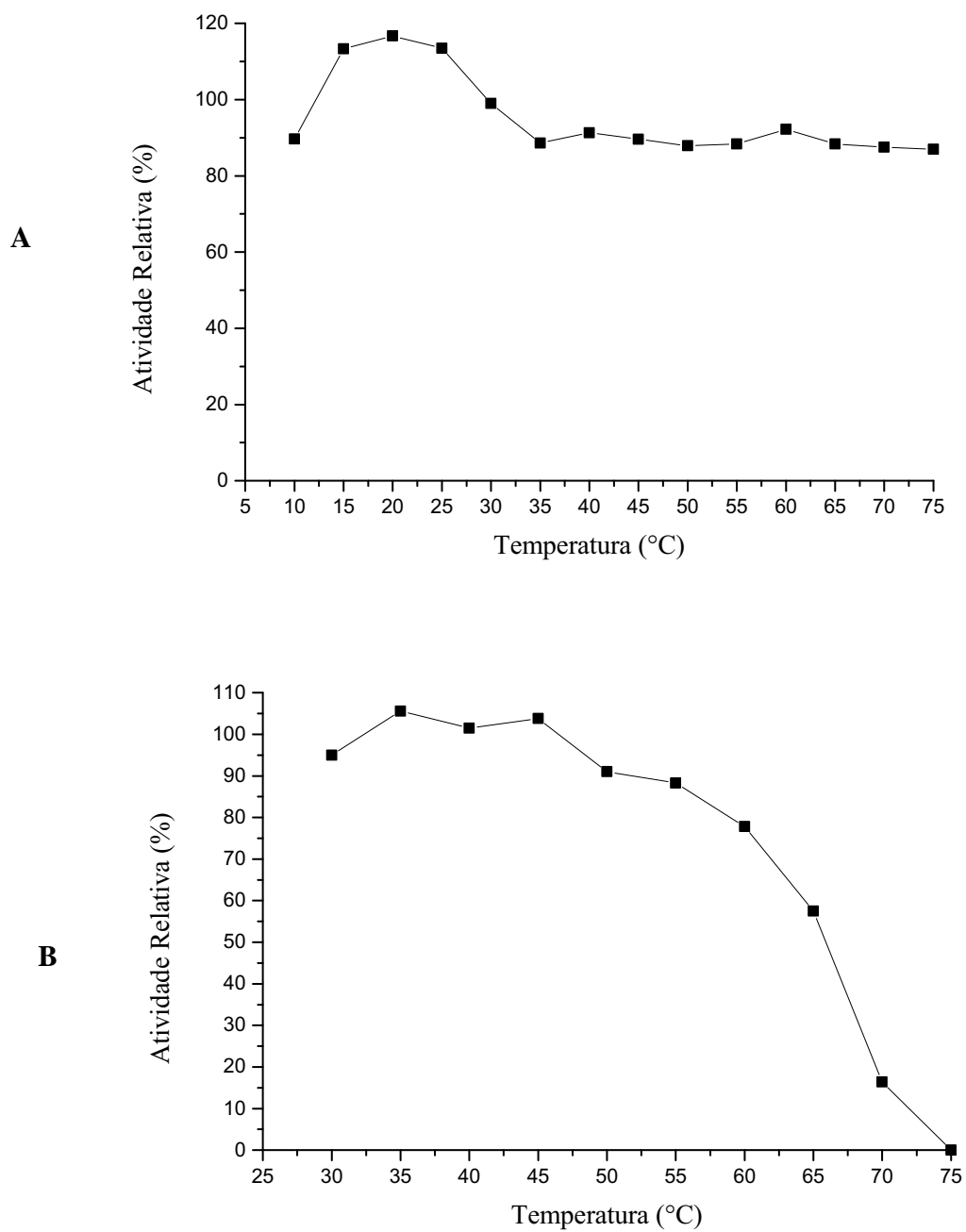


Figura 28: Efeito da temperatura sobre a estabilidade das ligninases produzidas por *Pycnoporus sanguineus*.
(A) Atividade de MnP e (B) Atividade de Lacase

Na tabela 3 é apresentado o resumo das características físico-químicas das ligninases produzidas por *Lentinus strigellus* e *Pycnoporus sanguineus*.

Tabela 3: Resumo das características físico-químicas das ligninases.

Fungo	Enzima	pH	Temperatura	pH	Temperatura
		ótimo	ótima (°C)	estabilidade	estabilidade (°C)
<i>L. strigellus</i>	MnP	3,0	40°	2,5-10,5	40°
	Lacase	2,5	50°-55°	7,0	30° - 45°
<i>P. sanguineus</i>	MnP	3,5	40°	2,5-10,5	15° - 25°
	Lacase	3,0	60°-70°	7,5	35° - 45°

A MnP da linhagem *Aspergillus terreus* LD-1 foi caracterizada por Kanayama e colaboradores (2002). O pH ótimo foi 12,5, sendo o pH de estabilidade na faixa de 11,0-12,5. As temperaturas ótima e de estabilidade foram de 37°C e 40°C, respectivamente. Característica esta distinta das enzimas MnPs produzidas pelas linhagens deste estudo e dos dados encontrados comumente na literatura, onde o ótimo para quase todas as enzimas ligninolíticas se referem ao pH ácido.

Bonfá (2003) observou pH ótimo 5,0 para a MnP produzida por *Coriolopsis byrsina*, apresentando estabilidade em pH 7,0. A temperatura ótima para a enzima foi a 30°C permanecendo ainda com 90% de sua atividade após incubação a 70°C por 1 hora. A termoestabilidade relatada pelo autor para o *C. byrsina* é semelhante a mostrada neste estudo pelos fungos *L. strigellus* e *P. sanguineus* que mantiveram 75% e 80% da atividade inicial da enzima a 70°C. O fungo *Trichophyton rubrum* LSK-27 produziu MnP com pH ótimo 4,5. A temperatura de

estabilidade ficou entre 30-40°C. Segundo o autor, esta enzima possui alta termoestabilidade, pois não perdeu a atividade a 40°C por 24 horas e reteve 80% da atividade original a 50°C por 10 horas (BERMEK et al., 2004).

Ürek e Pazarlioglu (2004) caracterizaram a MnP produzida pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*. O pH ótimo foi de 4,5, mas diminuiu acentuadamente quando o pH diferiu do valor ótimo. A enzima permaneceu estável na região de pH 4,5-6,0, sendo susceptível a inativação em pH 6,5. A temperatura ficou em torno de 25-45°C e a estabilidade térmica foi de 40°C e a 65°C foi totalmente inativada. Estudos com o fungo *Irpex lacteus* mostraram que o pH ótimo da enzima MnP foi em torno de 5,5-6,5 e sendo a enzima estável em uma ampla faixa de pH (4,0-7,0). A temperatura ótima foi relativamente alta (50-60°C) e a enzima não foi ativa acima de 70°C. Entretanto, a estabilidade em temperaturas elevadas foi baixa perdendo rapidamente a atividade a 65°C (BABOROVÁ et al., 2005).

A MnP de *Lentinus edodes* foi produzida em sabugo de milho em condições de FES para caracterização da enzima. O pH e temperatura ótima da MnP foi 4,5 e 40°C, respectivamente. A enzima foi completamente estável em uma grande faixa de pH (entre 4,0 a 6,0) e não perdeu a atividade a 40°C por 24 h e reteve 80% da atividade original a 45°C por 2 h (BOER et al., 2006).

Já para as lacases, os dados de caracterização da enzima produzida por *Trametes sanguinea* M85-2 mostraram que o pH e temperatura ótima foi 5,0 e 60°C, respectivamente. A enzima manteve-se estável em torno de pH 5,0 a 10,0 a 25°C por 1 dia e a estabilidade térmica foi a 70°C por 10 minutos (NISHIZAWA et al., 1995). Min e colaboradores (2001) caracterizaram a lacase produzida por *Phellinus ribis*. O pH ótimo para a oxidação do ABTS e seringaldazina foi obtido em pH 5,0 e 6,0, respectivamente. A atividade ótima para 2,6 dimetoxifenol foi observado em uma ampla faixa entre pH 4,0 a 6,0. Quando a enzima foi incubada por 12 horas em pH 6,0 a 37°C a atividade não foi alterada. Contudo, em pH 3,0 ocorre uma rápida diminuição da atividade. A

temperatura ótima foi a 65°C mantendo-se estável durante a pré-incubação a 50°C por 90 minutos. Pazarlioglu e colaboradores (2005), relataram pH e temperatura ótima 4,5 e 35°C para a lacase de *Trametes versicolor*.

O pH ótimo para a lacase de *Trichophyton rubrum* LKY-7 foi 3,0 e 3,5 para o ABTS e guaiacol como substratos, respectivamente, mantendo-se mais estável em pH próximo ao neutro (5,0 a 7,0). A estabilidade térmica ocorreu a 50°C, mas foi rapidamente inativada em temperaturas acima de 70°C (JUNG et al., 2002). A lacase de *Pleurotus pulmonarius*, estudada por Souza e Peralta (2003), mostrou atividade ótima a pH 6,2-6,5, 4,0-4,5 e 6,0-8,0 para seringaldazina, ABTS e guaiacol como substrato, respectivamente. Em todos os substratos a temperatura foi a 50°C. A enzima foi estável em uma ampla faixa de pH (4,5 a 8,0) e a 50°C.

A lacase de *Peniophora* sp mostrou atividade ótima em pH 4,0, mantendo-se estável em pH 6,0 a 7,0. A atividade da enzima permanece inalterada em pH 6,0 depois de duas horas de incubação de 40°C a 50°C. A 60°C, a atividade relativa foi de 74% em 5 horas (NIKUPAAVOLA et al., 2004). Kluczek-Turpeinen e outros (2003) relataram pH ótimo de 5,5 para a lacase produzida pelo deuteromiceto *Paecilomyces inflatus* e temperatura ótima entre 25°C e 40°C, com máximo em torno de 28°C. Já o basidiomiceto *Panus rudis* produziu a lacase com pH e temperatura ótima de 3,5 e 60°C, respectivamente (ZHANG et al., 2006).

De acordo com a literatura a maioria das lacases fúngicas são tipicamente ativas em pH baixo e a temperatura ótima fica geralmente em torno de 30°C a 60°C. A lacase de *L. strigellus* e *P. sanguineus* mostraram melhor atividade em pH 2,5 e 3,0, respectivamente e a temperatura ótima para a enzima do primeiro fungo ficou em torno de 50°C a 55°C, sendo estes resultados confirmados com os dados já publicados, embora a lacase de *P. sanguineus* demonstrou temperatura ótima entre 60°C a 70°C. A enzima de *P. sanguineus* apresentou a mesma temperatura ótima da lacase comercial analisada por Pazarlioglu e colaboradores (2005). Também

apresentou mesmo comportamento em relação à temperatura ótima das lacases de *Coprinus cinereus* (SCHNEIDER et al., 1999) e *Albatrella dispansus* (WANG; NG, 2004). A lacase de um basidiomiceto não identificado (UD4) apresentou temperatura ótima de 70°C (JORDAAN et al., 2004).

4.5 Avaliação da ação das enzimas sobre os corantes aromáticos

Os ensaios de descoloração foram realizados a partir de soluções enzimáticas extraídas na primeira semana de fermentação tanto para o fungo *L. strigellus* quanto para o *P. sanguineus*, em meio de farelo de trigo, conforme já foi verificado anteriormente nos ensaios de produção, este período correspondeu ao de maior produção das enzimas do complexo ligninolítico dos fungos. Para os experimentos de descoloração foram utilizados os corantes: Laranja II, Crisofenina, Vermelho Reativo 120, Azul Cibacron 3GA, Azul Brillhante Remazol R (RBBR), Cristal Violeta, Azure B e Azul de Metileno.

4.5.1 Comprimento de onda e concentração dos corantes

Foi primeiramente, realizada a varredura em espectrofotômetro em comprimento de onda entre 200 nm a 800 nm para cada corante, de modo a definir os comprimentos de onda de absorbância máxima de cada corante. A partir daí, foram analisadas várias concentrações dos corantes para se obter a concentração mais apropriada para os testes de descoloração (item 3.4.9). As concentrações ótimas para os ensaios com os corantes (Laranja II, Crisofenina, Vermelho Reativo 120, Azul Cibacron 3GA, RBBR, Cristal Violeta, Azure B e Azul de Metileno) são apresentadas na tabela 4 e as curvas de absorção em função da concentração estão apresentadas nas Figuras 29 a 32.

Tabela 4: Comprimento de onda (nm) de absorção máxima e concentração ótima dos corantes.

Corante	Grupo Cromóforo	Comprimento de onda (nm)	Abs.	Concentração do corante (mg/L)
Laranja II	Azo	485	0,5891	10
Crisofenina	Azo	400	0,5501	10
Reactive Red 120	Azo	535	0,5950	25
Cibacron Blue 3GA	Triazina	605	0,5766	75
RBBR	Antraquinona	590	0,5755	60
Cristal Violeta	Trifenilmetano	590	0,5527	5
Azure B	Tiazina	645	0,55770	5
Azul de Metileno	Tiazina	663	0,5372	7

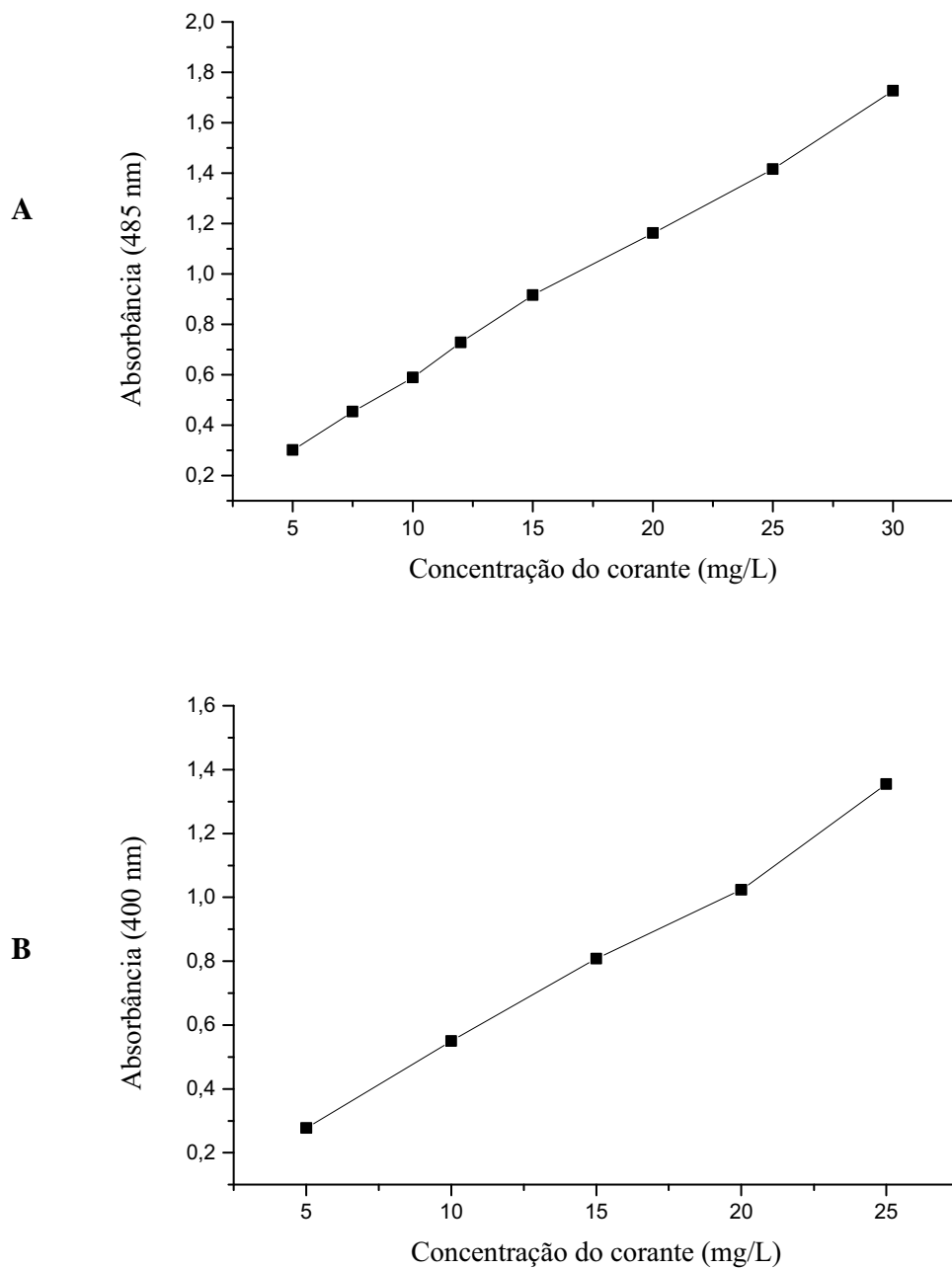


Figura 29: Relação entre a concentração e a absorvância dos corantes Laranja II e Crisofenina. (A) Laranja II e (B) Crisofenina

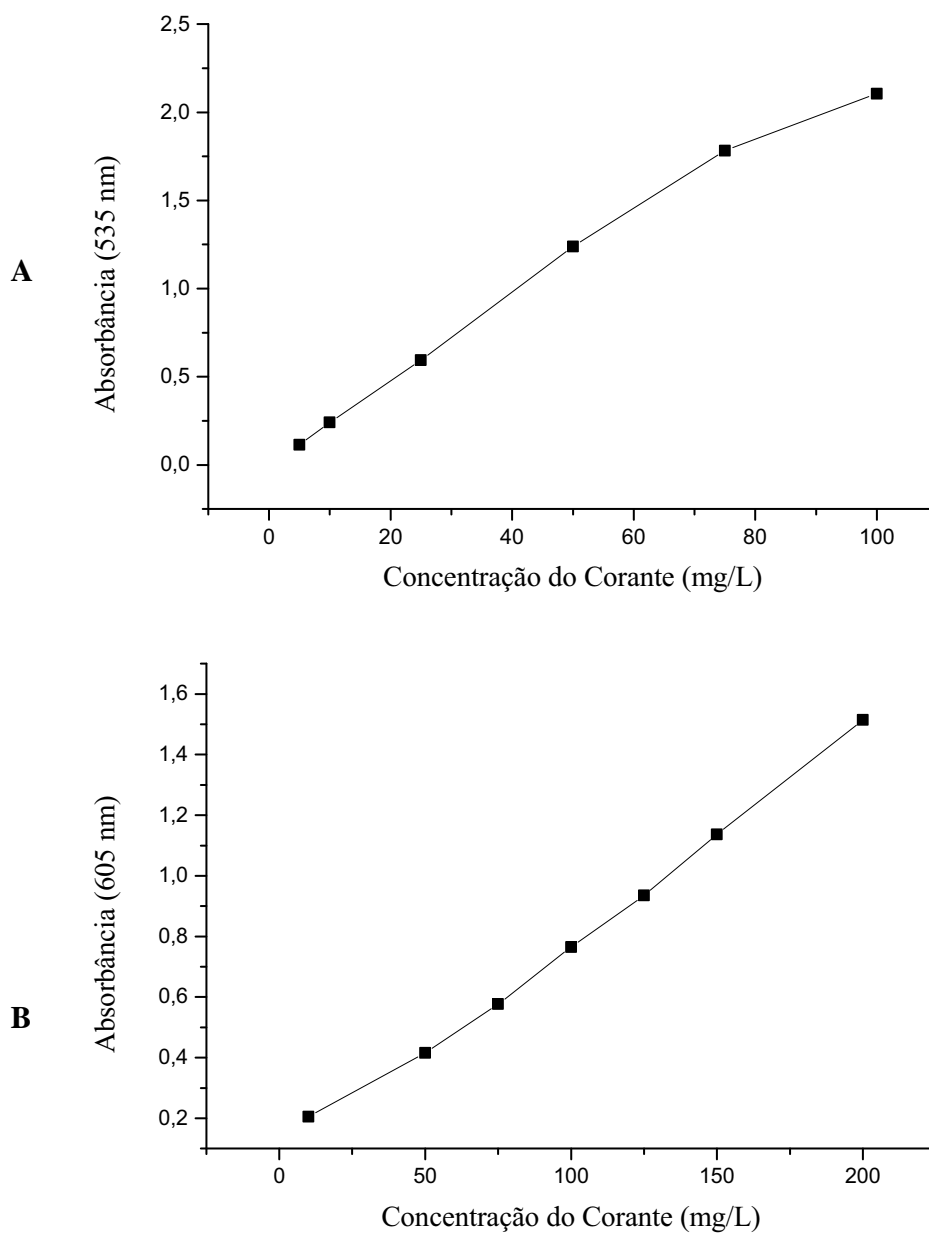


Figura 30: Relação entre a concentração e a absorvância dos corantes Reactive Red 120 e Azul Cibacron 3GA .
(A) Reactive Red 120 e (B) Azul Cibacron 3GA

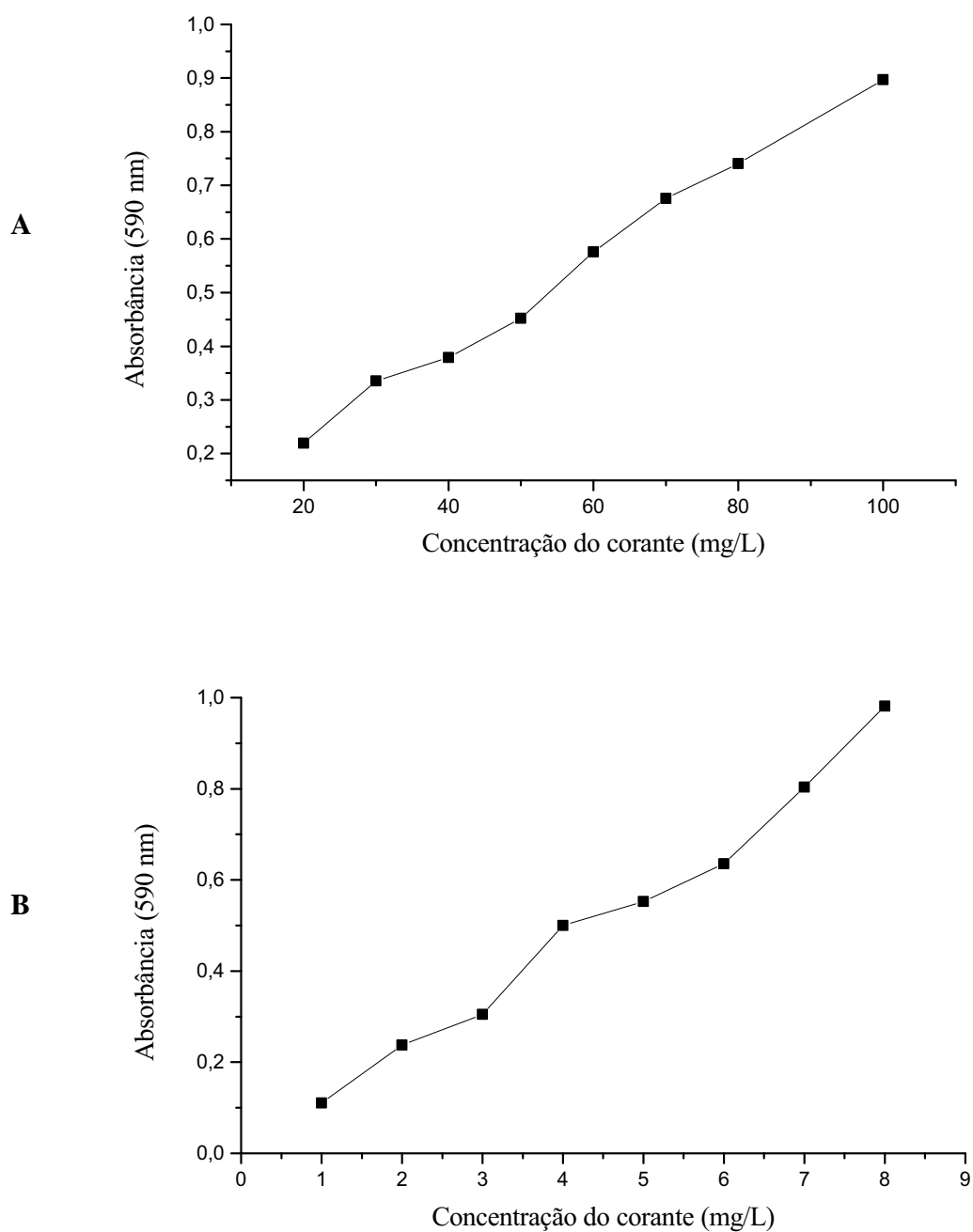


Figura 31: Relação entre a concentração e a absorvância dos corantes Azul Brillante Remazol R e Cristal Violeta.
(A) Remazol Brilliant Blue R e (B) Cristal Violeta

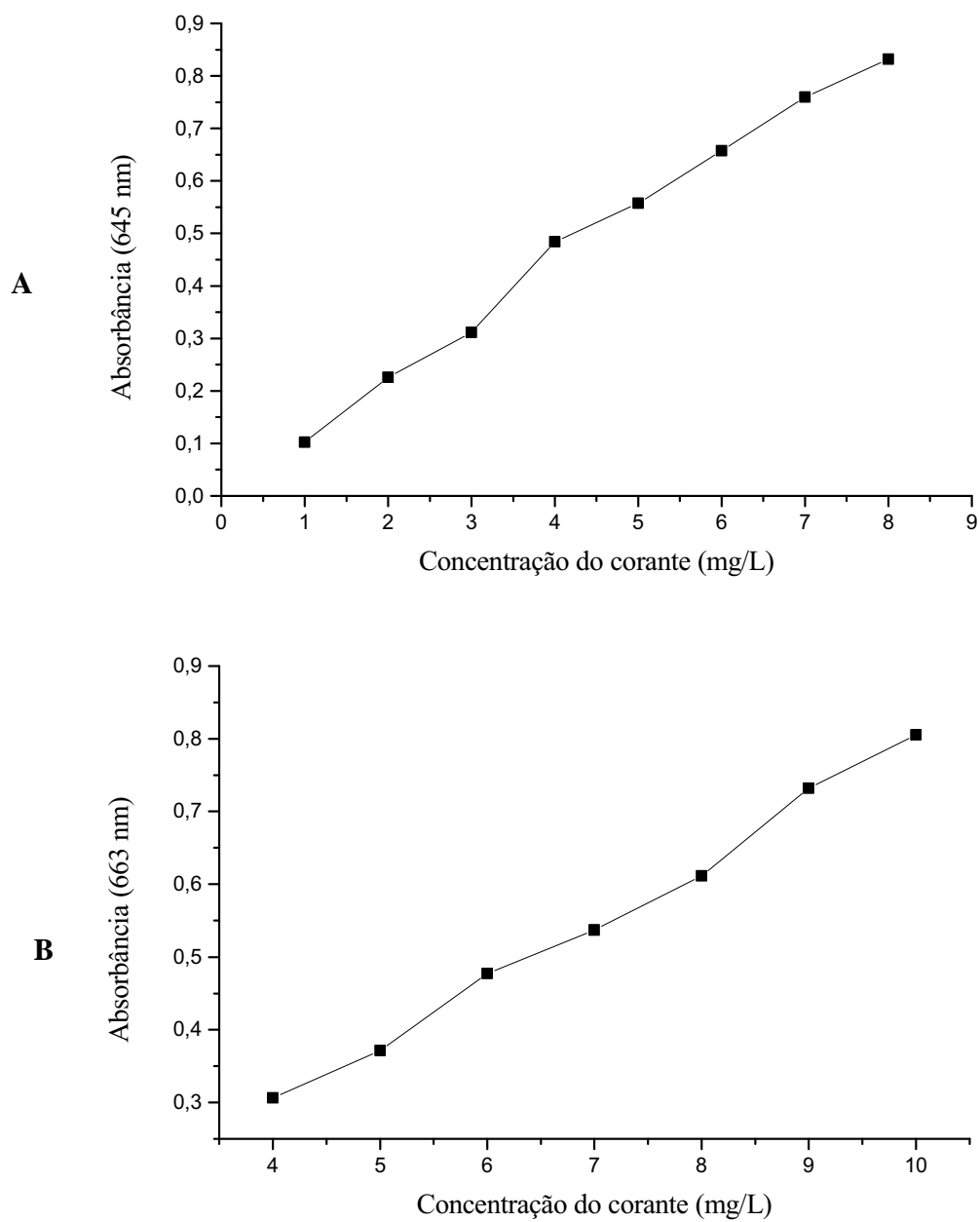


Figura 32: Relação entre a concentração e a absorvância dos corantes Azure B e Azul de Metileno.
(A) Azure B e (B) Azul de Metileno

4.5.2 Ensaio enzimáticos

As atividades enzimáticas de MnP e lacase no extrato bruto foram quantificadas para determinar as quantidades de enzima (U/g) presentes nas reações de descolorações. Os valores das atividades das ligninases são mostrados a seguir na tabela 5.

Tabela 5: Atividade das ligninases MnP e lacase

Fungo	Atividade de MnP (U/g)	Atividade de Lacase (U/g)
<i>Lentinus strigellus</i>	848	39480
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	778	39160

4.5.3 Ensaio de descoloração

Nas tabelas a seguir serão apresentados os resultados da aplicação do extrato enzimático bruto contendo as enzimas MnP e lacase, produzidas pelos fungos *L. strigellus* e *P. sanguineus* na descoloração dos diversos corantes sintéticos. Foram estudadas a descoloração em relação ao pH ácido e o neutro e também quanto presença dos substratos enzimáticos (MnSO₄ e ABTS) no pH 3,5.

4.5.3.1 Laranja II

Na tabela 6 estão apresentados os resultados dos testes de descoloração do corante Laranja II. Pode-se verificar que em pH 3,5 a máxima descoloração, ocorreu em 48 horas, sendo obtida

18% e 40% de descoloração, respectivamente. E em pH neutro não foi detectada a perda da cor do corante em nenhum dos ensaios.

A descoloração em presença de Mn^{+2} foi gradativa ao longo do período estudado, para enzimas de ambos os fungos, atingindo a perda máxima de cor (30%) em 48 horas para o extrato enzimático de *L. strigellus* e perda de 38% em reação com extrato enzimático de *P. sanguineus*. Quando utilizado o ABTS, houve uma mais intensa e mais rápida descoloração do Laranja II. O extrato de *L. strigellus* promoveu 73% de descoloração em 24 horas e *P. sanguineus* 72% em apenas 6 horas de incubação.

Descolorações em presença de substrato, semelhante à observada neste trabalho, são encontradas nos dados de Gill e colaboradores (2002), que avaliaram a descoloração do Laranja II pelo uso direto de quatro linhagens de basidiomicetos. Dentre elas, a mais eficiente foi *P. floridensis* com 72% de remoção da cor depois de 24 horas.

Bonfá (2003) não verificou descoloração do Laranja II pelos extratos enzimáticos obtidos pela cultura das linhagens *P. rimosus* e *C. byrsina*, em presença ou ausência de Mn^{+2} . Porém, observou significativa descoloração deste corante em presença de ABTS, com 50% de descoloração utilizando os mesmos extratos enzimáticos brutos.

A descoloração máxima observada por Carvalho (2005), para o corante Laranja II foi de 63,5% quando tratado com a solução enzimática de *Lentinus* sp na presença e ausência de ABTS. A máxima descoloração desse mesmo corante pelas ligninases de *C. byrsina* foi de 55,1% após 48 horas de tratamento na presença de ABTS. O autor não relatou descoloração significativa do corante na presença de $MnSO_4$.

De acordo com a literatura, os azo corantes como o Laranja II, Vermelho Reativo 120 e Crisofenina têm sido descritos como sendo os mais resistentes à degradação microbiana. Isto pode ser devido a diferenças na estrutura dos corantes, visto que corantes azo não são prontamente

degradados pelos fungos devido aos grupos sulfo e azo, que não ocorrem naturalmente (MUNARI et al., 2004).

Tabela 6: Taxa de descoloração do corante Laranja II.

Corante	Fungo	pH / Substrato	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Laranja II	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	-
			6	9%
			24	13%
			48	18%
Laranja II	<i>L. strigellus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Laranja II	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	16%
			6	23%
			24	28%
			48	30%
Laranja II	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	55%
			6	63,5%
			24	73%
			48	74%
Laranja II	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	6,5%
			6	18%
			24	27,5%
			48	40%
Laranja II	<i>P. sanguineus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Laranja II	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	19,5%
			6	21%
			24	32%
			48	38%
Laranja II	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	66%
			6	72%
			24	72%
			48	72%

(-) Não descoloriu

4.5.3.2 Crisofenina

Na Tabela 7 estão representados os valores de descoloração do corante Crisofenina pelo extrato bruto extraído do fungo *L. strigellus* e *P. sanguineus*. Observa-se que a máxima porcentagem de descoloração para este corante foi 19% em 48 horas na presença de $MnSO_4$, utilizando o extrato enzimático de *P. sanguineus*, sugerindo que a enzima MnP atuou na descoloração. Nas demais condições não foi observada nenhuma descoloração.

Não houve remoção da cor pelo extrato enzimático produzido por *L. strigellus* em nenhuma das condições avaliadas. A presença de $MnSO_4$ ou ABTS não facilitou a descoloração.

Carvalho (2005) observou 28% descoloração do corante Crisofenina pelo extrato enzimático de *Lentinus* sp na presença de $MnSO_4$ em 48 horas de tratamento. Já no estudo de Bonfá (2003), o autor relatou que não houve descoloração do Crisofenina pelo extrato bruto de *Phellinus rimosus* e nem por *Coriolopsis byrsina* tanto na ausência como na presença de $MnSO_4$ ou ABTS. O corante Crisofenina tem sido reportado por ser facilmente descolorido pelo *Phanerochaete chrysosporium* (PASZCZYNSKI; CRAWFORD, 1991)

Segundo Munari e colaboradores (2004), a resistência à degradação está relacionada à estrutura molecular destes compostos já que pertencem ao grupo azo. O Crisofenine é um dos azo corantes mais recalcitrantes, acompanhado do amarelo clorazol. Já o corante amarelo brilhante possui estrutura semelhante a Crisofenina, porém é mais facilmente degradado (KNAPP et al., 1995).

Abadulla e colaboradores (2000) mostraram que corantes do tipo antraquinona são melhores substratos para as ligninases do que os azo.

Tabela 7: Taxa de descoloração do corante Crisofenina

Corante	Fungo	pH / Substrato	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Crisofenina	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Crisofenina	<i>L. strigellus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Crisofenina	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Crisofenina	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Crisofenina	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Crisofenina	<i>P. sanguineus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Crisofenina	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	14,5%
			6	18%
			24	18%
			48	19%
Crisofenina	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-

(-) Não descoloriu

4.5.3.3 Vermelho Reativo 120

Na Tabela 8 são apresentados os resultados dos testes de descoloração do corante VR 120 pelos extratos enzimáticos de ambos os fungos. A máxima descoloração obtida foi de 27% em 48 horas de tratamento, quando foram usadas as enzimas de *L. strigellus* em presença de MnSO_4 . Por esses dados pode-se inferir que a MnP atuou na descoloração do corante vermelho reativo 120. As maiores descolorações do corante VR 120 pelo extrato enzimático de *P. sanguineus* foi de 20% em 6 horas e 30% em 48 horas de incubação, em presença de MnSO_4 e de ABTS, respectivamente. Em pH 7,0 não houve a remoção da cor do corante por nenhum dos extratos enzimáticos.

O VR 120 é um corante que pertence a classe dos corantes reativos e possui o grupo azo como cromóforo. Pela análise dos dados, verifica-se que a remoção da cor para este corante ocorreu em menor porcentagem, dentro dos parâmetros analisados, em relação aos dados encontrados na literatura, mas deve-se levar em consideração que as condições e as linhagens relatadas pelos autores também foram diferentes.

Harazono e colaboradores (2003) investigaram a descoloração do corante VR 120 pelo cultivo direto do fungo basidiomiceto *Phanerochaete sordida* YK-624 em meio líquido, contendo o corante e obtiveram 90,6% de remoção depois de 7 dias de cultivo. Os autores observaram também, que a enzima MnP foi responsável pela descoloração devido a sua atividade significativa detectada durante o processo e que as altas concentrações de Mn(II) resultaram em aumento da descoloração. Em outro estudo, Harazono e Nakamura (2005) verificaram que a mesma linhagem citada acima descoloriu (90 %) o corante VR 120 na presença de Tween 80 em 48 horas de cultivo em meio de cultura líquido.

Tabela 8: Taxa de descoloração do corante Vermelho Reativo 120.

Corante	Fungo	pH / Substrato	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Vermelho reativo 120	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	-
			6	4%
			24	8%
			48	8%
Vermelho reativo 120	<i>L. strigellus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Vermelho reativo 120	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	17%
			6	17%
			24	17%
			48	27%
Vermelho reativo 120	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Vermelho reativo 120	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	3%
			6	7%
			24	10%
			48	10%
Vermelho reativo 120	<i>P. sanguineus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Vermelho reativo 120	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	18,5%
			6	20%
			24	20%
			48	20%
Vermelho reativo 120	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	-
			6	-
			24	25%
			48	30%

(-) Não descoloriu

4.5.3.4 Azul Cibacron 3GA

O corante Cibacron Blue 3GA utilizado neste trabalho possui o grupo antraquinona como cromóforo. A partir da análise da Tabela 9, pode-se observar que houve ótima descoloração do corante pelas enzimas tanto na ausência quanto na presença de Mn^{+2} e ABTS. As máximas descolorações ocorreram em pH 3,5 sendo de 86% e 84% em 48 horas de incubação, quando foram usadas as enzimas de *L. strigellus* e *P. sanguineus*, respectivamente em apenas 6 horas de tratamento. Na presença de $MnSO_4$, a melhor descoloração foi de 90% em 48 horas em presença das enzimas de *L. strigellus* e de 86% em (6 horas) para as de *P. sanguineus*. Em presença de ABTS, a descoloração chegou a 84% e 90%, em 48 horas de tratamento, quando usada enzimas de *L. strigellus* e *P. sanguineus*, respectivamente.

Pela comparação dos dados apresentados na Tabela 9 nota-se que os valores obtidos na ausência e presença de Mn^{+2} e ABTS não apresentaram muitas diferenças entre si, o que pode sugerir, neste caso, a ação das enzimas sobre o Azul Cibacron 3GA. Em pH 7,0 não houve descoloração pelo extrato de nenhuma das linhagens.

Radha e outros (2005) avaliaram os efeitos da variação do pH entre 2,0 e 7,0 na descoloração de vários corantes, dentre eles o Verde Ácido que é um corante do tipo antraquinona, assim como o Azul Cibacron 3GA. Os autores observaram 75% de descoloração em pH 5,0 utilizando o fungo *P. chrysosporium* em cultura líquida em dois dias de cultivo.

Em outro trabalho, Carvalho (2005) relatou máxima descoloração para o Azul Cibacron 3GA de 69% em 48 horas de tratamento quando aplicada a solução enzimática bruta do fungo basidiomiceto *Coriolopsis byrsina* tanto em ausência como na presença de $MnSO_4$ ou ABTS no meio de reação.

Tabela 9: Taxa de descoloração do corante Azul Cibacron 3GA.

Corante	Fungo	pH / Substrato	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Azul Cibacron 3GA	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	71%
			6	83%
			24	85%
			48	86%
Azul Cibacron 3GA	<i>L. strigellus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Azul Cibacron 3GA	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	69%
			6	84%
			24	88%
			48	90%
Azul Cibacron 3GA	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	7%
			6	63%
			24	73%
			48	84%
Azul Cibacron 3GA	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	60%
			6	80%
			24	83%
			48	84%
Azul Cibacron 3GA	<i>P. sanguineus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Azul Cibacron 3GA	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	77%
			6	86%
			24	86%
			48	86%
Azul Cibacron 3GA	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	2%
			6	56%
			24	84%
			48	90%

(-) Não descoloriu

4.5.3.5 Azul Brillhante Remazol R

Os experimentos com RBBR mostraram que a máxima descoloração ocorreu em pH 3,5 e foi de 70% e 80% em 24 horas, pelo uso das enzimas de ambos os fungos. A solução enzimática obtida de *L. strigellus* foi capaz de descolorir em 77% a solução do corante em presença de $MnSO_4$ em 48 horas, enquanto que o *P. sanguineus* descoloriu 80%, também na presença do mesmo substrato, em 24 horas. Quando adicionado ABTS ao meio de reação, foi obtido 65,5% e 77% de descoloração, em 48 horas, pelas enzimas de *L. strigellus* e *P. sanguineus*, respectivamente. Observando-se os dados da Tabela 10 verifica-se que houve uma evolução na descoloração do corante RBBR ao longo do período de incubação da mistura de reação, sob todos os parâmetros analisados. Em pH neutro não foi observada descoloração do RBBR.

Uma lacase fúngica pura, obtida de uma formulação comercial utilizada na indústria têxtil foi adicionada ao meio de reação contendo o corante RBBR. Os autores não observaram descoloração do mesmo na presença da enzima, somente quando foram adicionados alguns mediadores (SOARES et al., 2001). Pelos dados aqui apresentados, os extratos enzimáticos brutos de *L. strigellus* e *P. sanguineus* foram capazes de descolorir significativamente, em apenas um dia de tratamento, o corante RBBR. É possível que, no extrato enzimático bruto houve a presença de mediadores da reação de lacase.

Schliephake e Lonergan (1996) observaram a descoloração do RBBR pelo fungo *Pycnoporus cinnabarinus* e verificaram que ocorreu 75% de descoloração depois de 48 horas. Swamy e Ramsay (1999) relatam que as ligninases produzidas pelo fungo *Bjerkandera* sp. BOS55 obteve máxima descoloração de 65% desse corante em 20 dias. Boer e colaboradores (2004) avaliaram a descoloração de vários corantes, dentre eles, o RBBR pelo fungo *Lentinus edodes* em um sistema de FES utilizando sabugo de milho moído enriquecido de solução nutriente e corante. Os autores observaram descoloração máxima de 70% entre 11 e 14 dias de cultivo.

Deveci e outros (2004) estudaram a descoloração do RBBR por um filtrado bruto da cultura de *Funalia trogii* ATCC 200800 que foi cultivado por FES em meio contendo farelo de trigo e casca de soja. Os autores observaram a influência do pH, da temperatura e da concentração do corante, verificando melhor descoloração em pH 3,0 a 50°C e em concentração abaixo de 100mg/L.

Em outro estudo, o corante RBBR foi avaliado quanto à descoloração por FSM pelas linhagens *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinsum* e *Pleurotus calyptratus* durante 14 dias. *I. resinsum* removeu 96% em cinco dias de cultivo, *D. squalens* e *P. calyptratus* descoloriram 98% e 78% respectivamente, em 14 dias de fermentação (EICHLEROVÁ et al., 2005a). A descoloração descrita no presente trabalho foi menor que relatada pelo autor acima, porém, o período analisado também foi menor. As enzimas de *L. strigellus* e *P. sanguineus* descoloriram significativamente (70% e 80%) em 24 horas de incubação. Então, pela análise dos dados, sugere-se que as enzimas produzidas por esses fungos possuem grande potencial de aplicação no tratamento de resíduos da indústria, visto que o tempo de descoloração seria significativamente menor.

Outro trabalho semelhante ao descrito acima foi realizado por Palmieri e colaboradores (2005) na qual investigaram a descoloração do corante RBBR pelo fungo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* em cultura líquida, na presença de álcool veratrílico. Os autores observaram 10% de descoloração após 3 dias e a remoção total da cor após 9 dias.

O corante RBBR foi avaliado quanto à descoloração por filtrados de cultura de *Trametes trogii*. A descoloração completa foi observada em 8 horas nos filtrados que foram suplementados com sulfato de cobre e somente 6% de descoloração foi obtida usando culturas filtradas sem adição de sulfato de cobre (MECHICHI et al., 2006).

Os corantes do grupo antraquinona são amplamente utilizados em pesquisas e bastante encontrados na literatura. Eles servem como substrato para o sistema enzimático ligninolítico dos fungos, sendo que a sua descoloração também tem sido usada como indicador e medida da atividade ligninolítica (JAROSZ-WILKOLAZKA et al., 2002).

Tabela 10: Taxa de descoloração do corante Azul Brillhante Remazol R.

Corante	Fungo	pH / Substrato	Incubação (horas)	Descoloração (%)
RBBR	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	43%
			6	67%
			24	70%
			48	70%
RBBR	<i>L. strigellus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
RBBR	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	42,5%
			6	69%
			24	75,5%
			48	77%
RBBR	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	4%
			6	23,5%
			24	58%
			48	65,5%
RBBR	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	43%
			6	75%
			24	80%
			48	80%
RBBR	<i>P. sanguineus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
RBBR	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	39,5%
			6	73,5%
			24	80%
			48	80%
RBBR	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	-
			6	24%
			24	64,5%
			48	77%

(-) Não descoloriu

4.5.3.6 Cristal Violeta

Como pode ser observado na Tabela 11, a máxima descoloração do Cristal Violeta ocorreu em pH 3,5 na ausência do substrato, sendo de 45%, em 48 horas, para enzimas das duas linhagens. Quando utilizado MnSO_4 ao meio de reação, a descoloração aumentou em 9% e 10%, para o fungo *L. strigellus* e *P. sanguineus*, respectivamente em 48 horas, em relação ao meio que não continha esse sal. Tanto na ausência quanto na presença de MnSO_4 , o tempo de descoloração foi o mesmo, embora a taxa de remoção tenha sido um pouco maior na presença de Mn^{+2} . Na presença de ABTS, a máxima descoloração foi de 65% para o extrato de *L. strigellus*, em 24 horas, e a enzima de *P. sanguineus* descoloriu em 64% o corante, em 48 horas. A presença de Mn^{+2} e ABTS promoveu aumento da descoloração. Não ocorreu descoloração em pH 7,0 por nenhuma das linhagens estudadas.

Tekere e outros (2001) estudaram a descoloração do Cristal violeta em placas por 10 linhagens de basidiomicetos. Apenas *Trametes versicolor*, *Datrona concentrica* e uma linhagem não indentificada DSPM95, promoveram significativa descoloração do corante em 10 dias de cultivo. Descoloração semelhante a descrita no presente trabalho foi descrita em estudo com as linhagens *Dichomitus squalens* e *Phlebia* spp que levaram à extensiva descoloração do cristal violeta, resultando na remoção de 60% da cor do mesmo, em 48 horas e completa descoloração depois de 5 dias (GILL et al., 2002).

Eichlerová e colaboradores (2005b) relataram a descoloração de Cristal Violeta pelo fungo *Dichomitus squalens* em placas de petri contendo agar, obtendo descoloração completa em 24 dias de crescimento. Em outro estudo, os mesmos autores avaliaram o fungo *Pleurotus calyptratus* quanto à descoloração do corante Cristal Violeta em cultura líquida durante 14 dias de cultivo, e observaram 80% de remoção da cor em 7 dias de fermentação (EICHLEROVÀ et al., 2006).

Tabela 11: Taxa de descoloração do corante Cristal Violeta.

Corante	Fungo	pH / Substrato	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Cristal Violeta	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5	0,5	17%
		Ausência de substrato	6	17%
			24	37%
			48	45%
Cristal Violeta	<i>L. strigellus</i>	pH 7,0	0,5	-
		Ausência de substrato	6	-
			24	-
			48	-
Cristal Violeta	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	17,5%
			6	25%
			24	52%
			48	54,5%
Cristal Violeta	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	-
			6	33%
			24	65%
			48	65%
Cristal Violeta	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	17%
			6	17%
			24	37%
			48	45%
Cristal Violeta	<i>P. sanguineus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Cristal Violeta	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	22%
			6	28%
			24	46%
			48	55%
Cristal Violeta	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	-
			6	25%
			24	50%
			48	64%

(-) Não descoloriu

4.5.3.7 Azure B

De acordo com os dados da Tabela 12, pode-se constatar que a descoloração do Azure B foi mais intensa quando usado o extrato enzimático de *L. strigellus* em presença de ABTS sendo removidos 22% da cor em 48 horas de incubação. O extrato enzimático do fungo *P. sanguineus* removeu 7% da cor quando adicionado $MnSO_4$ ao meio de reação, em 30 minutos, e na presença de ABTS, o mesmo extrato descoloriu 5% do corante, em 48 horas. Não foi observada descoloração do corante Azure B em pH ácido e nem em pH neutro em ausência de Mn^{+2} e ABTS por nenhum dos extratos enzimáticos.

A ação da enzima de *L. strigellus* foi facilitada pela adição de ABTS, a partir daí pode-se inferir que a lacase é que deve estar atuando. Na descoloração utilizando o extrato enzimático do fungo *P. sanguineus*, pode-se sugerir que ocorreu ação da lacase e Mn-P, visto que houve descoloração na presença tanto de $MnSO_4$ quanto de ABTS.

Cripps e colaboradores (1990) estudaram a biodegradação do corante Azure B em cultura líquida utilizando o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, e observaram completa descoloração em meio limitado em nitrogênio em 24 horas de tratamento.

Verma e colaboradores (2004) trataram o corante Azure B com Cu (II), H_2O_2 e ácido glucárico e obtiveram 93% de descoloração.

No trabalho realizado por Carvalho (2005) não foi observada a ocorrência de descoloração do corante Azure B pelas enzimas produzidas pela linhagem *Coriolopsis byrsina*, mas obteve 12% de descoloração, em 48 horas quando utilizou extrato enzimático obtido de *Lentinus* sp em presença de ABTS.

Tabela 12: Taxa de descoloração do corante Azure B.

Corante	Fungo	pH / Substrato	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Azure B	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Azure B	<i>L. strigellus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Azure B	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Azure B	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	-
			6	-
			24	18%
			48	22%
Azure B	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Azure B	<i>P. sanguineus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Azure B	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	7%
			6	7%
			24	7%
			48	7%
Azure B	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	5%

(-) Não descoloriu

4.5.3.8 Azul de Metileno

A Tabela 13 mostra os resultados dos ensaios com o corante Azul de Metileno. Como pode ser observada, a máxima descoloração foi obtida utilizando-se o extrato enzimático do fungo *L. strigellus* e foi de 21%, em 48 horas na ausência de Mn^{+2} e ABTS. Na presença desses, a porcentagem de descoloração foi semelhante, atingindo 24% e 22%, respectivamente, em 48 horas de tratamento. No meio contendo extrato enzimático de *P. sanguineus*, não houve descoloração em pH 3,5. A máxima descoloração ocorreu quando foi adicionado $MnSO_4$ ao meio de reação (14% em 30 minutos de incubação). Em presença de ABTS houve 32% de perda da cor do corante, em 48 horas de tratamento.

Boer e colaboradores (2004) relataram a habilidade do fungo *Lentinus edodes* em descolorir, em até 61%, o corante azul de metileno, após 18 dias de cultivo. Os autores notaram que a ausência de Mn^{+2} e H_2O_2 no meio afetaram a eficiência da MnP na descoloração do Azul de Metileno.

Os experimentos de descoloração com Azul de Metileno realizados por Carvalho (2005) mostraram que a solução enzimática do fungo *C. byrsina* foi capaz de descolorir em 41% a solução do corante, em presença de $MnSO_4$, enquanto que o *Lentinus* sp descoloriu 24%, também na presença deste substrato, ambos em 48 horas de incubação.

Radha e colaboradores (2005), avaliaram os efeitos do pH ácido e neutro na descoloração do Azul de Metileno em cultura líquida contendo o fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* e relataram que o corante foi melhor descolorido em pH 5,0 com 70% de remoção da cor.

Tabela 13: Taxa de descoloração do corante Azul de Metileno.

Corante	Fungo	pH / Substrato	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Azul de Metileno	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5	0,5	13%
		Ausência de substrato	6	13%
			24	20%
			48	21%
Azul de Metileno	<i>L. strigellus</i>	pH 7,0	0,5	-
		Ausência de substrato	6	-
			24	-
			48	-
Azul de Metileno	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	18,5%
			6	19%
			24	23,5%
			48	24%
Azul de Metileno	<i>L. strigellus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	-
			6	-
			24	7%
			48	22%
Azul de Metileno	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Azul de Metileno	<i>P. sanguineus</i>	pH 7,0 Ausência de substrato	0,5	-
			6	-
			24	-
			48	-
Azul de Metileno	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com MnSO ₄	0,5	14%
			6	14%
			24	14%
			48	14%
Azul de Metileno	<i>P. sanguineus</i>	pH 3,5 com ABTS	0,5	-
			6	-
			24	2%
			48	32%

(-) Não descoloriu

Na tabela 14 a seguir, encontra-se o resumo dos melhores resultados obtidos na descoloração dos corantes sintéticos pelos extratos enzimáticos produzidos por *L. strigellus* e *P. sanguineus*.

Tabela 14: Resumo dos melhores resultados de descoloração.

Corante	Fungo	Substrato	Tempo	Descoloração
Laranja II	<i>L. strigellus</i>	ABTS	48h	74%
Laranja II	<i>P. sanguineus</i>	ABTS	6h	72%
Vermelho Reativo	<i>L. strigellus</i>	MnSO ₄	48h	27%
Vermelho Reativo	<i>P. sanguineus</i>	ABTS	48h	30%
Azul Cibacron	<i>L. strigellus</i>	-	48h	86%
Azul Cibacron	<i>L. strigellus</i>	MnSO ₄	48h	90%
Azul Cibacron	<i>L. strigellus</i>	ABTS	48h	84%
Azul Cibacron	<i>P. sanguineus</i>	-	48h	84%
Azul Cibacron	<i>P. sanguineus</i>	MnSO ₄	6h	86%
Azul Cibacron	<i>P. sanguineus</i>	ABTS	48h	90%
RBBB	<i>L. strigellus</i>	-	24h	70%
RBBR	<i>L. strigellus</i>	MnSO ₄	48h	77%
RBBR	<i>P. sanguineus</i>	-	24h	80%
RBBR	<i>P. sanguineus</i>	MnSO ₄	24h	80%
RBBR	<i>P. sanguineus</i>	ABTS	48h	77%
Cristal Violeta	<i>L. strigellus</i>	ABTS	24h	65%
Cristal Violeta	<i>P. sanguineus</i>	ABTS	48h	64%
Azure B	<i>L. strigellus</i>	ABTS	48h	22%
Azul de Metileno	<i>L. strigellus</i>	ABTS	48h	24%
Azul de Metileno	<i>P. sanguineus</i>	ABTS	48h	32%

(-) ausência de substrato

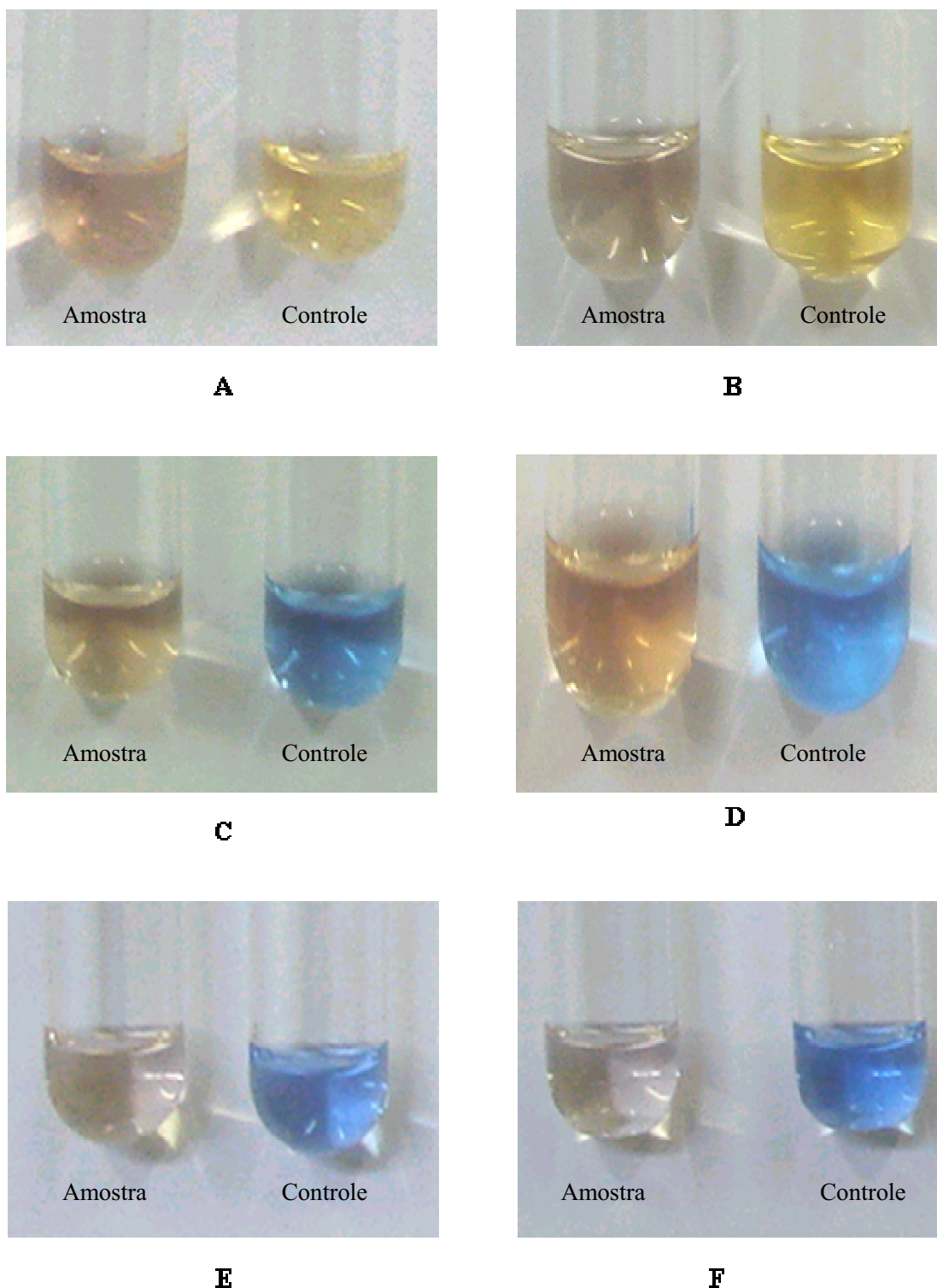


Figura 33: Descoloração dos corantes Laranja II, Azul Cibacron 3 GA e RBBR.
 (A e B) Laranja II: (A) ABTS + *L. strigellus* e (B) ABTS + *P. sanguineus*
 (C e D) Azul Cibacron: (C) MnSO_4 + *L. strigellus* e (D) ABTS + *P. sanguineus*
 (E e F) RBBR: (E) MnSO_4 + *L. strigellus* e (F) MnSO_4 + *P. sanguineus*

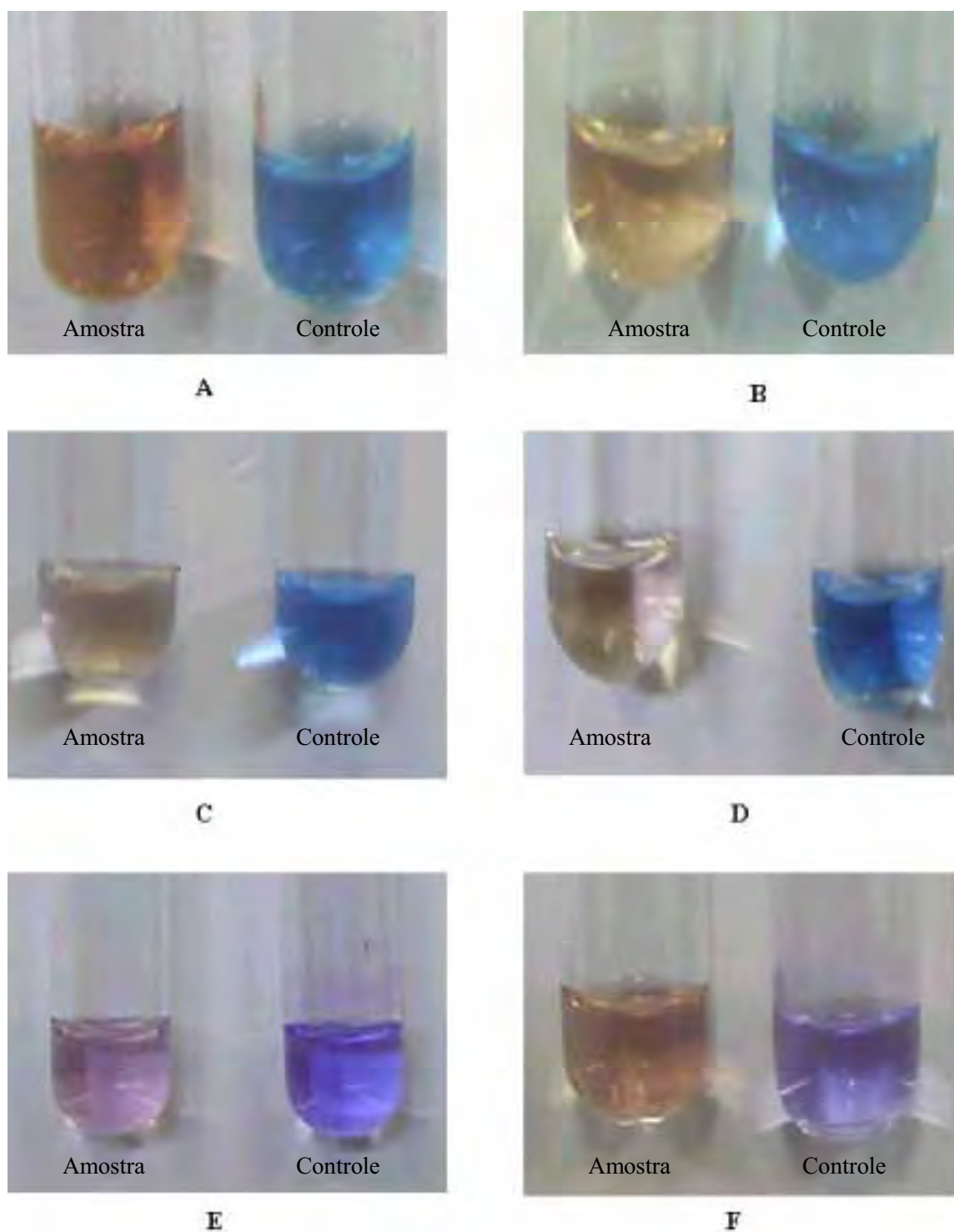


Figura 34: Descoloração dos corantes RBBR, Azul Cibacron 3GA e Cristal Violeta (A e B) RBBR: (A) pH 3,5 + *L. strigellus* e (B) pH 3,5 + *P. sanguineus*. (C e D) Azul cibacron: (C) ABTS + *L. strigellus* e (D) $MnSO_4$ + *P. sanguineus* (E e F) Cristal Violeta: (G) $MnSO_4$ + *L. strigellus* e (H) ABTS + *P. sanguineus*

5 CONCLUSÕES

Dentre as cinco linhagens estudadas, observa-se que as espécies *L. strigellus* e *P. sanguineus* apresentaram um bom potencial para a produção de mais de um tipo de enzima do complexo ligninolítico, sendo MnP e lacase produzidas simultaneamente.

O resíduo agro-industrial farelo de trigo destacou-se como o melhor substrato para a produção de ambas as enzimas. O tempo de cultivo em que se obteve as melhores produções enzimáticas, ficaram compreendidos na primeira semana para o fungo *L. strigellus* e na primeira e segunda semana para o fungo *P. sanguineus*, o que viabiliza custos na sua produção e utilização comercial e industrial.

A MnP e lacase produzida tanto por *L. strigellus* quanto por *P. sanguineus* apresentaram pH ótimo ácido. A temperatura ótima para a MnP de ambos os fungos foi de 40°C. Para a Lacase de *L. strigellus* a temperatura ótima ficou entre 50°C e 55°C, para a lacase de *P. sanguineus* a temperatura foi entre 60°C e 70°C. Quanto à estabilidade em relação ao pH, a MnP produzida pelos dois fungos comportaram-se de maneira semelhante mantendo-se estável em toda a faixa de pH estudada. A lacase de *L. strigellus* apresentou estabilidade em pH 7,0 e a de *P. sanguineus*, 7,5. A temperatura de estabilidade para a MnP de *L. strigellus* ficou entre 15°C e 40°C e para a enzima de *P. sanguineus* entre 15°C e 25°C. Para a lacase de *L. strigellus* a temperatura de estabilidade ficou entre 15°C e 40°C e a enzima de *P. sanguineus* entre 35°C e 45°C.

Todos os corantes sintéticos analisados sofreram descolorações em presença dos extratos enzimáticos de *L. strigellus* e *P. sanguineus* especialmente o Laranja II, Azul Cibacron 3GA, RBRR e o Cristal Violeta. E em alguns casos, como para o Laranja II, Crisofenina, Vermelho Reativo 120, Cristal Violeta, Azure B e Azul de Metileno, os substratos MnSO₄ ou ABTS possibilitaram uma maior descoloração dos corantes que na ausência destes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K.; CAVACO-PAULO, A.; GUBTIZ, G. M. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3357-3362, 2000.

ADLER, E. Lignin chemistry – past, present and future. **Wood Science and Technology**, v. 11, p. 169-218, 1977.

ADASKAVEG, J. E.; GILBERTSON, R. L.; BLANCHETTE, R. A. Comparative studies of delignification caused by *Ganoderma* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1932-1943, 1990.

AITKEN, M. D.; IRVINE, R. L. Characterization of reactions catalysed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 276, p. 405-414, 1990.

ARCHIBALD, F. S. Lignin peroxidase activity is not important in biobleaching of unbleached kraft pulp by *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3103-3109, 1992.

ANDER, P.; ERIKSSON, K. E. Selective degradation of wood components by white-rot fungi. **Physiologia Plantarum**, v. 41, p. 239-248, 1977.

ARORA, D. S.; CHANDER, M. Decolourisation of diverse industrial dyes by some *Phlebia* ssp and their comparison with *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, p. 331-338, 2004.

ARORA, D. S.; CHANDER, M.; GILL, P. K. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective lignolysis of wheat straw. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, p. 115-120, 2002.

ARORA, D. S.; GILL, P. K. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 89-91, 2001.

BABOROVÁ, P.; MÖDER, M.; BALDRIAN, P.; CAJTHAMLOVÁ, K.; CAJTHAML, T. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. **Research in Microbiology**, Article in press, Available online 20 September, 2005.

BACKA, S.; GIERER, J.; REITBERGER, T.; NILSSON, T. Hydroxyl radical activity in brown-rot fungi studied by a new chemiluminescence method. **Holzforschung**, v. 46, p. 61-67, 1992.

BALAN, D. S. L.; MONTEIRO, R. T. R. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 141-145, 2001.

BALAKSHIN, M.Yu; EVTUGUIN, D.V.; NETO, C. P.; CAVACO-PAULO, A. Polyoximetals as mediators in the laccase catalyzed delignification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.16, p. 131-140, 2001.

BLANCHETTE, R. A. Degradation on the lignocellulose complex in wood. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 999-1010, 1995.

BLANCHETTE, R. A. Delignification by wood decay fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 381-398, 1991.

BLANCHETTE, R. A.; OBST, J. R.; TIMELL, T. E. Biodegradation of compression wood and tension by white-rot and brown rot fungi. **Holzforschung**, v. 48, p. 34-42, 1994.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology: review. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000.

BERMEK, H.; YAZICI, H.; ÖZTÜRK, H.; TAMERLER, C.; JUNG, H.; LI, K.; BROWN, K. M.; DING, H.; XU, F. Purification and characterization of manganese peroxidase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LSK-27. **Enzyme and Microbial technology**, v. 35, p. 87-92, 2004.

BOER, C. G.; OBICI, L.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Decolorization of synthetic dyes by solid states cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 107-112, 2004.

BOER, C. G.; OBICI, L.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. **Process Biochemistry**, v.41, p. 1203-1207, 2006.

BONONI, V. L. R. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulósicos. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. ed. Microbiologia Ambiental, Embrapa – CNPMA, Jaguariúna, 1997. p. 243-268.

BONFÁ, M. R. L. Produção de ligninases por basidiomicetos, caracterização e aplicação das enzimas. 2003. 67 p. Relatório final (Iniciação Científica). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Veratrylic alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Journal of Biochemistry**, v. 255, p. 445-450, 1988.

BOUDET, A. M. Lignins and lignification: selected issues. **Plant Physiology and Biochemistry** v. 38, p. 81-96, 2000.

BOUDET, A. M.; KAJITA, S.; GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 576-581, 2003.

BOYLE, C. D.; KROPP, B. R.; REID, I. D. Solubilization and mineralization of lignin by white-rot fungi. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3217-3224, 1992.

BUCHALA, A. J.; LEISOLA, M. S. A. Structure of the β -glucan secreted by *Phanerochaete chrysosporium* in continuous culture. **Carbohydrate Research**, v. 165, p. 146-149, 1987.

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

CAVALLAZZI, J. R. P.; OLIVEIRA, M. G. A.; KASUYA, M. C. M. Laccase production by *Lepista sordida*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p. 2004.

CALL, H. P.; MÜCKE, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 163-202, 1997.

CAMPOS, R., KANDELBAUER, A., ROBRA, K. H., CAVACO-PAULO, A., GÜBITZ, G. M. Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 131-139, 2001.

CARVALHO, C. C. Produção de Ligninases por Basidiomicetos Através de Fermentação em Estado Sólido, Caracterização e Aplicação das Enzimas 2005. 112p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

CAPALASH, N.; SHARMA, P. Biodegradation of textile azo-dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 309-312, 1992.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, p. 270-276, 1939.

CHAHAL, D. S. Pretreatment of lignoceluloses with steam explosion for production on seed and fuel ethanol. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 2., 1985, Maringá. *Anais...* Maringá, 1985.

CHAGAS, E. L.; DURRANT, L. R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 473-477, 2001.

CHANDER, M.; ARORA, D. S.; BATH, H. K. Biodecolourisation of some industrial dyes by white-rot fungi. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 94-97, 2004.

CHET, I.; TROJANOWSKI, J.; HUTTERMANN, A. Decolorization of the Poly B-411 and correlation with lignin degradation by fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 29, p.37-43, 1985.

CHUNG, K. T.; STEVENS, S. E. Degradation of azo dye by environmental microorganism and helminths. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, p. 2121-2132, 1993.

COUTO, S. R.; LÓPEZ, E.; SANROMÁN, M. A. Utilization of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors. **Journal of Food Engineering**, v.74, p. 263-267, 2006.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M.A. Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolorization ability. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 388-393, 2006a.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M.A. The effect of violuric acid on the decolourization of recalcitrant dyes by laccase from *Trametes hirsuta*. **Dyes and Pigments**, Article in press, Available on line 10 march, 2006b.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211-219, 2005a.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M.A. Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions. Application to Lissamine green B decolourization. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 208-213, 2005b.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M.A.; GUBITZ, G. M. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. **Chemosphere**, v. 58, p. 417-422, 2005.

COUTO, S. R.; GUNDÍN, M.; LORENZO, M.; SANROMÁN, M. A. Screening of support and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 249-255, 2002.

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

COUTO, S. R.; ROSALES, E.; GUNDÍN, M.; SANROMÁN, M. A. Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. **Journal of Food Engineering**, v. 64, p. 423-428, 2004.

CRIPPS, C.; BUMPUS, J. A.; AUST, S. D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1114-1118, 1990.

DANIEL, G. F.; NILSSON, T. Interactions between soft rot fungi and CCA preservatives in *Betula verrucosa*. **Journal of the Institute of Wood Science**, v. 11, p. 162 - 171, 1989.

DA SILVA, R.; FRANCO, R.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 249-260, 1997.

DAVIS, S., BURNS, R. G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.32, p. 721-726, 1990.

D'SOUZA, T. M.; MERRITT, C. S.; REDDY, C. A. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5307-5313, 1999.

DEVECI, T.; UNYAYAR, A.; MAZMANCI, M. A. Production of Remazol brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funalia trogii* ATCC 200800. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 25-32, 2004.

DURÁN, N. Siderophores on wood degradation: reduction of molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron. **Proceedings**, v. 5, p. 164-169, 1996.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação da lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. Ed. Microbiologia Ambiental, Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, 1997, p.269-292.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E.; INNOCENTINI-MEI, L. H.; CANHOS, V. P. A new alternative process for Kraft E1 effluent treatment. A combination of photochemical and biological methods. **Biodegradation**, v. 5, p. 13-19, 1994.

DURAND, A.; RENAUD, R.; ALMANZA, S.; MARATRAY, J.; DIEZ, M.; DESGRANGES, C. Solid-state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant. **Biotechnology Advances**, v. 11, p. 591-597, 1993.

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

EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F. Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Bioresource Technology*, Article in press. Available online 27 October 2005b.

EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F. Ability of industrial dyes decolorization and ligninolytic enzyme production by different *Pleurotus* species with special attention on *Pleurotus calyptratus*, strain CCBAS 461. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 941-946, 2006.

EL-NASSER, N. H. A.; HELMY, S. M.; EL-GAMMAL, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with rot fungi. **Polymer Degradation and Stability**, v. 55, p. 249-253, 1997.

ERIKSSON, K. E. L. Biotechnology in the pulp and paper industry. **Wood Science and Technology**, v. 24, p. 79-101, 1990.

ESLYN, W. E.; KIRK, T. K.; EFFLAND, M. J. Changes in the chemical composition of wood caused by six soft-rot fungi. **Phytopatology**, v. 65, p. 473-476, 1975.

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

FEIJOO, G.; MOREIRA, M. T.; SIERRAALVAREZ; FIELD, J. A.; LEMA, J. M. Kraft paste bleaching with ligninolytic fungi. **Afinidad**, v. 54, p. 321-326, 1997.

FULTHORPE, R. R.; ALLEN, D. G. A comparison of organochlorine removal from bleached Kraft pulp and paper-mill effluents by dehalogenating *Pseudomonas ancylobacter* and *Methylobacterium* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 782-789, 1995.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolourization of dye wastewater: a review. **Bioresource Technology**, v.79, p. 251-262, 2001.

GALLIANO, H.; GAS, G.; BOUDET, A. M. Lignin biodegradation by cultures of *Rigidoporus lignosus* in solid state conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 67, p. 295-300, 1990.

GILBERTSON, R. L. Wood-rotting fungi of North America. **Mycologia**, v. 72, p. 1-49, 1980.

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

GILL, P. K.; ARORA, D. S.; CHANDER, M. Biodecolourization of azo and triphenylmethane dyes by *Dichomitus squalens* and *Phlebia* spp. **Journal of industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 201-203, 2002.

GLENN, J. K.; AKILESWAREAN, L.; GOLD, M. H. Mn (II) oxidation is the principle function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 251, p. 688-696, 1986.

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

GOLD, M. H.; WARIISHI, H.; VALLI, K. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **ACS Symposium Series**, v. 389, p. 127-140, 1989.

GOLDSTEIN, I. S. Chemical from lignocelulose. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 6, p. 293-301, 1976.

GÓMES, J.; PAZOS, M.; COUTO, R. S.; SANROMÁN, M. A. Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 68, n. 3, p. 315-319, 2005.

GONÇALVES, A. R.; ESPOSITO, E.; BENAR, P. Evaluation of *Panus tigrinus* in the delignification of sugarcane bagasse by FTIR-PCA and pulp properties. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 177-185, 1998.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, p. 71-78, 2000.

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

HARAZONO, K.; NAKAMURA, K. Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. **Chemosphere**, v. 59, p. 63-68, 2005

HARAZONO, K.; WATANABE, Y.; NAKAMURA, K. Decolorization of azo dye by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and by its manganese peroxidase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, p. 455-459, 2003.

HARTLEY, R. D.; FORD, C. W. Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. In: LEWIS, N. G.; PAICE, M. G., ed. Biogenesis and biodegradation of plant cell polymers. **ACS Symposium series**, v. 399, p. 137-145, 1985.

HATVANI, N.; MÉCS, I. Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinus edodes* on malt-containing by-product of the brewing process. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 491-496, 2001.

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

HAVE, T. R.; HARTMANS, S.; TEUNISSEN, P. J. M.; FIELD, J. A. Purification and characterization of two lignin peroxidase isozymes produced by *Bjerkandera* sp. Strain BOS55. **FEBS Letters**, v. 422, p. 391-394, 1998.

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

JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; KOCHMANSKA-RDEST, J.; MALARCZYK, E.; WARDAS, W.; LEONOWICZ, A. Fungi and their ability to decolourize azo and antraquinonic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 566-572, 2002.

JAOUANI, A.; GUILLÉN, F.; PENNINCKX, M. J.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p478-486, 2005.

JORDAAN, J.; PLETSCHKE, B. I.; LEUKES, W. D. Purification and partial characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 635-641, 2004.

JUNG, H.; XU, F.; LI, K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p.161-168, 2002.

KAMIDA, M. H.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E. D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v. 28, p. 629-632, 2005.

KANAYAMA, N.; SUZUKI, T.; KAWAI, K. Purification and characterization of an alkaline manganese peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, p. 405-410, 2002.

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

KARIMINIAAE-HAMEDAANI, H. R.; SAKURAI, A.; SAKAKIBARA, M. Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase producing white rot fungus. **Dyes and Pigments**, v. 72, p. 151-162, 2007.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KIRK, T. K.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W. J.; LORENZ, L. F.; ZEIKUS, J. G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Microbiology**, v. 117, p. 277-285, 1978.

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

KLUCZEK-TURPEINEN, B.; TOMELA, M.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete *Paecilomyces inflatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 374-379, 2003.

KUMAR, A. G.; SEKARAN, G.; KRISHNAMOORTHY, S. Solid state fermentation of *Achras zapota* lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 13, p. 1521-1528, 2006.

KNAPP, J. S.; NEWBY, P. S.; REECE, L. P. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 664-668, 1995.

KUWAHARA, M.; GLEND, J. K.; MORGAN, A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, p. 247-250, 1984.

KUNZ, A.; ZAMORA-PERALTA, P.; MORAES, G. A. S.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, p. 78-82, 2002.

LANG, E.; NERUD, F.; ZADRAZIL, F. Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 167, p. 239-244, 1998.

LECHNER, B. E.; PAPINUTTI, V. L. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 594-598, 2006.

LEONOWICS, A.; CHO, N. S.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, p. 185-227, 2001.

MALTSEVA, O. V.; NIKU-PAAVOLA, M. L.; LEONTIEVSKY, A. A.; MYASOEDOVA, N. M.; GOLOVLEVA, L. A. Ligninolytic Enzymes of the White Rot Fungus *Panus tigrinus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 13, p. 291-302, 1991.

MARTINS, E. Produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agro-industriais 2003. 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

MATSUI, M.; SHIBATA, K.; TAKASE, Y. Ozonolysis of 1-phenylazo-2-naphthol. **Dyes and Pigments**, v. 5, p. 321-328, 1984.

MECHICHI, T., MHIRI, N., SAYADI, S. Remazol Brilliant Blue R decolorization by the laccase from *Trametes troglia*. **Chemosphere**, Article in press, Available on line 13 february, 2006.

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

McDOUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, D.; HILLMAN, J. R. Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 70, p. 133-150, 1996.

MCGUIRL, M. A.; DOOLEY, D.M. Copper containing oxidases. **Current Opinion in Chemistry Biology**, v. 3, p.138-144, 1999.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; FREITAS, R. J. S.; CHRISTEN, P.; SOCCOL, C. R. Optimization of production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 1, p. 33-39, 2000.

MIN, K-L.; KIM, Y-H; KIM, Y. W.; JUNG, H. S.; HAH, Y. C. Characterization of a novel laccase produced by the wood rotting fungus *Phellinus ribis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 392, p. 279-286, 2001.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Food Science and Technology**, v. 13, p. 205-216, 2002.

MONTGOMERY, R. A. P. The role of polyssaccharidase enzymes in the decay of wood by basidiomycetes. In: FRANKLAND, C.; HEDGER, J. N.; SWIFT, M. J. (eds) Decomposer basidiomycetes: their biology and ecology. **Cambridge University Press**, London., p. 51-65, 1982.

MUNARI, F. M.; GAIO, T. A.; CALLONI, R.; DILLON, A.J. P. Uso de caldo proveniente de cultivos em estado sólido e líquido de *Pleurotus sajor-caju* na descoloração de corantes têxteis. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE GESTÃO AMBIENTAL NA RELAÇÃO UNIVERSIDADE – EMPRESA, 1, 2004, Quito, *Anais...* Quito, 2004.

NERUD, F.; MISURCOVA, Z. Distribution of ligninolytic enzymes in white rot fungi. **Folia Microbiologica**, v. 41, p. 264-266, 1996.

NIGAM, P.; PANDEY, A.; PRABHU, K. A. Cellulase and ligninase production by basidiomycete culture in solid-state fermentation. **Biological Wastes**, v. 20, p. 1-9, 1987.

NILSSON, I.; MÖLLER, A.; MATTIASSON, B.; RUBINDAMAYUGI, M. S. T.; WELANDER, U. Decolorization of synthetic and real textile waste water by the use of white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 94-100, 2006.

NISHIZAWA, Y.; NAKABAYASHI, K. SHINAGAWA, E. Purification and characterization of laccase from white rot fungus *Trametes sanguinea* M85-2. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 91-93, 1995.

NIKU-PAAVOLA, M. L.; FAGERSTRÖM, R.; KRUUS, K.; VIIKARI, L. Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from *Peniophora* species. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 100-102, 2004.

NIKU-PAAVOLA, M. L.; RANUA, M.; SUURNAKKI, A.; KANTELINEN, A. Effect of lignin-midifying enzyme on pine kraft pulp. **Bioresources Technology**, v. 50, p. 73-77, 1995.

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

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

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 27, p. 109-117, 1992.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Bioconversion of biomass: a case study of ligno-cellulosics bioconversions in solid-state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, p. 379-390, 1998.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: I-Bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v.35, p. 1153-1169, 2000a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: I-Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000b.

PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, R. L. Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of veratryl alcohol. **Biochemical and biophysical Research Communication**, v. 178, p. 1056-1063, 1991.

PAZARLIOGLU, N. K.; SARIISIK, M.; TELEFONCU, A. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1673-1678, 2005.

PELAEZ, F.; MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. **Mycological Research**, v. 99, p. 37-42, 1995.

PÉRIÉ, F. H.; REDDY, B. V.; BLAKBURN, N. J.; GOLD, M. H. Purification and Characterization of Laccases from the White-Rot Basidiomycete *Dichomitus squalens*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 353, p.349-355, 1998.

PETERSEN, B. R.; MATHIASSEN, T. E.; PEELLEN, B.; ANDERSEN, H. Use of laccase for deoxygenation of oil-containing product such as salad dressing. **PCT Int Appl**. WO 9631133 A1, 1996.

RADHA, K. V.; REGUPATHI, I.; ARUNAGIRI, A.; MURUGESAN, T. Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3337-3345, 2005

RALPH, B. J. Solid substrate fermentations. **Food Technology in Australia**, v. 28, p. 247-251, 1976.

RAYNER, A. D. M.; BODDY, L. Fungal decomposition of wood: its biology and ecology. Chichester: John Wiley, 1988.

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

RENVALL, P. Community structure and dynamics of wood-rotting basidiomycetes on decomposing conifer trunks in northern Finland. **Karstenia**, v. 35, p. 1-51, 1995.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in Textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 247-255, 2001.

RODRIGUEZ, J.; DURÁN, N. Some new aspects of enzymatic lignin biodegradation. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 21, p. 411-422, 1988.

RODRÍGUEZ, E.; PICKARD, M. A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Current Microbiology**, v. 38, p. 27-32, 1999.

ROSALES, E.; COUTO, R. S.; SANROMÁN, M. A. Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 419-423, 2005.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, p. 77-86, 2001.

ROTHSCHILD, N.; NOVOTNÝ, C.; SASEK, V.; DOSORETZ, C. G. Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*): isolation and characterization of lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 627-633, 2002.

RYAN, S.; SCHNITZHOFFER, W.; TZANOV, T.; CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G. M.; Na acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolourization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 766-774, 2003.

SARKANEN, K. V.; HERGERT, H. L. Classification and distribution. In "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions", SARKANEN, K. V.; LUDWING, C. H (eds), **Wiley-Interscience**, 1971, p. 43.

SARKANEN, K. V.; LUDWING, C. H. Definition and nomenclature. In "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reaction" SARKANEN, K. V.; LUDWING, C. H. (eds), **Wiley-Interscience**, 1971, p.1

SARKAR, S.; MARTY'NEZ, A. T.; MARTY'NEZ, M. J. Biochemical and Molecular Characterization of a Manganese Peroxidase Isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1339, p. 23-30, 1997.

SATYENDRA, M. K.; MODI, D. R. Decolorization of Pulp-Paper Mill Effluents by White-rot Fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, p. 85-112, 1999.

SCHLIEPAHKE, K.; LONERGAN, G. T. Laccase variation during dye decolourisation in a 200L packed-bed bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 881-886, 1996.

SCHMIDT, J.; SZAKACS, G.; CENKVARI, E.; SIPOCZ, J.; URBANSZKI, K.; TENGERDY, R. P. Enzyme assisted ensiling of alfalfa with enzymes by solid substrate fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 207-212, 2001.

SCHLOSSER, D.; GREY, R.; FRITSCHKE, W. Patterns of ligninolytic enzyme in *Trametes versicolor*. Distribution of extra-and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 412-418, 1997.

SHAH, M. P.; REDDY, G. V.; BANERJEE, R.; BABU, P. R.; KOTHARI, I. L. Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (*Phylosticta* spp. MPS-001 and *Aspergillus* spp. MPS-002). **Process Biochemistry**, v. 40, p.445-451, 2005.

SHIN, K. S.; LEE, J. P. Purification and Characterization of a New Member of the Laccase Family from the White-rot Basidiomycete *Coriolya hirsutus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.384, p.109-115, 2000.

SHRIVASTAVA, R.; CHRISTIAN, V.; VYAS, B. R. M. Enzymatic decolorization of sulfonphthalein dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 333-337, 2005.

SCHNEIDER, P.; CASPERSEN, M. B.; MONDORF, K.; HALKIER, T.; SKOV, L. K.; OSTERGAARD, P. R.; BROWN, K. M.; BROWN, S. H. XU, F. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. **Enzyme and microbial technology**, v. 25, p. 502-508, 1999.

SI, J. Q. Use of laccase in baking. **PCT Int. Appl.** WO 9428728 A1, 1994.

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

SOARES, G. M. B., AMORIM, M. T. P., COSTA-FERREIRA, M. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 123-129, 2001.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 205-218, 2003.

SOUZA, D. F.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Efeito da umidade inicial na produção de lacases por *Pleurotus pulmonarius* em fermentação em estado sólido. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 6., 2004, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro, 2004. p. 130, T6-25.

SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Purification and characterization of the main laccase produced by white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 278-286, 2003.

SWAMY, J.; RAMSAY, J. A. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 130-137, 1999.

SZAKACS, G.; TENGEDY, R. P. Lignocellulolytic enzyme production on pretread poplar wood by filamentous fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 487-490, 1997.

TEKERE, M.; MSWAKA, A. Y.; ZVAUYA, R.; READ, J. S. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 420-426, 2001.

TIEN, M.; KIRK, K. T. Lignin-degrading enzyme from hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. **Science**, v. 221, p. 661-663, 1983.

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

TUOR, U.; WARIISHI, H.; SHOEMAKER, H. E.; GOLD, M. H. Oxidation of phenolic arylglycerol b-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*; oxidative cleavage of an α -carbonyl model compound. **Biochemistry**, v. 31, p. 4986-4995, 1992.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzyme of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, v. 41, p. 1-17, 1995.

TYCHANOWICZ, G. K.; ZILLY, A.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Decolourization of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 855-89, 2004.

ÜREK, R. O.; PAZARLIOGLU, N. K. Purification and partial characterization of manganese peroxidase immobilized Phanerochaete chrysosporium. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2061-2068, 2004.

VARELA, E.; MARTINEZ, A. T.; MARTINEZ, J. Southern blot screening for lignin peroxidase and aryl-alcohol oxidase genes in 30 fungal species. . **Journal of Biotechnology**, v. 83, p. 245-251, 2000.

VERMA, P.; SHAH, V.; BALDRIAN, P.; GABRIEL, J.; STOPKA, P.; TRNKA, T.; NERUD, F. Decolorization of synthetic dyes using a copper complex with glucaric acid. **Chemosphere**, v. 54, p. 291-291, 2004.

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

WANG, H. X.; NG, T. B. A novel laccase with fair thermostability from the edible wild mushroom (*Albatrella dispansus*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 319, p. 381-385, 2004.

WEBER, E. J.; STICKNEY, V. C. Hydrolysis kinetics of reactive blue 19 vinyl sulfone. **Water Research**, v. 27, p. 63-67, 1993.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot Fungi and Their Enzymes for the Treatment of Industrial Dye Effluents. **Biotechnology Advances**, v.22, p. 161-187, 2003.

YOUNG, L.; YU, J. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. **Pergamon**, v. 31, p. 1187-1193, 1997.

XAVIER-SANTOS, S. Diversidade, isolamento em cultura e perfil enzimático de fungos decompositores de madeira da Estação Ecologia do Noroeste Paulista – São José do Rio Preto/Mirassol, SP 2003. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

XU, F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 924-928, 1997.

XU, F.; SHIN, W.; BROWN, S. H.; WAHLEITHNER, J. A.; SUNDARAM, U. M.; SOLOMON, E. I. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity and stability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1292, p. 303-311, 1996.

ZACCHI, L.; BURLA, G., ZUOLONG, D.; HARVEY, P. J. Metabolism of cellulose by *Phanerochaete chrysosporium* in continuously agitated culture is associated with enhanced production of lignin peroxidase. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 185-192, 2000.

ZHANG, M.; WU, F.; WEI, Z.; XIAO, Y.; GONG, W. Characterization and decolorization ability of a laccase from *Panus rudis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 92-97, 2006.

ZILLY, A.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Utilização de farelo de trigo na produção de lacases por *Pleurotus pulmonarius* em fermentação. In: SEMANA DE BIOLOGIA DA UNIOESTE, 10, 2001, Cascavel. *Anais...* Cascavel, 2001.