

**Produção de Ligninases por Basidiomicetos Através de
Fermentação em Estado Sólido, Caracterização e Aplicação das
Enzimas**

Caio Cesar de Carvalho

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração Microbiologia Aplicada).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro de 2005



“JULIO MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências - Campus de Rio Claro

**Produção de Ligninases por Basidiomicetos Através de
Fermentação em Estado Sólido, Caracterização e Aplicação das
Enzimas**

Caio Cesar de Carvalho

Orientador: Profa. Dra. ELENI GOMES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração Microbiologia Aplicada).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro de 2005

Dedico:

À minha família pela confiança depositada.

À minha “Nona” pelo exemplo de luta e determinação.

À todas as pessoas que fazem ciência com paixão e responsabilidade.

*“Aprendamos a sonhar, senhores, pois então talvez nos apercebamos da
verdade.”*

(August Kekulé, 1865)

“Pedras que rolam não criam limo.”

(Muddy Waters)

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

À Profa. Eleni Gomes, não só pela orientação, mas também pela sabedoria e confiança.

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

A todos professores, técnicos e funcionários do instituto pela ajuda, atenção e paciência em tentar passar um pouco de seus valiosos conhecimentos.

Aos meus companheiros de laboratório pela agradável convivência, pelo aprendizado e pelo respeito.

Aos meus amados irmãos Carlo e Cássio, pela força e companheirismo.

Ao meu pai e toda minha amada família em Rio Claro.

À minha tia Ana, pela ajuda e confiança nas horas mais difíceis da minha vida.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

À minha mãe.

Ao Pai.

ÍNDICE

	Página
I. RESUMO.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUÇÃO.....	3
III. 1. Decomposição da madeira.....	3
III. 2. Lignina.....	6
III. 3. Ligninases.....	8
III. 3.1. Lignina peroxidase (LiP).....	9
III. 3.2. Manganês peroxidase (MnP).....	10
III. 3.3. Lacase.....	11
III. 4. Aplicações biotecnológicas das ligninases.....	15
III. 4.1. Aplicação das ligninases na remoção de corantes sintéticos.....	16
IV. OBJETIVOS.....	22
V. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
V. 1. Microrganismos.....	23
V. 2. Cultivo para a produção da enzima.....	23
V. 2. 1. Inoculo.....	23
V. 2. 2. Preparação dos substratos.....	23
V. 2. 3. Fermentação sólida.....	24
V. 2. 4. Fermentação semi-sólida com suplementação de diferentes fontes de nitrogênio.....	24
V. 3. Determinação de atividade enzimática.....	25
V. 3. 1. Lacase.....	25
V. 3. 2. Manganês peroxidase.....	25
V. 3. 3. Lignina peroxidase.....	25

V. 4. Quantificação do nitrogênio total dos substratos de fermentação.....	26
V. 5. Caracterização físico-químicas das ligninases.....	26
V. 5.1. Efeito do pH sobre a atividade da enzima.....	26
V.5.2. Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima.....	27
V. 5. 3. Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas em ausência de substrato.....	27
V. 5. 4. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas em ausência de substrato.....	27
V.6. Avaliação da ação das enzimas sobre corantes aromáticos.....	27
V. 6. 1. Mistura da reação.....	28
V. 6. 2. Ensaio com substratos enzimáticos.....	28
V. 6. 3. Tempo de incubação.....	28
V. 6. 4. Temperatura e pH.....	28
V. 6. 5. Concentração e comprimento de onda para leitura espectrofotométrica dos corantes.....	29
V. 6. 6. Cálculo da descoloração.....	29
	30
VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
VI. 1. Aspectos gerais do crescimento fúngico nas fermentações sólidas.....	30
VI. 2. Atividade de ligninases nos diferentes substratos.....	31
VI. 3. Efeito da suplementação dos substratos com diferentes fontes de nitrogênio sobre o crescimento fúngico e sobre a produção de ligninases.....	38
VI. 4. Determinação do nitrogênio total nos meios de fermentação.....	39
VI. 4. 1. Aspectos gerais do crescimento fúngico sob influência de diferentes fontes de nitrogênio.....	40
VI. 4. 2. Atividade de ligninases em fermentações com suplementação de diferentes fontes de nitrogênio.....	43

VI. 4.3. Determinação do pH ótimo para a atividade das enzimas.....	66
VI. 4.4. Determinação da temperatura ótima para a atividade das enzimas.....	69
VI. 4.5. Efeito do pH sobre a estabilidade das ligninases.....	72
VI. 4.6. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das ligninases.....	75
VI. 5. Avaliação da ação das enzimas sobre corantes aromáticos.....	80
VII. CONCLUSÕES.....	99
VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Fenóis percussores da lignina.....	6
Figura 2: Estrutura representativa da lignina.....	7
Figura 3: Seqüência de reação de despolimerização de um anel aromático.....	9
Figura 4: Oxidação do álcool veratrílico a aldeído.....	10
Figura 5: Ciclo catalítico da manganês peroxidase (MnP).....	11
Figura 6: Papel do mediador na atividade da lacase.....	12
Figura 7: Estrutura e nomes abreviados de alguns mediadores utilizados pela lacase.....	14
Figura 8: Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre produção de ligninases por <i>Coriolopsis byrsina</i> 16.....	33
Figura 9: Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre produção de ligninases por <i>Gloeophyllum cf striatum</i> 40.....	35
Figura 10: Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre produção de ligninases por <i>Lentinus</i> sp 48.....	36
Figura 11: Produção de manganês peroxidase pelo fungo <i>C. byrsina</i> em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fonte de nitrogênio.....	44

Figura 12: Produção de lignina peroxidase pelo fungo <i>C. byrsina</i> em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fonte de nitrogênio.....	46
Figura 13: Produção de lacase pelo fungo <i>C. byrsina</i> em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fonte de nitrogênio.....	47
Figura 14: Produção de manganês peroxidase pelo fungo <i>Gloeophyllum cf striatum</i> em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fonte de nitrogênio.....	49
Figura 15: Produção de lignina peroxidase pelo fungo <i>Gloeophyllum cf striatum</i> em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fonte de nitrogênio.....	50
Figura 16: Produção de lacase pelo fungo <i>Gloeophyllum cf striatum</i> em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fonte de nitrogênio.....	51
Figura 17: Produção de manganês peroxidase pelo fungo <i>Lentinus</i> sp em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fonte de nitrogênio.....	53
Figura 18: Produção de lignina peroxidase pelo fungo <i>Lentinus</i> sp em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fonte de nitrogênio.....	55
Figura 19: Produção de lacase pelo fungo <i>Lentinus</i> sp em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fonte de nitrogênio.....	57
Figura 20: Efeito do pH sobre a atividade da enzima lacase produzida por <i>Coriopolisis byrsina</i>	67

Figura 21: Efeito do pH sobre a atividade da enzima lignina peroxidase produzida por <i>Gloeophyllum cf striatum</i>	67
Figura 22: Efeito do pH sobre ligninases produzidas por <i>Lentinus</i> sp.....	68
Figura 23: Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima lacase produzida por <i>Coriolopsis byrsina</i>	70
Figura 24: Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima lignina peroxidase produzida por <i>Gloeophyllum cf striatum</i>	70
Figura 25: Efeito da temperatura sobre ligninases produzidas por <i>Lentinus</i> sp.....	71
Figura 26: Efeito do pH na estabilidade da lacase produzida pelo <i>Coriolopsis byrsina</i> 16 em ausência de substrato.....	72
Figura 27: Efeito do pH na estabilidade da lacase produzida pelo <i>Lentinus</i> sp 48 em ausência de substrato.....	73
Figura 28: Efeito do pH na estabilidade da LiP em ausência de substrato.....	74
Figura 29: Efeito do pH na estabilidade da MnP produzida pelo <i>Lentinus</i> sp 48 em ausência de substrato.....	75

Figura 30: Efeito da temperatura na estabilidade da MnP produzida pelo <i>Lentinus</i> sp 48 em ausência de substrato.....	76
Figura 31: Efeito da temperatura na estabilidade da LiP em ausência de substrato.....	77
Figura 32: Efeito da temperatura na estabilidade da lacase em ausência de substrato.....	78
Figura 33: Fórmula estrutural do corante Orange II.....	80
Figura 34: Fórmula estrutural do corante Azure B.....	81
Figura 35: Fórmula estrutural do corante Chrysophenine.....	81
Figura 36: Fórmula estrutural do corante Cibacron Blue 3GA.....	82
Figura 37: Fórmula estrutural do corante Reactive Red 120.....	82
Figura 38: Fórmula estrutural do corante Azul de Metileno.....	83
Figura 39: Fórmula estrutural do corante Cristal Violeta.....	83
Figura 40: Fórmula estrutural do corante Vermelho Fenol.....	84
Figura 41: Comparação entre as estruturas químicas de vermelho fenol e azul de bromofenol.....	90
Figura 42: Fotos com descoloração obtida através de incubação por 48 horas dos corantes em solução enzimática bruta de <i>C. byrsina</i>	97

Figura 43: Fotos com descoloração obtida através de incubação por 48 horas dos corantes em solução enzimática bruta de <i>Lentinus</i> sp.....	98
---	----

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Estruturas químicas dos corantes orgânicos mais representativos.....	22
Tabela 2: Relação de fungos capazes de descolorir corantes sintéticos.....	20
Tabela 3: Crescimento fúngico durante a fermentação sólida.....	31
Tabela 4: Teores de nitrogênio total dos resíduos sólidos utilizados como substratos, determinados pelo método Kjeldhal.....	40
Tabela 5: Teores de N totais dos meios de fermentação.....	40
Tabela 6: Crescimento fúngico durante a fermentação sólida de substratos acrescidos de diferentes fontes de nitrogênio.....	42
Tabela 7: Produção máxima de ligninases pelo fungo <i>Coriolopsis byrsina</i> 16, respectivos meios e tempos de cultivo, aspecto do crescimento fúngico e do tipo de solução usada com suplemento de nitrogênio.....	59
Tabela 8: Produção máxima de ligninases pelo fungo <i>Gloeophyllum</i> cf <i>striatum</i> 40, respectivos meios e tempos de cultivo, aspecto do crescimento fúngico e do tipo de solução usada com suplemento de nitrogênio.....	60
Tabela 9: Produção máxima de ligninases pelo fungo <i>Lentinus</i> sp 48, respectivos meios e tempos de cultivo, aspecto do crescimento fúngico e do tipo de solução usada com suplemento de nitrogênio.....	62
Tabela 10: Resumo das características das ligninases.....	79

Tabela 11: Comprimento de onda de absorção máxima (nm) para os corantes.....	84
Tabela 12: Taxa de descoloração do corante Orangell por <i>C.byrsina</i> e <i>Lentinus</i> sp.....	86
Tabela 13: Taxa de descoloração do corante Crysophenine por <i>Lentinus</i> sp.....	88
Tabela 14: Taxa de descoloração do corante Cibacron Blue por <i>C.byrsina</i> e <i>Lentinus</i> sp.....	89
Tabela 15: Taxa de descoloração do corante Reactive Red 120 por <i>Lentinus</i> sp.....	91
Tabela 16: Taxa de descoloração do corante Vermelho Fenol por <i>Lentinus</i> sp.....	91
Tabela 17: Taxa de descoloração do corante Azure B por <i>C. byrsina</i> e <i>Lentinus</i> sp.....	93
Tabela 18: Taxa de descoloração do corante Azul de Metileno por <i>C. byrsina</i> e <i>Lentinus</i> sp.....	94
Tabela 19: Taxa de descoloração do corante Cristal Violeta por <i>C. byrsina</i> e <i>Lentinus</i> sp.....	96
Tabela 20: Resumo dos melhores resultados obtidos na descoloração de corantes sintéticos após 48 horas de incubação com solução enzimática bruta.....	98

I. Resumo

As ligninases atualmente têm sido consideradas de grande importância para indústria papeleira no branqueamento da polpa e em processos de tratamento de resíduos contendo compostos recalcitrantes como aromáticos derivados de corantes e organoclorados .

Neste trabalho foi estudada a produção de três ligninases (manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase) por três linhagens de basidiomicetos: *Coriopsis byrsina* 16, *Gloeophyllum* cf. *striatum* 40 e *Lentinus* sp 48. por um período de cultivo de seis semanas. Foram avaliados cinco diferentes resíduos agrícolas (casca de amendoim, palha de arroz, farelo de trigo, palha de milho e bagaço de cana) e produção de enzimas para os três fungos, além da influência de três fontes de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄ e (NH₄)₂SO₄ + (NH₄)₂HPO₄) no crescimento e produção de ligninases.

Entre as condições de fermentação testadas, a melhor produção de lacase (49011 U/g) foi obtida a partir do *Coriopsis byrsina* 16, cultivado em farelo de trigo por três semanas, suplementado com solução de (NH₄)₂HPO₄ + (NH₄)₂SO₄. O *Lentinus* sp. 48 apresentou uma produção de 15080 U/g, quando cultivado em meio de farelo de trigo suplementado com solução de (NH₄)₂SO₄, por três semanas de cultivo.

A lacase de *Coriopsis byrsina* 16 apresentou temperatura ótima de 60°C, e a lacase de *Lentinus* sp. 48 a 65°C. Os pHs ótimos das lacases foram de 3,5 para o *Coriopsis byrsina* 16 e 3,0 para o *Lentinus* sp. 48.

Foi avaliado o potencial de descoloração dos extratos enzimáticos brutos sobre oito corantes sintético. O corante Cibacron Blue foi descolorado em 69, 3% e o cristal violeta em 63% com o extrato enzimático de *Coriopsis byrsina*. O corante Orange II perdeu 63,5% da cor após o tratamento com solução enzimática de *Lentinus* sp. 48.

II. Abstract

Nowadays, the ligninases are considered very important to the paper industry in the pulp whitening and in the residual treatment processes, containing recalcitrant compounds acting as aromatics derived from colorings and organochlorine.

In this study, it was analyzed, in a culture period of six weeks, the production of three ligninases (manganese peroxidase, lignin peroxidase and laccase) per three lineages of basidiomycetes: *Coriolopsis byrsina* 16, *Gloeophyllum cf. striatum* 40 e *Lentinus* sp 48. It was evaluated five different agricultural residues (peanut shell, rice straw, wheat bran, corn straw and sugar-cane bagasse) and the production of enzymes for three fungi, besides the influence of three nitrogen sources ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) in the ligninases growth and production.

In the fermentation conditions tested, the best production of laccase (49011 U/g) was obtained from *Coriolopsis byrsina* 16, cultivated in wheat bran for three weeks, and supplemented with a solution of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The *Lentinus* sp. 48 had a production of 15808 U/g when cultivated in wheat bran for three weeks, and supplemented with a solution of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

The *Coriolopsis byrsina* 16 laccase demonstrated an excellent temperature of 60°C, and the *Lentinus* sp. 48 laccase of 65°C. The considerable pHs of the laccases were 3,5 for the *Coloriopsis byrsina* 16 and 3,0 for the *Lentinus* sp. 48.

It was evaluated the discoloration potential of the raw enzymatic extracts in eight synthetic colorings. The coloring Cibacron Blue was discolored in 69, 3% and the crystal violet in 63% with the enzymatic extract of *Coriolopsis byrsina*. The coloring Orange II lost 63,5% of its color after the treatment with the enzymatic solution of *Lentinus* sp. 48.

III. Introdução

III. 1. Decomposição da madeira

A decomposição e a ciclagem biogeoquímica da biomassa da madeira é essencial para a saúde, o funcionamento e a persistência dos ecossistemas florestais. Troncos e galhos mortos acolhem um grande número de fungos e insetos, além de pássaros e outros animais. A madeira em estado de apodrecimento serve como substrato para briófitas e outras plantas e podem ainda, exercer função ativa na regeneração de florestas, atuando como sementeiras (RENVALL, 1995).

A decomposição da madeira é um processo biológico complexo que geralmente se inicia com a árvore ainda viva. Bactérias como actinomicetos são freqüentemente descritas como microrganismos que atacam a madeira fresca intacta, embora os fungos poliporóides sejam os principais invasores de troncos nesta fase (HALLAKSELA, 1993).

Com a morte ou derrubada da árvore, o tronco é colonizado por grande número de fungos saprofíticos, representados principalmente pelos basidiomicetos, que facilitam o desenvolvimento de outros decompositores (MONTGOMERY, 1982). No decorrer da decomposição, ocorrem alterações estruturais e químicas na madeira e os iniciadores do processo são substituídos por outros microrganismos mais competitivos. Finalmente, fungos inespecíficos e transitórios utilizam os compostos remanescentes da decomposição e o restante é incorporado ao húmus (RENVALL, 1995).

O processo de decomposição da madeira está diretamente ligado ao potencial enzimático do microrganismo. Fungos decompositores produzem celulases, hemicelulases (xilanases), pectinases e ligninases, direcionadas à hidrólise da parede vegetal (SZAKACS, TENGEDY, 1997).

A estrutura básica das paredes celulares vegetais é formada por polímeros que incluem a celulose, polissacarídeos não celulolíticos (PNC), proteínas e compostos fenólicos unidos por ligações intermoleculares formando uma rede complexa. Os PNC podem ser ainda separados em pécticos e hemicelulósicos (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 (KOSARIC et al., 1988; 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. Extratos de madeira presentes como óleos e resinas, também têm efeitos significativos sobre os microrganismos e sua capacidade de degradar madeira, além disso, condições ambientais podem ser cruciais para governar a seletividade da biodegradação fúngica de componentes da madeira (ZACCHI et al., 2000).

Os fungos têm maior facilidade de acesso ao substrato, uma vez que as hifas do micélio penetram nos tecidos vegetais melhor do que bactérias e protozoários, dessa forma, tendo acesso ao conteúdo celular, indisponível para outros microrganismos do mesmo ambiente (WUBAH et al., 1993).

A decomposição da madeira por fungos é classificada em três grupos principais: decomposições branca, marrom e macia. Decompositores brancos são um grande grupo heterogêneo de fungos classificados entre os basidiomicetos e alguns ascomicetos e caracterizados pela sua habilidade em degradar todos os componentes da parede celular, inclusive a lignina. Esses fungos podem causar a deslignificação da madeira de forma seletiva, como *Phanaerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata* e *Polyporus versicolor* (*Coriolus versicolor*), na qual há preferência pela degradação da lignina e a madeira adquire aspecto fibroso-esbranquiçado em decorrência da decomposição de até 97% da lignina e acúmulo de celulose. Por outro lado, na decomposição não seletiva, realizada por *Trametes versicolor*, a deslignificação é acompanhada pela degradação de todos os componentes da parede celular (PALMIERI et al, 2000; LEONTIEVSKY et al, 2000; KIRK e FARRELL, 1987). Muitos fungos colonizam o lúmen celular e causam erosão da parede pela presença das hifas. Zonas erodidas das paredes se coalescem com o processo de decomposição, formando grandes vazios que são preenchidos com micélio.

Em ecossistemas florestais, eles são os decompositores mais comuns das angiospermas do que das gimnospermas (GILBERTSON, 1980).

A decomposição macia foi assim chamada, originalmente, para descrever um tipo de ataque à madeira de ambientes úmidos, por fungos classificados como ascomicetos e deuteromicetos. As bordas da madeira úmida decomposta têm uma aparência marrom e macia que se racham em fragmentos quando seca. Duas formas de decomposição macia são conhecidas. O tipo I, pelo qual, cavidades distintas, bicônicas ou cilíndricas, são formadas no interior das paredes celulares secundárias e o tipo II, que se refere a uma forma de degradação por erosão, onde a parede celular secundária é degradada gradualmente. A lamela-média não é erodida e persiste mesmo em um avançado estágio da decomposição. Essa característica distingue esse tipo II de decomposição macia da forma não-seletiva na decomposição branca, pois os decompositores brancos erodem e podem destruir completamente a lamela-média (BLANCHETTE, 1995).

A decomposição marrom é realizada por basidiomicetos que causam um ataque difuso, primeiramente sobre a celulose. Os polissacarídeos são removidos, mas a degradação da lignina é limitada. A madeira decomposta é marrom e consiste principalmente de lignina quimicamente modificada, mas não degradada. A madeira decomposta, freqüentemente se quebra em fragmentos cúbicos. Uma característica que distingue a decomposição 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 (BLANCHETTE, 1995; 1991; DANIEL, NILSSON, 1989).

Os processos de degradação descritos requerem 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).

III. 2. Lignina

Lignina é um polímero amorfo complexo composto de unidades fenil propano (C_9) unidas por diferentes tipos de ligações. Essa irregularidade do polímero é consequência do mecanismo de sua biossíntese que é dado através de acoplamento de várias formas de ressonância de radicais livres (FENGEL E WEGENER, 1984).

Os precursores diretos da lignina são três álcoois conhecidos como *Lignóis*, e derivam do ácido chiquímico: coniferil, sinapil e álcool *p*-cumaril (Figura1).

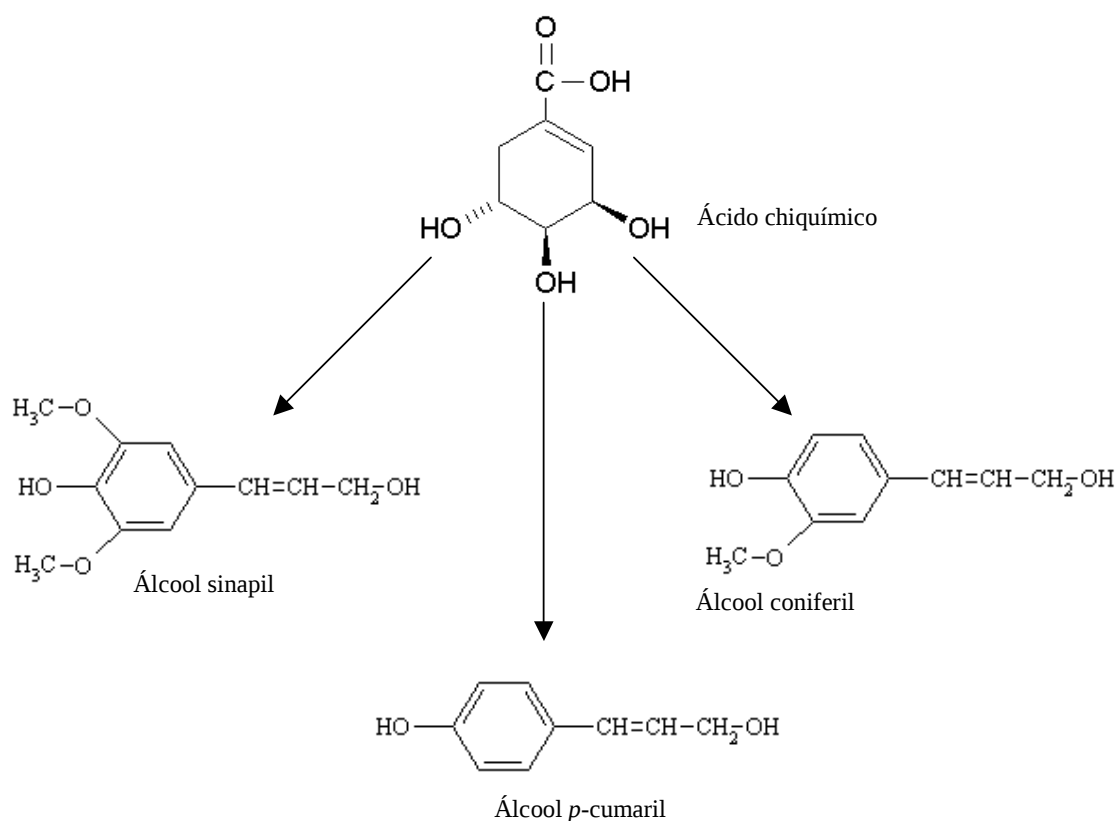


Figura 1: Fenóis precursores da lignina.

A glicose, fotossintetizada a partir de CO_2 atmosférico e H_2O , é convertida ao ácido chiquímico. A biossíntese das unidades de construção da lignina se dá através de várias etapas de transformação do ácido chiquímico principalmente pela ação de fenolases e metiltransferases, até resultar nos aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) precursores dos lignóis. A

distribuição e a proporção destes álcoois são diferentes nos diferentes vegetais vasculares (NOGUEIRA, 1990) assim como, pode-se encontrar ligninas com diferentes composições na mesma planta (AMER e DREW, 1980).

Os precursores da lignina são sintetizados no complexo de Golgi e/ou no retículo endoplasmático das células vegetais e transportados para a parede celular por vesículas. Após o transporte, os lignóis têm seus grupos hidroxilas oxidados por peroxidases ou lacase formando radicais livres em formas mesoméricas. Estes radicais acoplam-se de forma aleatória formando dilignóides, intermediários oligoméricos e finalmente a lignina (Figura 2). O crescimento das moléculas de ligninas ocorre nos espaços entre as fibrilas de celulosas e cadeias de hemicelulosas na parede celular num processo conhecido como lignificação (NOGUEIRA, 1990; GLAZER e NIKAIDO, 1995).

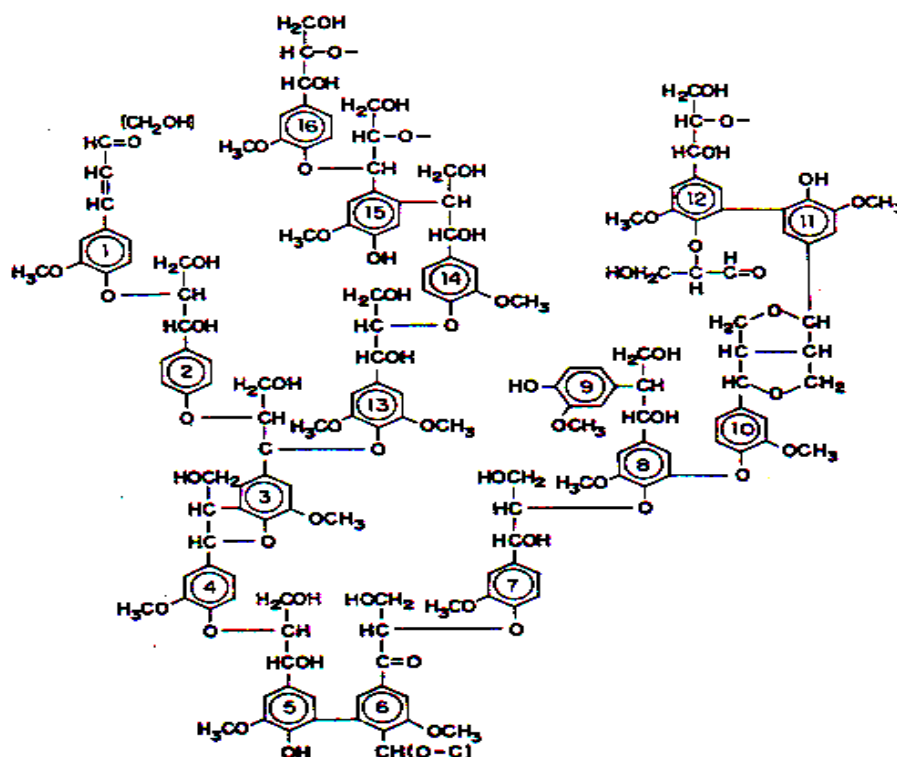


Figura 2: Estrutura representativa da lignina (NOGUEIRA, 1990).

As estruturas das ligninas variam entre as espécies vegetais e podem ser divididas em três categorias: lignina de gimnospermas ou de madeira mole, lignina de angiospermas ou de madeira dura e lignina de gramíneas (AMER e DREW, 1980). A lignina de madeira mole contém suas unidades de construção

principalmente originadas do álcool coniferil, algumas de álcool *p*-cumaril, mas não contém álcool sinapil. A lignina de madeira dura é composta de porções semelhantes de coniferil e sinapil (46%) e em menor número (8%) de *p*-hidroxifenilpropano (derivado do álcool *p*-cumaril) (ALEXANDER, MIKAIIDO, 1995). A lignina de gramíneas é composta por unidades de coniferil, sinapil e, comparada aos outros tipos de lignina, contém maior proporção de álcool *p*-cumaril (AMER, DREW, 1980).

Dentre as enzimas despolimerizantes de lignina encontramos as peroxidases, que se caracterizam por serem capazes de catalisar reações na presença de peróxido de hidrogênio (DURAN et al., 2000). Ligninas peroxidase de diferentes fontes mostraram-se capazes de mineralizar uma variedade de compostos aromáticos recalcitrantes e oxidar compostos fenólicos e poliélicos (KARAM et al., 1997). Manganês peroxidase catalisa a oxidação de fenóis monoaromáticos e corantes aromáticos, mas dependem de manganês divalente e presença de tampões (KARAM et al., 1997). As fenóis-oxidases são capazes de catalisar as reações de oxidação dos componentes fenólicos (DURAN et al., 1997). Entre estas enzimas encontramos as lacases que atuam concomitantemente com a redução do oxigênio à água e utilizam átomos de cobre em seus sítios ativos (XU, 1996; DURAN et al., 1997)

III. 3. Ligninases

Os fungos envolvidos na degradação das ligninas secretam diferentes enzimas extracelulares que catalisam reações que levam a degradação do polímero. As mais importantes são as ligninas peroxidases (Lip), manganês peroxidase (Mnp) e a lacase, mas algumas outras enzimas como as celobioses quinona oxidoreductase (CQB), celobiose dehidrogenase (CDH), glioxalato oxidase (GIOx), glucose oxidase, álcool veratrílico oxidase (AVO) e algumas esterases podem participar do complexo processo natural de decomposição da madeira (CALL et al., 1997).

III. 3.1. Lignina peroxidase (LiP)

A LiP catalisa a oxidação de grupos não fenólicos de lignina e compostos similares. O papel da LiP na lignólise é o de promover a transformação dos fragmentos de lignina, os quais foram inicialmente liberados pela ação da manganês peroxidase (WESENBERG et al. 2003).

A molécula contém um grupo prostético heme e sua ação depende da presença de H_2O_2 . O H_2O_2 , primeiramente oxida a enzima e o intermediário oxidado retira um elétron de núcleos aromáticos formando radicais aril, que se decompõem espontaneamente via reações de caráter iônico e radicalar (KIRK e FARREL, 1987). A enzima catalisa a oxidação de um elétron de compostos não fenólicos aromáticos com um alto potencial de redução, através da formação de um substrato com radical catiônico (Figura 3) (KERSTEN et al., 1985; SCHOEMAKER et al., 1985).

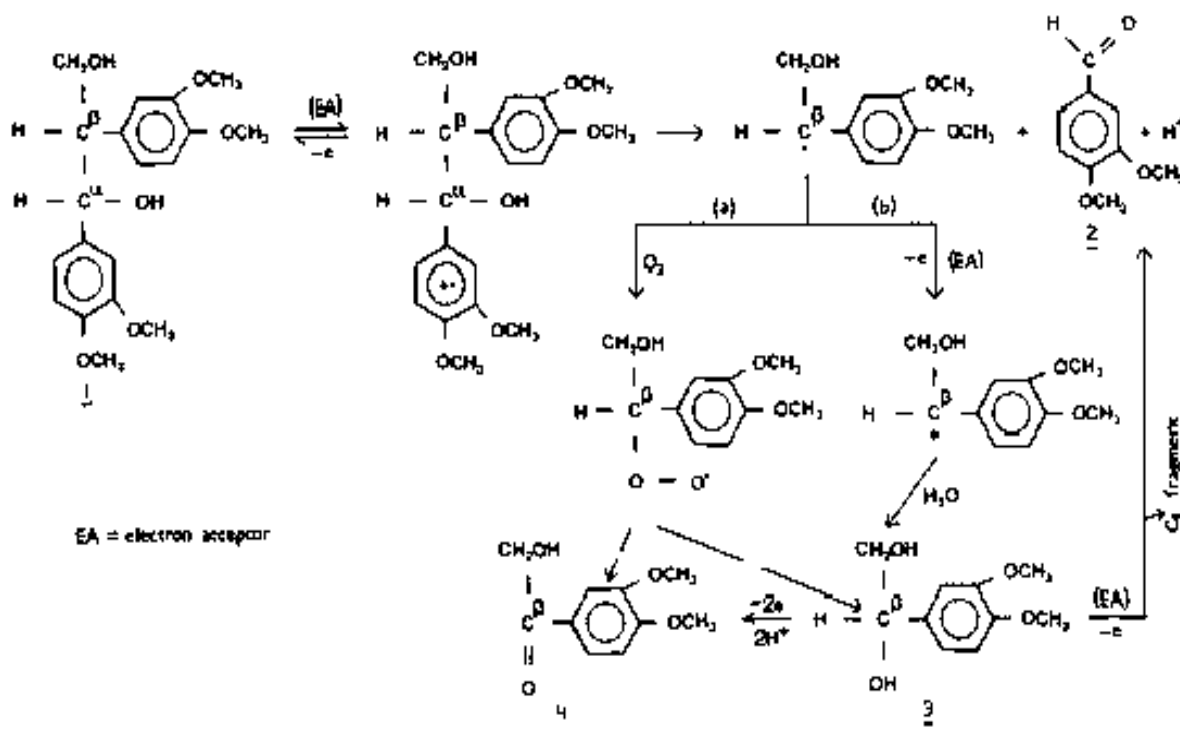


Figura 3: Seqüência de reação de depolimerização de um anel aromático (SCHOEMAKER et al., 1985).

A LiP provoca quebra de ligações $C_{\alpha}-C_{\beta}$ da cadeia propila de modelos de lignina e despolimeriza a lignina “in vivo”. Também é capaz de catalisar a oxidação do álcool veratrílico a aldeído (Figura 4) (KIRK, TIEN e FAISON 1984). O álcool veratrílico é o redutor preferido pela LiP, sendo produzido pelo fungo de degradação branca após lignólise e, aparentemente, protege a enzima contra inativação pelo excesso de peróxido de hidrogênio. Na presença de peróxido de hidrogênio, a LiP oxida o álcool a veratraldeído, reação esta, comum em ensaios de atividade da LiP (DURÁN e ESPÓSITO, 1997).

Genes que codificam isoenzimas de lignina peroxidase foram encontrados em fungos, em cujos meios de cultivo não foi encontrada a enzima, sugerindo que a expressão de LiP, em alguns fungos de decomposição branca, está relacionada com o método de cultivo utilizado ou com a presença de indutores específicos (REDDY et al., 1993; DITTMER et al., 1997). De acordo com Akhtar et al (1997) a produção da LiP é estimulada pelo álcool veratrílico.



Figura 4: Oxidação do álcool veratrílico a aldeído (GLAZER e NIKAIKO, 1995).

III. 3.2. Manganês peroxidase (MnP)

Do mesmo modo que a lignina peroxidase, a manganês peroxidase (MnP) requer H_2O_2 para sua atividade e contém um grupo heme. Porém, a MnP requer íon Mn^{2+} que é oxidado pela enzima a Mn^{3+} , que por sua vez oxida substratos orgânicos, como fenóis e radicais fenóxil (KUWAHARA et al., 1984).

O ciclo catalítico da MnP 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

do oxigênio da água (XU, 1996; DURÁN et al., 1997). É uma enzima despolimerizante de lignina que, por processo oxidativo, remove fenil-propano mais externo à cadeia, gerando radicais fenoxil. Esses radicais atuam em reações não catalíticas, como acoplamento radical-radical, desprotonação e desprotonação devido a ataques nucleofílicos pela água, levando a reações de polimerização, quebras alquílicas e oxidações nos C_α e desmetilações. Alguns intermediários aromáticos de baixo peso molecular acabam sendo também liberados, resultando na despolimerização da lignina (Figura 6) (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 catálise da enzima (MEMILLIN et al., 1997; MCGUIRL et al. 1999). De acordo com Call e Mücke (1997), o cobre do tipo 1 e 2 estão envolvidos na captura e transferência de elétrons. Os cobres do tipo 2 e 3 estão envolvidos na ligação com o oxigênio.

Lacases podem oxidar compostos como: corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, difenilmetanos, benzopirenos, organofósforos e modelo de fenóis de lignina (DURÁN et al., 2000).

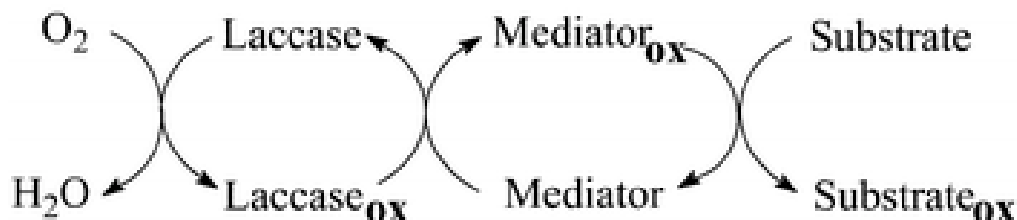


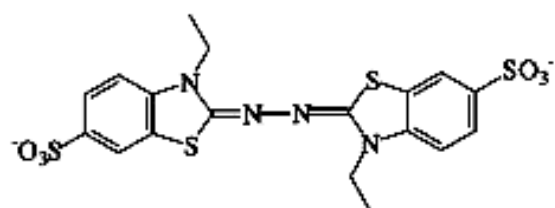
Figura 6: Papel do mediador na atividade da lacase (BARRECA et al., 2003).

Compostos não fenólicos podem ser oxidados pela enzima através de uma substância intermediária chamada “mediador”. Em geral, um mediador pode ser definido como uma molécula com a função de transportar elétrons entre as enzimas e os compostos não fenólicos. Depois de oxidado pela enzima, o mediador sai de seu sítio ativo e pode oxidar qualquer substrato, que, devido ao seu tamanho, não consegue entrar diretamente no sítio enzimático. A forma oxidada do mediador é distinta estruturalmente da enzima

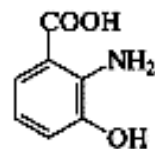
oxidada, o que lhe permite diferentes mecanismos de oxidação, e conseqüentemente aumenta a gama de substratos suscetíveis a ação da enzima (BAIOCCO et al., 2002).

Como exemplos de mediadores temos o ABTS-2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico), que pode atuar como substrato e/ou mediador da lacase, ou o álcool veratrílico, que aparece como um mediador natural da atividade de LiP em *Phanerochaete chrysosporium* fungus (HAMMEL et al., 1991).

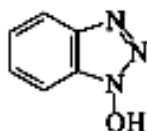
Alguns mediadores e suas respectivas estruturas estão representados na figura 7.



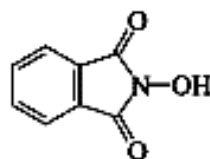
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
ABTS



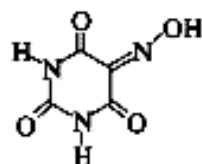
3-hydroxyanthranilic acid
HAA



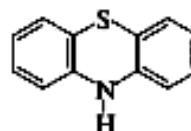
1-hydroxybenzotriazole
HBT



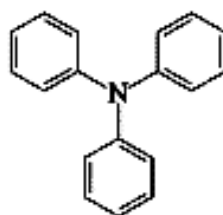
N-hydroxyphthalimide
HPI



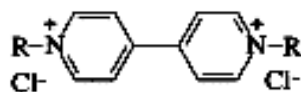
violuric acid
VLA



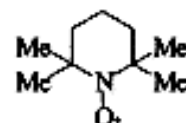
Phenothiazine
PT



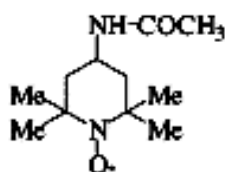
triphenylamine
TPA



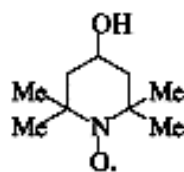
methyl viologen
MV



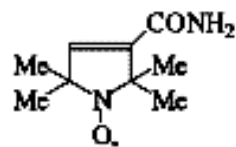
TEMPO



4-acetamido-TEMPO



4-hydroxy-TEMPO



3-carbamoyl-PROXYL-ene

Figura 7: Estrutura e nomes abreviados de alguns mediadores utilizados pela lacase (FABBRINI et al., 2002).

III. 4. Aplicações biotecnológicas das ligninases

Fungos de decomposição branca são bem conhecidos pela habilidade de produzir enzimas extracelulares oxidativas que iniciam um processo de despolimerização ligninolítica. Esta capacidade permite estender seu uso para uma série de aplicações biotecnológicas, baseadas na degradação das estruturas de diversos compostos aromáticos (MIELGO et al., 2001).

Os processos de obtenção e clarificação de polpas celulósicas e de papel geram resíduos altamente tóxicos como cloroligninas, clorofenóis e outros organoclorados de baixo peso molecular, além de substâncias derivadas da lignina que dão cor escura aos efluentes. Ligninases como a lignina peroxidase e Mn-peroxidase (LiP e MnP) podem promover a degradação desses compostos e remover a cor se aplicadas ao tratamento dos resíduos (MOYSON, VERACHTERT, 1991; DURÁN et al., 1997; FEIJOO et al., 1997; RATTO et al., 1994; FANG, GAO, 1999; BHAT, 2000).

Fungos ligninolíticos são capazes de degradar aerobicamente uma grande variedade de poluentes orgânicos recalcitrantes, incluindo vários tipos de corantes como azo- trifenilmetano, antraquinonona, ftalocianina e corantes heterocíclicos, assim como outros efluentes industriais (NOVOTNÝ et al., 2001).

Em outro contexto, a degradação da lignina transforma o substrato lignocelulósico em alimento de alta qualidade para ruminantes. A celulose e a hemicelulose de resíduos agrícolas, tais como a palha de trigo, por exemplo, são excelentes para a alimentação de ruminantes, no entanto, a disponibilidade desse composto depende da remoção da lignina “indigesta” desses materiais, a qual pode ser feita através do uso de ligninases em ausência de celulasas (EL-NASSER et al., 1997).

As aplicações das ligninases não se restringem à degradação de compostos recalcitrantes. A implantação de genes de *Trametes versicolor* em *Saccharomyces cerevisiae*, permite que a levedura produza lacase, o que aumenta sua resistência a inibidores fenólicos na hidrólise lignocelulósica. Os resultados de um estudo detalhado deste sistema mostram que, os compostos fenólicos são um importante inibidor da fermentação, e que é vantajoso o uso

de cepas de leveduras que expressam lacase na produção de etanol a partir de compostos lignocelulósicos (LARSSON et al., 2001).

Outra aplicação da lacase é na indústria vinícola, sendo usada como clarificante de vinhos ao remover fenóis de suco de uvas brancas (SERVILI et al., 2000).

Um novo método enzimático baseado no uso da lacase foi desenvolvido para distinguir morfina de codeína. Um sensor de enzima foi construído baseado na lacase e glucose desidrogenase imobilizada e um eletrodo de oxigênio “Clark”. A morfina é oxidada pela lacase com consumo de oxigênio e regenerada pela glucose desidrogenase. Lacase não é capaz de oxidar a codeína, então o sensor é sensível para morfina (BAUER et al., 1999).

Comercialmente a lacase juntamente com alguns mediadores são usados na indústria têxtil na finalização do processo de materiais índigos (Novo Nordisk Product Sheet B 917 and Application Sheet B 919).

Exoenzimas de fungos de decomposição branca são objetos de estudos da engenharia genética. Genes de lacase de fungos filamentosos foram transferidos para leveduras com sucesso (CHERRY et al., 1999). Plantas de tabaco transgênicas com genes expressores de manganês peroxidase oriundos de *Coriolus versicolor*, foram testadas para tratamento de resíduos de indústrias têxteis (LIMURA et al., 2002).

III. 4.1. Aplicação das ligninases na remoção de corantes sintéticos

A degradação de lignina pelo *Phanerochaete chrysosporium* é muito ativa na natureza e é responsável pela mineralização parcial ou total da lignina e uma grande variedade de poluentes orgânicos recalcitrantes como clorofenóis, nitrotolueno e hidrocarbonetos políclicos aromáticos (COUTO et al., 2000). Paszezynski et al. (1992) observou que a degradação de corantes por *P. chrysosporium* ocorre no estágio de metabolismo secundário e coincide com a fase ligninolítica.

A maioria das informações de biodegradação de corantes sintéticos foi obtida através de estudos feitos com o *Phanerochaete chrysosporium*, o que

deixa espaço para seleção de outras linhagens fúngicas eficientes na degradação, usando métodos de *screening* (COUTO et al., 2000).

Existe uma variedade de mais de 10000 corantes diferentes, com uma produção anual de mais de 7×10^5 toneladas que são comercializadas no mundo inteiro. Cerca de 5-10% dos materiais corados e corantes são perdidos nos efluentes industriais. Os corantes são os principais contaminantes detectados nos efluentes industriais e uma pequena porção destes na água (10-50 mg/L) é o suficiente para que seus efeitos sejam visíveis, como a alteração na transparência e solubilidade de gases na água (CAMPOS et al., 2001). Vários corantes são tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos (MICHAELS and LEWIS, 1985; CHUNG et al., 1992) e podem causar problemas com a legislação ambiental para as empresas (FORGACS et al., 2004).

Os corantes usados nas indústrias têxteis são desenvolvidos para resistir a exposição, a transpiração, luz, água, produtos químicos como agentes oxidantes e ataques microbianos. Dessa forma mantêm-se como compostos recalcitrantes no meio ambiente (WESENBERG et al., 2003). Os corantes ficam aderidos aos substratos por adsorção física, por formação de compostos complexos com metais e sais, por retenção mecânica ou por ligações covalentes (BALAN et al., 2001).

Os corantes podem ser classificados de acordo com a origem, propriedades físicas ou químicas e características relacionadas aos processos de aplicação. As classes de corantes usadas em escala industrial são azo, antraquinona, sulforado, indigoide, trifenilmetil (trítol). No entanto, a maioria dos corantes sintéticos usados é de derivados de azo (FORAGACS et al., 2004).

Corantes azos são considerados compostos xenobióticos recalcitrantes que apresentam uma dupla ligação entre nitrogênio ($N=N$) e outros possíveis grupos que não são facilmente biodegradados como o grupo sulfônico (SO_3H). Os corantes azos são tóxicos e também podem formar aminas aromáticas (anilinas) que são carcinogênicas e/ou mutagênicas (MARTINS et al., 2001).

Uma classificação sistemática dos corantes é feita de acordo com a estrutura química relacionada a um índice de cor (WESENBERG et al., 2003). A tabela 2 mostra as estruturas químicas dos corantes mais predominantes.

A exposição dos compostos azo reduzidos e nitrogenados ao oxigênio pode causar o reaparecimento da coloração. Contudo, aminas aromáticas podem ser mineralizadas por enzimas não específicas através da hidroxilação e abertura dos anéis aromáticos em tratamento de lodo ativado. A interação entre tratamentos aeróbicos-anaeróbicos de corantes foi testada por O'Neill et al. (2000) com análises de HPLC-UV. Foi verificada a formação de aminas tóxicas durante a fase anaeróbica. Na fase aeróbica houve degradação das aminas com a mineralização do nitrogênio orgânico (O' Neill et al., 2000). Estudos de desintoxicação feitos por Henfling et al. (1997) mostraram que a degradação dos azo-corantes por *B. adusta* resultaram em compostos não tóxicos.

Zhang et al. (1999) observou a descoloração do corante azo Orange II em reatores com uma alta descoloração (97% remoção de cor). No entanto, encontrou problemas de formação de agregados miceliais, formação de crosta nos eletrodos e aparecimento de material pegajoso, depois de um curto período de tempo, o que tornou necessária a remoção periódica da biomassa dos reatores.

O uso de microrganismos na remoção de corantes sintéticos de efluentes industriais oferece algumas vantagens como o baixo custo do processo, facilidade de manutenção, além dos produtos finais, geralmente, serem completamente mineralizados e atóxicos (FORGACS et al., 2004). Métodos físicos e químicos para remoção de corantes como adsorção, transformação química, incineração, fotocatalise ou ozonização são efetivas, mas de alto custo (BANAT et al., 1996; DE MORAES et al., 2000).

Vários autores já descreveram o processo de descoloração de efluentes por peroxidases produzidas por fungos (LiP, MnP e lacase). Recentemente, uma nova classe de peroxidases lignolíticas, tem sido descrita. Estas enzimas podem oxidar 2,6-dimetoxifenol (DMP) e álcool veratrílico numa reação independente de manganês.

A baixa especificidade das ligninases permite que tais enzimas possam ser capazes de degradar compostos azo-, trifenilmetano, antraquinonas, ftalocianinas e corantes heterocíclicos (OLIKKA et al., 1993; SWAMY, RAMSAY, 1999). Essa versatilidade as tornam interessantes biotecnologicamente. Contudo, enzimas com essas características foram descritas para um pequeno grupo de fungos (MOREIRA et al., 2001). A taxa de biodecomposição dos corantes sintéticos é altamente dependente da estrutura química do corante e das características do fungo (KNAPP et al., 1995).

A tabela 1 apresenta um resumo de alguns resultados publicados em experimentos com fungos, visando a remoção e/ou descoloração de corantes.

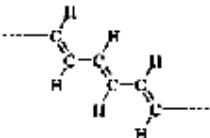
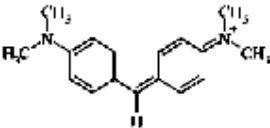
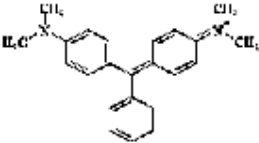
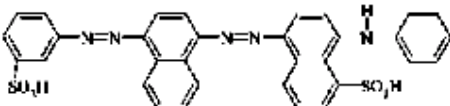
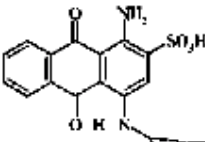
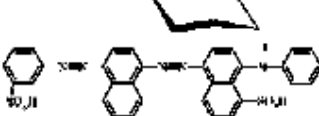
Tabela 1: Relação de fungos capazes de descolorir corantes sintéticos

Fungo	Corantes	Taxa de descoloração (%)	Tempo (dias)	Referência
<i>Phanerochaete cryosporium</i>	Orange II	99,5	1	Miego et al. (2001)
<i>Phellinus gilvus</i>	CI Vat Blue I	100	4	Balan et al. (2001)
<i>Phanerochaete cryosporium</i>		100		
<i>Pycnoporus sanguineus</i>		90		
<i>Pleurotus sajor-caju</i>		94		
<i>Phanerochaete cryosporium</i>	Poly R-478	95	8	Couto et al. (2000)
<i>Phanerochaete cryosporium</i>	Sp-g (diazó)	89	28	Martins et al (2001)
	Cm-s (diazó)	88		
<i>Irpex lacteus</i>	RBBR	93	14	Novotný et al. (2001)
	Azul de bromofenol	100		
	Cu-phthalocyanina	98		
	Vermelho metil	56		
	Vermelho congo	58		
<i>Dichomitos. Squalens</i>	Brilhant green	100	5	Gill et al. (2002)
	Cristal violeta	100	5	
	Vermelho cresol	100	5	
	Vermelho congo	96	5	
	Orange II	100	5	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Brilhant green	100	5	
	Cristal violeta	58,3	5	
	Vermelho cresol	20	5	
	Vermelho congo	84	5	
	Orange II	52,9	2	

Tabela 1 (continuação)

Fungo	Corantes	Taxa de descoloração (%)	Tempo (dias)	Referência
<i>Phlebia brevispora</i>	Cristal violeta	60	2	Gill et al. (2002)
<i>Phlebia fascicularia</i>	Brilhant green	98	5	
	Cristal violeta	100	5	
	Vermelho cresol	100	5	
	Vermelho congo	100	5	
	Orange II	100	5	
<i>Phlebia floridensis</i>	Brilhant green	100	5	
	Cristal violeta	95,2	5	
	Vermelho cresol	81,4	5	
	Vermelho congo	98	5	
	Orange II	100	5	
<i>Flavodon flavus</i>	Azure B	96	11	Raghukumar (2000)
	Brilhant gree	73	9	
	Vermelho congo	93	9	
	Cristal violeta	87	11	
	Poly-B	93	9	
	Poly-R	80	5	
	RBBR	93	9	
<i>Thelephora</i> sp	Orange G	33,3	9	Selvan et al. (2003)
	Vermelho congo	97,1	0,3	
	Amido black 10B	98,8	1	
<i>Geotrichum</i> sp	Reactive Black 5	100	10	Máximo et al. (2003)
	Reactive Red 158	100	20	
	Reactive Yellow 27	100	20	
<i>Bjerkandera fumosa</i>	Basic blue 22	100	0,08	Wilkořazka et al. (2002)
	Acid red 183	68	7	
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	Basic blue 22	100	1	
	Acid red 183	100	7	
<i>Stropharia rugoso-annulata</i>	Basic blue 22	100	0,6	
	Acid red 183	100	7	

Tabela 2: Estruturas químicas dos corantes orgânicos mais representativos

Name	Structures of representative colorants
Polieno e polimetino	
Michter's hydrol (corante diarilmetino)	
Verde de malaquita (corante triarilmetino)	
Foron yellow (corante nitro & nitroso)	
NY3 (corante antraquinônico)	
IN 13 (corante	

IV. Objetivos

- Estudar a produção de ligninases (lacase, Mn-peroxidase e lignina peroxidase) por três cepas de basidiomicetos: *Corioloropsis byrsina* 16, *Gloeophyllum cf striatum* 40 e *Lentinus* sp 48, através de fermentação em estado sólido.
- Avaliar a viabilidade do uso de resíduos agrícolas como palha de arroz, palha de milho, casca de amendoim, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substratos para o crescimento dos fungos e produção dessas enzimas.
- Caracterizar as enzimas produzidas quanto ao pH e temperaturas ótimos para as atividades e quanto à estabilidade frente às variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato.

- d) Avaliar o potencial de ação das soluções enzimáticas brutas sobre corantes sintéticos.

V. Material e métodos

V. 1. Microrganismos

Os fungos basidiomicetos foram coletados na Estação Ecológica do Noroeste Paulista, nos municípios de São José do Rio Preto e Mirassol/SP, em troncos e galhos de árvore em decomposição em dois trechos de mata remanescente (XAVIER-SANTOS, 2003).

V. 2. Cultivo para produção de enzimas

V. 2.1. Inóculo

As linhagens fúngicas foram cultivadas em placas de Petri sobre meio BDA (batata, dextrose agar) a 27°C por 2 semanas. Cortes do meio miceliado (2cmx2cm) foram utilizados como inóculo, numa proporção de ½ para cada grama de meio de cultivo.

V. 2.2. Preparação dos substratos

Foram utilizados casca de amendoim, palha de milho, palha de arroz e farelo de trigo fornecido pelo comércio local. O bagaço de cana foi adquirido na usina de cana-de-açúcar “Guarani” - Olímpia -SP.

Os substratos para a fermentação foram previamente lavados com água destilada e secos em estufa a 60°C por 24 horas ou até peso constante. Após a secagem, a casca de amendoim, a palha de milho e o bagaço de cana foram submetidos a trituração e peneiramento a fim de obter uma granulação de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro.

V. 2.3. Fermentação sólida

Para a fermentação sólida foi utilizado um composto constituído de 5g (farelo de trigo, casca de amendoim e palha de arroz) ou 3g (bagaço de cana e palha de milho) dos substratos secos. Os substratos foram suplementados e ao mesmo tempo hidratados com solução de NH_4SO_4 0,05M, numa proporção de 2mL/g de material. A quantidade de nitrogênio adicionado correspondeu a 3mg de N por grama de substrato.

Após a inoculação com o fragmento de agar miceliado, o material foi incubado a 27 °C, por um período de seis semanas. A cada sete dias, um erlenmeyer, de cada linhagem e cada substrato, foi retirado para avaliação das atividades enzimáticas.

O material fermentado foi suspenso em água destilada (8mL/g de material fermentado), agitado por 40 minutos a 100 rpm e filtrado a vácuo. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta. Devido ao alto teor de material particulado suspenso no filtrado do farelo de trigo, este foi centrifugado a 10000g por 10 minutos a 5°C. Os ensaios foram realizados em três repetições.

V. 2.4. Fermentação sólida com suplementação de diferentes fontes de nitrogênio.

As fermentações foram realizadas de forma idêntica ao item anterior, porém utilizando-se, além da solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,05M, outras fontes de nitrogênio como solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,05M ou solução contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,025M e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,025M, cujos volumes adicionados e concentrações de nitrogênio seguiram o descrito no item 2.3.

Neste experimento, foram retirados frascos de Erlenmeyer, de cada linhagem e de cada meio, em períodos de 1, 3 e 5 semanas. Os ensaios foram realizados em três repetições.

V. 3. Determinação de atividade enzimática

V. 3.1. Lacase:

A atividade de lacase foi determinada a partir da oxidação do 2,2'-azino-bis-etilbenthiiazolina (ABTS) de acordo com Buswell et al. (1995). A reação foi realizada a 40°C usando 1mL de mistura contendo 0,1 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0); 0,8 mL de solução de ABTS a 0,03% (p/v) e 0,1 mL da solução enzimática bruta. A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. Uma unidade de atividade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μ mol de ABTS por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar para ABTS oxidado de $3,6 \times 10^4$ /mol/cm (BOURBONNAIS, PAICE, 1988).

V. 3.2- Manganês peroxidase:

A atividade de manganês peroxidase (MnP) na solução enzimática bruta foi determinada a 35°C numa mistura de reação composta de 0,8 mL de tampão lactato de sódio a 0,05M (pH 4,5), 0,1 mL de solução de MnSO_4 a 0,4M e 0,1 mL da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (40 μ M) e a absorbância medida a 240 nm. Uma unidade de atividade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol 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).

V. 3.3. Lignina peroxidase:

A atividade de lignina peroxidase (LiP) na solução enzimática bruta foi determinada a 40°C numa mistura de reação composta de 0,8 mL de tampão fitalato ácido de potássio-HCl a 0,05M (pH 3,5), 0,1 mL de solução de álcool veratrílico a 40 mM e 0,1 mL da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de 20 μ L 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 de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima

necessária para formar 1 μmol de veratraldeído por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $9,3 \times 10^3/\text{mol}/\text{cm}$ (TIEN, KIRK, 1988).

A determinação de atividade enzimática foi realizada em duplicata e os dados apresentados correspondem, portanto, a média das 2 repetições.

V. 4. Quantificação do nitrogênio total dos substratos de fermentação.

Para a determinação do nitrogênio total dos substratos foi utilizado o método de Kjeldahl. Foi utilizado 0,15 g da amostra, à qual foi acrescentada 1,5g de mistura catalítica Kjeldahl (4% de Cu_2SO_4 e 96% de K_2SO_4) e 3,0 mL de H_2SO_4 concentrado. Os tubos foram levados a um biodigestor, cuja temperatura foi controlada de forma que houvesse um aumento de 50°C a cada 15 minutos até atingir 350°C . Após 2 a 4 h de digestão, adicionou-se 8mL de água destilada em cada tubo para a destilação da amônia liberada. No destilador, as amostras foram neutralizadas com NaOH 40%. O destilado foi coletado em erlenmeyers contendo 10mL solução de ácido bórico 2% com indicador (verde de bromocresol e vermelho de metila). Fez-se a titulação do material recolhido com HCl padronizado em 0,02137 N. Todos os testes foram feitos em triplicatas.

O teor de nitrogênio total dos substratos foi calculado através da equação:

$$\% \text{ de N} = \frac{A \cdot B \cdot 0,014 \cdot 100}{C}$$

onde:

A= volume utilizado de HCl em mL;

B= normalidade do HCl;

C= massa da amostra em gramas.

V. 5. Caracterização físico-química das ligninases

Foi realizada a caracterização quanto ao pH e temperatura das ligninases que apresentaram produções mais significantes para cada um dos três microrganismos. Foram feitas também, a determinação da estabilidade das enzimas frente às variações de pH e temperatura.

V. 5.1. Efeito do pH sobre a atividade da enzima

Foi estudado o comportamento das atividades enzimáticas frente as variações de pH entre 2,0 e 6,5. Os tampões usados para a caracterização das ligninases foram: Citrato-NaOH (pH 2,0-6,0) e Bis-Tris-HCl (pH 6,0-6,5) em concentração de 0,2M. As determinações das atividades seguiram o descrito no item 3.

V. 5.2. Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima

O efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas foi avaliado incubando-se as misturas de reação em temperaturas de 10 a 30°C em intervalos de 10°C, e de 35 a 85°C em intervalos de 5°C. O pH utilizado foi aquele determinado como ótimo para cada caracterização, seguindo o descrito no item 4.

V. 5.3. Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas em ausência de substrato

A estabilidade em diferentes valores de pH quando em ausência de substrato, foi avaliada incubando-se os extratos enzimáticos brutos em tampões com pH variando de 2,0 a 11,0 (Citrato-NaOH pH 2,0-6,0; Bis-Tris-HCl pH 6,0-8,0 e Glicina-NaOH pH 8,0-11,0) a 25°C por 24 horas, na proporção de 1mL de tampão a 0,1M para cada mL de enzima bruta. Após esse período, foram tomadas amostras para determinação da atividade enzimática residual, nas condições de pH e temperaturas ótimos.

V. 5.4. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima, quando em ausência de substrato

As soluções enzimáticas foram incubadas por uma hora em ausência de substrato em temperaturas que variaram de 10 a 70°C em intervalos de 10°C. Após esse período, foram tomadas amostras das soluções incubadas para realização dos ensaios de atividade enzimática nas condições ótimas de pH e temperatura.

V. 6. Avaliação da ação das enzimas sobre corantes aromáticos

As soluções enzimáticas obtidas pelo cultivo de *Coriopsis byrsina* 16 e *Lentinus* 48, em meio composto por farelo de trigo, por três e duas semanas respectivamente. Foram avaliados quanto a capacidade de descorar os corantes sintéticos: Orange II, Reactive Red, Cibacron Blue, Crysophenine, Azure Blue, Cristal Violeta, Azul de Metileno e Vermelho Fenol.

V. 6.1. Mistura da reação

Para os ensaios de descoloração foram utilizados 0,8 mL do corante a ser testado, 0,1mL da solução enzimática bruta, 0,1mL de tampão citrato-NaOH 0,5M pH 3,0 para *Lentinus* sp, ou pH 3,5 para *Coriopsis byrsina* e 0,01mL de peróxido de hidrogênio.

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.

V. 6.2. Ensaios com substratos enzimáticos

Foi testada a influência dos substratos das enzimas utilizados nos ensaios enzimáticos de MnP, LiP e lacase sobre descoloração dos corantes. Foram adicionados 0,1mL dos substratos sulfato de manganês (0,5 mM), álcool veratrílico (40mM) e ABTS (0,03% p/v), separadamente, além de 0,7 mL de corante, 0,1 mL solução enzimática bruta, 0,1mL de tampão e 0,01mL de peróxido de hidrogênio.

V. 6.3. Tempo de incubação.

Para os testes de descoloração foram retiradas amostras após incubação por 0,5, 6, 24 e 48 horas.

V. 6.4. Temperatura e pH

A temperatura utilizada para os ensaios de descoloração foi de 25°C e os pHs testados foram os dados como ótimos para a reação de lacase

(Tampão citrato-NaOH pH 3,5 para *Coriopsis byrsina* 16 e pH 3,0 para *Lentinus* sp 48).

V.6.5. Concentração e comprimento de onda para leitura espectrofotométrica dos corantes.

Antes dos ensaios de descoloração foram realizadas varreduras em espectrofotômetro entre 300 e 800 nm para verificação do pico de absorbância para cada corante. A partir daí, foram realizados os testes de descoloração, nos comprimentos de onda de absorção máxima, assim como na concentração mais adequada para leitura no espectrofotômetro.

V. 6.6. 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.

$$A = \frac{100 \times B}{C}$$

$$X = 100 - A$$

Onde:

A= porcentagem de absorção de luz da amostra tratada enzimaticamente em relação ao controle;

B= Absorção da amostra de corante tratada;

C= Absorção do controle;

X= porcentagem de descoloração enzimática do corante.

VI. Resultados e discussão

VI. 1. Aspectos gerais do crescimento fúngico nas fermentações sólidas

O crescimento fúngico foi acompanhado apenas visualmente, sendo a intensidade e a velocidade de miceliação avaliadas através da simbologia apresentada na Tabela 3. Observa-se que o *Coriolopsis byrsina* 16 apresentou bom crescimento em todos os meios, com exceção da palha de arroz. Os meios de farelo de trigo e casca de amendoim, foram totalmente miceliados por essa linhagem ao término da primeira semana. *Gloeophyllum* cf *striatum* 40 foi a linhagem que apresentou o menor crescimento em termos gerais, e da mesma forma que a linhagem citada anteriormente, tomou completamente o meio de farelo de trigo em uma semana. A linhagem *Lentinus* sp 48 também apresentou um bom crescimento nos meios testados, com destaque para o bom desempenho no bagaço de cana e farelo de trigo, neste último, chegando a apresentar corpo de frutificação na cultura.

Tabela 3: Crescimento fúngico durante a fermentação sólida

	<i>Corioloopsis byrsina</i> 16					
	1ªSem.	2ªSem.	3ªSem.	4ªSem.	5ªSem.	6ªSem.
Casca de Amendoim	++	+++	+++	+++	+++	+++
Palha de Arroz	+	+	+	+	+	+
Bagaço de Cana	+	++	++	++	+++	+++
Palha de Milho	+	++	++	++	+++	+++
Farelo de Trigo	+++	+++	+++	+++	+++	+++

	<i>Gloeophyllum cf striatum</i> 40					
	1ªSem.	2ªSem.	3ªSem.	4ªSem.	5ªSem.	6ªSem.
Casca de Amendoim	-	-	+	+	+	+
Palha de Arroz	-	-	+	+	+	+
Bagaço de Cana	+	++	++	++	++	++
Palha de Milho	+	+	+	+	+	+
Farelo de Trigo	+++	+++	+++	+++	+++	+++

	<i>Lentinus sp</i> 48					
	1ªSem.	2ªSem.	3ªSem.	4ªSem.	5ªSem.	6ªSem.
Casca de Amendoim	+	++	++	+++	+++	+++
Palha de Arroz	+	+	+	+	+	+
Bagaço de Cana	++	++	++	+++	+++	+++
Palha de Milho	+	++	++	++	+++	+++
Farelo de Trigo	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(-) Não houve crescimento significativo; (+) Crescimento regular; (++) Crescimento bom; (+++) Crescimento ótimo.

VI. 2. Atividades de ligninases nos diferentes substratos

A cada semana foram obtidos 15 extratos enzimáticos brutos, com os quais foram realizados os testes para as ligninases (MnP, LiP e Lacase), totalizando 45 testes.

Nas figuras 8 a 10 estão representados os valores das atividades enzimáticas por grama de substrato. Os dados correspondem a valores médios de três repetições.

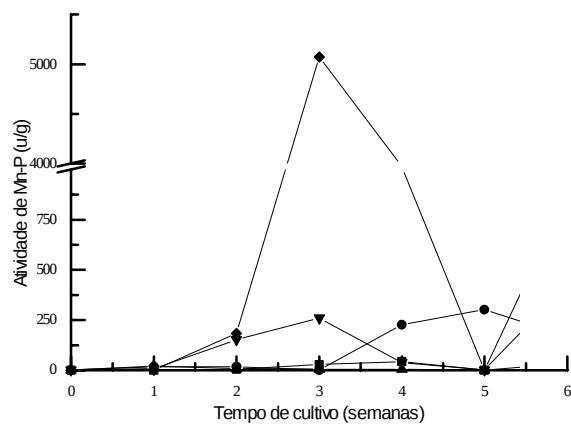
A produção de Mn peroxidase, por *Corioloopsis byrsina* 16 (Figura 8 A), nos meios compostos por casca de amendoim, palha de arroz, bagaço de cana

e palha de milho, foi baixa. Entretanto, apresentou elevada produção dessa enzima em meio constituído por farelo de trigo, chegando a atingir 5073 U/g após três semanas de fermentação. A produção de lignina peroxidase por esta linhagem, ao longo do período fermentativo, foi muito semelhante nos diferentes substratos, exceto em farelo de trigo, no qual foram determinadas as maiores atividades da enzima (11284,59 e 9500,95 U/g, na primeira e quinta semanas, respectivamente). Após a segunda semana de fermentação, as atividades de LiP em todos os meios foram bastante significativas (Figura 8 B).

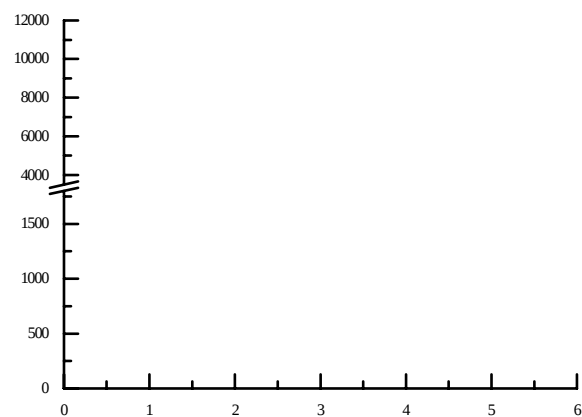
A linhagem *Coriolopsis byrsina* 16 mostrou-se hiper produtora de lacase em meio de farelo de trigo, atingindo 429940,6 U/g, em três semanas. Em meio de casca de amendoim, esta linhagem também apresentou bom desempenho, produzindo 8992 U/g no início do período fermentativo. Nos demais meios essa produção ficou abaixo de 5000 U/g em até seis semanas (Figura 8 C).

Quanto ao fungo *Gloeophyllum* cf *striatum* 40, observa-se que a produção de Mn peroxidase foi bastante influenciada pelo tipo de substrato usado nas fermentações e pelo tempo de cultivo (Figura 9 A). A maior atividade foi detectada em meio de farelo de trigo fermentado por três semanas (1454 U/g). De uma maneira geral, essa linhagem não foi considerada eficiente na produção de MnP, se comparada com as outras duas estudadas, principalmente nos substratos com menor teor de nutrientes como bagaço de cana, palha de milho e casca de amendoim.

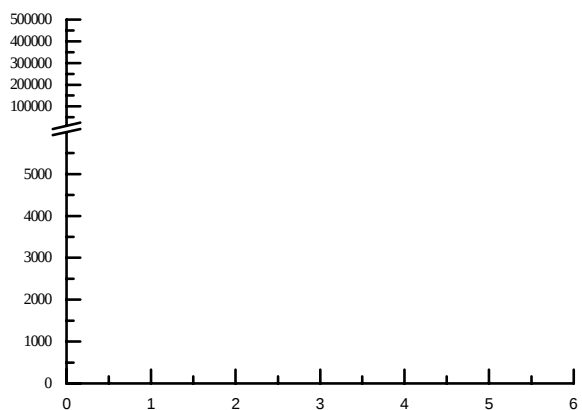
A produção de lignina peroxidase por *G. striatum* foi menos variada em função do tipo de substrato usado, sendo obtidas atividades semelhantes, após a segunda semana de fermentação, exceto em farelo de trigo, no qual a atividade detectada foi quase sempre mais elevada que nos demais meios. Bagaço de cana e palha de milho também proporcionaram boa produção dessa enzima (1511,40 e 1254,91 U/g, respectivamente) (Figura 9 B).



A



B



C

Figura 8: Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre produção de ligninases por *Corioloopsis byrsina* 16. (A) MnP; (B) LiP e (C) lacase.

Legenda: -■- Casca de amendoim; -●- Palha de arroz; -▲- Bagaço de cana; -▼- Palha de milho; -◆- Farelo de trigo.

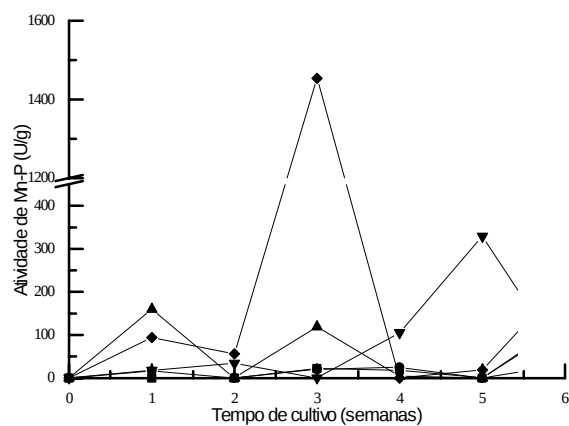
Nota-se que *G. striatum* 40 apresentou uma menor produção de lacase em relação às outras linhagens, em todos os meios estudados (Figura 9 C).

Com relação ao *Lentinus sp* 48, observou-se uma produção maior de MnP do que para as outras linhagens, atingindo 6400 U/g em farelo de trigo, na quarta semana. A segunda maior produção ocorreu em casca de amendoim (1004 U/g) (Figura 10 A). A produção da lignina peroxidase por este fungo também foi significativa, com valores entre 3211,5 e 9753,39 U/g, determinadas em fermentações cujo substrato foi o farelo de trigo (Figura 10 B). O Meio constituído por palha de milho também proporcionou alta produção de LiP na terceira e quinta semana de fermentação (Figura 10 B). Quanto à lacase, o *Lentinus sp* mostrou produção desde a primeira semana para todos os meios testados e dentre os picos da primeira semana de fermentação, destaca-se a produção em farelo de trigo (Figura 10 C).

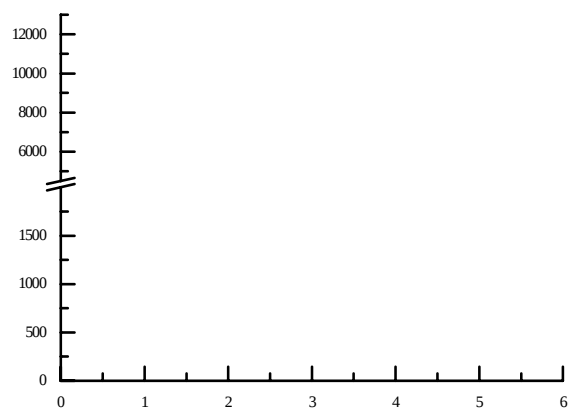
Após esta etapa do trabalho ficou evidente a dependência da produção das ligninases em relação ao meio utilizado e o tempo de fermentação, no entanto, em termos gerais as melhores produções ficaram compreendidas após uma, três ou cinco semanas de fermentação.

Os dados apresentados nos permitem concluir que os fungos estudados são excelentes produtores de MnP, se comparados com os dados de Nüske et al. (2002) relativos à produção de ligninases por *Nematoloma frowardii*, em fermentação em lascas de madeira, e aos de Fujian et al. (2001), com estudos utilizando *Phanerochaete chrysosporium*, um fungo bastante estudado por sua capacidade de produção de ligninases, que também mostrou atividade inferior às duas espécies referidas neste trabalho, em 5 dias de fermentação em farelo de trigo.

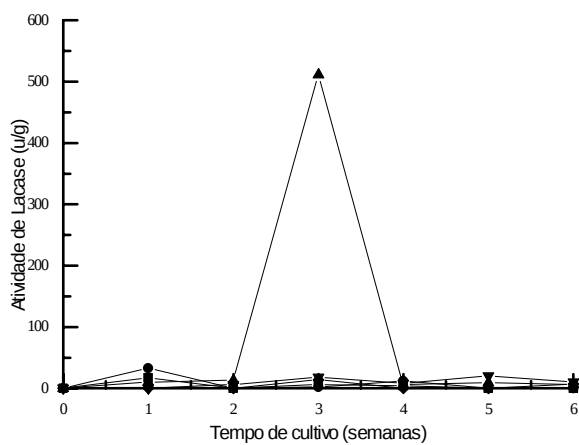
Com relação à LiP, estes fungos também demonstram as mesmas tendências de produção da MnP, apresentando atividades bem mais elevadas do que as apresentadas na literatura. Em cinco semanas de fermentação em farelo de trigo, foram obtidas 11701,8 U/g (1465,7 U/mL) por *G.striatum* e no mesmo substrato, *C. byrsina* produziu 9500,9U/g (1187,6 U/mL), valores superiores àqueles obtidos com *Phanerochaete chrysosporium* (2,7 U/mL) em fermentação, por 5 dias, em farelo de trigo (FUJIAN et al., 2001).



A



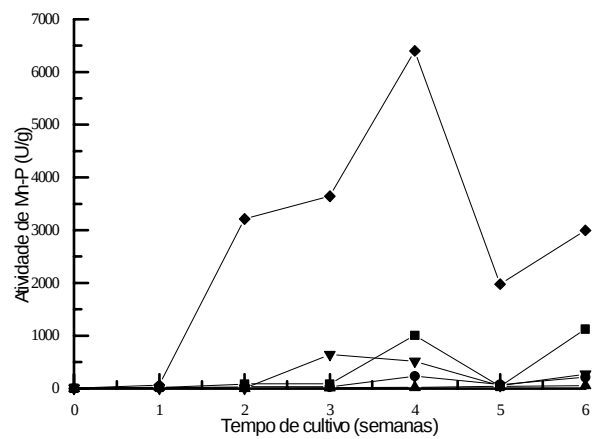
B



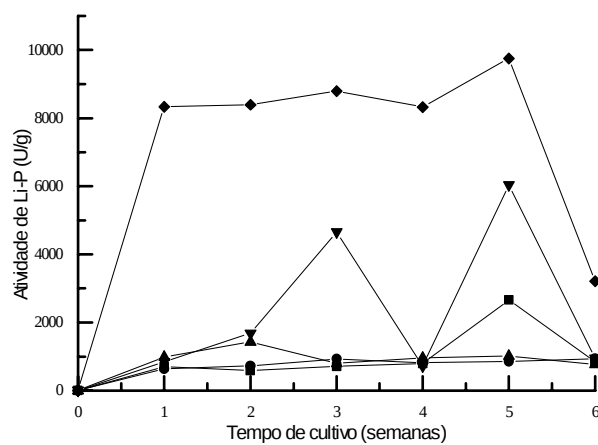
C

Figura 9: Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre produção de ligninases por *Gloeophyllum* cf *striatum* 40. (A) MnP; (B) LiP e (C) lacase.

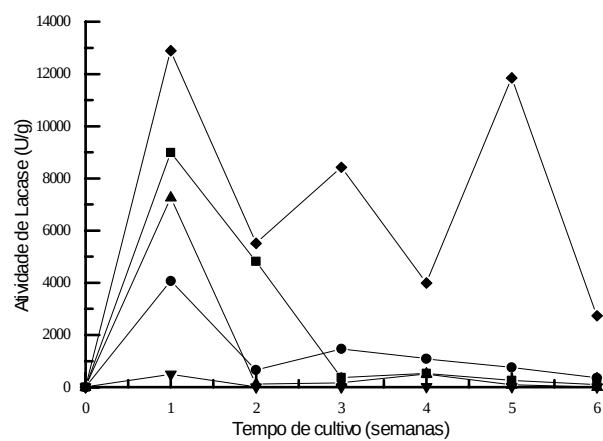
Legenda: -■- Casca de amendoim; -●- Palha de arroz; -▲- Bagaço de cana; -▼- Palha de milho; -◆- Farelo de trigo.



A



B



C

Figura 10: Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre produção de ligninases por *Lentinus sp* 48. (A) MnP; (B) LiP e (C) lacase.

Legenda: -■- Casca de amendoim; -●- Palha de arroz; -▲- Bagaço de cana; -▼- Palha de milho; -◆- Farelo de trigo.

No caso da lacase, houve uma hiper produção (276098,6 U/g ou 34512,2 U/mL em fermentação por 4 semanas em farelo de trigo) por *C. byrsina*. Utilizando as mesmas condições, inclusive a mesma metodologia (oxidação do 2,2"-azino-bis-etilbenthiazolina), Lang et al. (1998) observaram que *Pleurotus* sp produziu 0,38 U/mL em 4 semanas em fermentação de farelo de trigo. Um basidiomiceto bastante pesquisado, *Dichomitus squalens*, mostrou no mesmo trabalho, uma atividade também inferior a *C. byrsina* (0,1 U/mL em farelo de trigo durante 3 semanas de fermentação).

Desse modo, podemos inferir que os microrganismos utilizados no presente trabalho possuem excelente potencial para produção de ligninases. Entretanto, a comparação de obtenção de produtos por fermentação não é um procedimento totalmente seguro, visto que as inúmeras variações de procedimentos adotados no processo fermentativo (fermentação sólida ou submersa) e a forma de extração da enzima, além das análises e expressão das atividades enzimáticas podem influenciar nos resultados.

Os materiais lignocelulósicos utilizados nos ensaios correspondem, na maioria deles, a subprodutos de gramíneas (bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, palha de milho e palha de arroz). Sabe-se que as paredes celulares de tecidos das gramíneas são constituídas por 10-30% de lignina, 25-40% de celulose e 25-50% de hemicelulose (GOLDSTEIN, 1976). A lignina, nesses materiais, é formada por uma mistura de álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumarílico. A composição da parede celular desse grupo diferencia-se daquela de Gymnospermas e Angiospermas, em cujos grupos encontram-se os tecidos lenhosos, alvos dos fungos decompositores de madeira. Não há dados na literatura a respeito da composição da lignina das estruturas das leguminosas, que no nosso caso estão representadas pela casca de amendoim.

As possíveis diferenças da composição e proporção das ligninas nos materiais estudados como meio de cultura, poderiam estar refletidas nas variações de respostas dos fungos cultivados nesses meios, com relação à secreção das ligninases.

Foi demonstrada que a produção de lacase por *Botryosphaeria* sp foi induzida quando esse fungo foi cultivado em meios contendo compostos

aromáticos similares àqueles que compõem a lignina, contendo lignina modificada e em mistura de hidrocarbonetos poliaromáticos. Por outro lado, a inibição da produção de lacase foi observada quando compostos como dimetoxifenol e ácido benzóico estavam presentes no meio de cultura (DEKKER et al, 2002).

Tem sido reportado que o conteúdo de celulose do material usado como substrato para crescimento de fungos ligninolíticos também induz a atividade ligninolítica (COUTO et al., 2002).

Além da composição química, a estrutura (tamanho e porosidade) afeta o crescimento do fungo. Estudos comparativos da produção de lacase em meios sólidos compostos por farelo de trigo, palha de aveia, palha de cevada e lascas de madeira, indicaram diferenças de indução da produção de lacase por *Trametes versicolor*. Segundo os autores (COUTO et al., 2002), essas diferenças estavam relacionadas à composição química dos resíduos e à estrutura das partículas.

O uso de resíduos vegetais em processos de fermentação sólida, mostra-se bastante conveniente, pois os mesmos, além do fornecimento da fonte de carbono e outros nutrientes, ainda atuam como suporte para o desenvolvimento do micélio fúngico.

Sob o ponto de vista do aproveitamento de resíduos agrícolas, deve-se considerar que a aplicação dos mesmos em processos fermentativos, visando a produção de substâncias de valor comercial, agrega valor a esses materiais, ao mesmo tempo que evita seu descarte e conseqüentes problemas ambientais.

VI. 3. Efeito da suplementação dos substratos com diferentes fontes de nitrogênio sobre o crescimento fúngico e sobre a produção de ligninases.

Dados de literatura têm destacado a influência do teor e fonte de nitrogênio do meio sobre a produção de ligninases. Em vista disso, propusemos a avaliação da influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção da MnP, LiP e lacase pelas três linhagens de basidiomicetos.

Após a primeira etapa, na qual o crescimento e produção das ligninases, pelos três fungos, foi acompanhada durante seis semanas, utilizando substratos lignocelulósicos de diferentes origens (farelo de trigo, bagaço de cana industrializado, palha de milho, palha de arroz e casca de amendoim), iniciou-se os estudos do efeito do nitrogênio sobre a produção das enzimas. Para esses ensaios, foram fixados períodos de uma, três e cinco semanas de fermentação, utilizando os mesmos substratos e as soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como fontes de nitrogênio.

VI. 4. Determinação do nitrogênio total nos meios de fermentação

Através do teste de Kjeldhal foi possível determinar a quantidade de nitrogênio presente nos resíduos sólidos utilizados neste projeto como substrato para as fermentações (Tab. 4). Nota-se que a palha de arroz, o bagaço de cana e a palha de milho possuem baixos teores de nitrogênio total, enquanto casca de amendoim e farelo de trigo, possuem as maiores quantidades desse elemento. Entretanto, não é possível fazer afirmações a respeito da disponibilidade desse nutriente para os fungos, nos materiais estudados, com exceção do farelo de trigo, que é usado como suplemento de nitrogênio em rações compostas de material lignocelulósico.

Com base nas informações apresentadas na Tabela 4, foram calculados os teores de nitrogênio totais presentes nos meios de fermentação testados, após a adição de soluções de diferentes compostos nitrogenados. Estas informações estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 4: Teores de nitrogênio total dos resíduos sólidos utilizados como substratos, determinados pelo método Kjeldhal.

Substrato	%
<i>Casca de amendoim</i>	1,076725
	0,366942
Palha de arroz	
<i>Bagaço de cana-de-açúcar</i>	0,216413
<i>Palha de milho</i>	0,198187
<i>Farelo de trigo'</i>	2,383169

Tabela 5: Teores de N totais dos meios de fermentação

Substrato	Total de substrato usado (g)	N no substrato seco (mg/g)	N total do substrato (mg)	Total de N adicionado (mg)	N Total no Meio de fermentação (mg)	Conc. De N no meio de fermentação (mg/g)
<i>Casca de amendoim</i>	5	18,0	53,84	15	68,84	13,77
<i>Casca de arroz</i>	5	3,7	18,35	15	33,35	6,67
<i>Bagaço de cana-de-açúcar</i>	3	2,2	6,49	9	15,49	5,16
<i>Palha de milho</i>	3	2,0	5,95	9	14,95	4,98
<i>Farelo de trigo</i>	5	23,8	119,16	15	134,16	26,83

VI. 4.1. Aspectos gerais do crescimento fúngico sob influência de diferentes fontes de nitrogênio.

O acompanhamento do crescimento fúngico foi realizado da mesma forma descrita no item 1.

A linhagem de *Coriolopsis byrsina* mostrou bom crescimento na casca de amendoim, sendo que, ao final da primeira semana de cultivo, já havia miceliado todo o substrato, com exceção daquele hidratado com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (sol. 2). Em meio constituído de palha de arroz, crescimento ótimo foi obtido nas fermentações hidratadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sol. 1) na terceira semana de fermentação, embora ao final de cinco semanas de cultivo, para as três soluções testadas houve crescimento classificado como ótimo. O

crescimento desse fungo em bagaço de cana não foi muito expressivo, sendo considerado regular ou bom. Note-se, entretanto, que quando este meio foi suplementado com solução 2 $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ e 3 $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ o crescimento foi apenas regular, mesmo após cinco semanas. O crescimento na palha de milho foi, aparentemente, favorecido quando os meios de cultura foram suplementados com as soluções 2 e 3. A miceliação do farelo de trigo foi a mais expressiva, ao final da primeira semana os meios foram completamente tomados pelo fungo e não sofreu influência do tipo de fonte de nitrogênio adicionada (Tab. 6).

A linhagem de *Gloeophyllum* cf *striatum* apresentou maior dificuldade de crescimento entre os fungos testados, exceto em farelo de trigo. O crescimento em casca de amendoim e palha de arroz foi praticamente insignificante, enquanto que o crescimento no bagaço de cana-de-açúcar e na palha de milho foi considerado bom apenas nos meios suplementados com soluções 2 e 3, após a terceira semana de fermentação (Tab. 6).

O crescimento do *Lentinus* sp foi aparentemente afetado pela presença de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (solução 2), quando os substratos foram palha de arroz e farelo de trigo, visto que houve retardo na miceliação completa do meio. Nos demais casos o crescimento foi avaliado de bom a ótimo a partir da 3ª semana (Tab. 6).

Tabela 6: Crescimento fúngico durante a fermentação sólida de substratos acrescidos de diferentes fontes de nitrogênio.

Corioloopsis byrsina 16									
	1ª Semana			3ª Semana			5ª Semana		
	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3
Casca de Amendoim	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Palha de Arroz	-	-	+	+++	+	++	+++	+++	+++
Bagaço de Cana	+	+	+	+	++	++	+	++	++
Palha de Milho	+	++	++	++	++	+++	++	+++	+++
Farelo de Trigo	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Gloeophyllum cf striatum 40									
	1ª Semana			3ª Semana			5ª Semana		
	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3
Casca de Amendoim	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Palha de Arroz	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Bagaço de Cana	-	-	+	-	++	++	+	++	++
Palha de Milho	+	-	-	+	+	++	+	+	++
Farelo de Trigo	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Lentinus sp 48									
	1ª Semana			3ª Semana			5ª Semana		
	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3
Casca de Amendoim	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Palha de Arroz	-	-	-	+++	-	++	+++	+	+++
Bagaço de Cana	++	+	+	++	+++	++	++	+++	+++
Palha de Milho	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Farelo de Trigo	++	+	++	+++	+	+++	+++	+++	+++

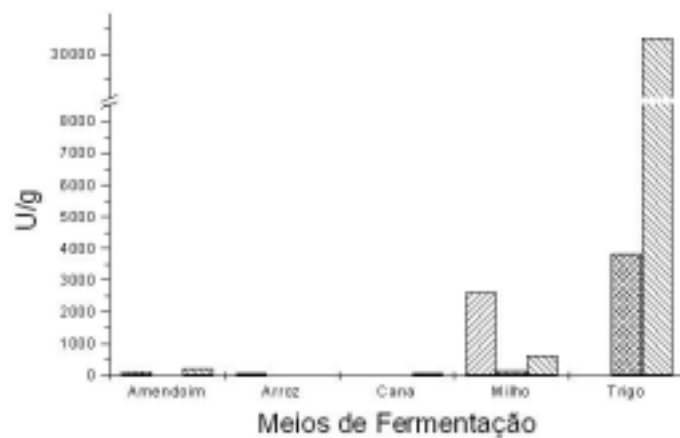
(-) Não houve crescimento significativo; (+) Crescimento regular;

(++) Crescimento bom; (+++) Crescimento ótimo

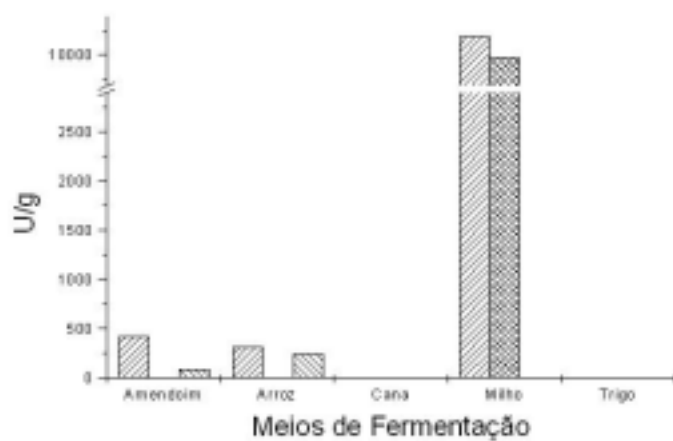
Sol. 1=solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Sol. 2= solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; Sol. 3= solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

VI. 4.2. Atividade de ligninases em fermentações com suplementação de diferentes fontes de nitrogênio.

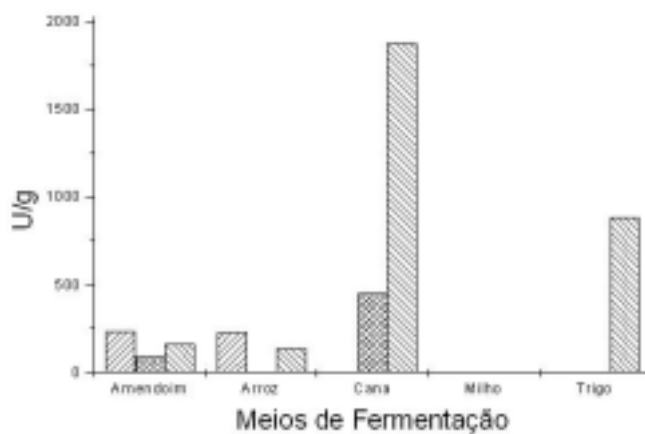
Nas Figuras de 11 a 13 são mostradas as produções de MnP, LiP e lacase pelo *Corioloopsis byrsina* nos períodos de 1, 3 e 5 semanas de fermentação (Fig. 11A, 11B e 11C, respectivamente). Os dados da Figura 11A indicaram que a variação nas fontes de nitrogênio adicionadas à maioria dos substratos não levaram à modificações substanciais nas quantidades de MnP produzidas nestes, ao longo do período fermentativo. Nota-se, entretanto, que quando o substrato de fermentação foi o farelo de trigo, a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ favoreceu a produção de MnP na primeira e quinta semanas de fermentação, enquanto que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ proporcionou maior produção da mesma em meio de palha de milho. A produção de MnP em bagaço de cana foi detectada na quinta semana em maior quantidade também em presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. A maior atividade de MnP foi detectada na terceira semana de cultivo para o meio de palha de milho nas soluções $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.



A



B



C

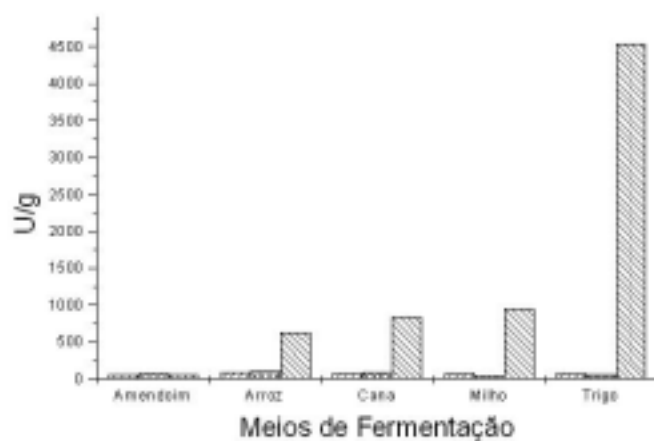
Figura 11: Produção de manganês peroxidase pelo fungo *C. byrsina* em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fontes de nitrogênio. A,B e C representam cultivos de uma, três e cinco semanas, respectivamente. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Em relação a produção de LiP (Fig 12), em uma semana de cultivo, o *Coriolopsis byrsina* mostrou os maiores valores de atividade no meio de farelo de trigo, sendo a máxima produção obtida quando esse substrato foi suplementado com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, na primeira e terceira semanas (Fig. 12A e 12B). Após cinco semanas de cultivo, as diferenças entre as produções de LiP, em função da solução de nitrogênio adicionadas, não foram significativas (Fig.12C).

A produção de lacase foi detectada em quantidades consideráveis apenas em meio de farelo de trigo (Fig. 13A). Na primeira semana de fermentação (Fig.13A) nota-se que a maior produção ocorreu quando a suplementação de N foi feita com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, entretanto, na terceira e quinta semanas observa-se que essa quantidade se mantém, enquanto as produções em meios suplementados com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ atingiam valores muito elevados (Fig. 13B 13C).



A

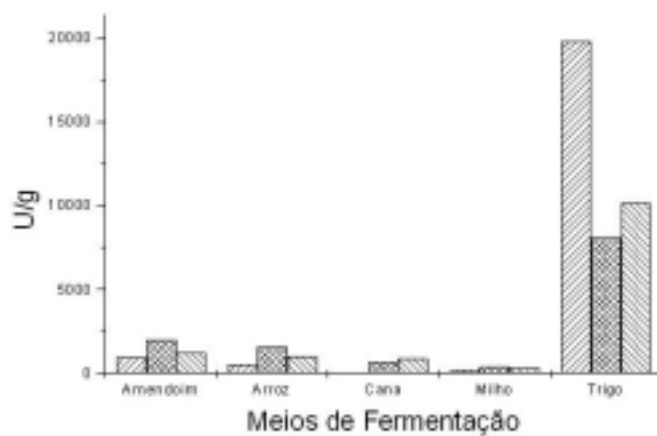


B

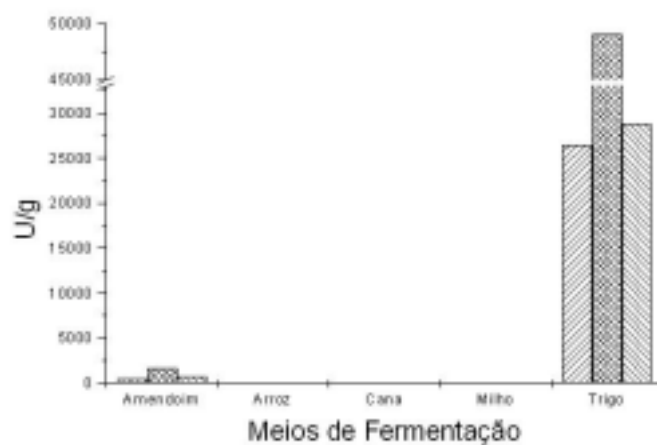


C

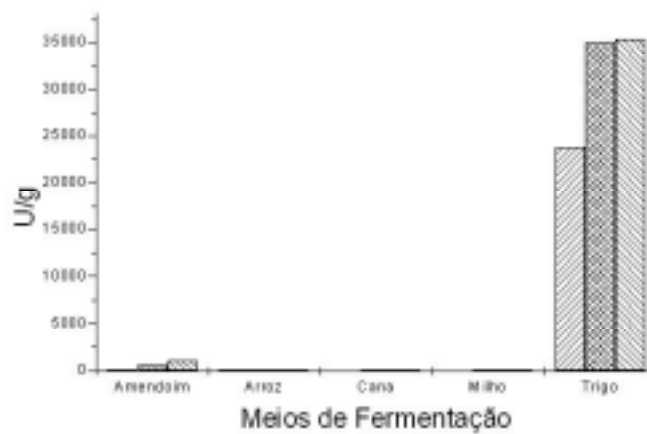
Figura 12: Produção de lignina peroxidase pelo fungo *C. byrsina* em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fontes de nitrogênio. A,B e C representam cultivos de uma, três e cinco semanas, respectivamente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$



A



B



C

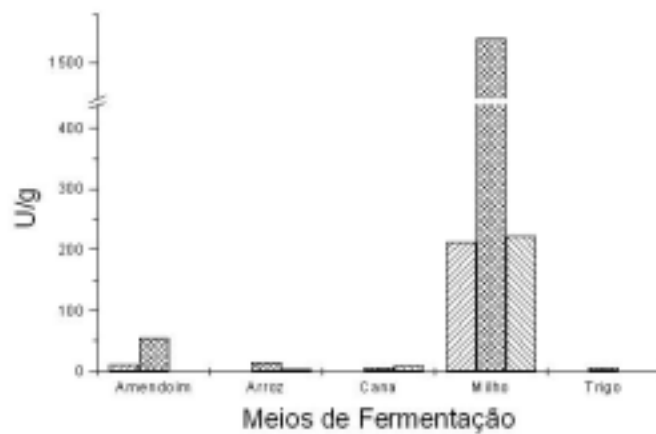
Figura 13: Produção de lacase pelo fungo *C. byrsina* em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fontes de nitrogênio. A,B e C representam cultivos de uma, três e cinco semanas, respectivamente.

 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$,
  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

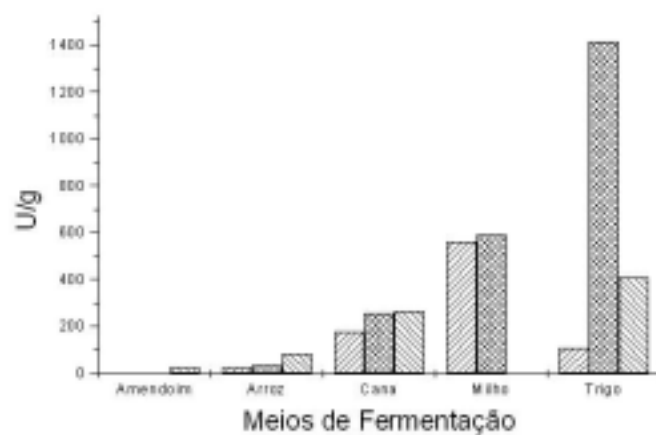
O fungo *Gloeophyllum* cf *striatum* foi capaz de produzir MnP em outros meios, além do farelo de trigo, na terceira e quinta semanas de fermentação (Fig. 14). Destaque-se a produção dessa enzima em palha de milho, cujo valor máximo foi detectado com a adição de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ na primeira semana, sendo o mesmo observado em meio de farelo de trigo após três semanas de cultivo.

As soluções 2 [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$] e 3 [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$] estimularam a produção de LiP em todos os meios testados, a partir da primeira semana de cultivo, exceto em palha de milho na quinta semana com solução 3. Em meios suplementados com solução 1 [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] a atividade dessa enzima aparece a partir da terceira semana (Fig 15A, B e C). Nestes ensaios, as atividades em meios compostos por farelo de trigo também foram acentuadamente maiores do que aquelas detectadas nos demais.

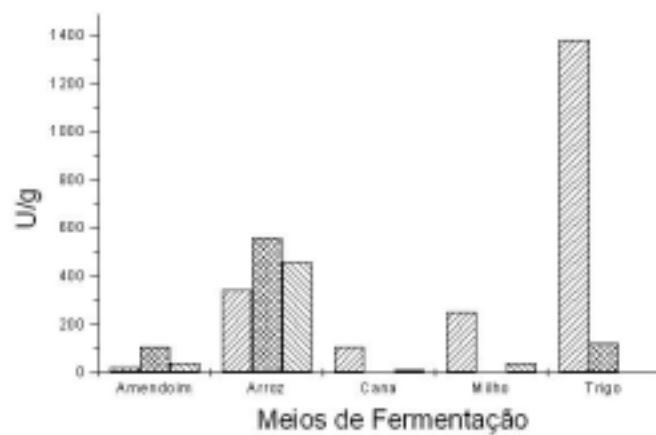
Tal qual observado nos ensaios referentes à relação tempo de cultivo/substrato, cujos resultados foram apresentados no item 3, a produção da lacase pelo *Gloeophyllum* cf *striatum* foi pouco expressiva se comparada aos dos outros dois fungos, confirmando que o mesmo não é um bom produtor dessa enzima (Fig.16).



A

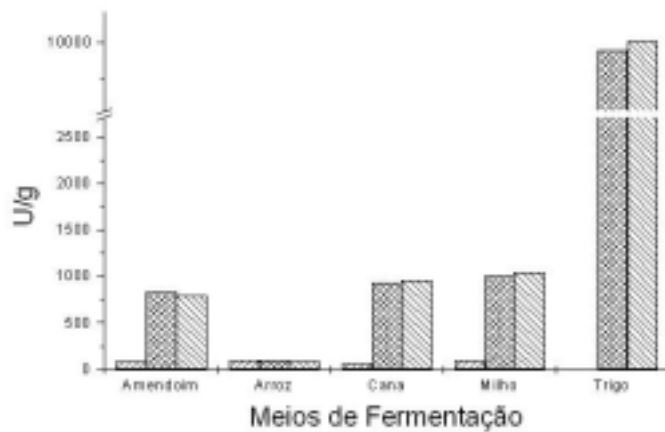


B

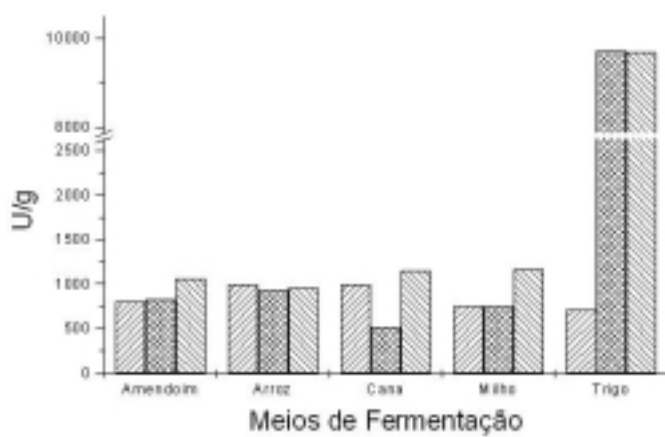


C

Figura 14: Produção de manganês peroxidase pelo fungo *Gloeophyllum cf striatum* em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fontes de nitrogênio. A,B e C representam cultivos de uma, três e cinco semanas, respectivamente.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$



A

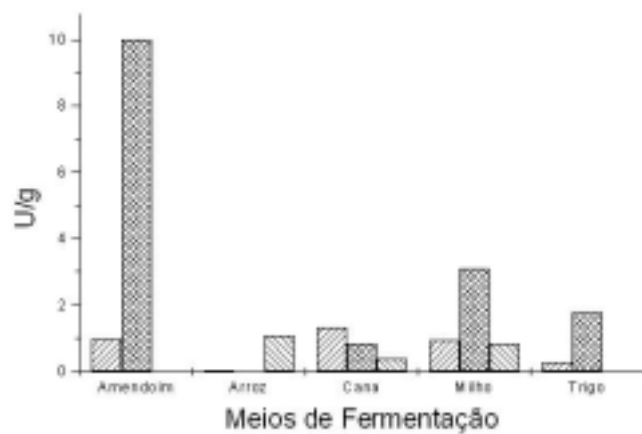


B

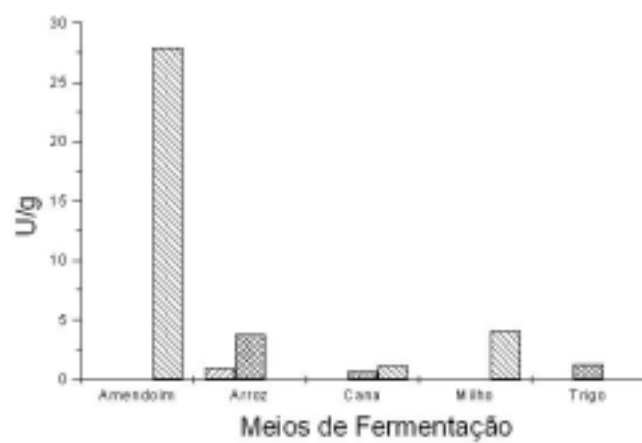


C

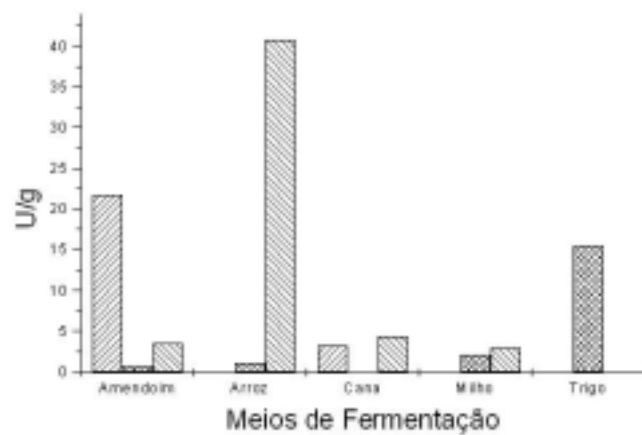
Figura 15: Produção de lignina peroxidase pelo fungo *Gloeophyllum cf striatum* em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fontes de nitrogênio. A,B e C representam cultivos de uma, três e cinco semanas, respectivamente. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (hatched), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (solid), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (dotted)



A



B

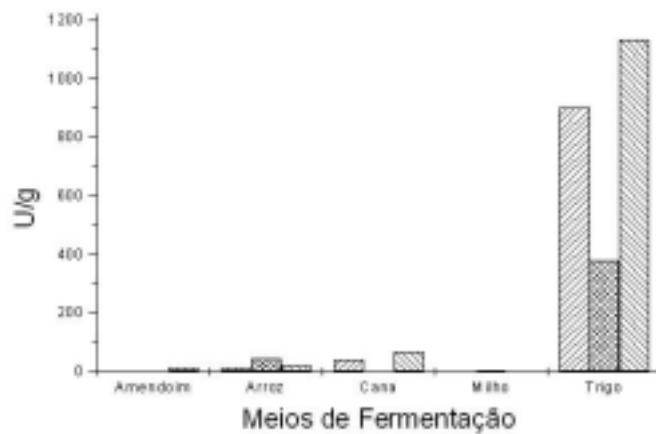


C

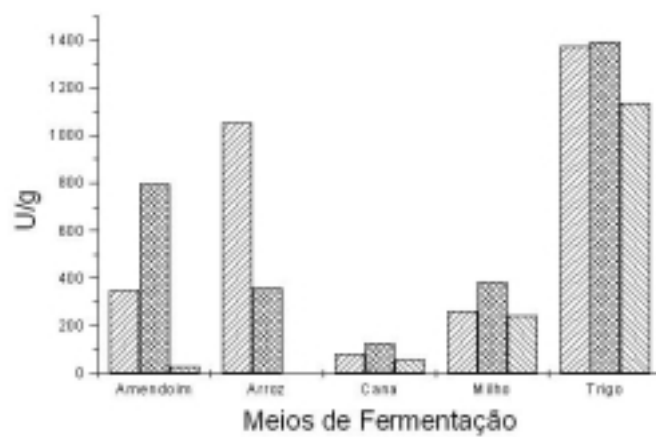
Figura 16: Produção de lacase pelo fungo *Gloeophyllum cf striatum* em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fontes de nitrogênio. A,B e C representam cultivos de uma, três e cinco semanas, respectivamente.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Com relação ao fungo *Lentinus sp* (Fig.17 a 19), nota-se também que o farelo de trigo foi o melhor substrato para a produção das ligninases, mesmo com a variação da fonte de N adicionada. Após uma semana de cultivo, a produção de MnP em meio de meio de farelo de trigo foi maior nos meios aos quais foram adicionadas as soluções 1 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ e 3 $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (Fig. 17A). Na terceira semana de cultivo não foi percebida diferença significativa entre as atividades de MnP, em função da fonte de N, enquanto que, na quinta semana percebe-se um aumento da produção da enzima em presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

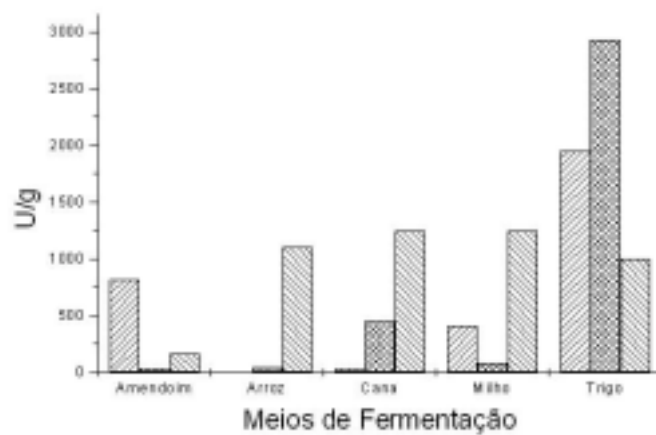
Produção significativa também foi observada na terceira semana nos meios de casca de amendoim (solução 2 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) e palha de arroz acrescentados de solução 1 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. Após cinco semanas de cultivo, foram detectadas atividades semelhantes de MnP em palha de arroz, bagaço de cana, palha de milho e farelo de trigo acrescentado da solução 3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Fig.17C).



A



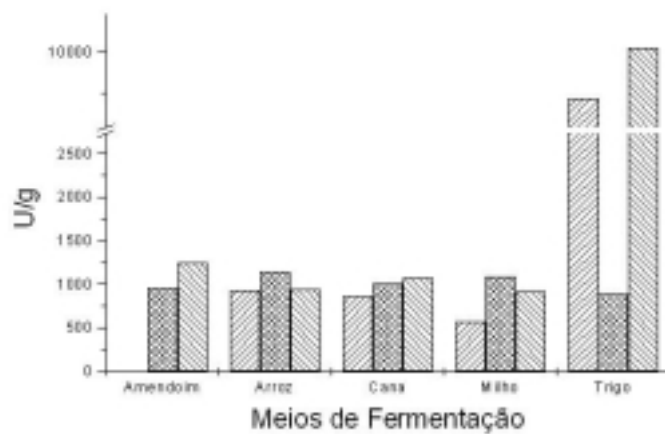
B



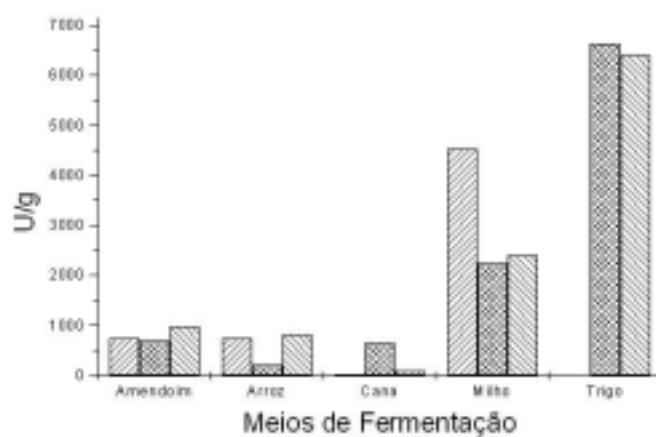
C

Figura 17: Produção de manganês peroxidase pelo fungo *Lentinus* sp em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fontes de nitrogênio. A,B e C representam cultivos de uma, três e cinco semanas, respectivamente. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

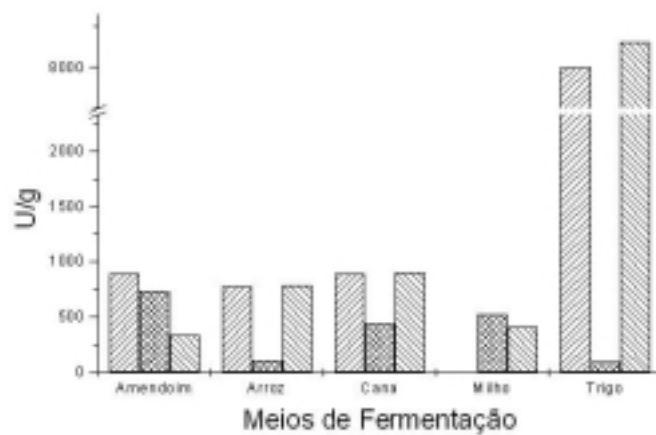
A produção de LiP, na primeira semana de fermentação, foi muito semelhante nos diferentes meios e não indicou influência da fonte de nitrogênio adicionada, exceto para aquela obtida em farelo de trigo, que, à semelhança dos demais ensaios, foi maior e demonstrou variações em função do tipo de composto de nitrogênio adicionado, sendo as maiores produções para meios acrescentados de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Fig. 18A). Resposta semelhante foi obtida na quinta semana de fermentação (Fig. 18C). Na terceira semana obteve-se produção considerável de LiP em meio de palha de milho, suplementado com sulfato de amônio, enquanto que em meio composto por farelo de trigo, as maiores atividades foram obtidas com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Fig.18C).



A



B



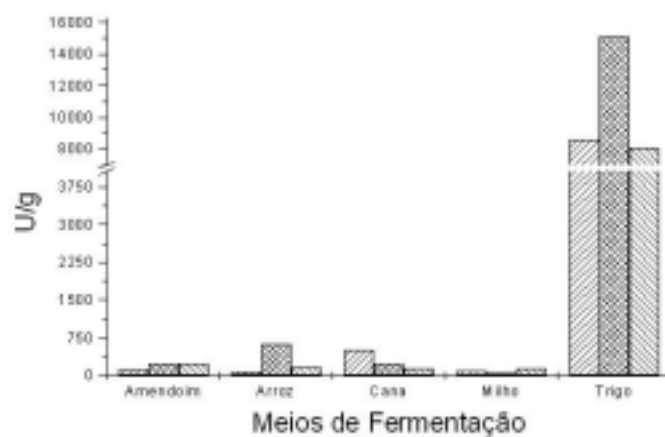
C

Figura 18: Produção de lignina peroxidase pelo fungo *Lentinus* sp em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fontes de nitrogênio. A,B e C representam cultivos de uma, três e cinco semanas, respectivamente. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

A produção da lacase pelo *Lentinus sp* quando inoculado em farelo de trigo e hidratado com solução 3 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ em todos os tempos avaliados passou das 7000U/g, enquanto que nos demais meios foi detectada atividade dessa enzima apenas após a primeira semana de cultivo (Figura 19).



A



B



C

Figura 19: Produção de lacase pelo fungo *Lentinus* sp em diferentes meios de cultivo, acrescentados de fontes de nitrogênio. A,B e C representam cultivos de uma, três e cinco semanas, respectivamente. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Nas tabelas de 7 a 9 são representadas, para cada linhagem, uma síntese dos dados das figuras de 11 a 19, as quais incluem as máximas produções em cada meio testado, os respectivos tempos de cultivo, aspecto geral de crescimento e o tipo de solução usada com suplemento de nitrogênio.

O fungo *Coriolopsis byrsina* apresentou as melhores produções das três ligninases, se comparado com *Gloeophyllum cf striatum* e *Lentinus sp.* As produções máximas de MnP, LiP e lacase para esse fungo encontram-se entre o período de uma a três semanas de cultivo, com exceção para o bagaço de cana.

Observa-se que nenhuma das produções máximas de MnP e LiP ocorreram na presença da solução 2, com exceção da fermentação do farelo de trigo, enquanto que as atividades máximas de lacase foram obtidas em meios suplementados com soluções 2 e 3, indicando que a presença de íon fosfato, em maior concentração, pode ter inibido a produção ou atividade das duas primeiras enzimas e favorecido a lacase.

Os dados da tabela 7 indicam ainda, que, embora em quantidades menores que aquelas detectadas em meios constituídos por farelo de trigo, os demais resíduos e sub-produtos agro-industriais testados permitiram o crescimento do fungo e produção de ligninases. Outro aspecto a ser destacado nessa tabela, é a ausência de correlação entre crescimento e quantidade de enzima produzida. Apesar de não ter sido quantificado, a avaliação qualitativa indicou que o crescimento ótimo do fungo nem sempre resultou em maiores quantidades de enzima, da mesma forma, que em alguns ensaios, crescimento regular contrasta com altas atividades de enzima nos meios.

Na tabela 8 são mostradas as produções máximas de ligninases por *Gloeophyllum cf striatum* obtidas nos diferentes meios. Todas as máximas produções de MnP ocorreram em meios suplementados com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Solução 2) exceto o bagaço de cana. A produção de LiP foi muito semelhante na maioria dos meios (exceto em farelo de trigo) em relação a quantidade (U/g), tempo de cultivo (três semanas) e suplementação de nitrogênio (solução 3). A baixa produção da lacase é evidente nesta tabela, embora, similar ao observado para lacase de *C. byrsina*, as maiores produções

foram obtidas com suplementação de fontes de nitrogênio que continham fosfato (sol. 2 e 3). Também para *G. striatum* nota-se que a produção de ligninases nem sempre esteve correlacionada a um crescimento bom ou ótimo.

Tabela 7: Produção máxima de ligninases pelo fungo *Corioloopsis byrsina* 16, respectivos meios e tempos de cultivo, aspecto do crescimento fúngico e tipo de solução usada com suplemento de nitrogênio.

MnP			
Meios	Produção máxima (U/g)	Tempo de Cultivo/Crescimento	Solução
Amendoim	426,17	3 semanas/+++	1
Arroz	319,5	3 semanas/+++	1
Cana	1879,5	5 semanas/++	3
Milho	10740,74	3 semanas/++	1
Trigo	31629,63	1 semana/+++	3
LiP			
Meios	Produção máxima (U/g)	Tempo de Cultivo/Crescimento	Solução
Amendoim	1020,64	1 semana/+++	3
Arroz	1126,88	5 semanas/+++	1
Cana	1210,75	5 semanas/+	1
Milho	110,21	1 semana/++	3
Trigo	14387,1	5 semana/+++	2
Lacase			
Meios	Produção máxima (U/g)	Tempo de Cultivo/Crescimento	Solução
Amendoim	1976,66	1 semana/+	2
Arroz	1587,22	1 semana/+	2
Cana	889,44	1 semana/+	3
Milho	392,55	1 semana/++	2
Trigo	49011,11	3 semana/+++	2

(-) Não houve crescimento significativo; (+) Crescimento regular; (++) Crescimento bom; (+++) Crescimento ótimo.

Sol. 1=solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Sol. 2= solução de $(\text{NH}_4)_2\text{H PO}_4$;

Sol. 3= solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Tabela 8: Produção máxima de ligninases pelo fungo *Gloeophyllum cf striatum* 40, respectivos meios e tempos de cultivo, aspecto do crescimento fúngico e tipo de solução usada com suplemento de nitrogênio.

MnP			
Meios	Produção máxima (U/g)	Tempo de Cultivo/Crescimento	Solução
Amendoim	106,17	5 semanas/+	2
Arroz	557,04	5 semanas/++	2
Cana	265,19	3 semanas/++	3
Milho	1622,72	1 semana/-	2
Trigo	1412,35	3 semanas/+++	2
LiP			
Meios	Produção máxima (U/g)	Tempo de Cultivo/Crescimento	Solução
Amendoim	1056,34	3 semanas/-	3
Arroz	992,26	3 semanas/-	1
Cana	1159,57	3 semanas/++	3
Milho	1169,89	3 semana/++	3
Trigo	10030,11	1 semana/+++	3
Lacase			
Meios	Produção máxima (U/g)	Tempo de Cultivo/Crescimento	Solução
Amendoim	27,87	3 semanas/-	3
Arroz	40,69	5 semanas/-	3
Cana	4,42	5 semanas/++	3
Milho	4,04	3 semanas/++	3
Trigo	15,47	5 semanas/+++	2

(-) Não houve crescimento significativo; (+) Crescimento regular; (++) Crescimento bom; (+++) Crescimento ótimo.

Sol. 1=solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Sol. 2= solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; Sol. 3= solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Os dados da tabela 9, resumem o desempenho do *Lentinus* sp. quanto a produção de ligninases. A máxima produção da enzima MnP ocorreu pelo cultivo do fungo em farelo de trigo (2925,95 U/g), visto que nos demais meios, as produções não passaram de 1250 U/g. O tempo de cultivo foi de cinco semanas para todos os substratos.

A produção da LiP foi quantitativamente semelhante à das outras duas linhagens fúngicas estudadas, exceto para o meio de palha de milho, no qual obteve-se uma produção mais elevada (Tabela 9). Nota-se ainda, que as maiores produções ocorreram em meios suplementados com soluções contendo nitrogênio e fosfato.

As produções máximas de lacase foram obtidas na primeira semana de cultivo nos diferentes meios e fontes de nitrogênio, exceto aquela em farelo de trigo que foi máxima após três semanas. Com relação ao tipo de fonte de nitrogênio adicionada ao substrato de fermentação, nota-se que não houve uma relação consistente entre as atividades máximas e uma determinada fonte de nitrogênio (Tabela 9).

Tabela 9: Produção máxima de ligninases pelo fungo *Lentinus* sp 48, respectivos meios e tempos de cultivo, aspecto do crescimento fúngico e tipo de solução usada com suplemento de nitrogênio.

MnP			
Meios	Produção máxima (U/g)	Tempo de Cultivo/Crescimento	Solução
Amendoim	820,74	5 semanas/+++	1
Arroz	1097,78	5 semanas/+++	3
Cana	1249,88	5 semanas/+++	3
Milho	1250,00	5 semanas/++	3
Trigo	2925,93	5 semanas/+++	2

LiP			
Meios	Produção máxima (U/g)	Tempo de Cultivo/Crescimento	Solução
Amendoim	1241,75	1 semana/+++	3
Arroz	1141,23	1 semana/-	2
Cana	1070,54	1 semana/+	3
Milho	4529,03	3 semanas/+++	1
Trigo	10103,23	1 semana/++	3

Lacase			
Meios	Produção máxima (U/g)	Tempo de Cultivo/Crescimento	Solução
Amendoim	1995,56	1 semana/+++	3
Arroz	1357,11	1 semana/-	1
Cana	852,22	1 semana/++	1
Milho	1114,44	1 semana/+++	3
Trigo	15080,00	3 semanas/+	2

(-) Não houve crescimento significativo; (+) Crescimento regular; (++) Crescimento bom; (+++) Crescimento ótimo.
 Sol. 1=solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Sol. 2= solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; Sol. 3= solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Para o fungo *Lentinus* sp também não houve relação entre crescimento ótimo e produção máxima de ligninases.

Segundo Keyser et al (1978), o sistema ligninolítico de vários basidiomicetos decompositores brancos de madeira, é expressado somente durante a fase de metabolismo secundário e em condições de escassez de

nitrogênio. Entretanto, vários outros trabalhos têm indicado que a maior degradação da lignina ocorre durante a fase de crescimento logarítmico do fungo, além de dados que demonstram que elevadas taxas de nutrientes não afetam a produção de ligninases (LEATHAM, 1986, LEATHAM e KIRK, 1983; FU et al, 1997; HATVANI e MÉCS, 2002).

Foi demonstrado em cinco diferentes basidiomicetos de decomposição branca, um estímulo na produção de MnP e LiP por altas concentrações de NH_4^+ -N e peptona-N (KAAL et al., 1995), contrapondo os estudos de Buswell et al. (1995), que relataram a supressão na produção de MnP em *Lentinula (Lentinus) edodes*, ao mesmo tempo em que encontraram altas atividades de lacase. Haddadin et al. (2001) concluíram que o efeito da adição de 1,2 mM e 2,4mM de tartarato de amônio, como fonte adicional de nitrogênio, na degradação da lignina, inibiu a produção da lacase, enquanto que Zadrazil e Brunnert (1980) e Jefries et al. (1981) demonstraram que a degradação da lignina foi estimulada por concentração limitante nitrogênio. Boyle et al. (1992) sugeriram que as fontes de nitrogênio inibem a degradação da lignina, por terem efeito adverso na formação de certos produtos hidro-solúveis que aumentam inicialmente o processo de degradação.

Vários outros trabalhos indicaram o efeito diferenciado do nitrogênio sobre os três tipos de ligninases. Em experimentos realizados por Ahammed e Prema (2002) a adição de peptona e KNO_3 inibiram completamente a síntese de LiP por *Aspergillus sp.*, enquanto que a adição de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 12,5 mM, levou à máxima atividade desta enzima.

A limitação de nitrogênio no meio de cultura estimulou a produção de LiP por *Phanaerochaete chrysosporium*, enquanto que a presença de peptona e íons NH_4^+ estimulou a produção de MnP por *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera odusta* e *L. edodes* (KAAL et al, 1995). O aumento da produção de lacase por *Trametes versicolor* e *P. chrysosporium* foi constatado por Collins et al, (1997) após a adição de triptofano ao meio de cultura, dados também observados por Arora e Gill (2001) em produção de lacase por *Daedalea flaida*, *Phlebia bruispora* e *Picnoporus sanguineus*.

Diferentes comportamentos foram mostrados por duas linhagens fúngicas, *P. sajor-caju* e *L. edodes* quanto à produção de MnP em altas concentrações de nitrogênio. A produção de MnP pelo *P. sajor-caju* foi afetada pelos altos níveis de nitrogênio, enquanto que *L. edodes* continuou produzindo peroxidases. Isto pode ser explicado em parte pelas contrastantes habilidades dos basidiomicetos de crescerem em diferentes resíduos lignocelulósicos (FU et al., 1997).

Um dos problemas em comparar diferentes espécies de fungos em substratos complexos, é o pouco conhecimento dos mecanismos de degradação da lignina (HADDADIN et al., 2001). Por exemplo, *P. chrysosporium* produz lignina peroxidase extracelular (ligninase) que só é encontrada em um limitado número de fungos degradadores de lignina (decomposição branca) (GARCIA et al., 1987; KANTELINEN et al., 1989), enquanto a maioria dos fungos de decomposição branca produz fenol oxidase extracelular (lacase) que podem iniciar a degradação da lignina (PLATT et al., 1984; SANNIA et al., 1991).

A contradição encontrada nos dados da literatura pode estar relacionada também com o tipo de meio de cultura utilizado. A maioria dos trabalhos reporta-se a cultivos submersos e com glicose como fonte de carbono, a qual, pode, em determinadas concentrações, exercer a repressão catabólica sobre as ligninases. Considerando o processo fermentativo sólido, cujos substratos são materiais lignocelulósicos e portanto, exigem que o fungo inicie um processo de ligninólise para liberação de compostos de carbono assimiláveis, a necessidade nutricional para a formação de micélio iniciador da colonização desse substrato, deve ser considerada.

Além do nitrogênio, a adição de íons fosfato parece ter influenciado positivamente a produção das ligninases. Fang et al., (1999) descreveu em seu trabalho a influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de uma outra enzima lignolítica, celobiose desidrogenase produzida pelo basidiomiceto *Schizophyllum commune*. Neste trabalho, as melhores produções enzimáticas foram obtidas nas culturas suplementadas com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,2%.

A disparidade entre as atividades encontradas em cultivos em farelo de trigo e nos demais meios, pode estar relacionada com a diferença quantitativa de algumas substâncias como amido, fibras, proteínas, gordura e minerais. Smits et al., (1996) avaliou a influência do farelo de trigo na produção de CMC-ase por *Trichoderma reesei* tendo como base a composição do meio usado. Sabe-se que o farelo de trigo é um material rico em carbono orgânico, vitaminas e nutrientes minerais, possuindo, por isso, elevado valor nutritivo para o homem, animais e microrganismos. Em função dessa composição, esse material tem sido usado como substrato padrão para ensaios de fermentação sólida (MARTINS et al., 2002; SILVA et al., 2002).

As maiores produções de ligninases observadas nesse substrato podem estar relacionadas com a presença de outros nutrientes minerais como Mn^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} e Fe^{+3} , que são elementos importantes para a estrutura e função das ligninases. Buswell et al. (1995) encontraram em seus experimentos altas concentrações de MnP em culturas enriquecidas com Mn, e mais, observaram que a influência do Mn na produção MnP não está obrigatoriamente relacionada com o aumento na produção de biomassa fúngica. No fungo de decomposição branca *P. chrysosporium*, o Mn regula a expressão de MnP através da ativação do gene de transcrição da MnP via “*growth-stage-specific*” e mecanismo de “*concentration-dependent*” (Brown et al., 1991).

Utilizando cobre em concentração de 1,5 a 2,0 mM em cultivo de meio líquido de *Trametes pubescens*, foram obtidos os máximos valores de atividade para a lacase (65 U/L). A síntese dessa enzima mostrou ser dependente de Cu no meio como foi demonstrado por Galhaup et al. (2001).

Crawford et al. (1975) estudaram a degradação do veratril-glicerol- β -(o-metoxifenil), um modelo de componente da lignina, por *Pseudomonas acidovorans*. Ele observou que uma das primeiras etapas na degradação era a demetilação, e para isto a oxidase responsável utilizava Fe^{+2} .

Esses dados sugerem a necessidade da avaliação de micronutrientes dos substratos de fermentação.

VI. 4.3. Determinação do pH ótimo para a atividade das enzimas

Os ensaios foram realizados utilizando as soluções enzimáticas brutas obtidas nas fermentações sólidas. O tempo de fermentação usado levou em consideração a produção geral das enzimas para cada linhagem fúngica.

Nos testes para *Corioloopsis byrsina* foi utilizada a solução enzimática bruta retirada três semanas após o inóculo, em farelo de trigo, umedecido com solução $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$.

A influência do pH foi determinada apenas para a lacase, uma vez que a atividade das demais enzimas foi pouco significativa comparada com os altos valores da lacase. Nota-se que, a atividade desta enzima foi maior na faixa de pH compreendida entre 3,0 e 5,0 com máximo em pH 3,5. A partir do pH 4,5 houve uma queda acentuada na atividade desta enzima, chegando a uma redução de 80% da atividade em pH 5,5. Não foi encontrada atividade em pHs maiores do que 5,5 (Fig 20). Makkar et al (2001) descreveu um perfil semelhante de atividade para lacase em *Lentinula edodes*.

A figura 21 representa a atividade de lignina peroxidase, produzida por *Gloeophyllum cf striatum*, em meio de farelo de trigo após 2 semanas de cultivo, suplementado com solução $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, em diferentes valores de pH. A máxima atividade ocorreu em pH 3,0, e a partir deste valor a atividade da lignina peroxidase de *Gloeophyllum cf striatum* decresceu até pH 5,0. Estes dados corroboram os de Rothschild et al (2002) para a LiP produzida.

Para os ensaios de caracterização da manganês peroxidase produzida por *Lentinus* sp, foi utilizado a solução enzimática obtida por fermentação de farelo de trigo, suplementado com solução $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, após duas semanas de cultivo. A manganês peroxidase mostrou-se mais ativa em pH 3,0. Em pH 3,5 tanto como 2,5, a atividade foi de aproximadamente 70% da máxima observada. Houve uma redução de 75% da atividade em pH 4,0 (Fig. 22 A).

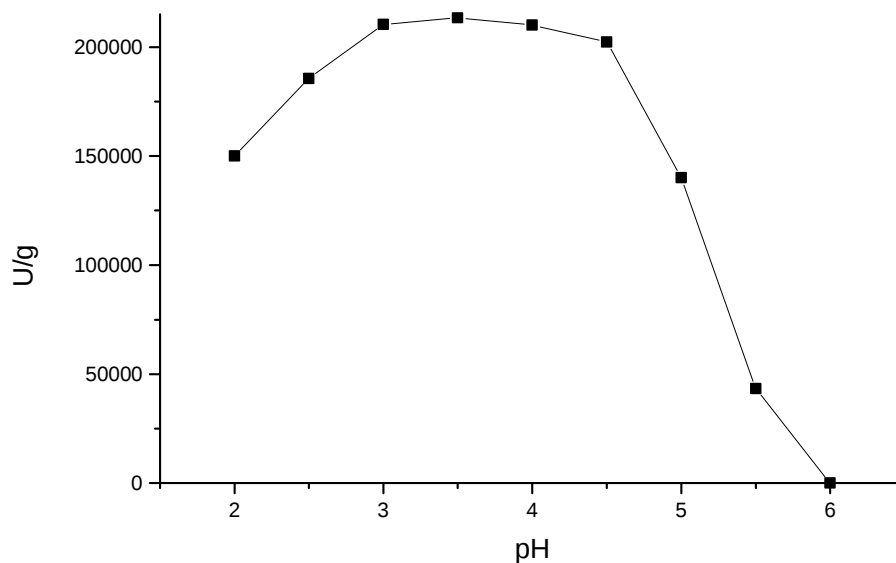


Figura 20: Efeito do pH sobre a enzima lacase produzida por *Corioloopsis byrsina*. Tampões utilizados: Citrato-NaOH (pH 2,0-6,0) e Bis-Tris-HCl (pH 6,0-6,5).

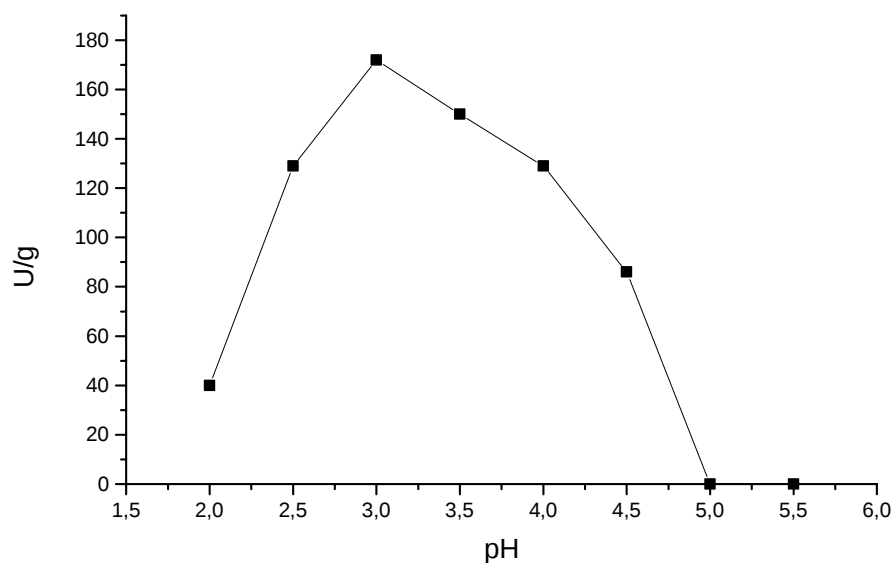


Figura 21: Efeito do pH sobre a atividade da enzima lignina peroxidase produzida por *Gloeophyllum cf striatum*. Tampões utilizados: Citrato-NaOH (pH 2,0-5,5).

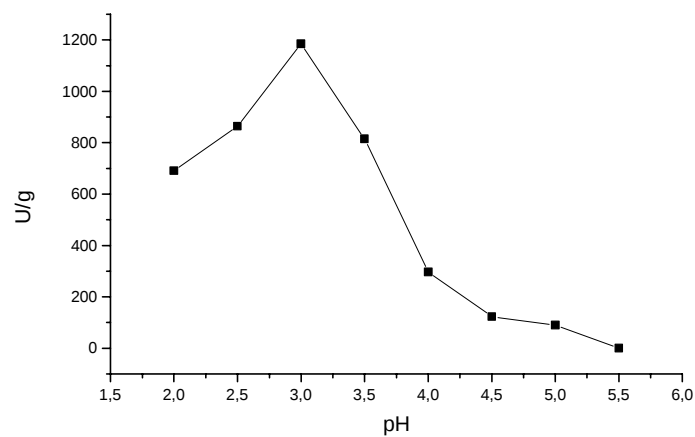
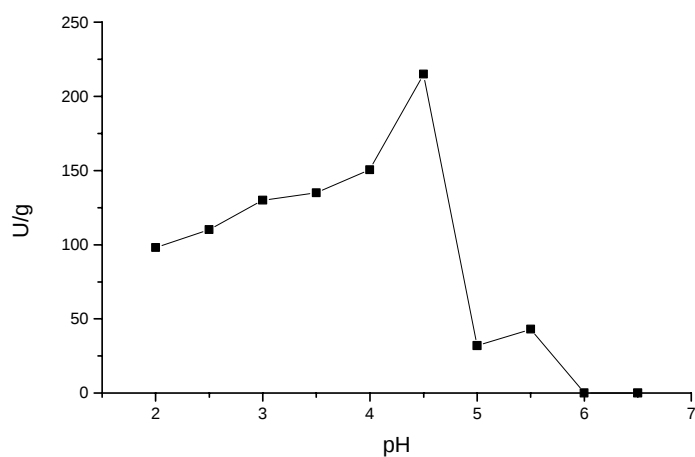
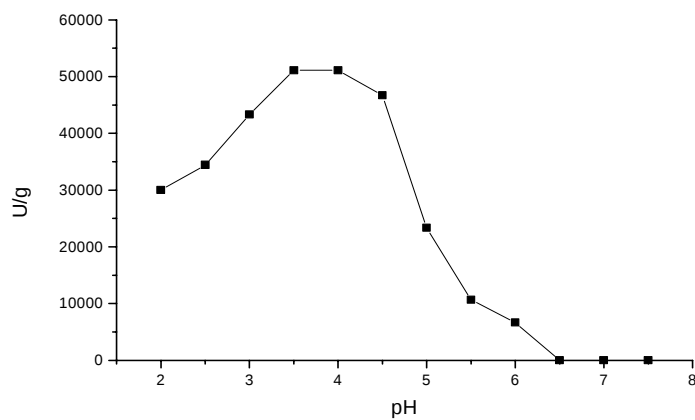
**A****B****C**

Figura 22: Efeito do pH sobre ligninases produzidas por *Lentinus* sp; **(A)** manganês peroxidase; **(B)** lignina peroxidase; **(C)** lacase. Tampões utilizados: Citrato-NaOH (pH 2,0-6,0) e Bis-Tris-HCl (pH 6,0-6,5)

A lignina peroxidase produzida por *Lentinus* sp em farelo de trigo mostrou um aumento da atividade a partir do pH 3,5, chegando à máxima atividade em pH 4,5. A partir deste ponto ocorreu uma acentuada queda na atividade de cerca de 75% em pH 5,0 (Fig. 22 B). O efeito semelhante do pH foi observado para lignina peroxidase produzida por *P. chrysosporium* e *Ganoderma* sp. (HADDADIN et al., 2001).

A lacase produzida pelo fungo *Lentinus* sp demonstrou semelhança com a produzida pelo *Coriolopsis byrsina*, com atividade ótima entre pH 3,5 e 4,0, no entanto, quando os ensaios foram realizados em pH 5,0 houve um decréscimo de 55% da atividade (Fig. 22 C).

VI. 4.4. Determinação da temperatura ótima para a atividade das enzimas

A temperatura máxima de atividade de lacase foi de 60°C para a enzima produzida por *Coriolopsis byrsina* (Fig. 23) e de 65°C para o *Lentinus* sp (Fig.25 C), temperatura superior à da temperatura máxima de atividade para lacase de *Pleurotus ostreatus* (50°C) (HUBLIK et al., 2000). De forma geral, as lacases produzidas por *Coriolopsis byrsina* e *Lentinus* sp tiveram valores de temperatura ótimo semelhantes a lacase comercializada pela Novo Nordisk produzida através de fermentação submersa de *Aspergillus* geneticamente modificado (SOARES et al., 2001).

A enzima lignina peroxidase foi avaliada para *Gloeophyllum cf striatum* (Fig. 24) e *Lentinus* sp (Fig. 25 B), apresentando como temperatura ótima 35°C e em valores maiores do que 40°C sua atividade apresenta uma expressiva queda, provavelmente vinculada ao desnaturamento da enzima.

A temperatura ótima de MnP produzida pela linhagem *Lentinus* sp foi de 55°C (Fig.25 A), bem acima dos 30°C para atividade máxima da enzima de *Aspergillus terreus* e *P.chrysosporium* encontradas por Kanayama et al., (2002) e Öztürk (2004), respectivamente.

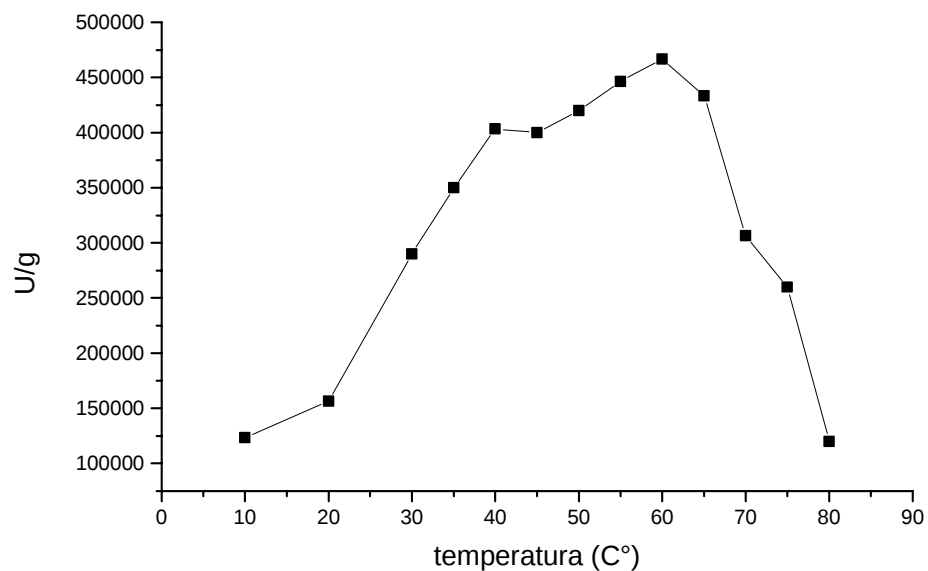


Figura 23: Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima lacase produzida por *Coriopsis byrsina*.

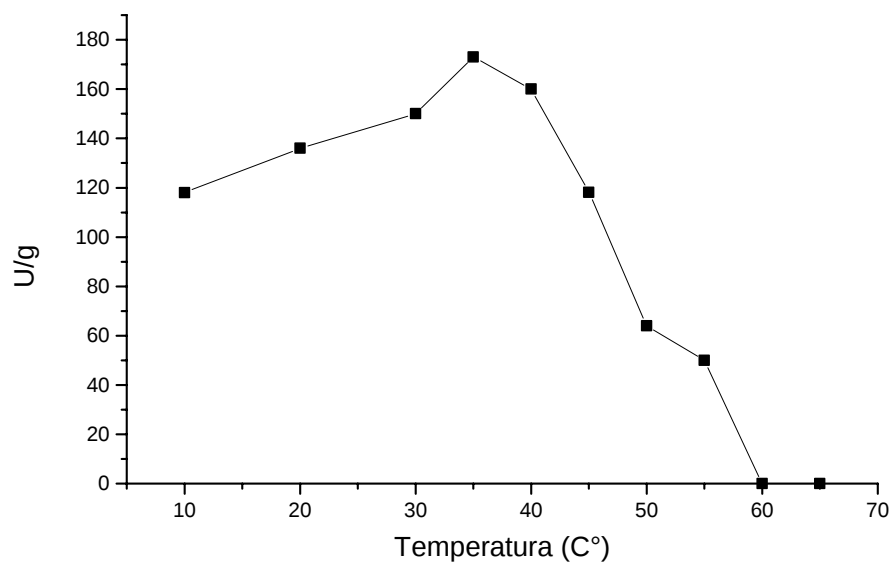


Figura 24: Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima lignina peroxidase produzida por *Gloeophyllum cf striatum*.

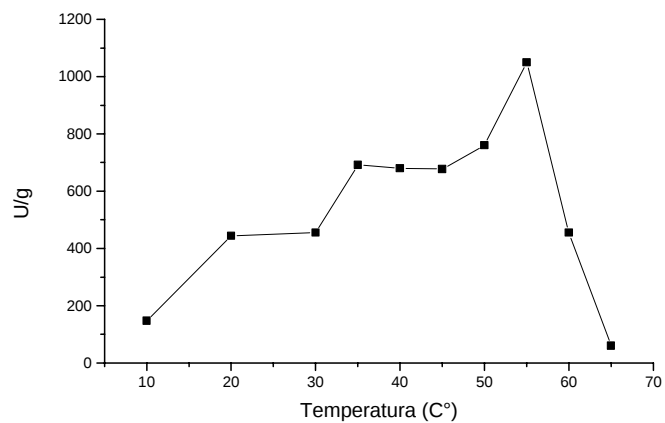
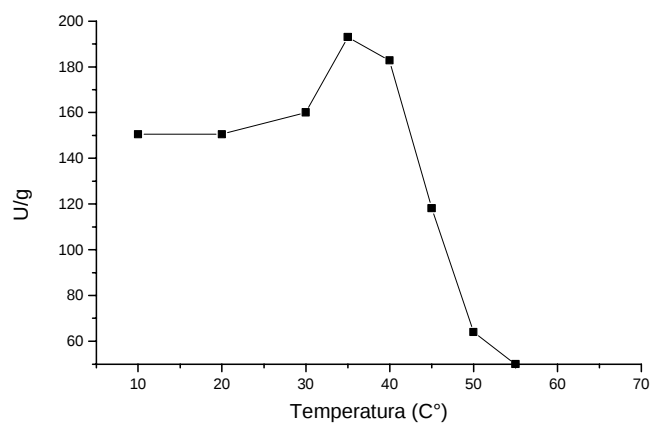
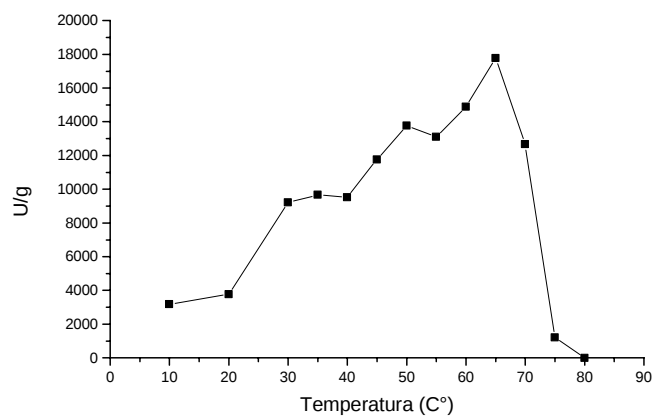
**A****B****C**

Figura 25: Efeito da temperatura sobre ligninases produzidas por *Lentinus* sp; **(A)** manganês peroxidase; **(B)** lignina peroxidase; **(C)** lacase.

VI. 4.5. Efeito do pH sobre a estabilidade das ligninases

As soluções enzimáticas brutas utilizadas nesta etapa do trabalho foram obtidas nas mesmas condições de cultivo dos extratos utilizados na caracterização de pH e temperatura ótimos. As soluções enzimáticas foram incubadas em tampões com pH variando de 2,0 a 9,0 (Citrato-NaOH pH 2,0-6,0; Bis-Tris-HCl pH 6,0-8,0 e Glicina-NaOH pH 8,0-9,0), por 24 horas, a 25°C. As atividades enzimáticas residuais foram determinadas no pH e temperatura ótimos de cada enzima, utilizando como substrato solução de MnSO_4 a 0,4M para ensaios de MnP em *Lentinus* sp 48, Álcool veratrílico a 40mM para LiP em *Gloeophyllum* cf *striatum* 40 e *Lentinus* 48 e ABTS a 0,03% (p/v) para atividades de Lacase em *Corioloopsis byrsina* 16 e *Lentinus* sp 48.

Na figura 26 observa-se que a lacase produzida pelo *Corioloopsis byrsina* 16 apresenta 50% ou mais de sua atividade residual em pHs ácido-alcalino (5,0-9,0) e chega ao valor máximo de 120000 U/g em pH 9,0, e uma acentuada queda de atividade em valores seqüentes de pH.

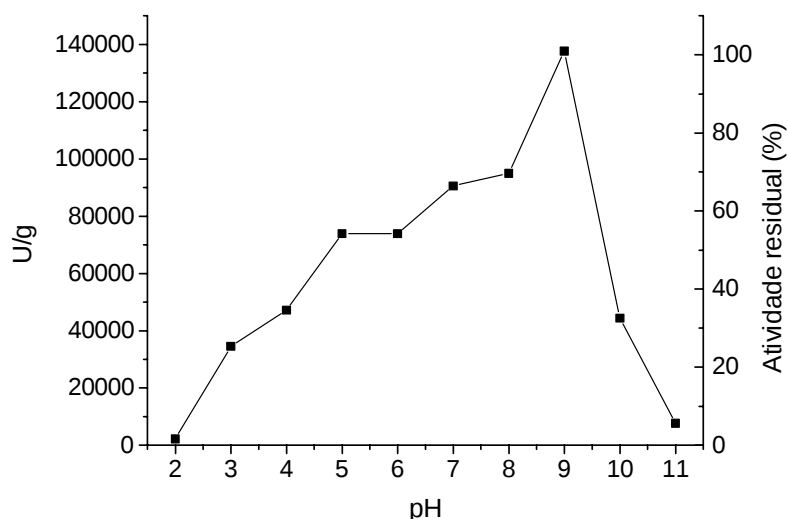


Figura 26: Efeito do pH na estabilidade da lacase produzida pelo *Corioloopsis byrsina* 16 em ausência de substrato. Tampões utilizados para pHs de 2,0 a 11,0: Citrato-NaOH pH 2,0-6,0; Bis-Tris-HCl pH 6,0-8,0 e Glicina NaOH pH 8,0-11,0.

Um comportamento distinto foi encontrado frente às variações de pH para a lacase produzida pelo *Lentinus* sp 48. A enzima permaneceu estável em faixa de pH compreendida entre 4,0 e 7,0, e sua máxima atividade residual se deu frente ao pH 5,0 (Fig. 27). Decréscimos de mais de 50% da atividade residual foram detectados em pHs menores que 4,0 e não foi encontrada atividade em pHs acima de 8,0.

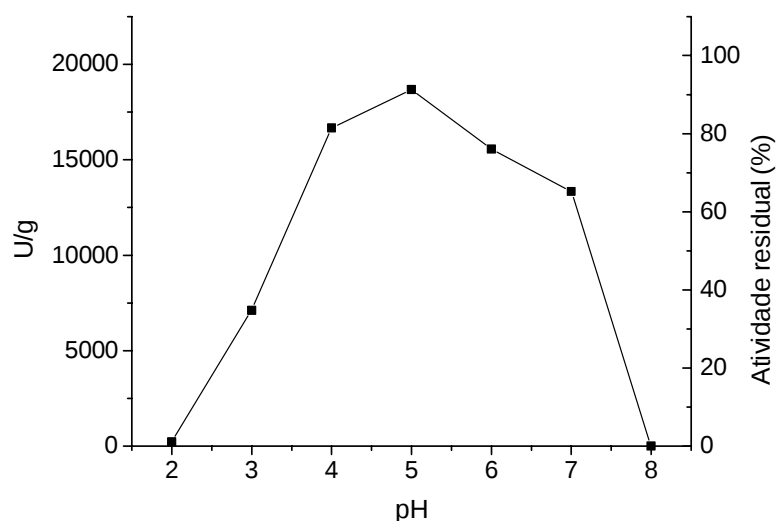


Figura 27: Efeito do pH na estabilidade da lacase produzida pelo *Lentinus* sp 48 em ausência de substrato. Tampões utilizados para pHs de 2,0 a 8,0: Citrato-NaOH pH 2,0-6,0; Bis-Tris-HCl pH 6,0-8,0.

Na figura 28 A estão representados os dados obtidos para os ensaios de pH de estabilidade para a LiP produzida pelo *G. cf striatum* 40, que manteve sua estabilidade acima dos 90% em faixa de pH de 4,0 a 7,0. A partir do pH 8,0 houve uma significativa perda de cerca de 20% na atividade residual. Um comportamento semelhante foi observado na LiP produzida pelo *Lentinus* sp 48 (Fig. 28 B), onde a atividade residual manteve-se acima dos 80% em valores de pH entre 4,0 e 6,0 e queda de atividade em pHs alcalinos.

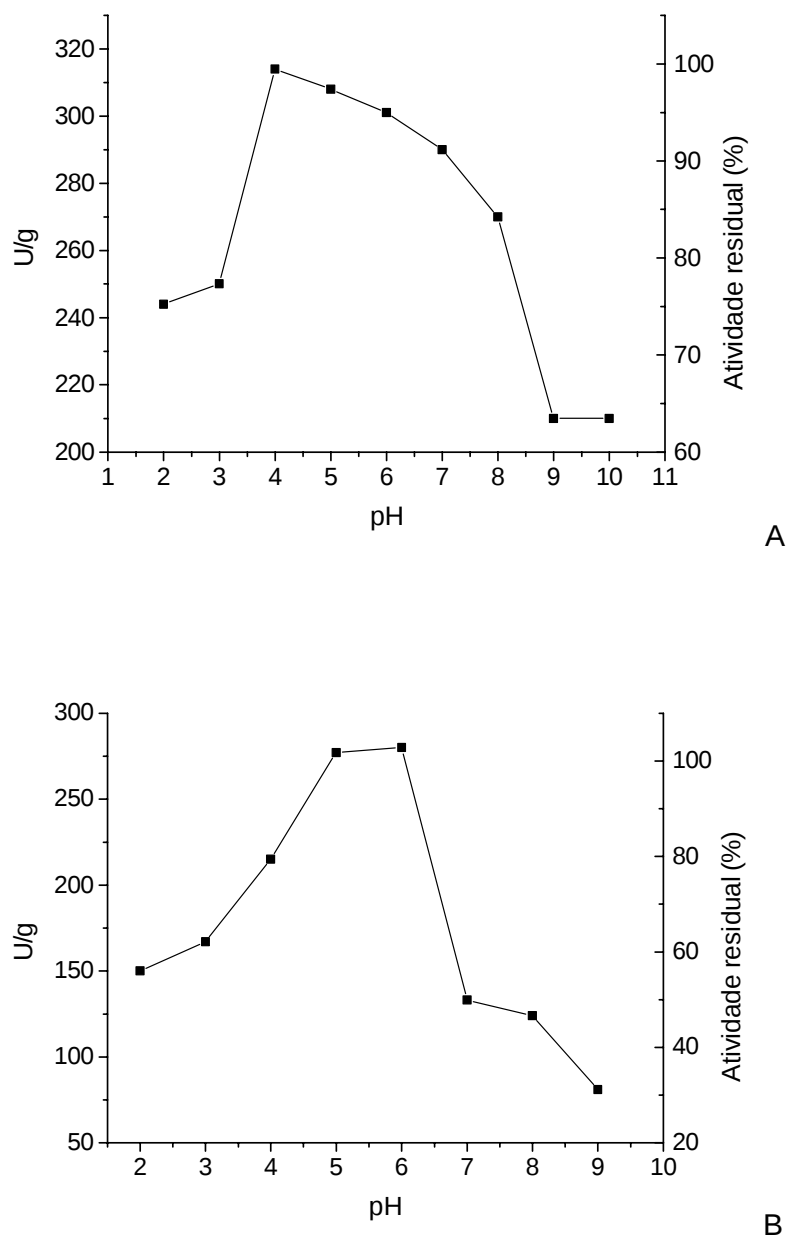


Figura 28: Efeito do pH na estabilidade da LiP em ausência de substrato. (A) *Gloeophyllum cf striatum* 40 e (B) *Lentinus* 48. Tampões utilizados para pHs de 2,0 a 10,0: Citrato-NaOH pH 2,0-6,0; Bis-Tris-HCl pH 6,0-8,0 e Glicina NaOH pH 8,0-10,0.

A partir da figura 29 observa-se que a MnP produzida pelo *Lentinus* sp 48 apresenta a estabilidade máxima em pH neutro (6,0-7,0), mas a enzima

mostrou-se sensível a pHs alcalinos a ponto de ter sua atividade residual reduzida em 45% entre os pHs 7,0 e 8,0.

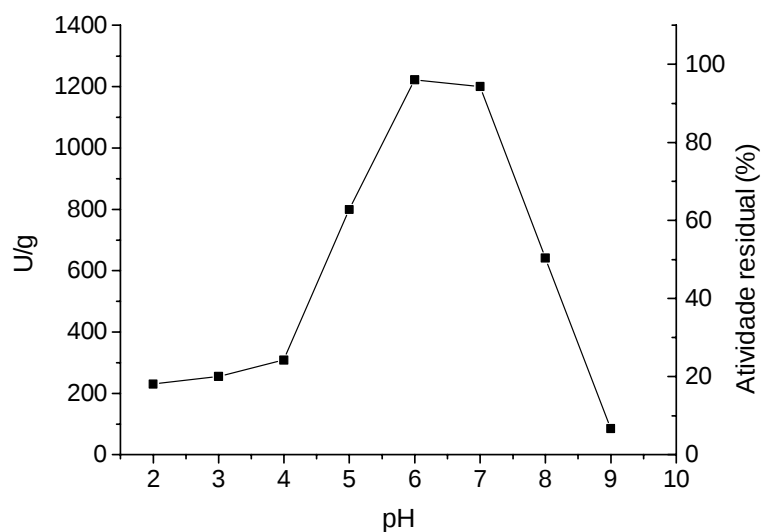


Figura 29: Efeito do pH na estabilidade da MnP produzida pelo *Lentinus* sp 48 em ausência de substrato.

VI. 4.6. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das ligninases

As soluções enzimáticas brutas foram incubadas em temperaturas de 10° a 70°C em ausência de substrato por uma hora.

A enzima MnP produzida pelo *Lentinus* sp 48 (Fig. 30) manteve valores próximos aos 100% entre 40° e 50°C e uma acentuada queda na atividade em temperaturas mais elevadas. Observa-se que a temperatura testada ótima da MnP foi de 55°C, no entanto a enzima se mostrou sensível a esta temperatura quando incubada por uma hora.

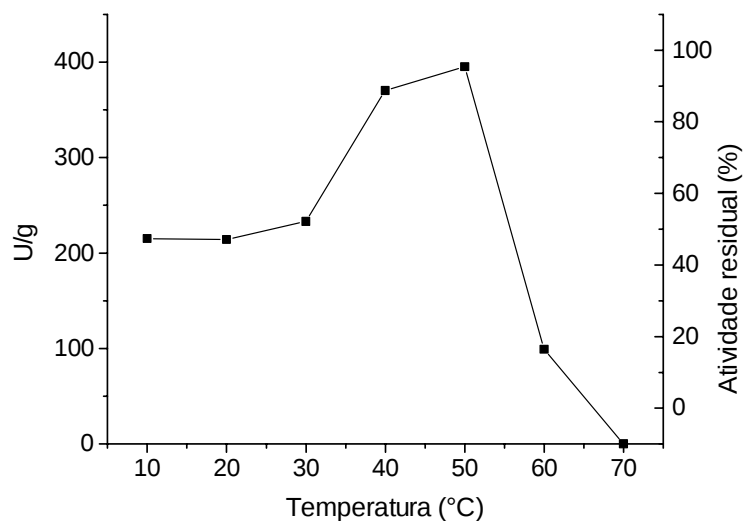


Figura 30: Efeito da temperatura na estabilidade da MnP produzida pelo *Lentinus* sp 48 em ausência de substrato.

As figuras 31 A e B mostram os efeitos da temperatura sobre a atividade de LiP do *G. cf striatum* 40 e *Lentinus* sp 48. Apesar da LiP do *G. cf striatum* 40 ter mantido a sua atividade acima dos 80% em uma faixa ampla de temperatura (10° aos 50°C), esta enzima foi mais sensível do que a LiP de *Lentinus* sp 48 em temperaturas mais elevadas. O *Lentinus* sp 48 manteve atividade residual de 50% em 70°C e um pico de atividade em 40°C sugere que a enzima sofreu uma ativação em temperaturas próximas as das ótimas encontradas nos ensaios de temperatura ótima.

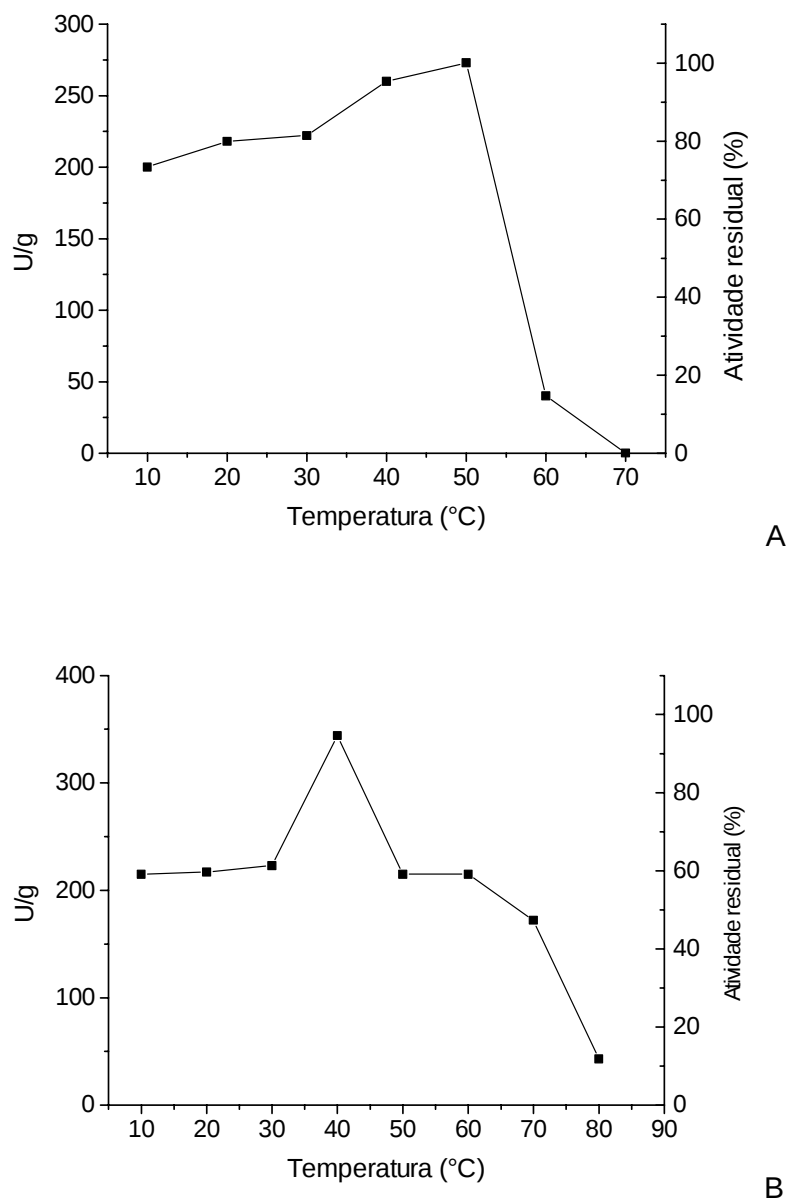
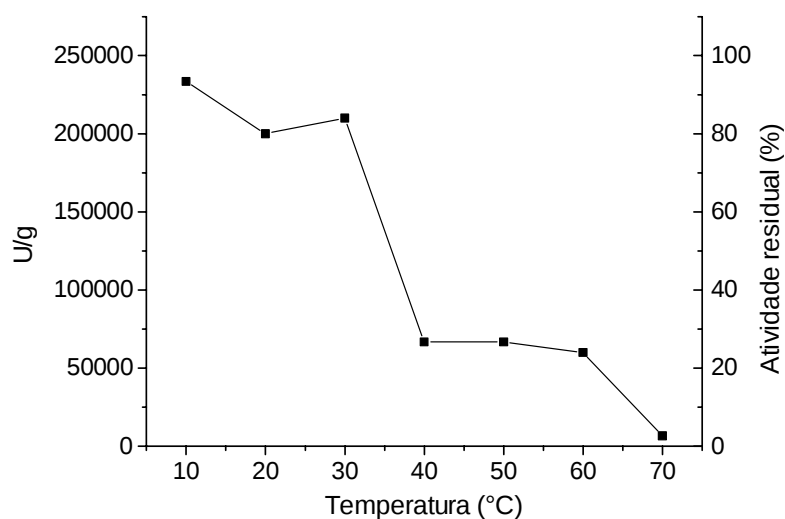


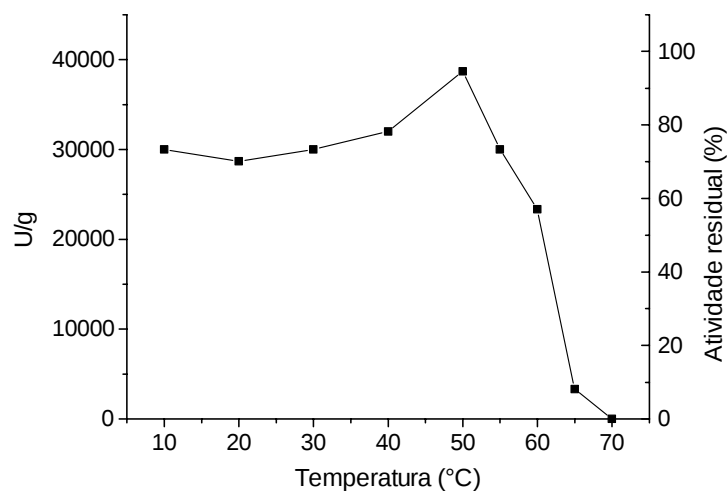
Figura 31: Efeito da temperatura na estabilidade da LiP em ausência de substrato. (A) *Gloeophyllum cf striatum* 40 e (B) *Lentinus* 48.

Analisando as figuras 32 A e B referentes à temperatura de estabilidade da lacase de *Coriolopsis byrsina* 16 e *Lentinus* sp 48, verificamos que apesar da produção ser maior em *C. byrsina* sua termoestabilidade não tolera valores maiores do que 30°C, enquanto que a lacase produzida por *Lentinus* sp

mantêm-se estável em uma faixa ampla de temperatura (10° a 50°C). No entanto a atividade enzimática encontrada no *C. byrsina* em temperaturas até 60°C é maior do que os 100% de atividade residual de *Lentinus* sp



A



B

Figura 32: Efeito da temperatura na estabilidade da lacase em ausência de substrato. (A) *Coriolopsis byrsina* 16e (B) *Lentinus* 48.

O resumo das características físico-químicas das ligninases é apresentado na tabela 10.

Tabela 10: Resumo das características das ligninases.

Fungo estudado	Enzima estudada	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	pH de preservação de 70-100% da atividade original	Temperatura de preservação de 70-100% da atividade original (°C)
<i>Coriolopsis byrsina</i>	Lacase	60	3,5	8,0-9,0	10-30
<i>Gloeophyllum cf striatum</i>	LiP	35	3,0	4,0-7,0	10-50
<i>Lentinus</i> sp	Lacase	65	3,0	4,0-6,0	10-55
	LiP	35	3,5	5,0-6,0	40
	MnP	55	3,5-4,0	5,0-6,0	40-50

VI. 5. Avaliação da ação das enzimas sobre corantes aromáticos

Foram utilizados oito corantes sintéticos nos testes de descoloração, cujas características estão descritas a seguir:

- **Orange II** (Sigma)

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

Número CAS: 633-96-5

Índice Colorimétrico: 15510

Número EG/EC: 2111990

A estrutura é mostrada na figura 33.

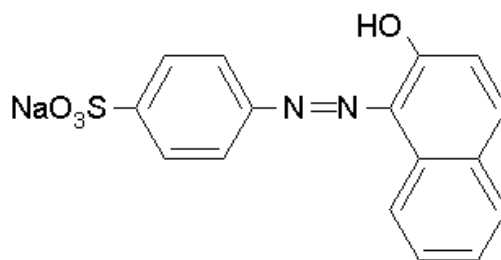


Figura 33: Fórmula estrutural do corante Orange II.

- **Azure B** (Sigma)

Sinônimos: Azure I, *N,N,N'*-Trimethylthionin e Methyleneazure

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

Peso Molecular: 305.83

Número CAS: 531-55-5

Índice Colorimétrico: 52010

Número EG/EC: 2085112

A estrutura é mostrada na figura 34.

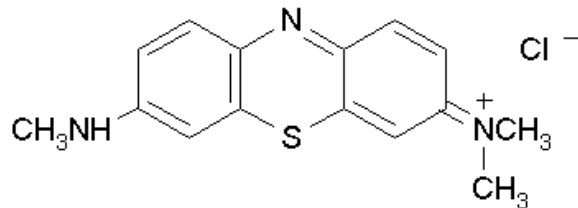


Figura 34: Fórmula estrutural do corante Azure B.

• **Chrysophenine** (Sigma)

Sinônimos: Direct Yellow 12

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

Peso Molecular: 680.66

Número CAS: 2870-32-8

Índice Colorimétrico: 24895

A estrutura é mostrada na figura 35.

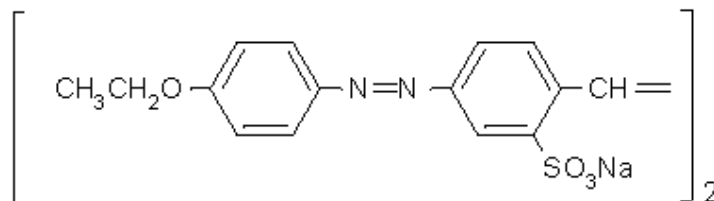


Figura 35: Fórmula estrutural do corante Chrysophenine.

• **Cibacron Blue 3GA** (Sigma)

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

Peso Molecular: 774.16

Número CAS: 84166-13-2

A estrutura é mostrada na figura 36.

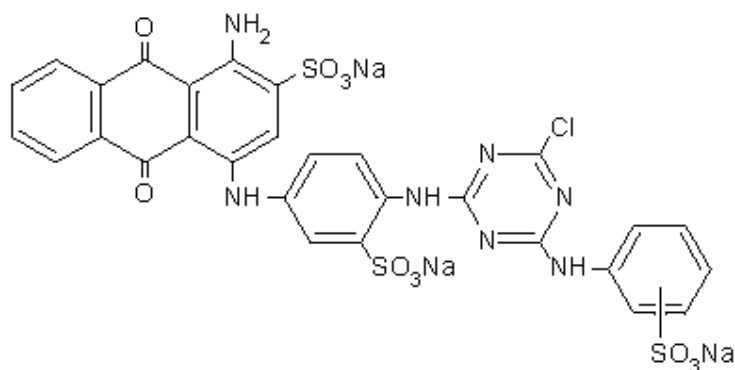


Figura 36: Fórmula estrutural do corante Cibacron Blue 3GA

• **Reactive Red 120** (Sigma)

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

Peso Molecular: 1469.98

Número CAS: 61951-82-4

A estrutura é mostrada na figura 37.

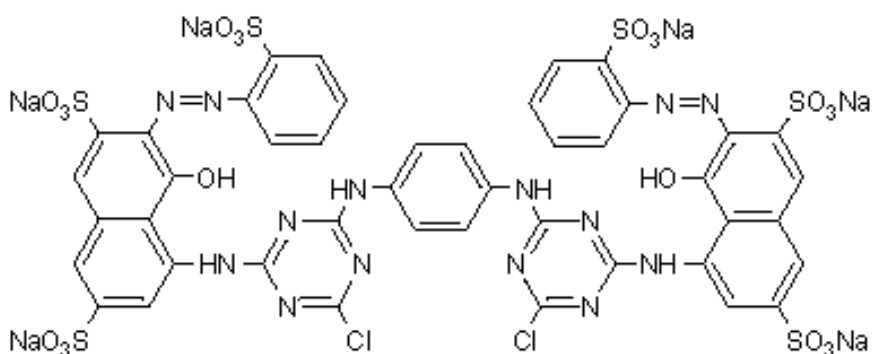


Figura 37: Fórmula estrutural do corante Reactive Red 120

• **Azul de Metileno trihidratado** (Nuclear)

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

Peso Molecular: 373.90

Número CAS: 7220-79-3

Índice Colorimétrico: 52015

A estrutura é mostrada na figura 38.

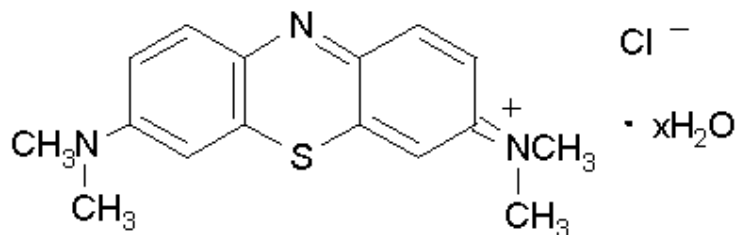


Figura 38: Fórmula estrutural do corante Azul de Metileno.

• **Cristal Violeta** (Hopkin & Williams)

Sinônimos: Hexamethylpararosaniline chloride, Methyl Violet 10B, Violeta Genciana, Basic Violet 3.

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

Peso Molecular: 407.98

Número CAS: 548-62-9

Índice Colorimétrico: 42555

A estrutura é mostrada na figura 39.

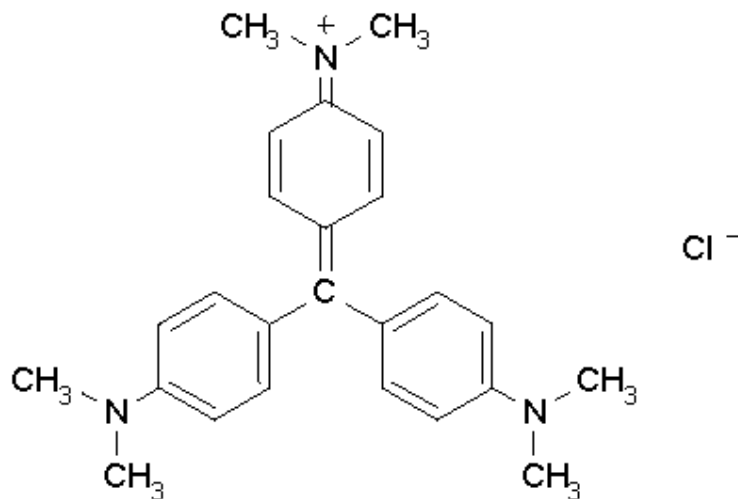


Figura 39: Fórmula estrutural do corante Cristal Violeta.

• **Vermelho Fenol**

Sinônimos: Phenolsulfonphthalein

Fórmula Molecular: $C_{19}H_{14}O_5S$

Peso Molecular: 354.38

Número CAS: 143-74-8

A estrutura é mostrada na figura 40.

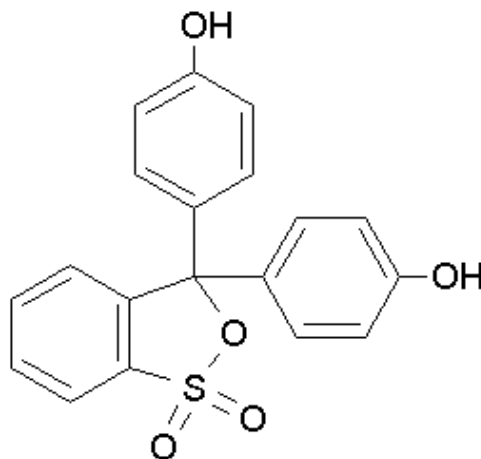


Figura 40 Fórmula estrutural do corante Vermelho Fenol.

A partir da varredura realizada em espectrofotômetro, obteve-se os comprimentos de onda de absorbância máxima para os corantes e também a concentração apropriada para os testes de descoloração para cada um (Tabela 11).

Tabela 11: Comprimento de onda de absorção máxima (nm) para os corantes.

Corante	Comprimento de onda (nm)	Concentração do corante (mg/L) solução
Orange II	485	15
Reactive Red 120	535	25
Cibacron Blue 3GA	605	75
Chrysophenine	400	10
Azure B	646	5,5
Azul de Metileno	663	10
Vermelho Fenol	432	12,5
Cristal Violeta	589	6,5

Os extratos enzimáticos escolhidos para os experimentos foram obtidos pelo cultivo de *Coriolopsis byrsina* 16 por três semanas em meio de farelo de trigo e de *Lentinus* sp 48 por duas semanas, também em meio de farelo de trigo. Ambas culturas foram suplementadas com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Estes extratos foram escolhidos por apresentarem maiores atividades de lacase (*C. byrsina* 16 com 146000 U/mL e *Lentinus* sp 48 com 7431 U/mL). Os testes foram realizados em temperatura ambiente e em pH 3,5 para a solução enzimática de *C. byrsina* 16 e pH 3,0 para a solução enzimática de *Lentinus* sp.

Os resultados obtidos na descoloração não estão relacionados com a adsorção do corante pelas hifas, uma vez que foi utilizado nos experimentos apenas o extrato enzimático bruto e livre de biomassa fúngica. No entanto não podemos concluir que houve total mineralização dos corantes, pois os produtos não foram submetidos a análises químicas.

Como pode-se observar na tabela 12, a descoloração máxima para Orange II foi de 63,5% quando tratado com a solução enzimática de *Lentinus* sp e ABTS, enquanto que a máxima descoloração promovida pelo *C. byrsina* foi de 55,1% após 48 horas de tratamento. Entretanto, a descoloração foi de 45% em 30 min em presença de ABTS, quando foi usada a enzima de *C. byrsina* e de 26%, com enzima de *Lentinus* sp. A descoloração do Orange II pela lacase pareceu ser facilitada pela presença do mediador ABTS. Uma vez que a atividade de lacase foi maior no extrato enzimático de *C. byrsina* do que em *Lentinus* sp, a velocidade de descoloração observada foi coerente, embora a enzima de *Lentinus* sp. tenha proporcionado melhor resultado final. Em um trabalho similar com descoloração de Remazol Brilhante Blue R (corante do tipo antraquinona), Soares *et al.* (2001) observaram que a lacase pura era incapaz de descolorir o RBBR, no entanto a taxa de descoloração foi otimizada com a presença do mediador ácido violúrico.

Miege *et al.* (2001) relatou em seu trabalho com *P. chrysosporium* uma descoloração de 70% do Orange II após um período de 10 dias de incubação. Knapp *et al.* (1995) obteve 42% de descoloração do Orange II com *P. chrysosporium* após 7 dias de incubação.

Baseados nessas observações concluímos que a evolução da descoloração sobre o Orange II ao longo dos tempos analisados, foi mais eficiente em *Lentinus* sp do que em *C. byrsina*. Pode ser que a ação da enzima sobre o corante leve à formação de algum produto, resistente a ação da enzima do *C. byrsina*, enquanto a lacase de *Lentinus* sp. continua atuando sobre os possíveis derivados do corante.

Tabela 12: Taxa de descoloração do corante Orange II por *C. byrsina* e *Lentinus* sp.

Corante	Fungo	Substrato (0,1mL)	Quantidade de enzima (mL)	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Orange II	<i>C.byrsina</i>	-	0,1	0,5	5
				6	11
				24	15
				48	17
Orange II	<i>C.byrsina</i>	ABTS	0,1	0,5	45
				6	45,4
				24	48,5
				48	55,1
Orange II	<i>C.byrsina</i>	MnSO ₄	0,1	0,5	3
				6	3
				24	6,7
				48	7,9
Orange II	<i>C.byrsina</i>	Ácool veratrílico	0,1	0,5	2,3
				6	2,3
				24	5,9
				48	9,9
Orange II	<i>Lentinus</i> sp	-	0,1	0,5	-
				6	-
				24	-
				48	2,5
Orange II	<i>Lentinus</i> sp	ABTS	0,1	0,5	26,4
				6	53,5
				24	55,5
				48	63,5
Orange II	<i>Lentinus</i> sp	MnSO ₄	0,1	0,5	-
				6	1,6
				24	10,1
				48	14,5
Orange II	<i>Lentinus</i> sp	Ácool veratrílico	0,1	0,5	-
				6	3,3
				24	9,8
				48	16,74

Na tabela 13 estão representados os valores de descoloração do corante sintético crysophenine por *Lentinus* sp. A solução enzimática extraída do *C. byrsina* não foi capaz de descolorir a crysophenine.

A máxima porcentagem descoloração da crysophenine (28%) foi observada nos ensaios com presença de MnSO_4 . Knapp *et al.* (1995) realizou testes com *Piptoporus betulinus*, e obteve como valor máximo de descoloração da crysophenine em 51%.

A crysophenine faz parte dos azo-corantes mais resistentes, e a dificuldade de degradação está relacionada com sua recalcitrância. O yellow brilliant tem uma estrutura semelhante com a da crysophenine e, no entanto é mais facilmente degradado (Knapp *et al.*, 1995). Pequenas diferenças estruturais podem afetar o processo de descoloração. Presume-se que essas diferenças estejam ligadas a distribuição eletrônica e a densidade de cargas (Knapp *et al.*, 1995). Pasti-Grigsby *et al.* (1992) demonstraram que a natureza e posição dos substituintes em um dos anéis aromáticos podem influenciar a descoloração.

A presença de mediadores pareceu não facilitar a descoloração, uma vez que os valores obtidos foram semelhantes entre os ensaios na presença ou ausência de substrato. O álcool veratrílico demonstrou desfavorecer a ação da enzima sobre a crysophenine.

Durante os experimentos que envolveram a utilização do ABTS, notou-se que a presença da lacase oxidava a solução de ABTS originalmente incolor, e a tornava azulada. Nos casos em que a degradação do corante era expressiva, o ABTS oxidava o substrato e se reduzia voltando ao aspecto incolor. Do contrário, se não houvesse a oxidação do corante, ou se esta não fosse intermediada pelo ABTS, a cor azulada poderia interferir na leitura. Nestes casos foi adotado como resultado a ausência de descoloração.

Tabela 13: Taxa de descoloração do corante Crysophenine por *Lentinus* sp.

Corante	Fungo	Substrato (0,1mL)	Quantidade de enzima (mL)	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Crysophenine	<i>Lentinus</i> sp	-	0,01	0,5	-
				6	-
				24	7,4
				48	26,7
Crysophenine	<i>Lentinus</i> sp	ABTS	0,01	0,5	-
				6	-
				24	-
				48	-
Crysophenine	<i>Lentinus</i> sp	MnSO ₄	0,01	0,5	-
				6	3,5
				24	11,4
				48	28,3
Crysophenine	<i>Lentinus</i> sp	Ácool veratrílico	0,01	0,5	-
				6	2
				24	6,4
				48	13,5

O corante Cibacron Blue 3GA utilizado neste trabalho faz parte do grupo das triazinas. É comum encontrar trabalhos que utilizam este nome como sinônimo de Reactive Blue 2 (C.A.S. 12236-82-7), no entanto esses dois corantes não são isômeros (www.sigma-aldrich.com, 7/10/2004).

Os máximos valores de descoloração para o Cibacron Blue 3GA (69%) foram obtidos pelo tratamento com a solução enzimática de *C. byrsina* tanto em ausência como na presença de substratos (tabela 14). Valores próximos foram obtidos com o tratamento do corante pela solução enzimática de *Lentinus* sp na presença de álcool veratrílico (66%).

Verma *et al.* (2004) obtiveram uma descoloração de 88% em seus experimentos com Reactive Blue 2 (corante do tipo antraquinona) através de um sistema contendo Cu(II), H₂O₂ e d-arabino-1,4- lactona.

Comparando-se os dados apresentados na tabela 14 notamos que os valores obtidos na ausência e presença de substrato não apresentaram grandes discrepâncias, o que nos leva a concluir que a presença de substrato pouco influenciou na ação das enzimas sobre o Cibacron Blue 3GA.

Nota-se uma rápida ação da enzima de *C. byrsina* sobre o corante. As taxas de descoloração ao final de 48 horas ficaram próximas daquelas observadas após 30 minutos.

Tabela 14: Taxa de descoloração do corante Cibacron Blue por *C. byrsina* e *Lentinus* sp.

Corante	Fungo	Substrato (0,1mL)	Quantidade de enzima (mL)	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Cibacron Blue	<i>C.byrsina</i>	-	0,1	0,5	64,5
				6	67,8
				24	68,3
				48	69,3
Cibacron Blue	<i>C.byrsina</i>	ABTS	0,1	0,5	-
				6	46,12
				24	57,3
				48	61,8
Cibacron Blue	<i>C.byrsina</i>	MnSO ₄	0,1	0,5	58,3
				6	63,6
				24	63,6
				48	65,3
Cibacron Blue	<i>C.byrsina</i>	Ácool veratrílico	0,1	0,5	62,2
				6	65,5
				24	65,5
				48	69
Cibacron Blue	<i>Lentinus</i> sp	-	0,1	0,5	23,8
				6	37
				24	43
				48	57
Cibacron Blue	<i>Lentinus</i> sp	ABTS	0,1	0,5	-
				6	-
				24	42,5
				48	44
Cibacron Blue	<i>Lentinus</i> sp	MnSO ₄	0,1	0,5	30
				6	45,8
				24	57
				48	62,7
Cibacron Blue	<i>Lentinus</i> sp	Ácool veratrílico	0,1	0,5	25,3
				6	46
				24	58
				48	66

Nas tabelas 15 e 16 são apresentados os dados dos ensaios de descoloração do corante Reactive Red 120 e vermelho de fenol respectivamente. Apenas a lacase de *Lentinus* sp atuou nesses corantes.

O maior valor obtido na descoloração do Reactive Red foi de 30% em presença de MnSO₄. Este valor foi menor que o de 90,6% obtido por Harazono *et al.* (2003) em experimentos com *Phanerochaete sordida*, porém nesses

experimentos o tempo de tratamento foi de 7 dias, enquanto em nossos experimentos, a incubação foi de 2 dias.

O corante vermelho fenol, uma sulfoftaleína-(SP) foi descolorada em 15% pela lacase de *Lentinnus* sp. em presença de álcool veratrílico (Tabela 16).

Deve-se destacar que as amostras de enzimas utilizadas nos testes não foram concentradas nem tão pouco purificadas como na maioria dos trabalhos realizados em descoloração (HOU *et al.*, 2003).

Shrivastava *et al.* (2004) obteve resultados favoráveis em experimentos com *Pleurotus ostreatus*; concluindo que a descoloração de sulfoftaleínas está relacionada com a atividade de MnP e outro tipo de peroxidase: Mn independente de peroxidase (MIP). Grupos fenólicos livres sofrem ataques sucessíveis da MnP, enquanto que os grupos halogêneos (bromina) são um substrato melhor para as MIP. MIP aparentemente são mais indicadas para degradação de corantes com halogenados aromáticos (SHRIVASTAVA *et al.*, 2004). Destaca-se que nas soluções enzimáticas utilizadas haviam atividades de peroxidases, embora em baixas concentrações.

Novotný *et al.* (2001) obteve 100% de descoloração do azul de bromofenol através do crescimento de *Irpex lacteus*, em meio líquido contendo o corante.

A estrutura molecular do azul de bromofenol é semelhante ao do vermelho fenol, tendo como diferença a presença de átomos de bromo (figura 41).

Figura 41: comparação entre as estruturas químicas de vermelho fenol e azul de bromofenol.

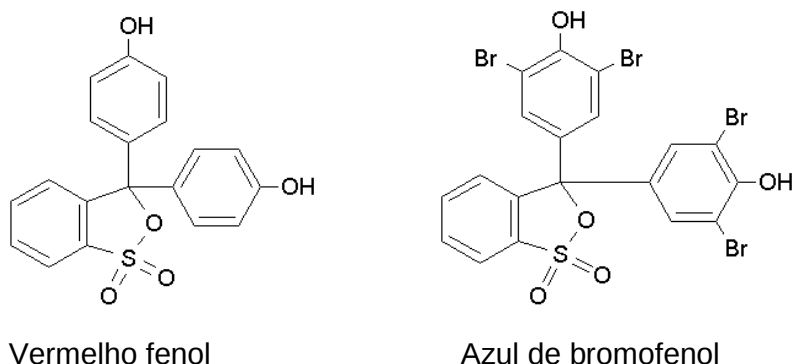


Tabela 15: Taxa de descoloração do corante Reactive Red 120 por *Lentinus* sp.

Corante	Fungo	Substrato (0,1mL)	Quantidade de enzima (mL)	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Reactive Red	<i>Lentinus</i> sp	-	0,1	0,5	-
				6	-
				24	13,7
				48	16
Reactive Red	<i>Lentinus</i> sp	ABTS	0,1	0,5	-
				6	-
				24	-
				48	-
Reactive Red	<i>Lentinus</i> sp	MnSO ₄	0,1	0,5	-
				6	-
				24	26,3
				48	30
Reactive Red	<i>Lentinus</i> sp	Ácool veratrílico	0,1	0,5	-
				6	-
				24	-
				48	-

Tabela 16: Taxa de descoloração do corante vermelho fenol por *Lentinus* sp.

Corante	Fungo	Substrato (0,1mL)	Quantidade de enzima (mL)	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Vermelho Fenol	<i>Lentinus</i> sp	-	0,1	0,5	-
				6	-
				24	-
				48	6
Vermelho Fenol	<i>Lentinus</i> sp	ABTS	0,1	0,5	-
				6	-
				24	-
				48	-
Vermelho Fenol	<i>Lentinus</i> sp	MnSO ₄	0,1	0,5	-
				6	5
				24	6,8
				48	14
Vermelho Fenol	<i>Lentinus</i> sp	Ácool veratrílico	0,1	0,5	-
				6	4,6
				24	7,6
				48	15

Na tabela 17 estão representados os valores da descoloração do corante Azure B. As maiores porcentagens de descolorações por *C. byrsina* foram obtidas em presença de MnSO₄ (29,7%) e álcool veratrílico (24,7%). Raghucumar (2000) obteve em seus experimentos com fungo marinho

(*Flavodon flavus*) uma descoloração do Azure B de 69% após três dias de incubação. Verma *et al.* (2004) obtiveram 93% de descoloração do Azure B com tratamento de Cu (II), H₂O₂ e ácido glucárico.

A ação das enzimas de *Lentinus* promoveu maior descoloração nos ensaios sem substrato (24%), e nos ensaios com os substratos, os valores caíram pela metade, sugerindo que a presença de mediadores foi de alguma forma, prejudicial na ação da enzima.

Levin *et al.*(2004) utilizaram o Azure B como método indicativo de atividade de LiP enquanto Zhao *et al.*, 1996 constataram a descoloração desse corante em ensaios em placas de Petri contendo agar, extrato de malte, glucose e 0,02% Azure B em 14 de 28 fungos testados.

Comparando-se os dados, notamos que a enzima de *C. byrsina* foi mais eficiente na descoloração do Azure B do que a de *Lentinus* sp, pois apesar dos valores máximos serem próximos entre as duas enzimas, as quantidades de enzima utilizada nos testes de *C. byrsina* foi dez vezes menor do que a de *Lentinus* sp.

Tabela 17: Taxa de descoloração do corante Azure B por *C. byrsina* e *Lentinus* sp.

Corante	Fungo	Substrato (0,1mL)	Quantidade de enzima (mL)	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Azure B	<i>C.byrsina</i>	-	0,01	0,5	-
				6	-
				24	9,3
				48	19
Azure B	<i>C.byrsina</i>	ABTS	0,01	0,5	-
				6	-
				24	-
				48	-
Azure B	<i>C.byrsina</i>	MnSO ₄	0,01	0,5	5
				6	11,5
				24	20
				48	29,7
Azure B	<i>C.byrsina</i>	Ácool veratrílico	0,01	0,5	-
				6	5,7
				24	15
				48	24,7
Azure B	<i>Lentinus</i> sp	-	0,1	0,5	7,4
				6	9,7
				24	14
				48	24
Azure B	<i>Lentinus</i> sp	ABTS	0,1	0,5	-
				6	-
				24	3
				48	12
Azure B	<i>Lentinus</i> sp	MnSO ₄	0,1	0,5	-
				6	-
				24	5
				48	10
Azure B	<i>Lentinus</i> sp	Ácool veratrílico	0,1	0,5	-
				6	6
				24	7,8
				48	13

Os experimentos de descoloração com azul de metileno (tabela 18) mostraram que a solução enzimática de *C. byrsina* foi capaz de descolorir em 41% a solução do corante em presença de MnSO₄, enquanto que o *Lentinus* sp descoloriu 24%, também na presença de MnSO₄. O melhor desempenho da lacase de *C. byrsina* comparada ao de *Lentinus* sp ficou constatado não somente pelo maior valor na taxa de descoloração, mas também pelo fato da

quantidade de solução enzimática ser dez vezes menor do que a solução enzimática de *Lentinus* sp.

Bôer *et al.* (2004) relataram a habilidade do fungo *Lentinus edodes* em descolorir em até 61% o corante azul de metileno, após 18 dias de cultivo em meio contendo o corante. Os autores notaram que a ausência de Mn e H₂O₂ nos ensaios afetaram a eficiência da MnP na descoloração do azul de metileno. Em nosso experimento não foi encontrada atividade de MnP nas soluções enzimáticas utilizadas, sugerindo que a lacase ou outra peroxidase possa estar atuando.

Tabela 18: Taxa de descoloração do corante azul de metileno por *C. byrsina* e *Lentinus* sp.

Corante	Fungo	Substrato (0,1mL)	Quantidade de enzima (mL)	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Azul de Metileno	<i>C.byrsina</i>	-	0,01	0,5	5
				6	5
				24	9
				48	19
Azul de Metileno	<i>C.byrsina</i>	ABTS	0,01	0,5	-
				6	-
				24	-
				48	9
Azul de Metileno	<i>C.byrsina</i>	MnSO ₄	0,01	0,5	13
				6	16
				24	30
				48	41
Azul de Metileno	<i>C.byrsina</i>	Ácool veratrílico	0,01	0,5	14,5
				6	15
				24	21
				48	24,5
Azul de Metileno	<i>Lentinus</i> sp	-	0,1	0,5	4
				6	6
				24	13
				48	13
Azul de Metileno	<i>Lentinus</i> sp	ABTS	0,1	0,5	-
				6	-
				24	16
				48	22,7
Azul de Metileno	<i>Lentinus</i> sp	MnSO ₄	0,1	0,5	6,7
				6	12,7
				24	20,4
				48	24
			0,1	0,5	5

Azul de Metileno	<i>Lentinus</i> sp	Álcool veratrílico	6	12
			24	20
			48	20

Na tabela 19 estão representados os resultados da descoloração do corante cristal violeta.

A máxima descoloração observada nos ensaios com solução enzimática de *C. byrsina* foi de 63% na presença de ABTS, o que mostra que este substrato funcionou como mediador da reação da lacase, facilitando a descoloração. Assim como na descoloração do azul de metileno, a enzima encontra-se em quantidade dez vezes menor do que a de *Lentinus* sp.

No caso do *Lentinus* sp, as maiores taxas de descoloração foram de 51% em ausência de substrato e na presença de álcool veratrílico, no entanto não podemos afirmar que a reação de descoloração foi facilitada por algum mediador devido aos resultados serem próximos aos resultados dos ensaios sem substratos.

Esses dados confirmam os de Gill *et al.* (2002), cuja descoloração de 56% do cristal violeta foi observado após 48 horas de incubação com *Phanerochaete chrysosporium* e 96% de descoloração por incubação com *Kurthia* sp. (Sani *et al.*, 1999). Boer *et al.* (2004) obtiveram 77% de descoloração desse corante por *Lentinus edodes*, no entanto foi encontrado apenas atividade de MnP e ausência de atividade de lacase no meio. Knapp *et al.* (1995) observaram 77% de descoloração do cristal violeta por *Pleorotus ostreatus*.

Tabela 19: Taxa de descoloração do corante cristal violeta por *C. byrsina* e *Lentinus* sp.

Corante	Fungo	Substrato (0,1mL)	Quantidade de enzima (mL)	Incubação (horas)	Descoloração (%)
Cristal Violeta	<i>C.byrsina</i>	-	0,01	0,5	4
				6	8,6
				24	33,4
				48	50,3
Cristal Violeta	<i>C.byrsina</i>	ABTS	0,01	0,5	-
				6	-
				24	43,8
				48	63
Cristal Violeta	<i>C.byrsina</i>	Mn ₂ SO ₄	0,01	0,5	3,4
				6	20,4
				24	44,6
				48	57
Cristal Violeta	<i>C.byrsina</i>	Ácool veratrílico	0,01	0,5	9,8
				6	21,7
				24	44
				48	55
Cristal Violeta	<i>Lentinus</i> sp	-	0,1	0,5	-
				6	20,8
				24	50,7
				48	51,7
Cristal Violeta	<i>Lentinus</i> sp	ABTS	0,1	0,5	-
				6	-
				24	38
				48	39
Cristal Violeta	<i>Lentinus</i> sp	MnSO ₄	0,1	0,5	-
				6	21
				24	40
				48	41
Cristal Violeta	<i>Lentinus</i> sp	Ácool veratrílico	0,1	0,5	12,7
				6	26,5
				24	53
				48	51,5

Nas figuras 42 e 43 são mostradas fotos de alguns resultados da descoloração.

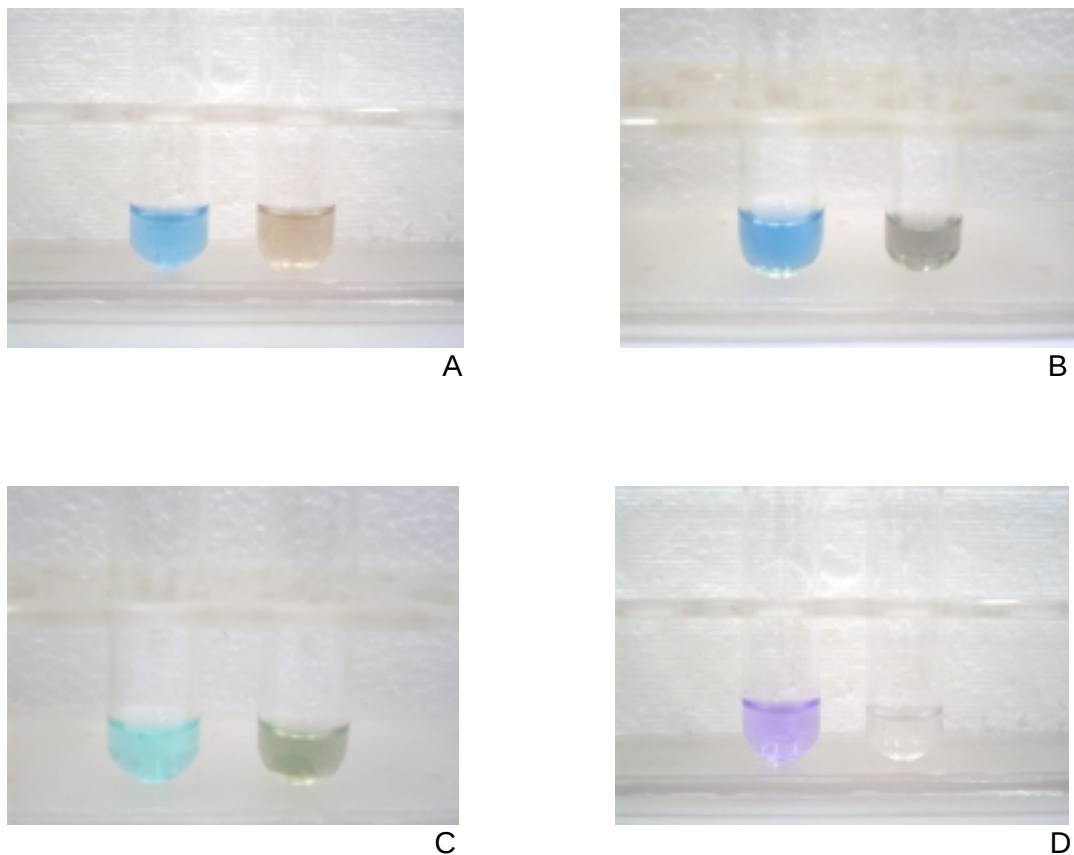


Figura 42: Fotos com descoloração obtida através de incubação por 48 horas dos corantes em solução enzimática bruta de *C. byrsina*. (A) Corante Cibacron Blue; (B) Corante Azul de metileno contendo o substrato MnSO_4 ; (C) Corante Azure B contendo o substrato MnSO_4 ; (D) Corante cristal violeta contendo o substrato ABTS.

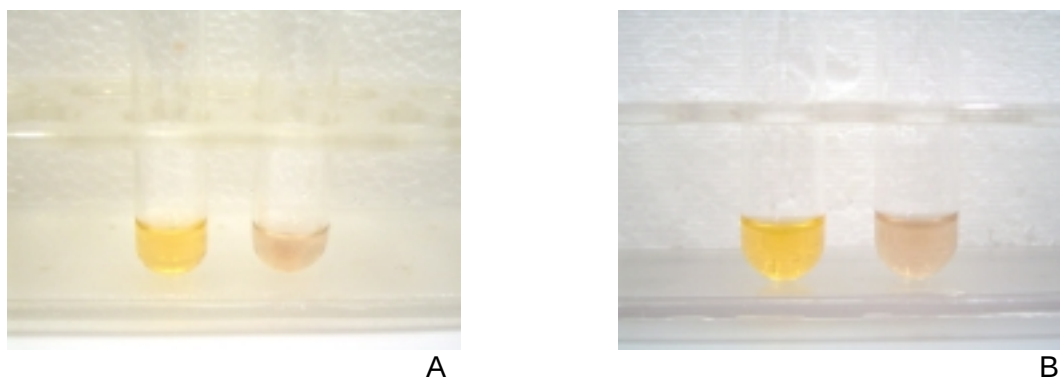


Figura 43: Fotos com descoloração obtida através de incubação por 48 horas dos corantes em solução enzimática bruta de *Lentinus* sp. (A) Corante Orange II contendo o substrato ABTS; (B) Corante Crysophenine contendo o substrato MnSO_4 .

Na tabela 20 está representado um resumo dos resultados obtidos na descoloração dos corantes sintéticos.

Tabela 20: Resumo dos melhores resultados obtidos na descoloração de corantes sintéticos após 48 horas de incubação com solução enzimática bruta.

Corante	Fungo	Substrato (0,1mL)	Volume de solução enzimática bruta (mL)	Descoloração (%)
Orange II	<i>Lentinus</i> sp	ABTS	0,1	63,5
Crysophenine	<i>Lentinus</i> sp	MnSO_4	0,01	28,3
Cibacron Blue	<i>C.byrsina</i>	-	0,1	69,3
Reactive Red	<i>Lentinus</i> sp	MnSO_4	0,1	30
Vermelho Fenol	<i>Lentinus</i> sp	Ácool veratrílico	0,1	15
Azure B	<i>C.byrsina</i>	MnSO_4	0,01	29,7
Azul de Metileno	<i>C.byrsina</i>	MnSO_4	0,01	41
Cristal Violeta	<i>C.byrsina</i>	ABTS	0,01	63

VII. Conclusões

Ao término deste projeto concluímos que:

- Entre os três fungos estudados neste projeto, o *C. byrsina* 16 e o *Lentinus* sp. 48 mostraram boas produções de ligninases, em especial a enzima lacase;
- O farelo de trigo mostrou-se melhor substrato para a produção de ligninases, além de possuir maior quantidade de nitrogênio (2,3%) do que os demais meios testados;
- Os tempos de cultivo em que houveram melhores produções enzimáticas, ficaram compreendidos nas três primeiras semanas, o que viabiliza a utilização comercial das enzimas;
- As soluções suplementadoras de nitrogênio exerceram diferentes efeitos na produção das ligninases, os efeitos variaram conforme o substrato, o organismo e a enzima avaliada;
- A lacase de *C. byrsina* 16 obtida após 3 semanas de fermentação em farelo de trigo com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ teve o pH ótimo 3,5 e temperatura ótima 60°C, atividade residual acima dos 70% entre pH 8,0-9,0 e em temperaturas entre 10°C e 30°C;
- A lacase de *Lentinus* sp. 48 obtida após 2 semanas de fermentação em farelo de trigo com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ teve o pH ótimo em 3,0 e temperatura ótima 65°C, atividade residual acima dos 70% entre pH 4,0-6,0 e temperaturas entre 10°C e 55°C;
- Todos os corantes sintéticos testados sofreram ação enzimática, em especial o Cibacron Blue com 69,3% de descoloração, o Orange II com 63,5% de descoloração, o cristal violeta com 63% de descoloração e o azul de metileno com 41% de descoloração, após 48 horas de tratamento com os extratos enzimáticos brutos.

VIII. Considerações finais

Ficou evidente que as enzimas produzidas pelas linhagens fúngicas aqui utilizadas, são interessantes biotecnologicamente. Outro dado relevante foi a realização de um estudo com fungos de nossa região, sendo que a maioria dos trabalhos publicados referem-se ao *P. chrysosporium*.

Para um estudo mais detalhado da aplicação destas enzimas na decomposição de corantes artificiais seriam necessárias análises dos produtos formados na descoloração em HPLC.

A boa produção de lacase, suas características físico-químicas e o vasto campo de aplicações, tornam esta enzima, uma importante ferramenta a ser utilizada em diversos processos biotecnológicos. Os resultados referentes à produção de lacase obtidos neste trabalho são animadores e nos estimulam a realizar futuros estudos visando produção em maior escala, passo importante para avaliar a viabilidade da produção. Outros experimentos utilizando biologia molecular seriam de importante contribuição para a obtenção de enzimas mais eficientes.

VIII. Referências bibliográficas

AHAMMED, S.; PREMA, P. Influence of media nutrients on synthesis of lignin peroxidase from *Aspergillus sp.* *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 102, p. 327-336, 2002.

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

AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R. A.; KIRK, T.K. *Fungal delignification and biomechanical pulping of wood*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Berlim: Springer, 1997.

AMER, F.I.; DREW, S.W. Microbiology of Lignin Degradation. *Annual Reports on Fermentation Process*, v. 4, p. 67-103, 1980.

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

BAIOCCO, P.; BARRECA, A.M.; FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase–mediator systems. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 1, p. 191-197, 2003.

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.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresearch Technology*, v. 58, p. 217-227, 1996.

BARRECA, A.M.; FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P.; LJUNGGREN, S. Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 26, p. 105-110, 2003.

BAUER, C.G.; KUEHN, A.; GAJOVIC, N.; SKOROBOGATKO, O.; HOLT, P.J.; BRUCE, N.C.; MAKOWER, A.; LOWE, C.R.; SCHELLER, F.W. New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius' Journal Analytical Chemistry*. v. 364, p. 179–183, 1999.

- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology: review. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 355-383, 2000.
- BLANCHETTE, R. A. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal Botanical*, v. 73, p. 999-1010, 1995.
- BLANCHETTE, R. A. Delignification by wood-decay fungi. *Annual Review Phytopathology*, v. 29, p. 381-398, 1991.
- BOER, C. D.; OBICI, L.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. *Bioresource Technology*, v. 94, p. 107-112, 2004.
- BORBONNAIS, R. , PAICE, M. G. Veratrylic alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochemistry Journal*, v. 255, p. 445-450, 1988.
- BOYLE, C.D., KROPP, B.R., REID, I.D. Solubilisation and mineralisation of lignin by white rot fungi. *Applied Environment Microbiology*, v. 58, p. 3217-3224, 1992.
- BROW, A.; ALIC, M.; GOLD, M. H. Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: activation by manganese. *Journal Bacteriology*, v. 173, p. 4101-4106, 1991.
- BUSWELL, J. K.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, v.128, p.81-88, 1995.
- CALL, H. P.; MÜCKE, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lygnozym®-process): Minireview. *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.
- CHAHAL, D. S. Pretreatment of lignoceluloses with steam explosion for production on seed and fuel ethanol. *Anais do II Seminário de Hidrólise enzimática de biomassas*. Maringá, Pr, Brasil, 1985.
- CHERRY, J.R.; LAMSA, M.H.;SCHNEIDER, P.; VIND, J.; SVENDSEN, A.; JONES, A.; PEDERSEN, A. H. Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnology*, v. 17, p. 379-384, 1999.

CHUNG, K. -T.; STEVENS, S.E.; CERNIGLIA, C.E. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Critical Reviews Microbiology*, v. 18, p. 175–190, 1992.

COLLINS, P.J.; FIELD, J.A.; TEUNISSEN, P.; DOBSON, A.D.W. Stabilization of lignin peroxidase in white rot fungi by tryptophan. *Applied Environment Microbiology*, v. 63, p. 2543-2548, 1997.

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

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

DANIEL, G. F.; NILSSON, T. Interactions between soft rot fungi and CCA preservatives in *Betula verrucosa*. *Journal Institute 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. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v. 31, p. 249-260, 1997.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; SARGENT, K. The effect of lignin-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 374-380, 2002.

DE MORAES, S. G.; FREIRE, R.S.; DURÁN, N. Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation process. *Chemosphere*, v. 40, p. 369-373, 2000.

DITTMER, J.K.; PATEL, N.J.; DHAWALE, S.W.; DHAWALE, S.S. Production of multiple laccase isoforms by *P. chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. *FEMS Microbiology Letters*, v. 149, p. 65-70, 1997.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de 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. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis*, v. 28, p. 83-99, 2000.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Oxidative enzymes applied to bioremediation, Proceedings of the first National Meeting Environmental Applied Microbiology, Vol. 1, Campinas, S.P., Brazil, 1997. p. 183. *Chemistry Abstract*, 127 (1997) 310976.

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.

FABBRINI, M.; GENTILI, P.; GALLI, C. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 16, p. 231-240, 2002.

FANG, J.; HUANG, F.; GAO P. Optimization of cellobiose production by *Schizophyllum commune* and effect of the enzyme on kraft pulp bleaching by ligninases. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 957-961, 1999.

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.

FENGEL, D.; WEGENER G., Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions Dietrich Fengel: Gerd Wegener- Berlin, 1984.

FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment International*, v. 30, p. 953-971, 2004.

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

GALHAUP, C.; HALTRICH, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, p. 225-232, 2001.

GARCIA, S.; LATGE, J.P.; PREVOST, M.C.; LEISOLA, M. Wood degradation by white fungi. *Applied Environment Microbiology*, v. 53, p. 2384-2387, 1987.

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

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

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. *Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology*, New York, Ed. W.H. Freeman and Company, cap. 10, p. 335-357, 1995.

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

GODSTEIN, I. S. Chemical from lignocellulose. *Biotechnol and Bioengineering Symposium*, v. 6, p. 293-301, 1976.

HADDADIN, M.S.; AL-NATOUR, R.; AL-QSOUS, S.; ROBINSON, R.K. Bio-degradation of lignin in olive pomace by freshly-isolated species of Basidiomycete. *Bioresource Technology*, v. 82, p. 131-137, 2001.

HALLAKSELA, A. M. Early interactions of *Heterobasidion annosum* and *Stereum sanguinolentum* with non-decay fungi and bacteria following inoculation into stems of *Picea abies*. *European Journal Forest Pathology*, v. 23, p. 416-430, 1993.

HATVANI, N.; MÉCS, I. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 381-386, 2002.

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, n. 5, p. 455-459, 2003.

HEINFLING, A.; BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. Biodegradation of azo and phtalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 48, p. 261-266, 1997.

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

JAROSZ-WILKOŃ, A.; SKA-RDEST, J.; MALARCYK, E., WARDAS, W.; LEONOWICZ, A. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 566-572, 2002.

JEFFRIES, T.W.; CHOI, S.; KIRK, T.K. Nutrition regulation of lignin degradation by *Phanerochaetes chrysosporium*. *Applied Environment Microbiology*, v. 42, p. 290-296, 1981.

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

KANTELIEN, A.; HATAKKA, A.; VIKARI, L. Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlebia radiata*. *Applied Microbiology. Biotechnology*, v. 31, p. 234-239, 1989.

KARAM, J.; NICELL, J.A. Potential applications of enzymes waste treatment. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*, v. 69, p. 141-145, 1997.

KENNETH E. HAMMEL; MARK A. MOEN. Depolymerization of a synthetic lignin *in vitro* by lignin peroxidase. *Enzyme Microbial Technology*, v. 13, p. 15-18, 1991.

KERSTEN, P.J.; TIEN, M.; KALYANARAMAN B.; KIRK TK. The ligninases of *Phanaerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 260, p. 2609-2612, 1985.

KEYSER, P.; KIRK, T. K.; ZEIKUS, J. G. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaetes chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *Journal of Bacteriology*, v. 135, p. 790-797, 1978.

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

KIRK, T. K.; TIEN, M.; FAISON, B. D. Biochemistry of the oxidation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium* REVIEW ARTICLE. *Biotechnology Advances*, v. 2, p. 183-199, 1984.

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

KOSARIC, N. Ethanol fermentation. In: Rehn, H. J. and Reed, G. (eds.). *Biotechnology*, v. 3, p. 257-385, 1988.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.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.

LARSSON, S.; CASSLAND, P.; JONSSON, L.J. Development of a *Sacharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Applied Environment Microbiology*, v. 67, p. 1163-1170, 2001.

- LEATHAM, G. F. The ligninolytic activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiological Biotechnology*. v. 24, p. 51-58, 1986.
- LEATHAM, G. F.; KIRK, T. K. Regulation of lignolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *Microbiology Letters.*, v. 16, p. 65-67, 1983.
- LEVIN, L.; PAPINUTTI, L.; FORCHIASSIN, F. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology*, v. 94, p. 169-176, 2004.
- LEONTIEVSKY, A.A.; MYASOEDOVA, N. M.; BASKUNOV, B. P.; EVANS, C. S.; GOLOVLEVA, L. A.; Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. *Biodegradation*, v.11, p. 331-240, 2000.
- LIMURA, Y.; IKEDA, S.; SONOKI, T.; HAYAKAWA, T.; KAJITA, S.; KIMBARA, K.; TATSUMI, K.; KATAYAMA, Y. Expression of a gene for Mn-peroxidase from *Coriolus versicolor* in transgenic tobacco generates potential tools for phytoremediation. *Applied Microbiological Biotechnology*. v. 59, p. 246-251, 2002.
- MARTINS, M. A. M.; FERREIRA, I. C.; SANTOS, I. M.; QUEIROZ, M. J; LIMA, N. Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, v. 89, p. 91-98, 2001.
- MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 949-954, 2002.
- MÁXIMO, C.; MARIA T. P. A.; COSTA-FERREIRA, M. Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp. CCMI 1019. *Enzyme Microbial Technology*, v. 32, p. 145-151, 2003.
- MCDUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, D.; HILLMAN, J. R. Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *Journal Science Food Agricultural*, v. 70, p. 133-150, 1996.
- MCGUIRL, M.A ; DOOLEY, D.M. Copper containing oxidases. *Current Opinion Chemistry Biology*, v. 3, p.138, 1999.
- MEMILLIN, D.R.; EGGLESTON, M.K. Bionorganic chemistry of laccase in: A.Messerschmidt (ED). Multi-Copper Oxidases. *Word Scientific*, p. 129, 1997.

MIELGO, I.; MOREIRA, M. T.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M. A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II). *Journal of Biotechnology*, v. 89, p. 99-106, 2001.

MOREIRA, P. R.; ALMEIDA-VARA, E.; SENA-MARTINS, G.; POLÓNIA, I.; MALCATA, F. X.; DUARTE, J. C. Decolourisation of Remazol Brilliant Blue R via novel *Bjerkandera* sp. strain. *Journal of Biotechnology*, v. 89, p. 107-111, 2001.

MOYSON, E.; VERACHTERT, H. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. *Applied Microbiological Biotechnology*, v. 36, p. 421-424, 1991.

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

MICHAELS, G.B.; LEWIS, D. L. Sorption and toxicity of azo and triphenylmethane dyes to aquatic microbial populations. *Environmental Toxicology Chemistry*, v. 4, p. 45-50, 1985.

MIELGO, I.; MOREIRA, M. T.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M. A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II). *Journal of Biotechnology*, v. 89, p. 99-106, 2001.

MONTGOMERY, R. A. P. The role of polycssaccharidase 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.

MOREIRA, P. R.; ALMEIDA-VARA, E.; SENA-MARTINS, G.; POLÓNIA, I.; MALCATA, F. X.; DUARTE, J. C. *Jornal of Biotechnology*, v. 89, p. 107-111, 2001.

NOGUEIRA, R. F. P. Síntese e degradação de composto-modelo de lignina por *Chrysonilia sitophila* (T F B 27441) 1990. Dissertação (Mestre em química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NOVOTNÝ, C.; RAWAL, B.; BHATT, M.; PATEL, M.; SASEK, V.; MOLITORIS, H. P. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Jornal of Biotechnology*, v. 89, p. 113-122, 2001.

NÜSKE, J.; [SCHEIBNER, K.](#); [DORNBERGER, U.](#); [ULLRICH, R.](#); [HOFRICHTER, M.](#) Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. [Enzyme and Microbial Technology](#), v. 30, p. 556-561, 2002.

OLLIKKA, P.; ALHONMÄKI, K.; LEPÄNEN, V. M.; GLUMOFF, T.; RAIJOLA, T.; SUOMINEN, I. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and

polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 4010-4016, 1993.

O'NEILL, C.; LOPES, A.; ESTEVES, S.; HAWKES, F.R.; HAWKES, D. L.; WILCOX, S. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 53, p. 249-254, 2000.

PALMIERI G.; GIARDINA P; BIANCO C; SCALONI A; CAPASSO A; SANNIA G. Copper induction of laccase isoenzymes in the lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.920-924, 2000.

PASTI-GRIGSBY, M. B.; PASZEYNSKI, A.; GOSZEZYNSKI, S.; CRAWFORD, D. L.; CRAWFORD, R. L. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 58, p. 3605-3613, 1992.

PASZEYNSKI, A.; HUYNH, V-B; CRAWFORD, R. Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 29, p. 37-41, 1985.

PASZEYNSKI, A.; PASTI-GRIGSBY, M. B.; GOSZEZYNSKI, S.; CRAWFORD, R. L.; CRAWFORD, D. L. mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58 (11), p. 3598-3604.

PLATT, M. W.; HADAR, Y.; CHET, I. Fungal activities involved in lignocellulose degradation by *Pleurotus*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 20, p. 150-154, 1984.

RAGHUKUMAR, C. Fungi from marine habitats: an application in bioremediation. *Mycology Research*, v.104 (10), p.1222-1226, 2000.

RATTO, M.; MATHRANI, I. M.; AHRING, B.; VIIKARI, L. Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus* sp. in enzymatic treatment of kraft pulps. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 41, p. 130-133, 1994.

REDDY, C.A. An overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *P.chrysosporium*. *Journal Biotcnology*, v. 30, p. 91-107, 1993.

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

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

SANI, R. K.; BANERJEE, U. C. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 433-437, 1999.

SANNIA, G.; LIMONAGI, P.; COCCA, E.; BUONOCORE, F.; NITTI, G.; GIARDINA, P. Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from a lignin-degrading Basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Biochemistry Biophysics Acta*, v. 73, p. 114-119, 1991.

SARKANEN, K.V.; LUDWIG, C.H.; SEVILI, M.; DESTEFANO, G.; PICQUADIO, P.; SCIANCALEPORE, V., A novel method for removing phenols from grape must. *American Journal Enology*, v. 51, 357-361, 2000.

SCHOEMAKER, H. E.; HARVEY, P.J.; BOWEN, R. M.; PALMER, J. M. On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. *FEBS Letters*, v.183, p. 7-12, 1985.

SELVAM, K.; SWAMINATHAN, K.; CHAE, KEON-SANG. Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. *Bioresource Technology*, v. 88, p. 115-119, 2003.

SHRIVASTAVA, R.; CHRISTIAN, V.; VYAS, B. R. M. Enzymatic decolorization of sulfonphthalein dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, no prelo, 2004.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by products. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, p. 318-324, 2002.

SMITS, J. P.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; SCHLÖSSER, E. E.; KNOL, W. Accurate determination of process variables in a solid-state fermentation system. *Process Biochemistry*, v 31, n.7, p. 669-678, 1996.

SOARES, G. M. B.; PESSOA de AMORIM, M. T.; 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.

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 pretreated poplar wood by filamentous fungi. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 13, p. 487-490, 1997.

TIEN, M.; KIRK, K.T. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In: Wood, K.; Kellogg, S. T. *Methods Enzymology*, v. 161, part B, p. 238-249, 1988.

TUOR, U.; WARIISHI, H.; SHOEMAKER, H.E.; GOLD, M.H. Oxidation of phenolic arylglycerol β -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.

VERMA, P.; BALDRIAN, P.; GABRIEL, J.; TRNKA, T.; NERUD, F. Copper-ligand complex for the decolorization of synthetic dyes. *Chemosphere*, v. 57, p. 1207-1211, 2004.

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.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M.H. Oxidative cleavage of phenolic diarylpropane lignin model dimmer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*, v. 28, p. 6017-6023, 1989.

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.

WWW.SIGMA-ALDRICH.COM, (7 de Outubro, 2004).

WUBAH, D.; AKIN, D.; BORNEMAN, W. Biology, Fiber-Degradation and Enzymology of Anaerobic Zoospore Fungi. *Critical Review Microbiology*, v. 19, p. 99-115, 1993.

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). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

XU, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials and halide inhibition. *Biochemistry*, v. 35, p. 7608-7611, 1996.

XU 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.

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

ZADRAZIL, F.; BRUNNERT, H. Influence of ammonium nitrate supplementation on degradation and in vitro digestibility of straw colonized by higher fungi. *European Applied Microbiology Biotechnology*, v. 9, p. 37-44, 1980.

ZHANG, F. M.; KNAPP, J. S.; TAPLEY, K. N. Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 48-53, 1999.

ZHAO, J.; DE KOKER, T.; JANSE, B. J. H. comparative studies of lignin peroxidases and manganase-dependent peroxidases produced by selected white rot fungi in solid media. *FEMS Microbiology Letters*, v. 143-399, 1996.