



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LACASE DO FUNGO**

*Trametes cubensis* (Mont.) Sacc. 1891

ANDREY AZEDO DAMASCENO

MANAUS - AM

2016

ANDREY AZEDO DAMASCENO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LACASE DO FUNGO**

*Trametes cubensis* (Mont.) Sacc. 1891

Tese apresentada como requisito à obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-PPGBIOTEC da Universidade Federal do Amazonas.

**Orientadora: Dra. Ceci Sales-Campos**

MANAUS - AM

2016

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me protegido e guiado meus passos e me dado forças para persistir em todos os obstáculos que superei durante o presente trabalho e os momentos difíceis de minha vida;

À Prof. Dra. Ceci Sales-Campos pela paciência, orientação, amizade e confiança durante a realização deste trabalho;

Ao Professor Dr. Ademir Castro e Silva pela paciência, orientação, amizade e confiança durante a realização deste trabalho;

Ao Professor Dr. Adolfo Mota pela identificação molecular do fungo;

Ao Professor Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio pela ajuda na molecular e contribuições para a realização deste trabalho;

À Dra. Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreira pela paciência e dedicação quanto às análises de dados na purificação da proteína, os meus sinceros agradecimentos;

Ao meu Amigo Emerson Bacellar pela ajuda em todos os momentos de minha acadêmica;

À Universidade do Federal do Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-PPGBIOTEC pela oportunidade de aperfeiçoar os meus conhecimentos;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela oportunidade da Pesquisa;

À Larrisa Chevreuil pelas sugestões e correções;

Aos meus familiares;

Aos meus filhos Ana Gabriela de Abreu Damasceno, Pedro Luca Carmo Damasceno e Andrey Azevedo Damasceno;

À minha Mãe Maria José Azêdo;

À minha Tia Maria do Carmo Gomes;

À minha Irmã Alessandra Azedo e meu irmão Márcio Azedo;

A todos os amigos e amigas que me acompanharam neste trabalho, em especial, Márcia Jaqueline Maciel, Anita de Souza, Edson do Carmo, Lindimar Rosas, Maria Dolores, Sarah Raquel, André Higa;

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos durante o período do curso;

Ao Projeto Capes Pró-Amazônia pelo apoio financeiro;

**Muito Obrigado!**

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	15
3.1. O mercado mundial de enzimas.....	15
3.2. As Enzimas .....	15
3.2.1. Enzimas ligninolíticas .....	16
3.2.1.1. Lacases .....	17
3.3. Aplicações biotecnológicas dos fungos da degradação branca .....	20
3.4. Basidiomicetos do gênero Trametes .....	23
4. OBJETIVOS .....	25
4.1 Geral.....	25
4.2 Específicos .....	25
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5.1. Seleção do fungo .....	26
5.2. Determinação qualitativa da atividade de fenol-oxidases .....	26
5.3. Identificação Molecular.....	27
5.3.1. Extração do DNA total .....	27
5.3.2. PCR.....	28
5.3.3. Reação de sequenciamento .....	28
5.3.4. Precipitação das reações de sequenciamento .....	29
5.3.5. Análise automática e processamento das sequências .....	29
5.4. Condições de cultivo .....	29
5.4.1. Fermentação Submersa (FSm).....	29
5.4.2. Fermentação semi-sólida (FSS).....	30
5.5. Extração enzimática proveniente de FSm e FSS.....	30
5.5. Detecção das atividades enzimáticas .....	31
5.5.1. Lacase.....	31
5.5.2. Manganês peroxidase .....	31
5.5.3. Lignina peroxidase .....	31
5.6. Quantificação de proteínas proteíνας totais .....	32
5.7. Purificação da lacase .....	32
5.7.1. Precipitação com sulfato de amônio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) .....	32
5.7.2. Cromatografia de troca iônica .....	33

5.8. SDS-PAGE e zimograma .....	33
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6.1. Análise qualitativa da atividade de fenol-oxidases .....	34
6.2. Identificação molecular .....	36
6.3. Atividade da lacase.....	37
6.4. Atividade da lignina peroxidase (LiP) .....	45
6.5. Atividade da manganês peroxidase (MnP) .....	47
6.6. Purificação da lacase .....	51
6.7. SDS-PAGE.....	52
7.1. Considerações Finais .....	55

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Função do mediador na atividade enzimática das lacases.....	18
<b>Figura 2.</b> Fluxograma de atividades.....	27
<b>Figura 3.</b> Atividade de fenol-oxidases (formação de halo) produzidas por <i>P. sanguineus</i> , <i>L. crinitus</i> , <i>H. glabra</i> , <i>Trametes</i> sp. CEST 03 e <i>Trametes</i> sp. CEST 04, a partir do teste de <i>Bavendamm</i> .....	34
<b>Figura 4.</b> Árvore filogenética comparando as sequências do fungo CEST 003 com sequências de linhagens depositadas no NCBI.....	36
<b>Figura 5.</b> Atividade da lacase em fermentação em estado semi-sólido (FSS), durante 25 dias de cultivo, suplementada com marupá, bagaço de cana e solução nutritiva.....	37
<b>Figura 6.</b> Atividade de lacase em fermentação submersa (FSm), em meio de cultivo contendo extrato de malte, suplementado com CuSO <sub>4</sub> e ABTS, aos 25 dias de cultivo.....	39
<b>Figura 7.</b> Atividade da lacase em fermentação submersa (FSm), em meio Czapek, suplementado com CuSO <sub>4</sub> e ABTS, durante 25 dias de cultivo.....	41
<b>Figura 8.</b> Atividade da lacase em fermentação em estado semi-sólido (FSS), durante 25 dias de cultivo suplementada com bagaço de cana, marupá e solução nutritiva.....	42
<b>Figura 9.</b> Atividade da lacase em fermentação submersa (FSm), em meio de cultivo contendo extrato de malte e Czapek suplementados com CuSO <sub>4</sub> e ABTS.....	43
<b>Figura 10.</b> Regressão linear da atividade da lacase em fermentação semi-sólida (FSS) em função do tempo, em meio de cultivo suplementado com marupá, bagaço de cana e solução nutritiva.....	44
<b>Figura 11.</b> Regressão linear da atividade da lacase em fermentação submersa (FSm) em função do tempo, em meio de extrato de malte e Czapek, suplementados com CuSO <sub>4</sub> e ABTS.....	45
<b>Figura 12.</b> Atividade da lignina peroxidase em fermentação em estado semi-sólido (FSS), durante 25 dias de cultivo, em meio suplementado com marupá, bagaço de cana e solução nutritiva.....	46
<b>Figura 13.</b> Atividade da lignina peroxidase em fermentação submersa (FSm) utilizando meio Czapek, suplementado com CuSO <sub>4</sub> e ABTS, durante 25 dias de cultivo.....	47
<b>Figura 14.</b> Atividade da lignina peroxidase em fermentação submersa (FSm) utilizando meio extrato de malte, suplementado com CuSO <sub>4</sub> e ABTS, durante 25 dias de cultivo.....	47
<b>Figura 15.</b> Atividade da manganês peroxidase (MnP) em fermentação em estado semi-sólido (FSS), durante 25 dias de cultivo, utilizando resíduo de marupá e bagaço de cana....	48
<b>Figura 16.</b> Atividade da manganês peroxidase (MnP) em fermentação em estado semi-sólido (FSS), durante 25 dias de cultivo, utilizando resíduo de marupá e bagaço de cana, suplementados com solução nutritiva.....	48
<b>Figura 17.</b> Atividade da manganês peroxidase (MnP) em fermentação submersa (FSm), durante 25 de cultivo, em meio extrato de malte, suplementado com CuSO <sub>4</sub> e ABTS.....	49
<b>Figura 18.</b> Atividade da manganês peroxidase (MnP) em fermentação submersa (FSm), durante 25 de cultivo, em meio extrato de malte, suplementado com CuSO <sub>4</sub> e ABTS.....	50
<b>Figura 19.</b> Gráfico de Lineweaver-Burk ou duplo-recíproco.....	52
<b>Figura 20.</b> SDS-PAGE e zimograma da lacase parcialmente purificada de <i>Trametes</i> sp.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Produção de lacases fúngicas por fermentação submersa e fermentação no estado sólido.....	<b>20</b>
<b>Tabela 2.</b> Aplicação de fungos de degradação branca em ensaios de biotratamento de diferentes compostos.....	<b>22</b>
<b>Tabela 3.</b> Modelos de ajustamento de curvas entre os tratamentos.....	<b>36</b>
<b>Tabela 4.</b> Purificação e rendimento em diferentes etapas de purificação de lacase de <i>Tramets cubensis</i> .....	<b>51</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS – 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico)  
BC – Bagaço de cana  
BC+M – Bagaço de Cana consorciado à serragem de marupá (*Simaruba amara* – Aubl.)  
BC+ KARP - Bagaço de cana consorciado ao meio mineral **KARP**  
BC+ CZP - Bagaço de cana consorciado ao meio de cultura Czapek  
BC + SC - Bagaço de cana consorciado ao Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>)  
DMP - 2,6-dimetoxifenol  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
FSm – Fermentação submersa  
FSS – Fermentação Semi-sólida  
FSm + CZP - Fermentação submersa usando o meio Czapek  
FSm + CZP+ ABTS - Fermentação submersa usando o meio Czapek e ABTS  
FSm + EM - Fermentação submersa usando o meio extrato de malte  
FSm + EM+ ABTS- Fermentação submersa usando o meio extrato de malte usando e ABTS.  
FSm + EM+ SC- Fermentação submersa usando o meio extrato de malte + Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>)  
His – Histidina  
ITS – Espaçador interno transcrito kb – quilobases  
MnP – Manganês peroxidase  
M – Serragem de marupá (*Simaruba amara* – Aubl).  
M+ BC- Serragem de marupá associado ao bagaço de cana  
M+K- Serragem de marupá associado ao meio mineral de (KARP 2012)  
M+BC+K- Serragem de marupá associado ao bagaço de cana em meio mineral de (KARP 2012)  
U – Unidade de atividade enzimática  
U mL<sup>-1</sup> Unidade de atividade enzimática por mililitro  
U g<sup>-1</sup> Unidade de atividade enzimática por grama na base seca  
U L<sup>-1</sup> Unidade de atividade enzimática por litro

## RESUMO

O crescente interesse pelas enzimas fúngicas vem em função da sua potencialidade para uso industrial, bem como na pesquisa biotecnológica. Neste contexto, a enzima lacase (EC 1.10.3.2) destaca-se pelo seu potencial uso em diversas aplicabilidades industriais. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi caracterizar a enzima lacase produzida pelo fungo amazônico *Trametes cubensis*. A cepa de *T. cubensis* foi coletada na Floresta Nacional de Tefé (FLONA) e determinada a atividade enzimática a partir da fermentação submersa e semi-sólida. Como substrato testou-se serragem da madeira de *Simarouba amara* e bagaço-de-cana de açúcar. Como indutores utilizou-se sulfato de cobre, ABTS e meio mineral. A lacase foi purificada por meio de cromatografia de troca iônica e caracterizada quanto à massa (SDS-PAGE e zimograma) e determinados os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$ . A atividade de lacase mais expressiva ocorreu no meio com substrato de *Simarouba amara* (marupá) com 184 U/mL. O rendimento foi de 40% e fator de purificação de 1,5, com  $V_{max}$  e  $K_m$  de 33,33  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  6,66 mM, respectivamente. A lacase proveniente de *Trametes cubensis* apresenta massa molecular aparente de, aproximadamente, 40 kDa. Nesse sentido, a partir do cultivo de *Trametes cubensis* é possível obter lacases, contudo, estudos ainda são necessários no que se refere ao uso de diferentes indutores, visando uma potencialização dessa atividade.

**Palavras-chave:** Proteínas fúngicas; prospecção de biomoléculas, cogumelos.

## ABSTRACT

The following interest in fungal enzymes comes about their potential for industrial use, as well as biotechnological research. In this context, the enzyme laccase (EC 1.10.3.2) stand out by its potential use in several industrial applications. Thus, the main goal of this research was to characterize the laccase enzyme produced by the Amazonian fungus *Trametes cubensis*. The *T. cubensis* strain was collected in Tefé National Forest (FLONA) and the enzymatic activity was determined from the submerged and semi-solid fermentation. As substrate, sawdust of the wood of *Simarouba amara* and sugarcane bagasse was tested. As inductors, copper sulfate, “ABTS” and mineral medium were used. The laccase was purified by means of ion exchange chromatography and characterized by mass (SDS-PAGE and zymogram) and determined kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$ . The most expressive laccase activity occurred in the medium with substrate of *Simarouba amara* (marupá) with 184 U / mL. The yield was 40% and purification factor of 1.5, with  $V_{max}$  and  $K_m$  of 33.33  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  6.66 mM, respectively. The becoming laccase from *Trametes cubensis* has an apparent molecular mass of approximately 40 kDa. In this way, from the cultivation of *Trametes cubensis*, it is possible to obtain laccases, however, the study is still necessary in reference the use of different inductors, looking for a potentialization of this activity.

Key words: Fungal proteins; Biomolecules prospecting, mushrooms

## 1. INTRODUÇÃO

O avanço mundial no mercado das enzimas deve-se ao desenvolvimento de tecnologias enzimáticas e à uma série de bioprocessos industriais e ambientais. Ao passo que a preferência pelo uso de enzimas em processos industriais está relacionado à função, especificidade e natureza proteica (BON et al., 2008).

A necessidade de uma produção industrial que cause pouco ou nenhum dano ambiental e que ainda mantenha as características de lucratividade é um desafio que promete impulsionar o mercado e a sociedade, de modo geral, e particularmente o mercado mundial de enzimas (DO VALLE, 2012).

Muitas aplicações enzimáticas estão disponíveis no mercado em diferentes graus de pureza. Essas enzimas apresentam as mais variadas finalidades e apresentam aplicação nos mais diversos setores da indústria como, por exemplo, alimentícias, têxteis, fármacos, clarificação de sucos e mais recentemente, na biorremediação de compostos recalcitrantes.

No Brasil, o avanço da tecnologia enzimática é favorecido pela biodiversidade e variedade de matérias-primas renováveis. A maior biodiversidade do mundo concentra-se na região Amazônica e estudos da diversidade biotecnológica com ênfase nos fungos basidiomicetos com potencial biotecnológico enzimático tem despertado o interesse de pesquisadores (ANDRADE, 2011).

Os micro-organismos são notavelmente uma excelente alternativa na produção de enzimas de interesse industrial isso em função da grande biodiversidade existente destes organismos, permitindo, assim, a obtenção de enzimas com características diversas e com aplicabilidades variadas, podendo ainda ser aplicadas nas mais distintas condições físico-químicas, permitindo que cada bioprocessos possa ter um tipo de enzima que melhor se adapte a ele (STOLP, 1988; MADIGAN et al., 2004).

As enzimas são fundamentais para qualquer processo bioquímico. Atuando em sequências organizadas, catalisando centenas de reações sucessivas pelas quais moléculas são degradadas. A energia química é mantida e transformada, sendo as macromoléculas sintetizadas a partir de moléculas simples. Exceto um pequeno grupo de moléculas de RNA que possuem propriedades catalíticas (ribozimas), todas as enzimas são proteínas, e sua atividade catalítica depende da integridade da sua conformação proteica nativa (NELSON; COX, 2006).

A grande variedade de substratos que a lacase é capaz de hidrolisar é uma característica extremamente interessante, que direciona o seu emprego, principalmente, na

biorremediação de compostos recalcitrantes convertendo-os em estruturas menores sendo, portanto, mais fáceis de serem absorvidos pelo solo. Temos aplicações da enzima para: efluentes de indústrias farmacêuticas, na indústria alimentícia, indústria de celulose e papel, indústria têxtil. (MACIEL; CASTRO E SILVA; RIBEIRO, 2010).

A maioria das lacases estudadas são proteínas extracelulares monoméricas glicosiladas, havendo também referências a homodímeros. As lacases também podem ser intracelulares, diméricas ou tetraméricas (MINUSSI et al., 2002; RIVA, 2006; HILDÉN et al., 2009).

A Fermentação Semi-Sólida (FSS) utiliza-se de substratos insolúveis ou não em água com teor de umidade suficiente para garantir o crescimento e o metabolismo do micro-organismo (DURAND et al., 1988; SCHMIDELL, et al., 2011).

Pesquisas têm evidenciado que a produção enzimática por Fermentação Semi-Sólida (FSS) apresentam bons níveis de atividade e propriedades funcionais adequadas às aplicações industriais quando comparada com a Fermentação Submersa (FSm), além das enzimas apresentarem boas propriedades de estabilidade do pH e temperatura (BIANCHI et. al., 2001; PALMA, 2003). Por outro lado, pesquisas tem mostrado que os fungos apresentam respostas diferenciadas para as mesmas classes de enzimas quando cultivadas em diferentes sistemas de fermentação (SUPRABHA et. al., 2008; BISWAS et. al., 1990).

O substrato exerce influência significativa na produção e atividade enzimática. O bagaço de cana de açúcar e o farelo de trigo são os substratos mais utilizados na fermentação, pelo baixo custo e por apresentarem resultados satisfatórios na produção de enzimas (SCHMIDELL et al., 2001).

A recuperação e purificação, também conhecida como “*downstream processing*”, é uma etapa complexa e de alto custo. O processo de purificação de proteína é iniciado em etapas iniciais de separação e precipitação de proteínas com uso de sais (*salting-out*) e solventes orgânicos que diminuem a solubilidade e reduzem a capacidade de solvatação da água promovendo agregação e precipitação das proteínas (WATANABE, 2004).

Neste *mister* é preciso incrementar pesquisas no que se refere à produção, atividade e caracterização destas enzimas de interesse industrial, principalmente a lacase, enzima que está diretamente associada ao processo de biodegradação de compostos recalcitrantes.

Diante do exposto, estudos envolvendo a exploração da biodiversidade fúngica pertencente à Amazônia são essenciais tanto do ponto de vista de conhecimento dessa diversidade, como na possível obtenção de enzimas de possível aplicação industrial, como as lacases.

## **2. JUSTIFICATIVA**

O crescente interesse mundial pelas enzimas fúngicas deve-se ao fato do potencial de usá-las em várias aplicações industriais, além do aumento da demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas.

Dados do Ministério do Desenvolvimento e Comércio Exterior do Governo Federal relatam que o mercado de enzimas no Brasil, no ano de 2007, foi de US\$ 95,7 milhões no total de importações, enquanto que as exportações foram de US\$ 5,4 milhões.

Este cenário mostra que o mercado brasileiro é essencialmente importador, indicando desvantagens tecnológicas e estratégica em termos de produção e uso das enzimas no País a despeito de possuímos um imenso depositário de diversidade fúngica quase que totalmente desconhecida que é a Amazônia.

Nesse contexto, a busca pelo uso alternativo de novos microorganismos presentes na Amazônia, visando a produção de enzimas de interesse comercial torna-se essencial. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi purificar e caracterizar uma enzima lacase produzida pelo fungo Amazônico (CEST 003), cultivados em diferentes meios de cultivo.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1. O mercado mundial de enzimas**

As pesquisas em biotecnologia têm sido impulsionadas nos últimos anos por uma produção industrial que impacte o menos possível o meio ambiente, mas que continue com a sua lucratividade. Neste contexto, o mercado mundial de enzimas vislumbra grande potencial para uma demanda crescente de uma sociedade que se preocupa com o meio ambiente (Sant'Anna Jr., 2001; Bon *et al.*, 2008).

Contudo, um dos grandes desafios consiste no nível de sofisticação tecnológica associado ao uso de enzimas nos processos industriais, que tem sido um gargalo para as economias emergentes e favorecido a concentração da demanda por enzimas a mercados de países desenvolvidos. Mesmo a despeito desse cenário, estimou-se um crescimento na demanda por enzimas de 6,8% ao ano em 2015, tendo nos mercados da América do Sul e Central, na África e Oriente Médio, os maiores crescimentos (FREEDONIA, 2011; BCC, 2012).

O mercado de enzimas para diagnóstico e biotecnologia tem liderado o crescimento em função da redução dos custos de sequenciamento de DNA nos últimos anos. A demanda da indústria de ração animal e da indústria de bebidas e alimentos por enzimas para uso no seu processo produtivo tem impulsionado os mercados emergentes (FREEDONIA, 2011).

#### **3.2. As Enzimas**

A União Internacional de Bioquímica (IUB) classifica as enzimas em 6 classes: (I) Oxidorredutases, (II) transferases, (III) hidrolases, (IV) liases, (V) isomerases; (VI) ligases (FORGIARINI, 2006).

Cada classe tem critérios específicos como, por exemplo, as oxidorrredutases onde se agrupam as enzimas que catalisam reações de oxi-redução através da transferência de elétrons enquadrando-se nesta classe as desidrogenases, redutases e as oxidases.

No grupo das transferases estão as enzimas que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc., como as quinases e as transaminases, enquanto que nas hidrolases classificam-se as enzimas que catalisam reações de hidrólise de ligação covalente, como ocorre nas peptidases. Na classe das liases estão enzimas como as desidratases e as descarboxilases que catalisam a quebra de ligações covalentes e dispõe moléculas de água, amônia e gás carbônico. Na classe das isomerases estão àquelas que catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos como as epimerases e nas ligases estão classificadas as enzimas que catalisam, à custa de

energia (ATP), reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes (FORGIARINI, 2006).

Vários processos industriais tem mostrado interesse nas enzimas da classe oxidoreductase, dentre as quais se encontram as peroxidases, capazes de utilizarem peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação de compostos orgânicos e inorgânicos (ENGLISH; TSAPRAILIS, 1995; WELINDER et al., 1992). Estas enzimas podem ser isoladas de uma ampla variedade de organismos tendo a grande maioria a protoporfirina IX (heme) como grupo prostético. Autores subdividem em duas superfamílias: a das peroxidases de mamíferos e das peroxidases de planta (ENGLISH; TSAPRAILIS, 1995; WELINDER et al., 1992). A superfamília das peroxidases de plantas são classificadas em três classes distintas: peroxidases intracelulares (Classe I); peroxidases fúngicas extracelulares (Classe II), como, por exemplo, a lignina-peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP) de *Phanerochaete chrysosporium* além de outras peroxidases de fungos do grupo dos basidiomicetos envolvidos na degradação de lignina e peroxidase extracelular de plantas (Classe III) (WELINDER; GAJHEDE, 1993; CONESA et al., 2002).

### 3.2.1. Enzimas ligninolíticas

As enzimas do grupo das ligninolíticas, inclusas na classe oxidoreductase, têm grande interesse biotecnológico, biocatalítico e aplicabilidade industrial. A estrutura molecular dessas enzimas é constituída por uma parte proteica que pode estar integrada a moléculas de carboidratos e lipídios. O seu poder catalítico é dependente de condições específicas de pH, temperatura e força iônica do meio. Ressalta-se, entretanto, que apesar da atividade catalítica, algumas enzimas requerem cofatores de natureza não protéica (coenzimas) que podem ser íons ou moléculas orgânicas (SANT'ANNA JR., 2001; BON et al., 2008).

As principais enzimas ligninolíticas que são produzidas extracelularmente por fungos filamentosos incluem manganês peroxidases (MnP; E.C. 1.11.1.13), lignina peroxidases (LiP; E.C. 1.11.1.14) e lacases (Lac; E.C. 1.10.3.2) complexo enzimático comumente denominado de fenoloxidase (GILL; ARORA, 2003). Pandey et al. (2000) relatam que estas enzimas são produzidas *em resposta a baixos níveis de fontes de nutrientes, principalmente carbono e nitrogênio*. Lac e MnP são responsáveis por oxidar estruturas fenólicas presentes na lignina, muito embora catalisem a formação de radicais de alto peso molecular, enquanto que a LiP é eficiente na oxidação tanto de compostos fenólicos quanto não-fenólicos (MIN et al., 2001).

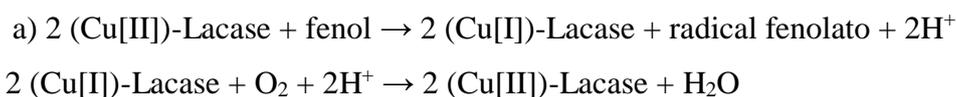
As enzimas fenol-oxidases não apresentam substratos específicos, característica esta que possibilita os micro-organismos de oxidar compostos com estruturas similares aos

derivados da lignina (SILVA; GOMES, 2004).

As enzimas ligninolíticas são capazes de romper o anel aromático de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e formar compostos que podem, posteriormente, ser mineralizados (COHEN et al., 2002). Esta característica de não-especificidade possibilita a oxidação de uma gama de poluentes, incluindo dióxido de carbono e água (BARR; AUST, 1994). Ressalta-se que alguns fungos são capazes de produzir Lac, MnP e LiP e outros apenas uma ou duas destas enzimas (BOER et al., 2004).

### 3.2.1.1. Lacases

A lacase foi primeiramente isolada nos exsudatos da planta *Rhus vernicifera*, sendo, posteriormente, encontrada em fungos (THURSTON, 1994) havendo relatos de sua presença em bactérias (CLAUS; FILIP, 1977). Foi caracterizada como uma enzima oxidase contendo metal por Bertrand em 1985 (MAYER; STAPLES, 2002). Conceitualmente, é definida como uma enzima multi-cobre azul responsável por oxidar compostos fenólicos, reduzindo o oxigênio a água pela retirada de um elétron do substrato aromático, gerando radicais fenoxilos (DURÁN, 2004):



De acordo com DURÁN e ESPOSITO (1997) os radicais formados atuam em reações não catalíticas, tais como acoplamento de radicais, desprotonação e ataque nucleofílico pela água, o que proporciona reações de polimerização, quebras alquiarílicas, oxidações nos carbonos alfa (C $\alpha$ ) e desmetilações.

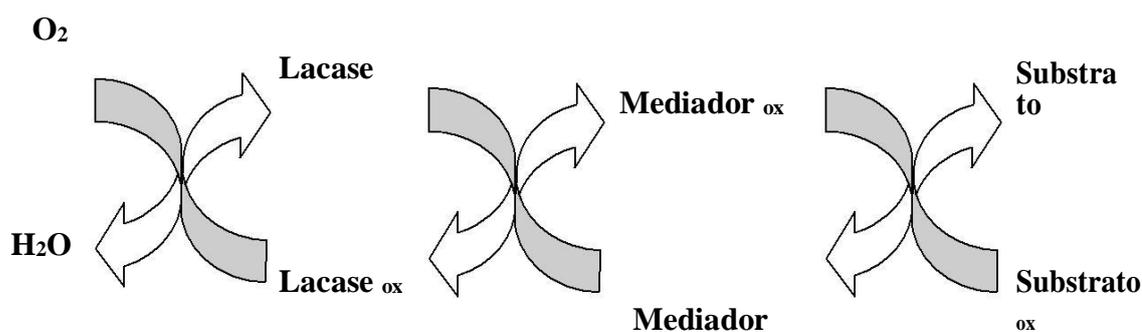
As lacases contêm cobre no seu sítio ativo, embora algumas lacases fúngicas possam conter outro tipo de metal, e são capazes de catalisar reações de desmetilação, importantes em processos de biodegradação de cadeias poliméricas, com subsequente rompimento de anéis aromáticos presentes na estrutura da lignina (PERALTA et al., 2004). Estas enzimas apresentam potencial de aplicação na indústria devido à não especificidade de substratos que podem oxidar. Entretanto, o sucesso da aplicação de lacases exige a produção de grandes quantidades a baixo custo (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007).

As lacases secretadas pelos fungos basidiomicetos são glicoproteínas que variam em seu tamanho por 520 - 550 resíduos de aminoácidos, os quais contêm quatro íons cobre (Cu) dispostos em três sítios de ligação (DURÁN; ESPÓSITO, 1997; HIGUCHI, 1990; MAYER;

STAPLES, 2002). Os íons são fundamentais na reação de oxidação do substrato fenólico, enquanto o oxigênio molecular é reduzido à molécula de água.

As lacases catalisam a oxidação de uma ampla faixa de amins fenólicas e aromáticas e o uso de sistemas mediados por estas enzimas é uma alternativa promissora para processos biotecnológicos de interesse ambiental, como branqueamento e deslignificação de polpa de celulose, descoloração de corantes têxteis, oxidação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, detoxificação de efluentes e poluentes ambientais e remoção de fenóis (BREEN; SINGLETON, 1999; TINOCO et al., 2001; GOMES; REBELO, 2003; DHAWAN et al., 2005; MUNARI et al., 2007, 2008). Além disso, lacases também podem ser utilizadas nas indústrias cosmética, química, farmacêutica, de alimentos e bebidas, assim como na elaboração de diagnósticos clínicos, clarificação e estabilização de sucos de frutas, melhoria da qualidade de rações animais (DHAWAN et al., 2005; COUTO; HERRERA, 2006)

Vários estudos mostram que as lacases podem atacar subunidades não fenólicas pela inclusão de mediadores apropriados, como o ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), o 1-hidroxibenzotriazol (HBT), o ácido hidroxiantranílico e o corante *Remazol Brilliant Blue* (BOURBONNAIS; PAICE, 1990; BOURBONNAIS et al., 1997; POZDNYAKOVA et al., 2004). O complexo Lac-ABTS, por exemplo, promove eficiente desmetilação e deslignificação de polpa *kraft* (BOURBONNAIS; PAICE, 1992). Neste caso o ABTS oxidado deve funcionar como um agente difusor na oxidação da lignina, isto porque a lacase é uma molécula grande que não é capaz de passar pela fibra da parede secundária para entrar em contato diretamente com o substrato lignina. BOURBONNAIS et al. (1997) encontraram um mediador natural para lacases, o ácido 3-hidroxiantranílico, produzido pelo fungo da degradação branca *Pycnoporus cinnabarinus*. A Figura 1 mostra um esquema exemplificando a função do mediador na atividade da enzima (sistema lacase-mediado).



**Figura 1.** Função do mediador na atividade enzimática das lacases. Fonte: PAICE et al., (1997); BREEN; SINGLETON (1999); D'ACUNZO et al. (2002); BAIOTTO et al. (2003); D'ACUNZO; GALLI (2003); ZILLE et al. (2005).

BOURBONNAIS et al., (1995) mostraram que lacases de *Trametes versicolor*, na presença de ABTS ou siringaldazina (SYR) são capazes de oxidar compostos não fenólicos de lignina, de forma similar à LiP. Durán (1997) sugeriu que o uso de HBT como mediador permite 50% de deslignificação de polpas na presença de lacases, uma vez que ao consumir oxigênio, o HBT se transforma num intermediário reativo que é oxidado pela enzima, indicando que os mecanismos de oxidação por ABTS e HBT são diferentes. Durán e Esposito (2000) afirmam que lacases são capazes de eliminar fenóis através de processos de polimerização. Contudo, na presença de ABTS e HBT, a degradação de fenol ocorre através de processos oxidativos (RASERA et al., 2009).

Atualmente, a utilização de lacases em escala industrial é uma realidade muito em função da diminuição dos custos de produção ocasionado pela fácil obtenção de enzimas recombinantes em organismos hospedeiros. Bourbonnais *et al.*, 1995) O processo de separação, purificação e cristalização é o que aumenta o custo. Desta forma, a desvantagem de se utilizar enzimas purificadas ou parcialmente purificadas em processos de biotratamento é o alto custo. Entretanto, a aplicação de lacases em sistemas de tratamento de efluentes surge como perspectiva, visto que apenas o oxigênio molecular é necessário como aceptor de elétrons para a reação enzimática (DAVIS; BURNS, 1990). Neste *Mister* cabe realizar a prospecção de linhagens de fungos basidiomicetos amazônicos buscando um que potencialize a produção de lacase e, assim, diminuir a importação de enzimas. Portanto, o investimento em pesquisa torna-se uma alternativa necessária para a reversão deste quadro no setor de biotransformação.

Lacases comerciais estão sendo usadas na indústria têxtil. Em 1996, a empresa Novozymes<sup>®</sup> (Novo Nordisk) produziu a *Denilite*<sup>®</sup>, uma lacase para ser usada no processo “denim” de fabricação de *jeans*. A formulação foi aprimorada e relançada no mercado em 1999 como *Denilite*<sup>®</sup> II. O corante índigo, utilizado no tingimento do *jeans*, pode ser removido pelo uso de lacases em um processo que não danifica o tecido e que o deixa com aparência lavada ou manchada, de acordo as exigências do mercado e da moda atual. Além da *Denilite*<sup>®</sup>, a Novozymes atua no mercado de enzimas comercializando lacases também sob os nomes comerciais *Novozym*<sup>®</sup> 51003 e *Suberase*<sup>®</sup>. A *Novozym*<sup>®</sup> 51003 é usada como biossensor e a *Suberase*<sup>®</sup> no tratamento de rolhas de cortiça para o envase de vinhos (PERALTA et al., 2004; ANSELMO et al., 2008).

Em relação à produção de enzimas fúngicas, vários estudos tem mostrado que a composição do meio de cultura e o modo de cultivo (Fermentação submersa ou em estado

sólido), bem como condição de cultivo (estático e agitação), produzem diferentes padrões de isoenzimas de lacase (Tabela 1) (DONG et al., 2005).

**Tabela 1.** Produção de lacases fúngicas por fermentação submersa e fermentação no estado semi-sólido.

Espécie	Modo de cultivo	Atividade máxima de lacase	Referência
<i>Agaricus blazei</i>	FSS	5000 U L <sup>-1</sup>	Ullrich et al. (2005)
<i>Agaricus blazei</i>	FSS	65 U g <sup>-1</sup>	D'Agostini et al. (2011)
<i>Cerrena máxima</i>	FSm	7620 U L <sup>-1</sup>	Elisashvili et al. (2008)
<i>Ganoderma lucidum</i>	FSm	93000 U L <sup>-1</sup>	Songulashvili et al. (2007)
<i>Lentinula edodes</i>	FSm	251 U mL <sup>-1</sup>	Cavallazzi et al. (2005)
<i>Morchella esculenta</i>	FSS	7,5 U g <sup>-1</sup>	Paniputi e Lechner (2008)
<i>Peniophora</i> sp.	FSm	4139,5 U L <sup>-1</sup>	Fonseca et al. (2010)
<i>Pleurotus dryinus</i>	FSm	6493 U L <sup>-1</sup>	Elisashvili et al. (2006)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	FSS	167 U g <sup>-1</sup>	Karp et al. (2012)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	FSS	74,3 U g <sup>-1</sup>	Alexandrino et al. (2007)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	FSS	36 U g <sup>-1</sup>	Iandolo et al. (2010)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	FSS	31 U g <sup>-1</sup>	Kumaran et al. (1997)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	FSm	19000 U L <sup>-1</sup>	Lomascolo et al. (2003)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FSS	46,5 U g <sup>-1</sup>	Vikineswary et al. (2005)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FSm	3143 U L <sup>-1</sup>	Fonseca et al. (2010)
<i>Trametes hirsuta</i>	FSm	20000 U L <sup>-1</sup>	Tapia-Tussel et al. (2011)
<i>Trametes hirsuta</i>	FSS	5400 U L <sup>-1</sup>	Rosales et al. (2005)
<i>Trametes pubescens</i>	FSm	740 U mL <sup>-1</sup>	Galhaup et al. (2002)
<i>Trametes trogii</i>	FSm	20000 U L <sup>-1</sup>	Zouari-Mechici et al. (2006)
<i>Trametes versicolor</i>	FSm	742 U L <sup>-1</sup>	Mikiashvili et al. (2005)
<i>Trametes versicolor</i>	FSm	1583 U L <sup>-1</sup>	Xavier et al. (2007)
<i>Trametes versicolor</i>	FSS	8,6 U g <sup>-1</sup>	Xin e Geng (2010)

FSm: fermentação submersa; FSS: fermentação no estado semi-sólido. Fonte: MAJEAU et al. (2010)

### 3.3. Aplicações biotecnológicas dos fungos da degradação branca

Fungos da degradação branca agrupam aqueles micro-organismos capazes de degradarem compostos ligninolíticos através das várias isoformas de oxidases extracelulares (WESENBERG et al., 2003). Quando a madeira é degradada, os fungos que fazem sua decomposição são classificados de acordo com tipo de podridão, gerando podridão branca ou parda, causadas principalmente por basidiomicetos, e podridão mole, produzida por

ascomicetos. A podridão branca, em particular, é produzida pelos fungos na parede celular do vegetal, sendo capaz de degradar celulose, hemicelulose e lignina. Quando ocorre essa degradação, a madeira apresenta aspecto com coloração esbranquiçada e quebradiça devido à ação de suas enzimas (BLANCHETTE et al., 2000; RYVARDEN, 1991)

O uso desses fungos em bioprocessos é vantajoso uma vez que eles não requerem um pré-condicionamento ao poluente. Devido ao fato de que a oxidação ocorre pela privação de nutrientes, a limitação destes pode iniciar o processo. Por outro lado, a transformação enzimática de compostos poluentes é menos tóxica e constitui uma alternativa para a remoção destas substâncias (GARCIA-ARELLANO et al., 2004). Muitas indústrias apresentam efluentes com compostos difíceis de serem metabolizados por sistemas biológicos, sendo que, usualmente, são empregadas bactérias que não possuem habilidade para degradá-los, diferentemente dos fungos produtores de enzimas extracelulares (LANTE et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2004).

É importante ressaltar que as enzimas também são capazes de transformar alguns poluentes aromáticos persistentes como pesticidas e inseticidas organofosforados, corantes, clorofenóis e HPAs, formados pela combustão incompleta da matéria orgânica da madeira e do petróleo, além de oxidar organopoluentes tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos, uma vez que, muitos desses compostos possuem capacidade de bioacumulação nas cadeias tróficas (DENIZLI et al., 2005).

As lacases, em particular, são enzimas capazes de catalisar a oxidação do surfactante nonilfenol, um composto que causa ruptura endócrina em organismos presentes em ecossistemas aquáticos, tornando-o compostos fenólicos menos tóxicos através de reações de polimerização (SOARES et al., 2005).

Os basidiomicetes, principalmente fungos da degradação branca, já foram empregados em trabalhos experimentais de biotratamento de efluentes e resíduos, como estratégias para descoloração, mineralização, transformação ou degradação de diferentes compostos naturais ou sintéticos (Soares *et al.*, 2005). (Tabela 2).

**Tabela 2.** Aplicação de fungos de degradação branca em ensaios de biotratamento de diferentes compostos.

Organismo	Aplicação	Referência
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Degradação e mineralização de HPAs	Novotný et al. (2001); Kunz et al. (2002); Martins et al. (2003); Hou et al. (2004); Nerud et al. (2004); Novotný et al. (2004); Santos et al.
	Eliminação de poluentes fenólicos Tratamento de efluentes da indústria de óleo de oliva	Hublik e Schinner (2000) Fountoulakis et al. (2002); Aggelis et al. (2003);
	Biorremediação de solos contaminados com HPAs	D'Annibale et al. (2005)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Degradação de HPAs	Lau et al. (2003)
	Degradação e remoção de clorofenóis	Law et al. (2003); Rodríguez et al. (2004) Zilly et al. (2002); Santos et al. (2004); Tychanowicz et al. (2004); Eichlerová et al.
	Descoloração de corantes	
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Degradação de taninos	Wong e Wang (1991)
	Degradação e remoção de clorofenóis	Rodríguez et al. (2004); Denizli et al. (2005)
	Descoloração de corantes	Capudi et al. (2003b); Murugesan et al. (2006);
<i>Polyporus sp.</i>	Tratamento de efluentes industriais	Rodríguez et al. (2003)
	Descoloração de corantes Branqueamento de polpa de papel e celulose	Rigas e Dritsa (2006) García et al. (2003); Camarero et al. (2004);
<i>Pycnoporus</i>		Sigoillot et al. (2005); Fillat et al. (2010)
<i>Pycnoporus coccineus</i>	Descoloração de efluentes da indústria de óleo de oliva	Jaouani et al. (2003)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Descoloração de corantes azo e antraquinona	Pointing e Vrijmoed (2000); Lu et al. (2007)
<i>Stereum hirsutum</i>	Degradação de bisfenol	Lee et al. (2005)
<i>Stropharia coronilla</i>	Degradação de benz[a]pireno	Steffen et al. (2003)
<i>Trametes hirsuta</i>	Degradação, descoloração e detoxificação de Corantes	Abadulla et al. (2000); Almansa et al. (2004); (2007)
<i>Trametes hispida</i>	Descoloração de corantes	Rodríguez et al. (1999)
<i>Trametes modesta</i>	Degradação de 2,4,6-trinitrotolueno Descoloração de corantes	Nyanhongo et al. (2006) Kandelbauer et al. (2004a e 2004b)
<i>Trametes pubescens</i>	Biodegradação de efluentes têxteis Descoloração de corantes	Osma et al. (2010) Enayatzamir et al. (2009)
<i>Trametes sp.</i>	Descoloração e detoxificação de corantes	Maalej-Kammoun et al. (2009)

	Polimerização oxidativa de metoxifenóis	Tanaka et al. (2010)
<i>Trametes trogii</i>	Descoloração e detoxificação de corantes e efluentes têxteis	Trupkin et al. (2003); Mechichi et al. (2006); Zouari-Mechichi et al. (2006); Khlifi et al.
<i>Trametes versicolor</i>		(2003); Blázquez et al. (2004); Moldes et al. (2004a); Novotný et al. (2004); Ramsay (2007); Chander e Arora (2007); Borràs et al. (2008); Vanhulle et al. (2008); Casas et al. (2009); Srinivasan e Murthy (2009); Champagne
<i>Trametes villosa</i>	Remoção de ácido hexenurônico e de lignina	Valls et al. (2010)
	Transformação de clorofenóis	Bollag et al. (2003)
	Transformação de 2,4,6-trinitrotolueno	Thiele et al. (2002)
	Tratamento de efluente kraft	Minussi et al. (2007)

**Fonte:** adaptado de BETTIN (2010).

### 3.4. Basidiomicetos do gênero *Trametes*

Enzimas de micro-organismos são utilizadas em vários processos industriais: têxtil, cosméticos, alimentos e bebidas, etc. Isso se deve ao fácil crescimento dos micro-organismos em vários meios de cultivo e em condições de pH e temperatura adequadas. Os meios de cultivo a serem utilizados podem ser formulados a partir de matérias-primas naturais resíduos agroindustriais ou sintéticos compostos químicos (Tanaka et al. 2010).

Na natureza, o grupo dos basidiomicetos atua na degradação da madeira com eficiência, na qual se encontram os fungos responsáveis pela podridão parda e podridão branca, que possuem características enzimáticas próprias, quanto à decomposição dos constituintes primários da madeira (ANDRADE, 2011)

O mecanismo de degradação da madeira é específico para cada grupo de fungos basidiomicetos, onde a produção de enzimas e metabólitos extracelulares degradam a parede celular do vegetal até que ela seja totalmente destruída. As espécies que atuam nesta degradação não seletiva na podridão branca da madeira são *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Phellinus pini* (BLANCHETTE, 1995; ERIKSSON et al., 1990, ERIKSSON, 2010).

O gênero *Trametes* tem sido associado à várias pesquisas visando a aplicação de suas enzimas, dentre eles o seu uso em biopolpação e biobranqueamento nas indústrias de produção de papel. O fungo *Trametes versicolor* é o mais estudado para esta aplicação,

devido à alta eficiência das enzimas ligninolíticas produzidas por essa espécie sobre a degradação celulósica, com destaque para a enzima lacase. A vantagem de se empregar enzimas fúngicas no processo de biopolpação e biobranqueamento é que se diminui o uso de produtos químicos poluentes, melhora a resistência do papel e economiza energia elétrica das indústrias (AKHTAR et al., 2000, ARORA; SHARMA, 2010; KIRK et al., 1992; WARD et al., 2003).

Na biodegradação de poluentes ambientais, os fungos que se destacam são *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Bjerkandera adusta* (COLLINS et al., 1996; BARR; AUST, 1994). *Trametes versicolor* também foi usado na degradação do corante Malachite Green por ação das enzimas lacase e manganês peroxidase (DORIO et al., 2008).

*Trametes* é um gênero de fungo basidiomiceto de podridão branca que pertence à família *Polyporaceae* e foi descrito inicialmente em 1788 com o nome de *Boletus villosus* (KO; JUNG, 1999; SWARTZ, 1788). Este gênero tem sido investigado por suas aplicações biotecnológicas por suas atividades enzimáticas como: lacase e manganês peroxidase (KUHAD; SINGH, 2007; JONG et al., 1992). *Trametes sp.* foi o melhor produtor de amilases e celulases de acordo com SOUZA et al. (2008). A enzima lacase de *Trametes villosa* foi primeiramente purificada e clonada por YAVER et al. (1996).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Purificar e caracterizar a lacase produzida pela espécie Amazônica *Trametes cubensis* em Fermentação Submersa e Fermentação Semi-sólida.

### 4.2 Específicos

- Selecionar um fungo, de ocorrência na Amazônia, mais apto para a produção de fenol-oxidases;
- Realizar a identificação molecular e clássica do fungo *Trametes cubensis*;
- Avaliar a produção de lacase, lignina e manganês peroxidase pelo fungo *Trametes cubensis* crescidos em diferentes condições de cultivo (fermentação submersa e semi-sólida, uso de diferentes resíduos, meios suplementados);
- Purificar a lacase produzida pelo fungo *Trametes cubensis*;
- Acompanhar a purificação da lacase por SDS-PAGE e estimar a massa molecular aparente da enzima purificada por zimograma.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), no Laboratório de Biologia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA – Tefé) e nos laboratórios pertencentes ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UEA (Manaus).

### 5.1. Seleção do fungo

Para esse estudo, inicialmente, foram coletados basidiocarpos de diferentes fungos com a finalidade de selecionar aquele mais apto à produção de fenol-oxidases, com ênfase nas lacases. Para tanto, os basidiocarpos, identificados morfologicamente como *Panus fasciatus*, *P. crinitus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Polyporus* sp., *Ganoderma* sp., *Lentinus crinitus*, *Dantronia brunneoleuca*, *Hexagona glabra*, *Trametes* sp. (CEST 03) e *Trametes* sp. (CEST 04) foram coletados em dezembro de 2012, na Floresta Nacional de Tefé a aproximadamente 750 km de distância da cidade de Manaus- Am e identificados no ICMBIO com o número de registro 32494. Após as coletas, realizou-se o isolamento dos fungos e as linhagens foram mantidas em meio BDA.

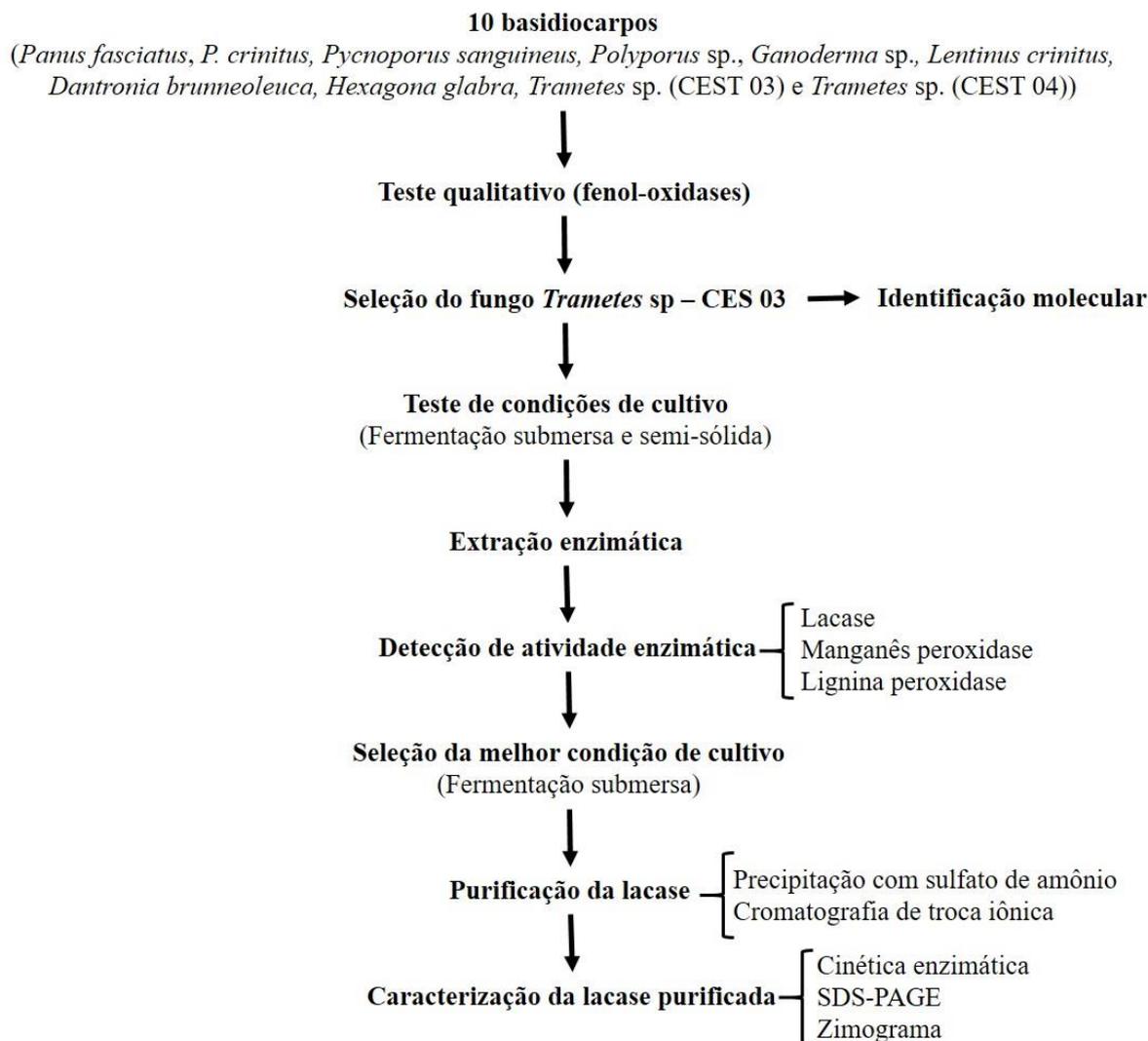
A seleção do fungo foi realizada a partir de teste inicial (teste qualitativo) de produção de enzimas fenol-oxidases e, aquele que apresentou a melhor atividade (*Trametes* sp. – CEST 03) foi submetido à identificação molecular e depositado na Coleção de Culturas e Microorganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA, sob número de registro 1844.

### 5.2. Determinação qualitativa da atividade de fenol-oxidases

A análise qualitativa da atividade de fenol-oxidases foi realizada através do método de *Bavendamm*, onde um fragmento de, aproximadamente, 30 mm dos basidiocarpos foram cultivados em placas de petri em meio contendo ácido tânico (Bononi e Trufen, 1985; Cornelis, 1987; Castro e Silva, 1996). As placas de petri foram incubadas em BOD a 30 °C ( $\pm 2$  °C) por um período de 72 horas para avaliar o potencial das cepas quanto à produção de halos indicadores de enzimas oxidativas. Os halos formados foram medidos com auxílio de um paquímetro digital. Os grupos controles foram preparados nas mesmas condições, contudo, na ausência de ácido tânico. As análises estatísticas foram realizadas por meio de *Software* BioStat. As placas que mostraram índice enzimático superior a 1 foram consideradas para uso nos testes de fermentação submersa e semi-sólida (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975).

### 5.3. Identificação Molecular

Após análise preliminar da produção de fenol-oxidases pelos fungos coletados, procedeu-se a identificação daquele com maior atividade enzimática (*Trametes* sp. – CES 03), sendo utilizado nas atividades posteriores (Figura 2).



**Figura 2.** Fluxograma de atividades.

#### 5.3.1. Extração do DNA total

Para a extração do DNA total do fungo foi utilizada a metodologia adaptada de WHITE e LEE (1990), em Mini-Beadbeater<sup>TM</sup> com pérolas de vidro (beads) de 0,5 mm. Para a lise celular ajustou-se o aparelho para três repetições de 30s, sob agitação a 2500 rpm.

Primeiramente, uma pequena quantidade de micélio de cada fungo foi colocada em microtubos de 1,5 mL, contendo “beads” até, aproximadamente, 50 µL. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de Tris-HCl 100 mM pH 8 e de EDTA 50 mM. Os tubos foram colocados

no Mini-Beadbeater™ para lise das células, em seguida foi adicionado 25 µL de SDS 10% e 0,2 mg/mL de proteinase K. O material foi acondicionado a 55°C por 30 min. Posteriormente, as amostras foram transferidas para outros microtubos e centrifugadas a 16.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e acrescentou-se igual volume da solução de acetato de potássio 5 M, as amostras foram acondicionadas a -20°C por 30 minutos.

Após o resfriamento, as amostras foram agitadas vigorosamente em agitador mecânico tipo vórtex e então centrifugadas por 10 min a 16.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionou-se igual volume de isopropanol, permanecendo a -20 °C por 30 min. Foram então, centrifugados a 16.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70%. O precipitado foi seco a temperatura ambiente dentro da câmara de fluxo laminar por cerca de 90 min. Após esse período, o DNA foi reidratado com 50 µL de tampão TE–RNase pH 7,0 (10 microgramas por mL).

### 5.3.2. PCR

A PCR foi realizada com o “kit” GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA). Em todos os casos (Região ITS ou D1/D2) optou-se pelo volume final de 25 µL, e para tanto as concentrações finais foram: 1X do tampão para PCR, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM de cada iniciador (ITS1 -5' TCCTCCGCTTATTGATATGC e ITS4 - 5' CGTAACAAGGTTTCCGTAGG) (WHITE et al., 1990), 5 µL dos produtos de extração, 0.13 µL Taq DNA polimerase (5 U.µL<sup>-1</sup>) e água ultrapura q.s.p.

A amplificação foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems), a partir de uma desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de: 95°C 30 s, 59°C 30 s, 72°C 30 s em um ciclo transferase terminal a 72°C por 10 min. O resultado da amplificação foi observado em gel de agarose 1,0 %.

### 5.3.3. Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada com volume final de 10 µL, sendo 2 µL de BigDye Terminator (v3.1), 2 µL do tampão “Save Money” 5X, 5.5 µL do produto da PCR e 0.5 µL do iniciador no termociclador Veriti (Applied Biosystems) nas seguintes condições de reação: 40 ciclos de 95°C 30 s, 50°C 30 s e 60°C por 2 minutos.

### **5.3.4. Precipitação das reações de sequenciamento**

Para precipitar as reações de sequenciamento utilizou-se a metodologia de Sambrook (2001), onde 6  $\mu\text{L}$  de solução de NG (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de glicogênio dissolvido em 5 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) e 50  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto foram homogeneizados e mantidos a  $-20^\circ\text{C}$  por 30 min. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 40 min a  $4^\circ\text{C}$ . O precipitado foi lavado duas vezes com 100  $\mu\text{L}$  de etanol 70% com centrifugação entre as lavagens a 12.000 g por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . O etanol 70% foi descartado e os precipitados foram submetidos a um “spin”, deixados em temperatura ambiente por alguns minutos e guardados a  $-20^\circ\text{C}$  até o sequenciamento automático e processamento das sequências.

### **5.3.5. Análise automática e processamento das sequências**

As amostras foram dissolvidas em 10  $\mu\text{L}$  de formamida, submetidas à desnaturação por 5 min a  $95^\circ\text{C}$ , seguido de um rápido resfriamento em gelo. A análise automática das sequências ocorreu em sistema de eletroforese capilar automático (ABI 3500 xL, Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram analisadas com o programa SeqMan da suíte de aplicativos DNASTAR II (LASERGENE, 1994). A identificação por comparação das sequências obtidas contra os bancos de dados (GenBank, DDBJ, EMBL) foi realizada através da ferramenta BLAST, configurada na opção BLASTN contra o banco não redundante (nr) (ALTSCHUL et al., 1990).

## **5.4. Condições de cultivo**

### **5.4.1. Fermentação Submersa (FSm)**

A fermentação submersa foi conduzida em frascos erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de cada meio (extrato de malte e meio Czapek) com pH ajustado para 5. Os meios foram autoclavados a  $121^\circ\text{C}$ , 1 atm, por 20 minutos. Para cada erlenmeyer foi inoculados 3 discos de, aproximadamente 6 mm de diâmetro do fungo e 150  $\mu\text{L}$  de uma solução de ABTS (1 mM) e 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$ . Os frascos foram mantidos sob agitação a 180 rpm,  $30^\circ\text{C}$  durante 25 dias, sendo retirado um frasco a cada intervalo de cinco dias, para a determinação das atividades enzimáticas (lacase, lignina e manganês peroxidase).

#### 5.4.2. Fermentação semi-sólida (FSS)

Para a fermentação semi-sólida, utilizou-se como substratos serragem de marupá (*Simaruba amara*) e bagaço de cana, os quais foram, inicialmente, secos 40°C em estufa e, posteriormente, triturados em moinho de facas, com peneira de 60 mesh. Após essa etapa, foram autoclavados a 121°C, 1 atm, por 30 minutos por 3 dias consecutivos.

O processo fermentativo foi conduzido em frascos erlenmeyer (250 mL) contendo, separadamente, 10 g de bagaço de cana, 10 g de resíduo de marupá e um consórcio entre ambos na proporção 1:1. A umidade inicial do substrato foi ajustada para 80% para ambos, isso na primeira batelada, sendo acrescido de água destilada. Para a segunda batelada utilizou-se 10 mL da solução (KARP, 2012). A solução nutritiva foi composta por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5 g L<sup>-1</sup>),  $\text{MgSO}_4$  (0,5 g L<sup>-1</sup>),  $\text{KCl}$  (0,5 g L<sup>-1</sup>),  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,036 g L<sup>-1</sup>),  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,035 g L<sup>-1</sup>), uréia (6,0 g L<sup>-1</sup>) e  $\text{CuSO}_4$  (150 µL). Os frascos foram mantidos por 25 dias a 30°C na ausência de luz em B.O.D.

Um estudo da cinética de produção FES foi realizado com o melhor suporte, onde dois frascos foram retirados para análise da atividade enzimática a cada 5 dias, por um período de 25 dias. Nesse mesmo intervalo de tempo, também se determinou o pH do fermentado e as atividades das enzimas lacase, lignina e manganês peroxidase foram determinadas.

#### 5.5. Extração enzimática proveniente de FSm e FSS

Para as condições de fermentação submersa (FSm) o extrato fermentado foi filtrado em papel Whatman nº 1, acondicionado em tubos falcon de 50 mL, centrifugado a 7.830 rpm, 4°C por 30 minutos e, o sobrenadante foi utilizado na determinação das atividades enzimáticas e análise em SDS-PAGE.

Nas condições de fermentação semi-sólida (FSS), a extração enzimática foi realizada a partir do produto fermentado, o qual foi homogeneizado em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 (1:10 m/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente (22 ± 3°C). Posteriormente, foi filtrado em papel filtro Whatman nº 1, centrifugado a 7.830 rpm a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante utilizado na determinação das atividades enzimáticas e análise de SDS-PAGE.

## 5.5. Detecção das atividades enzimáticas

### 5.5.1. Lacase

A atividade de lacase foi determinada a partir da oxidação do 2,2'-azino-bis-etilbenthiazolina (ABTS) de acordo com BUSWELL et al. (1995). Para tanto, incubou-se 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0); 0,6 mL do extrato enzimático e 0,1 mL de ABTS 0,03% (p/v) a 37°C por 10 minutos. Após esse período, foram realizadas leituras espectrofotométricas a 420 nm. Como grupo controle ( $Abs_i$ ) procedeu-se o mesmo ensaio, contudo, adicionou-se o extrato enzimático previamente fervido por 10 minutos a 100°C. O ensaio foi realizado em triplicata e o valor do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) do produto formado foi de  $36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (BUSWELL et al., 1995).

### 5.5.2. Manganês peroxidase

A atividade da enzima manganês peroxidase (Mnp) foi determinada a partir da metodologia adaptada de Khindaria (1994), utilizando-se como substrato o vermelho de fenol. Para tanto, foram incubados 300  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato-citrato 50 mM pH4,5; 300  $\mu\text{L}$  lactato de sódio 50 mM; 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnSO}_4$  1 mM; 100  $\mu\text{L}$  de vermelho de fenol 0,1%; 50  $\mu\text{L}$  de albumina bovina, 8%; 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2,0 mM e 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático a 35°C durante 5 minutos. Antes da incubação, leituras espectrofotométricas a 610 nm foram realizadas para a obtenção da absorbância inicial ( $Abs_i$ ). Para a paralisação da reação acrescentou-se 65  $\mu\text{L}$  de NaOH 6,5 M e, em seguida foram realizadas leituras espectrofotométricas a 610 nm ( $Abs_f$ ). Para o grupo controle procedeu-se o mesmo ensaio, contudo, adicionou-se o extrato enzimático aquecido a 100°C durante 10 minutos. O coeficiente de extinção molar do produto formado a 610 nm utilizado foi de  $22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Uma unidade de atividade foi considerada como a quantidade de enzima capaz de catalisar a formação de 1  $\mu\text{mol}$  de vermelho de fenol oxidado por minuto.

### 5.5.3. Lignina peroxidase

A atividade da enzima lignina peroxidase (LiP) foi determinada a partir da metodologia proposta por KIRK et.al. (1986) modificada, utilizando-se como substrato o álcool veratrílico. Inicialmente, incubou-se 400  $\mu\text{L}$  de tampão tartarato de sódio 100 mM pH 3; 50  $\mu\text{L}$  de álcool veratrílico 10 mM; 50  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1:1000 (v/v) e 500  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático durante 10 minutos a 40°C. Antes da incubação, leituras espectrofotométricas a 310 nm foram realizadas para a obtenção da absorbância inicial ( $Abs_i$ ). Após o período de incubação, novas leituras espectrofotométricas foram realizadas para a

obtenção da absorvância final ( $Abs_f$ ). Como grupo controle procedeu-se o mesmo ensaio, contudo, adicionou-se o extrato enzimático aquecido a  $100^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. O coeficiente de extinção molar do produto formado a 310 nm utilizado foi de  $9.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A atividade de LiP foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar  $1 \mu\text{mol}$  de álcool veratrílico por minuto e determinada segundo a fórmula (AGUIAR; FILHO, 2008; FERREIRA; 2009; MENEZES et al., 2010):

$$UI/L = \left( \left( \frac{\Delta Abs}{(\epsilon \times V_a \times t_r)} \right) \times Fd \times 10^6 \right)$$

Onde:  $\Delta Abs = Abs_f - Abs_i$ ;

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar do produto formado ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ );

$V_a$  = volume da amostra em L;

$t_r$  = tempo reacional em minutos;

$Fd$  = fator de diluição da amostra;

$10^6$  = fator de conversão de  $\mu\text{L}$  para L.

UI/L = Unidade internacional, onde internacional significa  $\mu\text{mol min}^{-1}$ .

## 5.6. Quantificação de proteínas proteíνας totais

Para a determinação de proteíνας totais foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para tanto, os extratos enzimáticos foram incubados com o reagente de Bradford (Sigma) e, após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), realizou-se leituras espectrofotométricas a 595 nm. Como padrão utilizou-se a albumina sérica bovina (BSA).

## 5.7. Purificação da lacase

### 5.7.1. Precipitação com sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )

O extrato enzimático (26 mL) proveniente da FSm, após 10 dias de cultivo (condição de maior expressão de atividade da lacase em teste preliminar) foi submetido à precipitação com sulfato de amônio a 80% em banho de gelo durante 2 horas. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 4.000 rpm a  $4^\circ\text{C}$  durante 20 minutos e o precipitado foi ressuspendido em 10 mL de tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0; dialisado contra o mesmo tampão durante 16 horas, visando a remoção do sal e, filtrado em membrana de PVDF de  $0,45 \mu\text{m}$ .

### 5.7.2. Cromatografia de troca iônica

O extrato enzimático (10 mL) proveniente da precipitação em sulfato de amônio foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna DEAE FF HiTrap (Ge Healthcare), acoplada ao sistema Äkta Purifier (Ge Healthcare), equilibrada em tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0. Para a eluição, aplicou-se um gradiente de 0 a 60% de tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0 contendo 0,5 M de NaCl, sob fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. As frações obtidas foram submetidas à detecção da atividade da lacase e às análises em SDS-PAGE, e zimograma para determinação da massa molecular aparente.

### 5.8. SDS-PAGE e zimograma

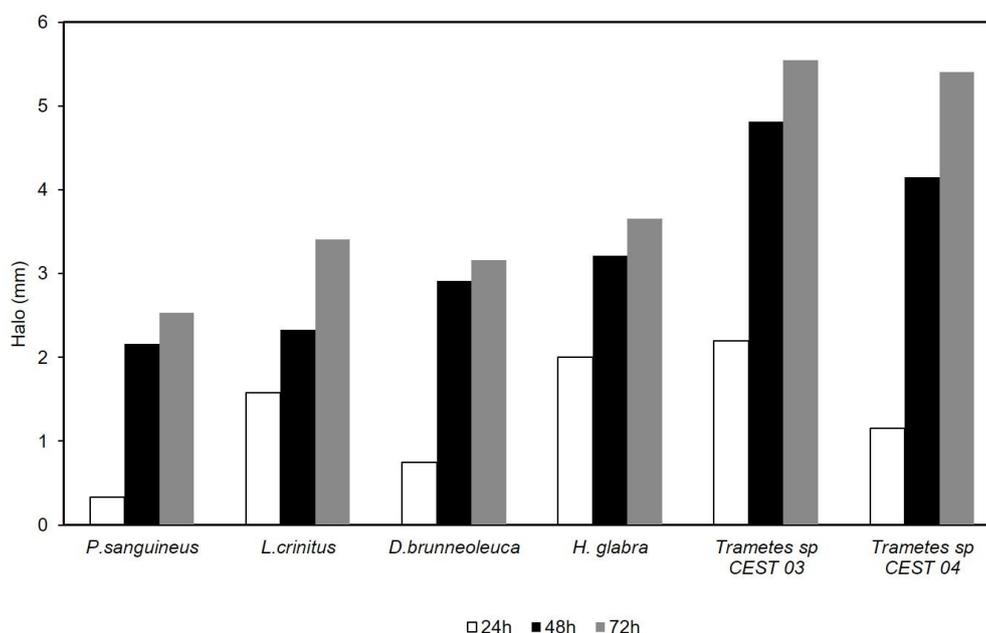
Para a análise de SDS-PAGE, as amostras (100 µL) foram, inicialmente, concentradas em speed vac (Thermo) e solubilizadas em 10 µL de tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0 e 5 µL de tampão de amostra sob condições desnaturantes (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 10% (v/v) SDS; 10% (v/v) β-mercaptoetanol; 50% (v/v) glicerol; 0,5% (p/v) azul de bromofenol) e aquecidas a 100°C durante 5 minutos, sendo aplicado 15 µL de amostra no gel de poliacrilamida a 12%, utilizando-se o tampão de corrida Tris-Glicina (Tris 0,025 M; Glicina 0,192 M, SDS 0,1%). Como condições de corrida, aplicou-se uma tensão de 200 V e corrente de 50 mA durante, aproximadamente, 1 hora. Após as corridas eletroforéticas os géis foram corados com prata a partir da metodologia adaptada de MORRISSEY, 1981).

Para a análise de zimograma, as amostras (15 µL) foram solubilizadas em 5 µL de tampão de amostra (sem β-mercaptoetanol e sem aquecimento) e submetidas às mesmas condições de corrida do SDS-PAGE descritas acima. Após as corridas eletroforéticas, os géis foram lavados em solução contendo 25% de isopropanol em 0,2 M de acetato de sódio pH 5,0 por 30 minutos em temperatura de 37°C. Posteriormente, os géis foram lavados com 0,1 M de acetato de sódio para remoção do isopropanol e, então, o gel de poliacrilamida foi posicionado sobre um gel de agarose 1% preparado com tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0 contendo 0,2 mM de ABTS e incubados a 37°C por 2 h. Após esse período, o gel foi digitalizado (LabScan 5.0, GE Healthcare).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Análise qualitativa da atividade de fenol-oxidases

Os 10 fungos coletados (10 basidiocarpos) foram, inicialmente, submetidos aos ensaios de detecção qualitativa da atividade de fenol-oxidases, visando selecionar o fungo mais apto à produção de lacase e, destes, apenas seis fungos apresentaram atividade de fenol-oxidases, sendo as maiores atividades (sinalizada pela formação de halos escuros) expressa após 72 horas de cultivo (Figura 3).



**Figura 3.** Atividade de fenol-oxidases (formação de halo) produzidas por *P. sanguineus*, *L. crinitus*, *H. glabra*, *Trametes sp. CEST 03* e *Trametes sp. CEST 04*, a partir do teste de Bavendamm.

As linhagens *Trametes sp. CES 03* e *CES 04* apresentaram as maiores atividades dentre os seis fungos com atividade para fenol-oxidases, com halos apresentando o dobro de tamanho após 48 horas de cultivo. Ao passo que, *Pycnoporus sanguineus* foi a espécie com a menor dimensão do halo (Figura 3).

É importante ressaltar que, a baixa atividade apresentada por *Pycnoporus sanguineus*, possivelmente, está relacionado com seus metabólitos, como enzimas e polissacarídeos. Dentre os metabólitos produzidos por esses fungos devemos destacar cinabarina, um derivado fenoxazínico com atividade antibacteriana e antiviral (SMÂNIA, 1997). Resultado semelhante foi obtido para o fungo *Lentinus crinitus*, que apresentou halos de 3,41 cm em 72 h de cultivo, corroborando com os dados encontrados por NEPOMUCENA (2010) (Figura 3).

A linhagem *Datronia brunneoleuca* também apresentou baixa atividade atingindo média dos halos de reação de 3,16 cm em 72 h de cultivo, divergindo dos dados obtidos por FONSECA (2009) (Figura 3).

Diversos fatores influenciam a produção de fenol-oxidases e, conseqüentemente, a formação de produtos, podendo-se destacar a composição do meio de crescimento, tempo de cultivo, pH, razão carbono: nitrogênio, temperatura, natureza química do substrato, luminosidade e aeração (IKEHATA et al., 2004).

O tempo de cultivo, em particular, pode ser responsável por alterar outras variáveis presentes no meio de cultura como, por exemplo, a umidade, que por sua vez pode afetar significativamente a produção enzimática do microrganismo em estudo (KARIMA, 2008).

Nesse sentido, considerando que *Trametes* sp. CES 03 apresentou as maiores atividades de fenol-oxidases, este fungo foi selecionado para as etapas posteriores desse estudo.

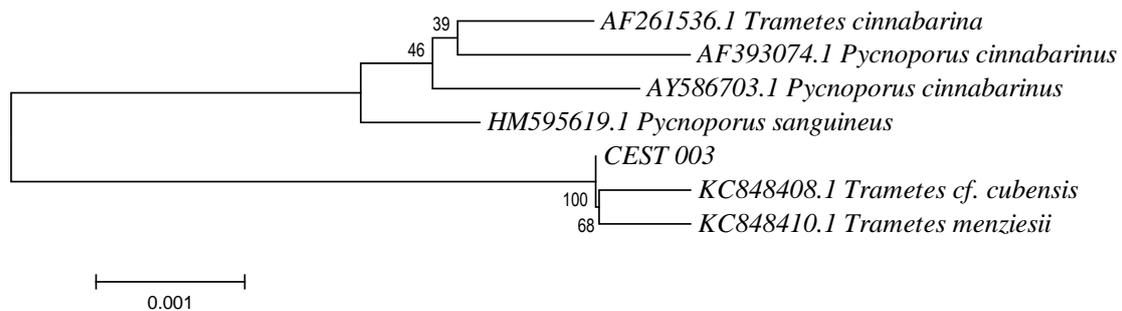
Com intuito de verificar a relação entre a as variáveis halo/tempo, realizou-se o ajustamento de curvas utilizando-se quatro modelos estatísticos (Tabela 3). De modo geral, o modelo geométrico foi o que melhor ajustou os dados para *P.sanguineus*, *D. brunoleuca*, e *H. glabra* enquanto que o modelo logarítmico foi melhor expresso para *Trametes* sp. CEST 03 e *Trametes* sp. CEST 04. O modelo linear foi o que apresentou o melhor ajuste apenas para *L. crinitus* (Tabela 3).

**Tabela 3.** Modelos de ajustamento de curvas entre os tratamentos.

	Linear	Exponencial	Logarítmico	Geométrico
<i>P.sanguineus</i>	$Y' = a + bX$ $Y=0,055+0,028x$ $R^2= 66,3\%$	$Y' = a * e^{(bX)}$ $Y=0,8064*e^{,0167x}$ $R^2= 68,3\%$	$Y' =a+b*\ln(X)$ $Y=-$ $3,2762+1,3679*$ $\ln(X)$ $R^2= 71,5\%$	$Y' = a * X^b$ $Y=0,0817*x^{0,8125}$ $R^2= 76,12\%$
<i>Trametes sp</i> CEST 04	$Y=1,0611+0,0286x$ $R^2=85,7\%$	$Y=1,6564*e^{0,181x}$ $R^2=78,5\%$	$Y=$ $69538+2,9662*$ $\ln(X)$ $R^2=91,9\%$	$Y= 0,1789*x^{0,8201}$ $R^2=86,7\%$
<i>Trametes sp</i> CEST 03	$Y=$ $06944+0,0889x$ $R^2=93,3\%$	$Y=$ $0,6226*e^{0,0324x}$ $R^2=86,3\%$	$Y=-$ $11,2706+3,9315*$ $\ln(X)$ $R^2=97,9\%$	$Y=$ $0,0118*x^{1,4627}$ $R^2=94,3\%$
<i>L.crinitus</i>	$Y=$ $0,6111+0,0382x$ $R^2=86,3\%$	$Y=$ $1,0507*e^{0,0164x}$ $R^2=83,8\%$	$Y= -6171+1,6056*$ $\ln(X)$ $R^2=81,7\%$	$Y=$ $0,1641*x^{0,7000}$ $R^2=82,1\%$
<i>H. glabra</i>	$Y=$ $1,2944+0,0347x$ $R^2=71,7\%$	$Y=1,5605*e^{0,0125x}$ $R^2=73,7\%$	$Y=$ $28631+1,5427*$ $\ln(X)$ $R^2=75,8\%$	$Y=$ $0,3412*x^{0,5619}$ $R^2=79,5\%$
<i>D.brunneoleuca</i>	$Y=0,05192+0,0401x$ $R^2=65,8\%$	$Y=0,8444*e^{0,0200x}$ $R^2=68,9\%$	$Y=-$ $4,6774+1,8805*$ $\ln(X)$ $R^2=74,9\%$	$Y=$ $0,0606*x^{0,9498}$ $R^2=79,9\%$

## 6.2. Identificação molecular

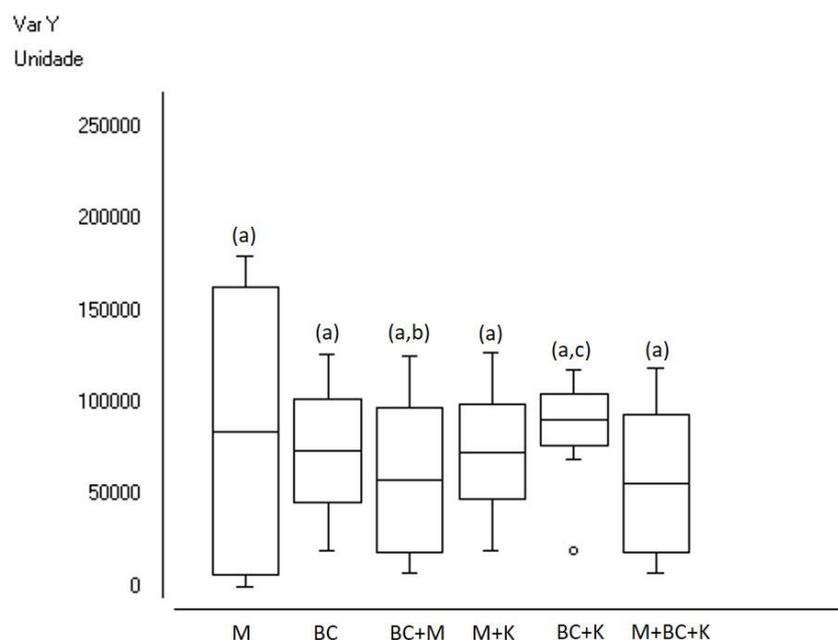
A análise filogenética, obtida a partir da comparação da sequência do fungo *Trametes* sp. CES 03 com sequências depositadas no NCBI demonstram alta homologia com os fungos *Trametes* cf. *cubensis* e *T. menziesii* (Figura 3).



**Figura 4.** Árvore filogenética comparando as sequências do fungo CEST 003 com sequências de linhagens depositadas no NCBI.

### 6.3. Atividade da lacase

Na condição de fermentação em estado semi-sólido (FSS), durante o período de 25 dias, observou-se alta atividade da lacase em todos os substratos avaliados, havendo diferença significativa entre o tratamento composto pela mistura de bagaço de cana e marupá (BC+M) e bagaço de cana suplementado com solução nutritiva (BC+K), sendo a atividade de BC+K, aproximadamente, 2 vezes superior ao encontrado em BC+M (Figura 5). Esse fato, possivelmente, está associado aos minerais utilizados na suplementação, uma vez que, um dos fatores críticos que afetam diretamente a expressão de lacases são as fontes de carbono e nitrogênio, suas concentrações e a razão entre elas (relação C/N), o tipo e a concentração de indutores (GALHAUP et al., 2002a; DEKKER et al., 2007).



**Figura 5.** Atividade da lacase em fermentação em estado semi-sólido (FSS), durante 25 dias de cultivo, suplementada com marupá (M), bagaço de cana (BC), bagaço de cana associado à marupá (BC+M), marupá suplementado com solução nutritiva\* (M+K), bagaço de cana suplementado com solução nutritiva\* (BC+K) e marupá associado à bagaço de cana e suplementado com solução nutritiva\* (M+BC+K). \*Solução nutritiva de Karp (2012). Letras diferentes significam que há diferença estatística entre as médias ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fu *et al.* (1997) mostraram que *P. sajor-caju* Pl-27 produz MnP e Lac, em meios contendo bagaço de cana como fonte de carbono em FSS. Os autores observaram que culturas contendo menor concentração de nitrogênio proporcionaram níveis mais elevados de MnP. Contudo, a atividade de Lac foi semelhante em culturas com alta e baixa concentração do nutriente, evidenciando que a suplementação não teve influência sobre esta enzima o que pode ser um dos fatores que influenciaram a produção de lacase pelo fungo CEST03 que obteve aproximadamente UI/L 50.000 em FSS com os resíduos sólidos empregados nessa

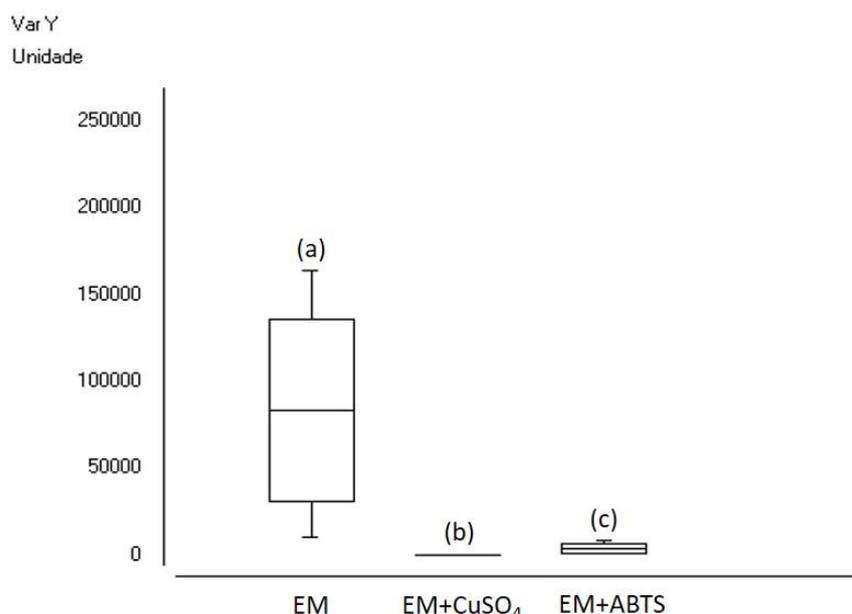
análise. Adicionalmente, resíduos bagaço de cana e marupá, tem sido descritos por serem ricos em celulose e lignina (PANDEY et al., 2000), o que pode ter contribuído para a atividade de lacase observada nesse estudo.

A influência da concentração de nitrogênio sobre a produção de lacase parece variar de acordo com a espécie e linhagem do fungo avaliado (GIARDINA et al., 2010). D'SOUZA et al. (1999) avaliaram a produção de lacase por *Ganoderma lucidum* em condições limitantes e não limitantes de nitrogênio (2,4 e 24 mM) e verificaram maior produção de lacase (2880 U L<sup>-1</sup>) em maior concentração desse nutriente. Enquanto HOU et al. (2004) cultivaram *Pleurotus ostreatus* em meio contendo ureia (0,5 e 5,0 g L<sup>-1</sup>) e verificaram maior produção no meio com menor concentração (85 U/mL<sup>-1</sup>), sugerindo que concentrações maiores de nitrogênio estariam inibindo a produção de lacase, corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa.

É importante ressaltar que a maioria das aplicações biotecnológicas requer grandes quantidades de enzimas a um custo reduzido e uma das abordagens para esse propósito é utilizar o potencial de resíduos lignocelulósicos, que podem conter concentrações significativas de carboidratos e indutores enzimáticos assim garantindo a síntese das enzimas (ELISASHVILI et al., 2008; GASSARA et al., 2010). Assim, a seleção do resíduo adequado com foco na produção enzimática tem papel importante no desenvolvimento de biotecnologia eficiente.

No que diz respeito à fermentação submersa (FSm), composta por extrato de malte (EM), a atividade da lacase observada foi substancialmente elevada, havendo a necessidade de proceder-se uma diluição (20 vezes), onde, após a diluição, a atividade apresentada foi na ordem de 83.000 UI/L e considerada satisfatória para fungos basidiomicetos (Figura 6).

Nos meios de cultura contendo extrato de malte suplementados com CuSO<sub>4</sub> e ABTS (EM+CuSO<sub>4</sub> e EM+ABTS) observou-se inibição da atividade da lacase (Figura 6).



**Figura 6.** Atividade de lacase em fermentação submersa (FSm), em meio de cultivo contendo extrato de malte (EM), suplementado com CuSO<sub>4</sub> (EM+CuSO<sub>4</sub>) e ABTS (EM+ABTS), aos 25 dias de cultivo. Letras diferentes significam que há diferença estatística entre as médias ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

A inibição da atividade da lacase em EM+CuSO<sub>4</sub> pode estar relacionado à presença de Cu<sup>+2</sup>, pois mesmo sendo um micronutriente essencial para a maioria dos organismos vivos, a exigência deste metal por micro-organismos são, geralmente, em níveis muito baixos, na ordem de 1 a 10 mM. Adicionalmente, na sua forma livre, em níveis mais elevados, o cobre é extremamente tóxico para as células microbianas. (Hess *et al.*, 2002).

Em estudos realizados com *Trametes multicolor*, a síntese de lacase foi estimulada pela adição de cobre após dez dias de crescimento, numa concentração final de 1 mM (HESS *et al.*, 2002). De acordo com PERALTA *et al.* (2004), o estresse provocado pelos íons cobre parece ser a razão fisiológica da produção desta enzima por *Pleurotus pulmonarius*. Além disso, o cobre desempenha um importante papel na regulação da expressão gênica das lacases (COLLINS; DOBSON, 1997).

BALDRIAN e GABRIEL (2002) estudaram a produção de lacases por *Pleurotus ostreatus* em meio líquido, sob limitação de nitrogênio e na presença de metais, mostrando que a adição de cobre ou cádmio resulta na indução enzimática, independentemente do tempo em que estes são adicionados ao meio, aumentando também a estabilidade destas enzimas.

Estudos realizados em *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* e *Volvariella volvacea* mostraram que a expressão do gene da lacase na transcrição gênica é regulada pela

presença de cobre e vários compostos aromáticos (COLLINS; DOBSON, 1997; PALMIERI et al., 2000; CHEN et al., 2004a). ELISASHVILI et al. (2010) relatam que a estrutura e a concentração dos compostos aromáticos desempenham uma importante função na regulação da síntese enzimática.

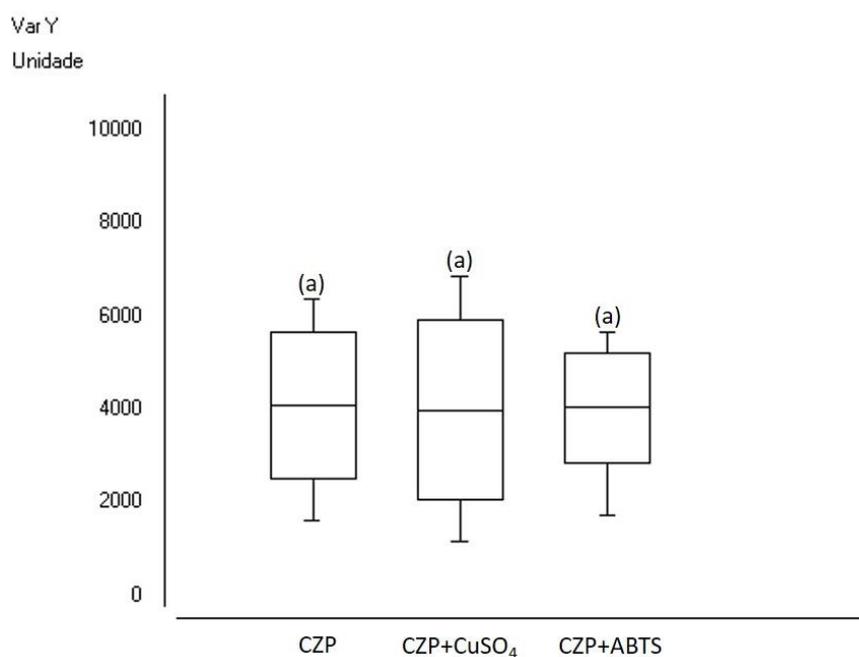
PALMIERI et al. (2003) detectaram a produção de duas isoenzimas de lacases em *P. ostreatus*, utilizando culturas suplementadas com cobre. A biossíntese enzimática deste fungo sofre influência de fatores como concentração das fontes de carbono e nitrogênio, suprimento de oxigênio, pH e proporção do inóculo (QINNGHE et al., 2004; MIKIASHVILI et al., 2006).

Apesar de a literatura evidenciar o potencial do  $\text{CuSO}_4$  e ABTS como indutores para lacase, nesse estudo com *Trametes* houve uma inibição significativa na determinação de lacase, isso possivelmente pode relacionado com a concentração utilizada no experimento (150  $\mu\text{M}$ ).

A produção de lacase em meio líquido também pode ser influenciada pela agitação, onde sob baixa agitação, a produção de lacase é favorecida, enquanto uma agitação alta pode e reduzir a síntese dessa molécula, por stress mecânico (FENICE et al., 2003; WESENBERG et al., 2003; COUTO; TOCA-TERRERA 2007). FENICE et al. (2003) demonstraram que a atividade da lacase de *Panus tigrinus* é fortemente afetada pela velocidade da agitação, onde acima de 500 rpm houve uma redução dos níveis de atividade enzimática (FENICE et al., 2003).

Na fermentação submersa (FSm), composta por meio Czapek (CZP), a atividade da lacase também foi significativa, embora com valores inferiores quando comparada à FSm em meio (EM) (Figuras 6 e 7). Adicionalmente, não houve diferença entre os tratamentos sem suplementação (CPZ) e com  $\text{CuSO}_4$  (CPZ+  $\text{CuSO}_4$ ) e ABTS (CZP+ABTS) (Figura 7).

No meio Czapek, a atividade da lacase também foi sinificativa, embora menor quando comparado ao meio malte (Figura 5). A fermentação utilizando o meio Czapek sem e com suplemento de  $\text{CuSO}_4$  e ABTS, mostraram-se estatisticamente iguais ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey (Figura 6). Isso possivelmente está relacionado pelo fato de cobre ser considerado um dos indutores de lacase mais eficientes, já que é necessário para a síntese das cobre polifenoloxidasas (GALHAUP et al., 2001; DEKKER et al., 2007).



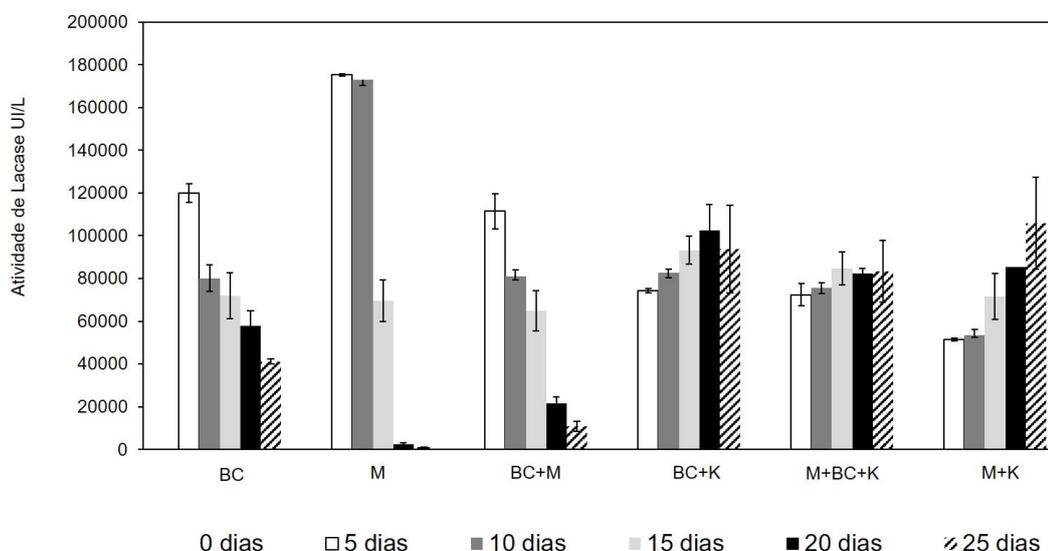
**Figura 7.** Atividade da lacase em fermentação submersa (FSm), em meio de cultivo contendo Czapek (CZP), suplementado com  $\text{CuSO}_4$  (CZP+ $\text{CuSO}_4$ ) e com ABTS (CZP+ABTS), durante 25 dias de cultivo. Letras iguais significam que há não diferença estatística entre as médias ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

A influência do cobre sobre a regulação da expressão gênica da lacase tem sido relatada para diversas espécies de fungos e, parece ocorrer via elementos sensíveis a metal (MRE – *metal responsive element*) presentes na região promotora de genes de lacase e que são indiretamente afetados pela presença de cobre no meio de cultivo (PALMIERI et al., 2000; FARACO, 2003; CAVALAZZI et al., 2005; NITHERANONT, 2011; KARP, 2012).

Assim, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que a fermentação submersa (FSm) sob agitação, respondeu de forma positiva à presença de  $\text{CuSO}_4$ , contudo, estudos envolvendo a expressão de lacases em *Trametes cubensis*, quando submetidos a diferentes condições de cultivo, ainda faz-se necessário, visando maior entendimento dos mecanismos reguladores dessa classe enzimática.

A atividade de lacase em Fermentação em Estado Sólido (FSS) foi determinada a partir da oxidação do 2,2'-azino-bis-etilbentiazolina (ABTS) de acordo com Buswell et al. (1995). Em um período de 25 dias de atividades, observou-se de uma excelente atividade de Lacase nos distintos substratos avaliados (Figura 8). Porém, no quinto dia constatou-se um aumento significativo de Lacase nos substratos: BC; (120.000 UI/L); M (180.000 UI/L) e BC+M (110.000 UI/L). Por outro lado com a adição do meio mineral (KARP), obteve-se uma atividade também significativa de Lacase. No entanto, inferior quando comparado aos outros

substratos sem adição deste meio. Isso possivelmente esteja relacionado com a composição deste meio mineral que continha  $\text{CuSO}_4$ .

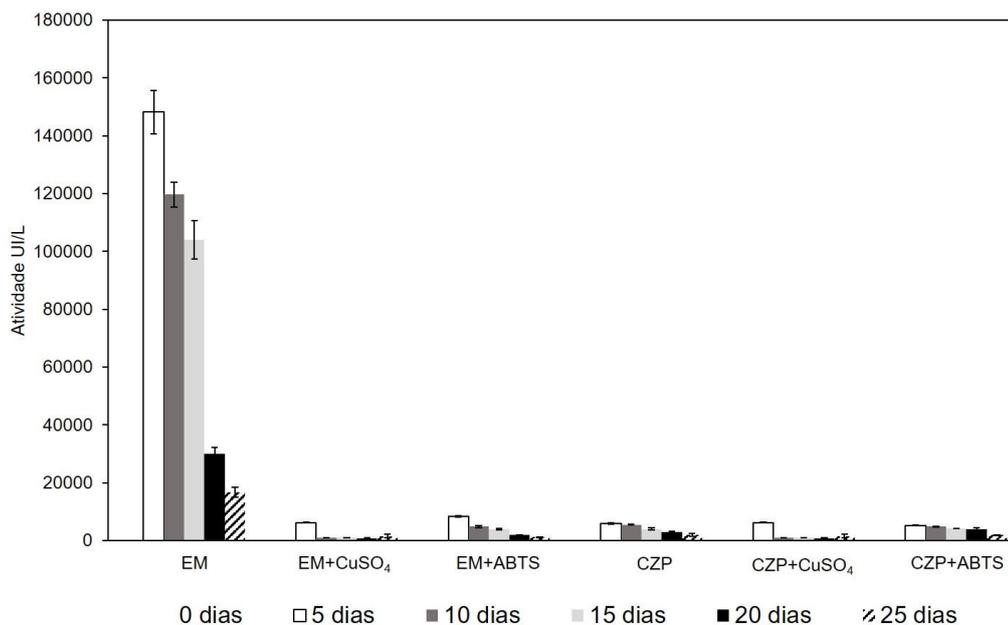


**Figura 8.** Atividade da lacase em fermentação em semi-sólida (FSS), durante 25 dias de cultivo suplementada com bagaço de cana (BC), marupá (M), bagaço de cana associado à marupá (BC+M), bagaço de cana suplementado com solução nutritiva\* (BC+K), marupá suplementado com solução nutritiva\* (M+K) e marupá associado à bagaço de cana e suplementado com solução nutritiva\* (M+BC+K) \*Solução nutritiva de Karp (2012).

A influência dos metais na produção de lacases é conhecida para uma ampla variedade de fungos, sendo o cobre um dos principais indutores de lacases.

COLLINS e DOBSON (1997) demonstraram que para *Trametes versicolor* a presença de 400  $\mu\text{M}$  de cobre no meio de cultivo provocou um aumento de 18 vezes na atividade de lacase ( $2500 \text{ U L}^{-1}$ ). FONSECA et al. (2010) verificaram que diferentes espécies nativas da Argentina (*Ganoderma applanatum*, *Peniophora* sp., *Pycnoporus sanguineus*, *Coriolus versicolor* e *F. antarcticus*) produziram mais lacase na presença de 500  $\mu\text{M}$  de cobre. *Peniophora* sp. foi o melhor produtor de lacase nessa condição ( $\sim 4140 \text{ U L}^{-1}$ ), mas *G. applanatum* mostrou-se especialmente sensível à adição desse metal, elevando a sua produção cerca de 40 vezes ( $\sim 1850 \text{ U L}^{-1}$ ) na presença de cobre.

Os dados atuais estão em discordância da literatura citada, isso possivelmente esteja relacionada com a concentração utilizada no meio de (KARP, 2012), que foi de 150  $\mu\text{M}$  dentre outros minerais. Entretanto, mesmo o  $\text{CuSO}_4$  a 150  $\mu\text{M}$  atuando de forma contrária, obtivemos resultados ainda superiores quando comparados à literatura citada, chegando ao pico de atividade no 10º dia, obtendo uma média aproximada de 100.000 UI/L (Figura 9).



**Figura 9.** Atividade da lacase em fermentação submersa (FSm), em meio de cultivo contendo extrato de malte (EM), suplementado com  $\text{CuSO}_4$  (EM+ $\text{CuSO}_4$ ) e ABTS (EM+ABTS) e em meio Czapek (CZP), suplementado com  $\text{CuSO}_4$  (CZP+ $\text{CuSO}_4$ ) e ABTS (CZP+ABTS).

Na fermentação em submersa (FSm) utilizando o Meio Extrato de Malte como única fonte de Carbono, observou-se um resultado expressivo na determinação de Lacase, chegando esta enzima ao pico da produção no 5º dia de Atividade média de 140.000 UI/L. Para o 10º dia obteve-se média de 120.000 UI/L e no 15º dia de Fermentação 100.000 UI/L (Figura 9). Outro ponto que merece nossas considerações foi o período de 15 dias em que a cepa CEST 03 manteve uma regular produção de Lacase. Nos demais dias de Fermentação obteve-se uma discreta atividade. Isso possivelmente esteja relacionado com o consumo do meio ou uma possível interferência dos indutores  $\text{CuSO}_4$  e ABTS.

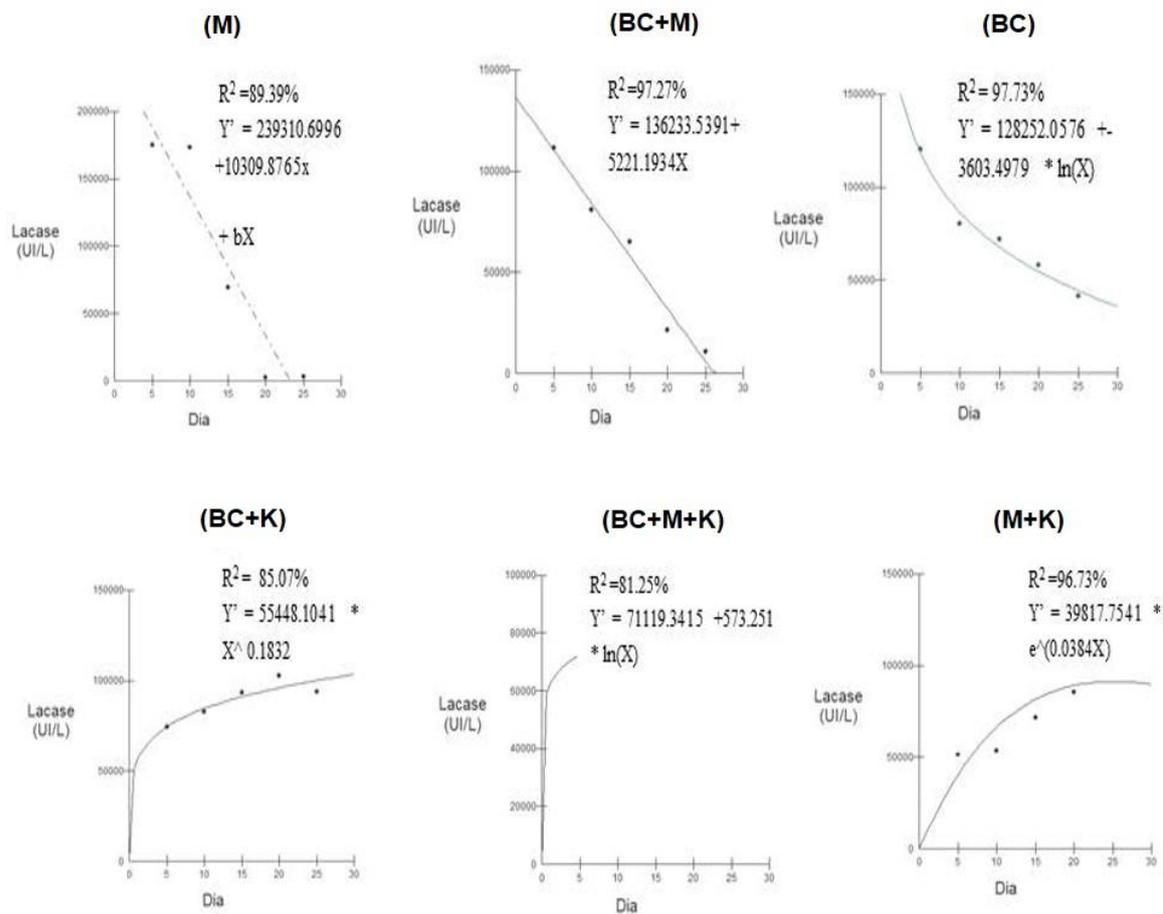
É importante ressaltar que, os resultados encontrados para *Trametes*, tanto na fermentação submersa, como na fermentação semi-sólida, apresentaram os maiores resultados de atividade da lacase no quinto dia fermentação.

Vários compostos orgânicos e inorgânicos têm sido descritos como inibidores de lacase. Segundo Morozova et al. (2007) ânions inorgânicos como fluoreto ( $\text{F}^-$ ), cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), azida ( $\text{N}_3^-$ ), cianeto ( $\text{CN}^-$ ) e hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) ligam-se ao sítio catalítico da enzima e impedem a transferência de elétrons do sítio T1 para o *cluster* T2/T3, inibindo a atividade enzimática. Íons metálicos ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ) e compostos orgânicos como ditiotreitol, ácido tioglicólico, dietil ditiocarbamato, L-cisteína e EDTA também parecem inibir lacases, contudo, alguns inibidores parecem afetar os subprodutos da degradação do

ABTS ao invés de, de fato, inibirem a atividade de lacase (BALDRIAN, 2006).

### 6.3.1. Ajustamento de curvas para a atividade de Lacase

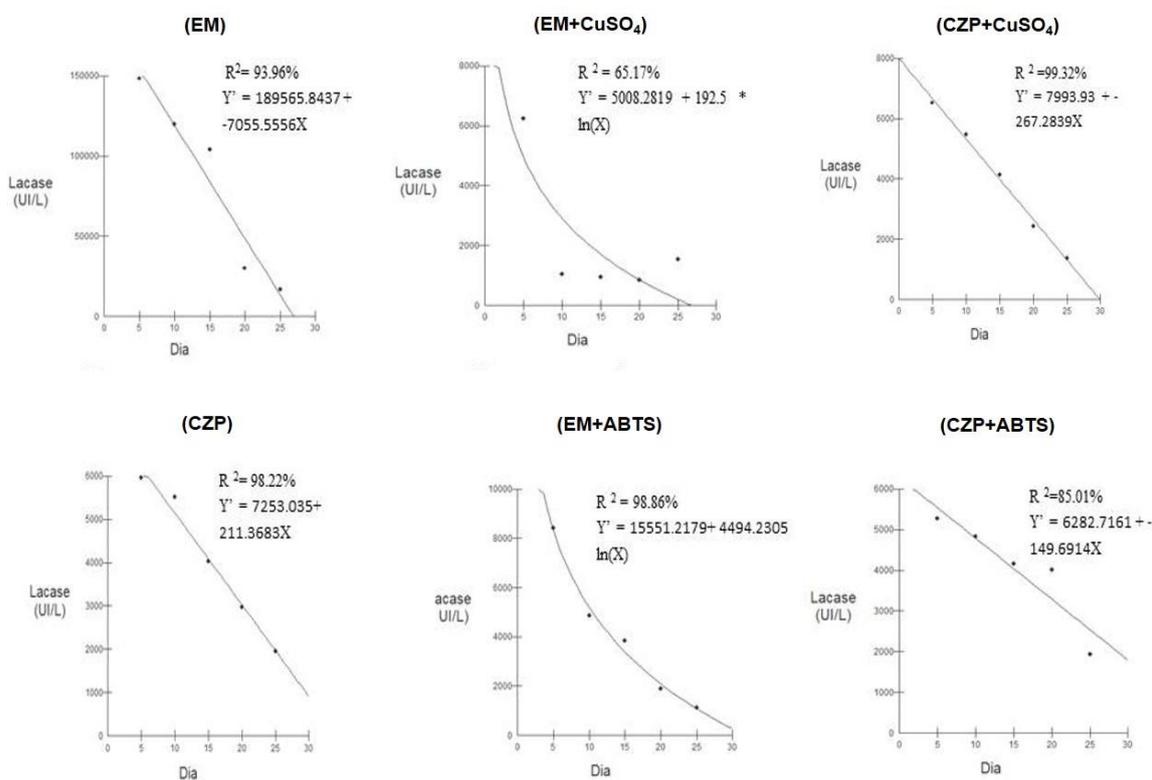
Visando verificar a resposta da atividade da lacase ao longo do tempo de fermentação semi-sólida (FSS) realizou-se testes de regressão, com ajustamentos de curvas, para definir o melhor modelo estatístico que justificasse a relação entre as duas variáveis (Figura 10).



**Figura 10.** Regressão linear da atividade da lacase em fermentação semi-sólida (FSS) em função do tempo, em meio de cultivo suplementado com marupá (M), bagaço de cana associado à marupá (BC+M), bagaço de cana (BC), bagaço de cana suplementado do solução nutritiva\* (BC+K), bagaço de cana associado à marupá e suplementado com solução nutritiva\* (BC+M+K) e marupá suplementado com solução nutritiva\* (M+K). Solução nutritiva de Karp (2012).

No tratamento utilizando resíduos de bagaço de cana associado ao marupá (BC+M), os modelos que mais se ajustaram foram os lineares (Figura 10). O tratamento com bagaço de cana suplementado com o meio mineral (BC+K), apresentou modelos estatísticos geométricos com  $R^2 = 85,07$  e  $81,25\%$  (Figura 10).

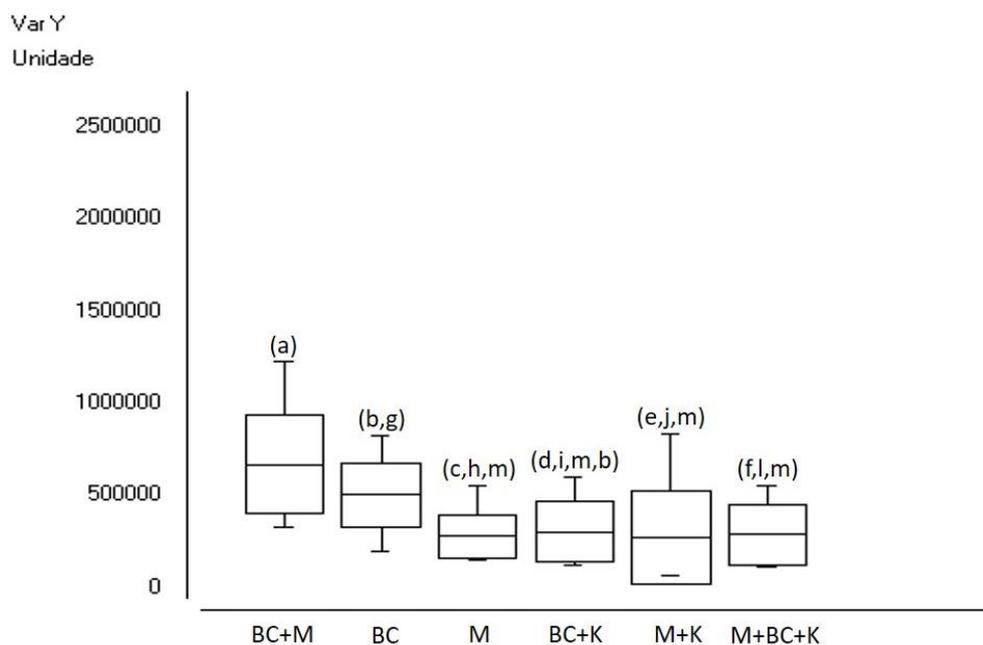
A FSS utilizando apenas o bagaço de cana (BC) apresentou modelo estatístico logarítmico, onde a atividade de lacase diminui à medida que o tempo de fermentação aumenta. Tal comportamento pode estar relacionado com o término da disponibilidade de carbono. Por outro lado, comportamento distinto foi evidenciado na fermentação em estado sólido quando acrescido de meio mineral, BC+M+K e M+K (Figura 10).).



**Figura 11.** Regressão linear da atividade da lacase em fermentação submersa (FSm) em função do tempo, em meio de cultivo em extrato de malte (EM), suplementado com CuSO<sub>4</sub> (EM+ CuSO<sub>4</sub>) e ABTS (EM+ABTS) e em meio Czapek (CZP), suplementado com CuSO<sub>4</sub> (CZP+ CuSO<sub>4</sub>) e ABTS (CZP+ABTS).

#### 6.4. Atividade da lignina peroxidase (LiP)

Na fermentação semi-sólida (FSS), utilizando diferentes fontes de carbono, a lignina peroxidase (LiP) apresentou atividade diferenciada entre os distintos meios de suplementação, sendo a maior atividade enzimática observada em meio contendo bagaço de cana associado ao marupá (BC+M), com valores médios de, aproximadamente, 50.000 (UI/L) (Figura 12). Entretanto, as melhores médias entre os dias de FSS foram atingidos entre o quinto e o décimo dia de atividade. Isso possivelmente esteja relacionado com o consumo do substrato ou ainda com o metabolismo do fungo, pois durante todo o experimento foi possível observar os picos da atividades entre os dias descritos acima.



**Figura 12.** Atividade da lignina peroxidase em fermentação em estado semi-sólido (FSS), durante 25 dias de cultivo, utilizando meio suplementado com marupá (M), bagaço de cana (BC), bagaço de cana associado à marupá (BC+M), marupá suplementado com solução nutritiva\* (M+K), bagaço de cana suplementado com solução nutritiva\* (BC+K) e marupá associado à bagaço de cana e suplementado com solução nutritiva (M+BC+K). \*Solução nutritiva de Karp (2012). Letras diferentes significam que há diferença estatística entre as médias ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

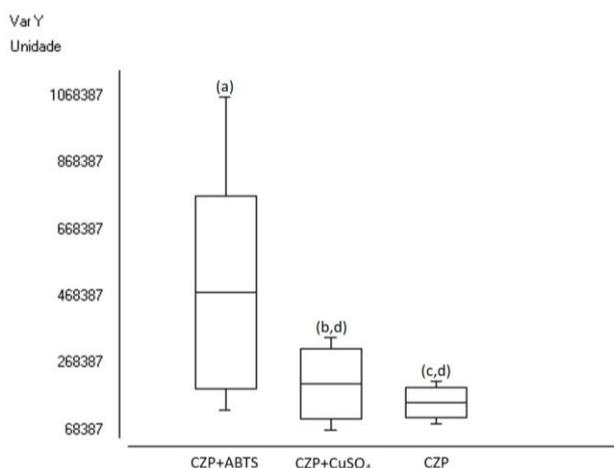
Segundo KAMIDA e DURRANT (2005), estudando a espécie *Pleurotus sajor-caju* observaram a atividade máxima da lignina peroxidase após 9 dias de fermentação semi-sólida suplementada com bagaço de cana contendo efluente têxtil, corroborando com os dados encontrados para *Trametes*, com, aproximadamente, 50.000 UI/L de atividade no quinto de fermentação, em meio contendo bagaço de cana.

De acordo com AGGELIS et al. (2003), das três principais enzimas ligninolíticas produzidas por fungos causadores de degradação branca (lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase), somente as lacases foram detectadas durante o crescimento de *Pleurotus ostreatus* em ensaios realizados em biorreator contendo efluentes da indústria de óleo de oliva.

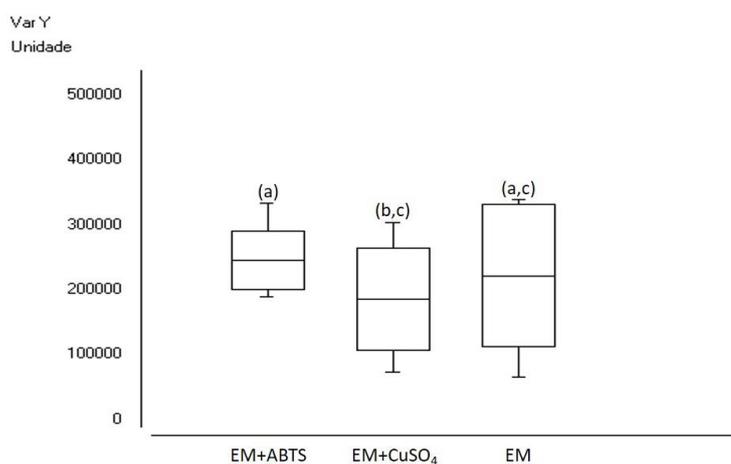
É importante ressaltar que, as variações nas atividades enzimáticas encontradas, incluindo *Trametes*, podem ser decorrentes da composição do meio de cultivo.

Quanto à fermentação submersa (FSm) em meio Czapek, suplementado com  $\text{CuSO}_4$  e ABTS, não foi observada diferença entre o controle e o meio acrescido de  $\text{CuSO}_4$ , sugerindo-se que a participação do ABTS como indutor da atividade enzimática (Figura 13). Ao passo

que, em meio malte os tratamentos suplementados com  $\text{CuSO}_4$  e ABTS não diferiram do controle (Figura 14).



**Figura 13.** Atividade da lignina peroxidase em fermentação submersa (FSm) utilizando meio Czapek (CZP), suplementado com  $\text{CuSO}_4$  (CZP+  $\text{CuSO}_4$ ) e ABTS (CZP+ABTS), durante 25 dias de cultivo. Letras diferentes significam que há diferença estatística entre as médias ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

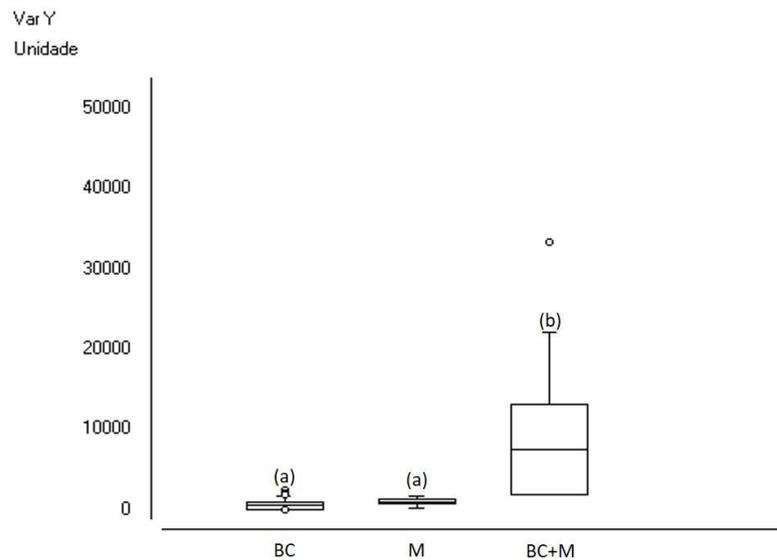


**Figura 14.** Atividade da lignina peroxidase em fermentação submersa (FSm) utilizando meio extrato de malte (EM), suplementado com  $\text{CuSO}_4$  (EM+  $\text{CuSO}_4$ ) e ABTS (EM+ABTS), durante 25 dias de cultivo. Letras diferentes significam que há diferença estatística entre as médias ao nível de 1% de significância pelo teste de Tukey.

### 6.5. Atividade da manganês peroxidase (MnP)

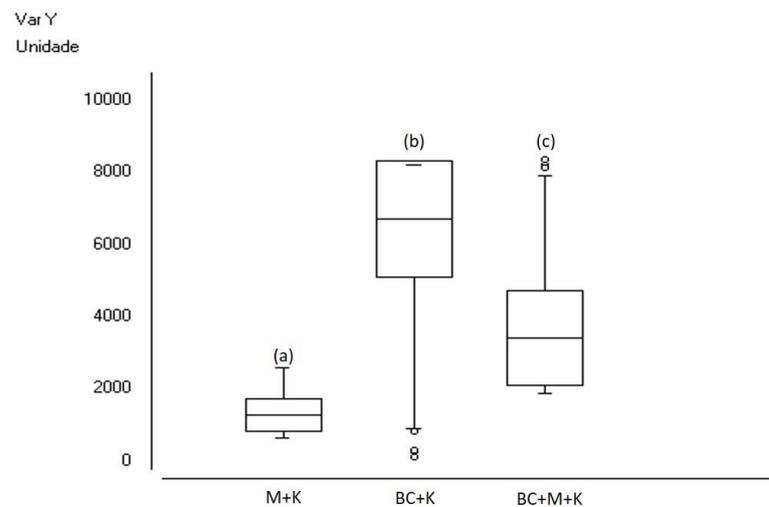
Na fermentação em estado semi-sólido (FSS), durante 25 dias de cultivo, não foi observada diferença na atividade enzimática da manganês peroxidase (MnP) entre os tratamentos utilizando como resíduos bagaço de cana (BC) e marupá (M). Contudo, quando avaliado o tratamento de bagaço de cana consorciado com marupá (BC+M), verificou-se uma

potencialização da atividade da MnP (Figura 15).



**Figura 15.** Atividade da manganês peroxidase (MnP) em fermentação em estado semi-sólido (FSS), durante 25 dias de cultivo, utilizando resíduo de marupá (M), bagaço de cana (BC) e bagaço de cana associado à marupá (BC+M). Letras diferentes significam que há diferença estatística entre as médias ao nível de 1% de significância pelo teste de Tukey.

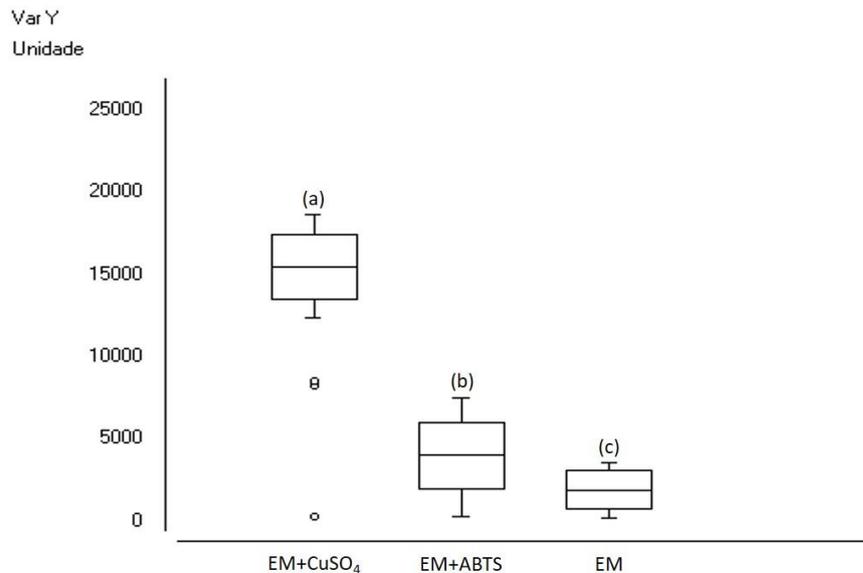
Em meios suplementados com solução nutritiva observou-se aumento da atividade da MnP, apresentando diferença entre os tratamentos, sendo BC+K o substrato com maior influência sobre a MnP, resultando em uma maior atividade enzimática (Figura 16).



**Figura 16.** Atividade da manganês peroxidase (MnP) em fermentação em estado semi-sólido (FSS), durante 25 dias de cultivo, utilizando resíduo de marupá suplementado com solução nutritiva\* (M+K), bagaço de cana suplementado com solução nutritiva\* (BC+K) e bagaço de cana associado à marupá e suplementado com solução nutritiva\* (BC+M+K). \*Solução nutritiva de Karp (2012). Letras diferentes significam que há diferença estatística entre as médias ao nível de 1% de significância pelo teste de Tukey.

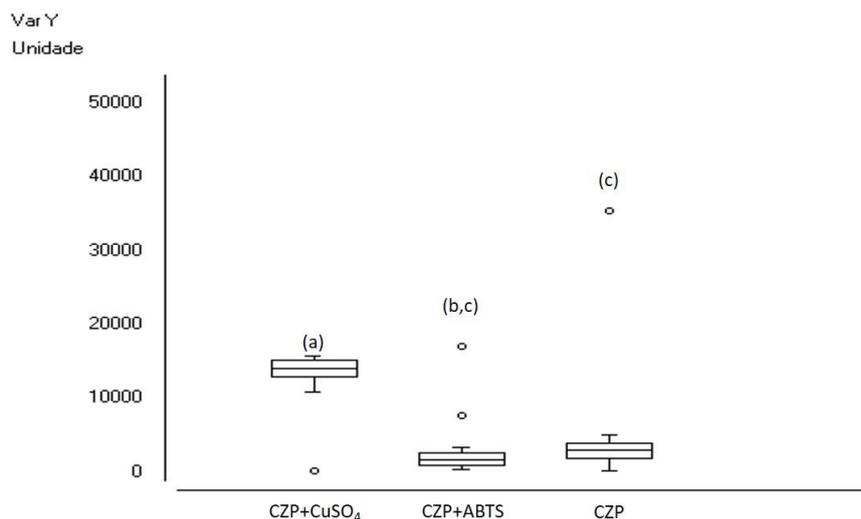
Segundo BONNEN et al. (1994), ao cultivar o fungo *Trametes villosa* em fermentação semi-sólida, observou a máxima atividade da enzima MnP no 10º dia de cultivo ( $23 \text{ U g}^{-1}$ ). Ao passo que *Agaricus bisporus*, cultivado em FSS, apresentou atividade máxima de  $2,4 \text{ U g}^{-1}$  no 5º dia de cultivo (ALEXANDRINO et al., 2007). Assim, os dados obtidos para *Trametes* sp. encontram-se cerca de 350 e 3.300 vezes superiores ao encontrado para *Trametes villosa* e *Agaricus bisporus*.

Quanto à fermentação submersa (FSm) utilizando o meio extrato de malte e suplementado com  $\text{CuSO}_4$  e ABTS, a atividade da MnP foi estatisticamente diferente entre os tratamentos, sendo potencializada na presença dos dois indutores estudados, com a maior atividade observada em meio contendo  $\text{CuSO}_4$  (Figura 17).



**Figura 17.** Atividade da manganês peroxidase (MnP) em fermentação submersa (FSm), durante 25 de cultivo, utilizando meio extrato de malte (EM), suplementado com  $\text{CuSO}_4$  (EM+ $\text{CuSO}_4$ ) e ABTS (EM+ABTS). Letras diferentes significam que há diferença estatística entre as médias ao nível de 1% de significância pelo teste de Tukey.

Na fermentação submersa (FSm) em meio Czapek (CZP), a atividade da MnP foi, cerca de, 3 vezes superior na presença de  $\text{CuSO}_4$ , quando comparada ao meio suplementado com ABTS (Figura e 18).



**Figura 18.** Atividade da manganês peroxidase (MnP) em fermentação submersa (FSm), durante 25 dias de cultivo, utilizando meio Czapek (CZP), suplementado com CuSO<sub>4</sub> (CZP+CuSO<sub>4</sub>) e ABTS (CZP+ABTS). Letras diferentes significam que há diferença estatística entre as médias ao nível de 1% de significância pelo teste de Tukey.

A atividade de MnP é sensível à presença de alguns metais. Vários metais (cobre, ferro, manganês, molibidênio, zinco e níquel) são essenciais para o crescimento fúngico e também atuam como co-fatores enzimáticos induzindo a atividade ligninolítica (BALDRIAN et al., 2005). Entretanto, estes metais são tóxicos ao fungo quando em excesso, podendo inibir o crescimento e a atividade de enzimas ligninolíticas (BALDRIAN, 2003; HATVANI; MÉCS 2003).

Estudos envolvendo *Lentinus edodes* demonstram a produção de 1,5 U/mL de atividade de MnP, quando cultivado, durante 7 dias, em substrato composto por uma mistura de resíduo de malte, serragem de carvalho e perlito (vidro vulcânico utilizado para aerar o meio) (HATVANI e MÉCS, 2001). No trabalho realizado por FUJIAN et al. (2001), com *Pleurotus sajor-caju*, desenvolveu-se um perfil de produção de MnP utilizando-se meio contendo palha explodida a vapor e farelo de trigo, sendo a atividade máxima atingida de 1,3 U/mL em cinco dias de cultivo.

ARORA et al. colaboradores (2002) avaliaram a produção de MnP em sete linhagens de basidiomicetos sob condição de fermentação em estado sólido, utilizando palha de trigo como substrato, durante 32 dias de cultivo e, constataram que a produção mais significativa de MnP foi de 29,8 U/mL apresentada pelo fungo *Phlebia radiata*. Ao passo que, *Pleurotus ostreatus*, quando cultivado em palha de trigo, apresenta pico máximo de atividade de MnP no sétimo dia de cultivo, com 0,006 U/mL (SHRIVASTAVA et al., 2005).

Os fungos de degradação branca, de modo geral, produzem diferentes combinações das enzimas do complexo ligninolítico, podendo produzir LiP e MnP, ou MnP e lacase, ou LiP e lacase, ou ainda, produzir apenas lacase e outras enzimas (HATTAKKA, 1994; BALAN; MONTEIRO, 2001). Adicionalmente, a produção combinada das enzimas MnP e lacase tem sido descritas como a forma mais comum expressada por fungos de degradação branca (PELAEZ et al., 1995; NERUD; MISURCOVA, 1996). Ademais, a atividade de MnP e/ou lacase podem ser suficientes na degradação da lignina em alguns fungos (NERUD, 1996).

### 6.6. Purificação da lacase

O extrato enzimático, proveniente da fermentação em estado sólido (FSS), utilizando resíduo de marupá durante 10 dias de cultivo, após as etapas de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica, resultou na purificação parcial da lacase, com rendimento de 40% e fator de purificação 1,5 vezes (Tabela 4).

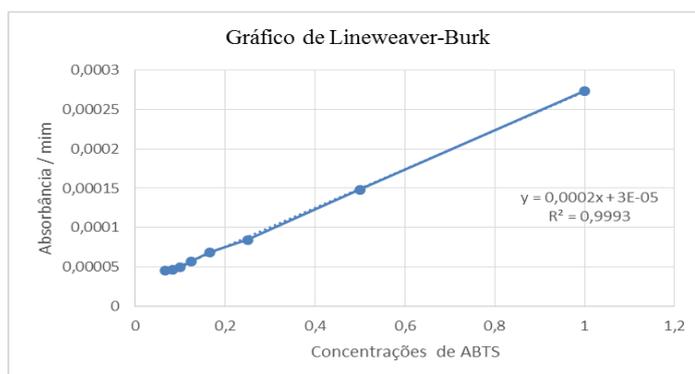
**Tabela 4.** Purificação e rendimento em diferentes etapas de purificação de lacase de *Trametes cubensis*.

Passos	Volume (mL)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Total (mg)	Atividade Recuperada (%)	Proteínas (µg/mL)	Fator de Purificação
<b>Extrato Bruto</b>	26	140,78	366,02	100%	12,3	1
<b>Precipitação em (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	10	2,06	206,00	56%	24,3	0,014
<b>HiTrap DEAE FF</b>	7	212,15	148,50	40%	0,2	1,506

As lacases produzidas por fungos tem sido amplamente purificadas por meio da combinação de várias técnicas, incluindo etapas de precipitação com sais e/ou solventes e cromatografias, destacando-se a precipitação com acetona e sulfato de amônio e cromatografias de exclusão molecular, troca iônica, hidrofobicidade e afinidade.

Quanto aos parâmetros cinéticos, as constantes de Michaelis-Menten (Km), velocidade máxima de reação (Vmax) e Kcat, foram determinadas a partir da variação na concentração do

substrato ABTS 0,03% (p/v), sendo os valores das constantes obtidos a partir da equação de Lineweaver-Burk ou duplo-recíproco (Figura 19).

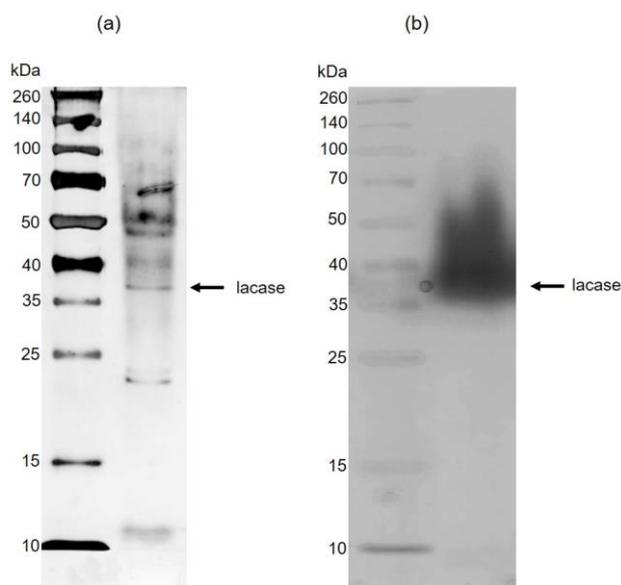


**Figura 19.** Gráfico de Lineweaver-Burk ou duplo-recíproco.

A partir da tabulação dos dados, obteve-se Km de 6,66 m, Vmax de 33,33 e Kcat de 0,224, evidenciando, desta maneira, que a lacase parcialmente purificada de *Trametes* sp. consiste em uma enzima Michaeliana.

## 6.7. SDS-PAGE

Após a cromatografia de troca iônica, as frações com a presença de atividade da lacase foram reunidas e submetidas à análise em SDS-PAGE e zimograma (Figura 20). A partir destes métodos, observou-se que a lacase parcialmente purificada apresenta massa molecular aparente de 40 kDa (Figura 20).



**Figura 20.** SDS-PAGE (a) e zimograma (b) da lacase parcialmente purificada de *Trametes* sp.

Muitos fungos secretam isoformas de lacase (LEONTIEVSKY et al., 1997) que podem se originar a partir do mesmo ou de diferentes genes que codificam essa enzima lacase (ARCHIBALD et al., 1997). O número de isozimas difere entre as espécies e também dentro das espécies, dependendo se eles são induzidas ou não induzidas (ASSAVANIG et al., 1992).

OBARA et. al. (2005) realizaram eletroforese PAGE em condições nativas da fração obtida da cromatografia DEAE-Celulose de *Botryosphaeria rhodina* que revelou somente uma banda colorida correspondente ao substrato ABTS oxidado, indicando a presença de proteínas com atividade de lacases PPO-I.

## 7. CONCLUSÃO

- ✓ No teste qualitativo com o teste de *Bavedamm* a cepa CEST 03, evidenciou um resultado significativo na formação de halos indicativos de fenol oxidases com média de 5,5 mm.
- ✓ A cepa CEST -03 mostrou resultados promissores na produção de Lacase e Lignina Peroxidase, tanto em FSm e FSS;
- ✓ O pico de maior atividade de Lacase ocorreu no 5º dia de atividade em ambas fermentações;
- ✓ A maior atividade de lacase em FSS, foi obtida utilizando o Marupá como única fonte de carbono, obtendo média de 180.000 UI/L de lacase;
- ✓ A maior atividade de lacase em FSm ocorreu quando foi utilizando o extrato de malte, atingindo uma média de 150.000 UI/L no quinto dia de fermentação;
- ✓ A presença de indutores na maioria das vezes inibiu a atividade enzimática;
- ✓ Apesar dos resultados favoráveis, urge a necessidade de variar as concentrações de ABTS e CuSO<sub>4</sub> e ainda testar outros indutores;
- ✓ A recuperação da enzima foi de 40% e o Fator de Purificação foi de 1,5;
- ✓ A massa molecular aproximada foi de 40 KDa.

### 7.1. Considerações Finais e sugestões

- ✓ É importante variar as concentrações dos indutores como por exemplo  $\text{CuSO}_4$  na tentativa de obter resultados ainda mais expressivos quanto a atividade enzimática;
- ✓ Avaliar outros indutores como xilidina, etanol, guaiacol e outros;
- ✓ Utilizar biorreatores obtendo assim um maior controle sobre componentes fundamentais para a melhoria dos resultados como:  $\text{N}$ ,  $\text{O}_2$  e agitação variando ainda as bateladas entre contínua ou descontínua e com isso acenar a possibilidade de potencialização dos resultados;
- ✓ Avaliar ainda outros tipos de Colunas como a de exclusão molecular S-200; coluna de alta performance HP; ou ainda que utilize a hidrofobicidade, com o objetivo de melhorar a recuperação da proteína.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGELIS, G.; ICONOMOU, D.; CHRISTOU, M.; BOKAS, D.; KOTZAILIAS, S.; CHRISTOU, G.; TASAGO, V.; PAPANIKOLAOU, S. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Res*, v. 37, p. 3897-3904. 2003.
- ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 364-368. 2007.
- AGUIAR FILHO, J.M.M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana de açúcar**. 2008. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. São Paulo-SP.
- AKHMEDOVA, Z.R.; BELETSKAYA, O.P.; DAVRANOV, K.D. Component composition of extracellular cellulases of basidiomycetes. *Mikologia i fitopatologia*, v. 28, n. 2, p. 39-44. 1994.
- AKHTAR, M. et al. Biomechanical pulping: a mill-scale evaluation. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 28, n. 3-4, p. 241-252. 2000.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, p. 403-410. 1990.
- ANDRADE, Angela Lúcia de Carvalho. **Aspectos do Crescimento e Influência de Parâmetros Físicos na Atividade de Lacase do fungo Amazônico *Trametes lactinea***. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) - Universidade de Estado do Amazonas, Manaus-Am.
- ANSELMO, A.M.; ALMEIDA-VARA, E.; SENA-MARTINS, G.; FERREIRA-LEITÃO, V.S. Enzimas em catálise ambiental. In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. (Ed.). Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado. *Interciência*, Rio de Janeiro, p. 387-405. 2008.
- ARCHIBALD, F.S., BOURBONNAIS, R.; JURASEK, L.; PAICE, M. G.; REID, I.D. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, v. 53, p. 215-336. 1997.
- ARORA, D.S.; GILL, P.K. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology*, v. 77, p. 89-91. 2001.
- ARORA, D.; SHARMA, R. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160, n. 6, p. 1760-88. 2010.
- ASSAVANIG, A.; AMORNKITTICHAROEN, B.; EKPAISAL, N.; MEEVOOTISOM, V.; FLEGEL, T.W. Isolation, characterization and function of laccase from richoderma. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 38, p. 198-202. 1992.

BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 206, p. 69-74. 2002.

BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, n. 1, p. 78-91. 2003.

BALDRIAN, P. Fungal laccases: occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, p. 215–242. 2006.

BALDRIAN, P., VALÁŠKOVÁ, V., MERHAUTOVÁ, V.; GABRIEL, J. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology*, v. 156, n. 5-6, p. 670-676. 2005.

BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanism white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol*, v. 28, p. 78-87. 1994.

BETTIN, F.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T.A.; SILVEIRA, M.M.; DILLON, A.J.P. Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, v. 36, p. 1-9. 2009.

BIANCHI, V.L; MORAES, I.O; CAPALBO, D.M. Fermentação em estado sólido. In.: SCHMIDELL,W.; LIMA,U.; AQUARONE,E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. v. 3, 1ª ed. São Paulo, UdgardBlucche, p. 247-276. 2001.

BISWAS, S.R; JANA, S.C.; MISHRA,A K.; NANDA,G. Production, purification, and characterization of xylanases from a hyperxylanolytic mutant *Aspergillus sochraceus*. *Biotechnol Bioeng.*, v. 5, n. 35, p. 244-51. 1990.

BLANCHETTE, R.A. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Biological Transformation of Wood by Microorganisms*, v. 73, n. 51, p. 999-1010. 1995.

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

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A.B.; PAIVA, C.L.A.; ALENCASTRO, R.B.; COELHO, R.R.R.C. *Enzimas em Biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciencia. 2008.

BONNEN, A.M.; ANTON, L.H.; ORTH, A.B. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 3, p. 960-965. 1994.

BONOMO R.P.; BOUDET A.M.; COZZOLINO R.; RIZZARELLI E.; SANTORO A.M.; STERJIJADES R.; ZAPPALÀ R. A comparative study of two isoforms of laccase secreted by “white-rot” fungus *Rigidoporus lignosous*, exhibiting significant structural and functional differences. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 71, p. 205-211. 1998.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G.; FREIERMUTH, B.; BIDOE, E.; BORNEMAN, S. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 63, p. 4627-4632. 1997.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G.; REID, I.D.; LANTHIER, P.; YAGUCHI, M. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 61, p. 1876-1880. 1995.

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

BREEN, A., SINGLETON, F.L. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. Curr. BURKERT, J.F.M. *Otimização das condições de produção da lipase por Geotrichum candidum NRRL-Y552*. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

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

CASTRO e SILVA, A. *Micromorfologia da degradação de madeira da espécie Amazônica Hura creptans L. por fungos ligninolíticos pertencentes a classe Hymenomyces*. 1996. Tese de Doutorado, INPA/FUA, Manaus, 180p.

CAVALAZZI, J.R.P.; KASUYA, C.M.; SOARES, M.A. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, n. 4. 2005.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 171, p. 501-505. 2005.

CHEN, S.; GE, W.; BUSWELL, J.A. Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Eur. J. Biochem.*, v. 271, p. 318-328. 2004.

CLAUS, H. Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron.*, v. 35, p. 93-96. 2004.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 58, p. 582-594. 2002.

COLLINS, P.J.; DOBSON, A.D.W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 63, p. 3444-3450. 1997.

COLLINS, P.J.; FIELD, J.A.; TEUNISSEN, P.; DOBSON, A.D.W. Stabilization of lignin peroxidases 363 in white rot fungi by tryptophan. *Appl Environ. Microbiol.*, v. 63, p. 2543-2548. 1997.

- COLLINS, P.J.; KOTTERMAN, M.J.J.; FIELD, J.A.; DOBSON, A.D.W. Oxidation of anthracene and benzo[ $\alpha$ ]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, p. 4563-4567. 1996.
- CONESA, A.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology*, v. 93, p. 143-158. 2002.
- COUTO, R.S.; SANROMAN, M.A. Application of solid state fermentation to food industry- A review. *Journal of Food Engineering*, v. 76, p. 291-302. 2006.
- COUTO, S.R.; TOCA-HERRERA, J.L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnol. Adv.*, v. 25, p. 558-569. 2007.
- COUTO, R.S.; TOCA-HERRERA, J.L. Laccases in the textile industry. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, v. 1, p. 115-120. 2006a.
- COUTO, S.R.; HERRERA, J.L.T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 500-513. 2006b.
- D'SOUZA, T.M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C.A. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 10, p. 3739-3744. 1999.
- DAVIS, S.; BURNS, R. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 32, p. 721-726. 1990.
- DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.; GIESE, E.C.; GODOY, S.D.; COVIZZI, L.G. Influence of nutrients on enhancing laccase production by "*Botros haeria rhodina*" MAMB-05. *Journal of the Spanish Society for Microbiology*, v.10, n. 3, p. 177-186. 2007.
- DEKKERS, K.L.; YOU, B.J.; GOWDA, V.S.; LIAO, H.L.; LEE, M.H.; BAU, H.J.; UENG, P.P.; CHUNG, K.R. The *Cercospora nicotianae* gene encoding dual O-methyltransferase and FAD-dependent monooxygenase domains mediates cercosporin toxin biosynthesis. *Fungal Genet Biol.*, v. 5, p. 444-54. 2007.
- DENIZLI, A.; CIHANGIR, N.; TÜZMEN, N.; ALSANCAK, G. Removal of chlorophenols from aquatic systems using the dried and dead fungus *Pleurotus sajor-caju*. *Bioresour. Technol.*, v. 96, p. 59-62. 2005.
- DHAWAN, S.; LAL, R.; HANSPAL, M.; KUHAD, R.C. Effect of antibiotics on growth and laccase production from *Cyathus bulleri* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresour. Technol.*, v. 96, p. 1415-1418. 2005.
- DIAS A.A. *Biorremediação de águas ruças: caracterização de lacases do fungo Euc-1*. 2004. Tese (Doutorado) Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro.
- DO VALE, J. S. *Produção e caracterização molecular de lacases de Agaricus blazei obtidas por fermentação de resíduos agroindustriais*. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR.

DORIO, L.A. et al. Development of a bioreactor system for the decolorization of dyes by *Coriolus versicolor* f. *antarticus*. *Chemosphere*, v. 72, n. 2, p. 150-156. 2008.

DURÁN, N. Remoção enzimática de cor de efluentes da indústria de celulose e papel. In: 3º *Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC)*. Anais. Rio de Janeiro, 1997.

DURÁN, N. Enzimas ligninolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Org.). *Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: EDUCS. pp 245-260. 2004.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: EMBRAPA. p. 269-292. 1997.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Appl. Catal., B: Environ.*, v. 28, p. 83-99. 2000.

DURRAND, A.; DE LA BROISE D.; BLACHERE, H. Laboratory scale bioreactor for solid state process. *Journal of Biotechnology*, v. 8, p. 59-66. 1988.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*, v. 144, n.1, p. 37-42. 2009.

ELISASHVILI, V.; PENNINGCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; Khardziani, T. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresour Technol.*, v. 99, p. 457-462. 2008.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; Khardziani, T.; AGATHOS, S.N. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, v. 37, p. 1091-1096. 2010.

ENGLISH, A.M.; TSAPRAILIS, G. Catalytic structure-function relationships in heme peroxidases. *Adv. Inorg. Chem.*, v. 43, p. 79-125. 1995.

ERIKSSON, K.E. Lignin Biodegradation. In: HEITNER, C.; DIMMEL, D.; SCHIMIDT, J. (Eds.). *Lignin and Lignans: Advances in Chemistry*, 1 ed., p. 629. 2010.

ERIKSSON, K.E.; BLANCHETTE, R.A.; ANDER, P. Microbial and enzymatic degradation wood and wood components. *Berlin: Springer-Verlag*, 1 ed., p. 407. 1990.

FARACO, V.; GIARDINA, P.; SANNIA, G. Metalresponsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Great Britain Microbiology*, v. 149, p. 2155-2162. 2003.

FENICE, M.; SERMANNI, G.G.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater based media. *J Biotech*, v. 100, p. 77-85. 2003.

FERREIRA, L.F.R. *Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos*. 2009. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP. Piracicaba-SP.

FONSECA, F.L.; NOHARA, L.L.; CORDERO, R.J.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; ALMEIDA, I.C.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M.L. Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. *Infect. Immun.*, v. 78, p. 3861–3870. 2010.

FONSECA, M.D.P. *Produção de Enzimas Oxidativas por Fungos Amazônicos Degradadores de Madeira*. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - MBT), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus-AM. 120p.

FORGIARINI, E. *Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP)*. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC. 110f.

FREEDONIA - The Freedonia Group Incorporated. *World Enzymes: industry study with forecasts for 2015 and 2020*. 2011. Disponível em: <<http://www.freedoniagroup.com/brochure/28xx/2824smwe.pdf>> Acesso em: 22/09/2014.

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.

GALHAUP, C.; WAGNERA, B. H.; HALTRICHA, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 529-536. 2001.

GALHAUP, C.; WAGNER, H.; HINTERSTOISSER, B.; HALTRICH, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 529-536. 2002.

GARCIA-ARELLANO, H.; ALCALDE, M.; BALLESTEROS, A. Use and improvement of microbial redox enzymes for environmental purposes. *Microb. Cell Factor*, v. 3, p. 1-3. 2004.

GASSARA, F.S.K.; BRAR, R.D.; TYAGI, M.; VERMA, R.Y.; SURAMPALLI. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engi. J.* v. 49, p. 388-394. 2010.

GIARDINA, P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, A.; VANHULLE, S.; SANNIA, G. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 67, p. 369–385. 2010.

GILL, P.K.; ARORA, D.S. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 30, p. 28-33. 2003.

GOMES, S.A.S.S.; REBELO, M.J.F. A new laccase biosensor for polyphenols determination. *Sensors*, v. 3, p. 166-175. 2003.

GONÇALVES, A.P.V.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Analysis of a BSTR reactor for triglyceride hydrolysis with an immobilised cutinase. *Journal of Molecular Catalysis B- Enzymatic*, v. 5, p. 35-38. 1998.

HANKIN, L.E.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, v. 67, n. 3, p. 597-607. 1975.

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

HATTORI, T.; SHIMADA, M. Microbial, enzymatic and biomimetic degradation of lignin in relation to bioremediation. *Wood and Cellulosic Chemistry*, 2 ed., p. 547-571. 2001.

HATVANI, N.; MÉCS, I. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 55, n. 2, p. 199-203. 2003.

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

HESS, J.; LEITNER, C.; GALAHUP, C.; KULBE, K.D.; HINTERSTOISSER, B.; STEINWENDER, M.; HLATRICH, D. Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98, p. 229-241. 2002.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *N. Wood Science and Technology*, v. 24, p. 23-63. 1990.

HILDÉN, K.; HAKALA, T.K.; LUNDELL, T. Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnol Lett*, v. 31, p. 1117-1128. 2009.

HOU, H.; ZHOU, J.; WANG, J.; DU, C.; YAN, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1415-1419. 2004.

IANDOLO, D. et al. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* tomato pomace. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 163, p. 40-51. 2011.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I.; SMITH, D. W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal Environmental Engineering and Science*, v. 3, p. 1-19. 2004.

JONG, E.; DE VRIES, F.P.; FIELD, J.A.; VANDER ZWAN, R.P. Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidase activity. *Mycology Research*, v. 96, p. 1098-1104. 1992.

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

KARIMA, B. *Étude de l'alphaamylase de levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) ET cultivées sur un milieu à base de lactoserum*. 2008. Dissertation présentée au Département de Biochimie et Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, France, 104p.

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

KARP, S.; FARACO, V.; AMORE, A.; BIROLO, L.; GIANGRANDE, C.; SOCCOL, V.T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 114, p. 735-739. 2012.

KARP, S. G. *Development of a biotreatment for delignification of sugarcane bagasse and production of laccases*. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 147 f.

KHINDARIA, A.; GROVER, T.A.; AUST, S.D. Oxalate-dependent reductive activity of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys.* v. 1, n. 314 (2), p. 301-6. 1994.

KIRK, T. K.; CROAN, S.; TIEN, M.; MURTAGH, K. E.; FARRELL, R.L. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 8, p. 27-32. 1986.

KIRK, T.K.; BURGESS, R.; KONING JR., J. Use of fungi in pulping wood: an overview of biopulping research. In: LEATHAM, G. (Ed.). *Frontiers in Industrial Mycology*, p. 99-111. 1992.

KO, E.-M.; LEEM, Y.E.; CHOI, H.T. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 57, p. 98-102. 2001.

KO, K.S.; JUNG, H.S. Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 75, n. 3, p. 191-199. 1999.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: future prospects. *IK International*. 2007.

LANTE, A.; CRAPISI, A.; KRASTANOV, A.; SPETTOLI, P. Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor. *Process Biochem.*, v. 36, p. 51-58. 2000.

LASERGENE. User's guide: A manual for the Lasergene System. *Biocomputing Software for Windows*. 1994. 253p.

LEONTIEVSKY, A.; MYASOEDOVA, N.; POZDNYAKOVA, N.; GOLOVLEVA, L. 'Yellow' laccase of *Panus tigrinus* oxidises non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. *FEBS Letters*, v. 413, p. 446-448. 1997.

LEVIN, L.; FORCHIASSIN, F.; RAMOS, A.M. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*, vol. 94, p. 377-383. 2002.

MADHAVI, V.; LELE S.S. Laccase properties and applications. *Bioresources*, v. 4, p. 1694-1717. 2009.

MACIEL, M.J.M.; CASTRO E SILVA, A.; RIBEIRO, H.C.T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.13, n. 6. 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10. ed. São Paulo: Person Education, 2004.

MATOS A.J.F.S. *Tratamento de águas ruças pelo fungo basidiomiceta Ganoderma applanatum (Pers.) Pat. e caracterização da lacase induzida*. 2006. Tese (Doutorado), Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro.

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

MENEZES, C.B; BONUGLI-SANTOS, R.C.; MIQUELETTO, P.B.; PASSARINI, M.R.Z.; SILVA, C.H.D.; JUSTO, M.R.; LEAL, R.R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V.M.; BERLINCK, R.G.S.; SETTE, L.D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state. *Brazil. Microbiol Res*, v. 165, p. 466-482. 2010.

MIKIASHVILI, N.; WASSER, S.P.; NEVO, E.; ELISASHVILI, V. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 22, p. 999-1002. 2006.

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

MINUSSI, R.C.; PASTORE, G.M.; DURÁN, N. Potential Laccase in the food industry. *Tends in Food Science e Tecnology*, v. 13, p. 205-216. 2002.

MOREIRA, M.H.; FEIJOO, G.; PALMA, C.; LEMA, J.M. Continuous production of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam in a pulsedpacked bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 56, p. 130–137. 1997.

MORRISSEY, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gel: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, v. 117, n. 2, p. 307-310. 1981.

MUÑOZ, C.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, A.T.; MARTÍNEZ, M.J. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and M<sup>2+</sup> oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 63, p. 2166-2174. 1997.

MUNARI, F M.; GAIO, T.A.; DILLON, A.J.P. Phenol degradation and colour removal in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju* with paper mill eluents. *Biocatal. Biotransform.* v. 25, p. 24–28. 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 4 ed. New York: Freeman and Company. 2006.

NEPOMUCENA, R.M.P. **Avaliação do potencial microbiano de crescimento e secreção de lacase do fungo Amazônico *Lentinus crinitus***. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia-MBT), Universidade do Estado do Amazonas – UEA. 140p.

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

NITHERANONT, T.; WATANABE, A.; ASADA, Y. Extracellular laccase produced by an edible basidiomycetous mushroom, *Grifolafrondosa*: purification and characterization. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 75, n. 3, p. 538-43. 2011.

NYANHONGO, G. S.; GOMES, J.; GÜBITZ, G.; ZVAUYA, R. ; LEIA, J.S.; STEINER, W. Produção de lacase por nova linhagem de *Trametes modesta*. *Bioresource Tecnologia*, v. 84, n. 3, p. 259-263. 2002.

OBARA, F.W.H; VREA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D.T.; SILVA, M.L.C. Purificação de lacases PPO-I de *Botryosphaeria rhodina*. *Acta Sci. Biol. Sci.* (Maringá), v. 27, n. 3, p. 303-310. 2005.

OLIVEIRA, J.S.; SOUZA, S.E.; OLIVEIRA, L.L.; CARVALHO, J.S.; MOREIRA, D.M.O. Distribuição do fungo *Cladosporium cladosporioides* em regiões de produtores de café da Bahia. *Bahia Agrícola*, v. 6, n. 3, p. 72-75. 2004.

PAICE, M.G.; BEMIER, R.; JURASEK, L. Viscosity-enhancing bleaching of hardwood kraft pulp with xylanase from a cloned gene. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 32, p. 235-239. 1988.

PALMA, M.B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. Tese (Doutorado - Departamento d Engenharia Química e Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianopolis-SC.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; FONTANELLA, B.; SANNIA, G. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 3, p. 920-924. 2000.

PALMIERI, G.; CENNAMO, G.; FARACO, V.; AMORESANO, A.; SANNIA, G.; GIARDINA, P. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, n. 2–3, p. 220–230. 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, v. 6, p. 153–162. 2000.

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

PELAEZ, F.; MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation and manganese peroxidase by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 1091–1096. 2010.

PERALTA, R.M.; SOUZA, C.G.M.; BÔER, C.G. As principais oxidoredutases de uso industrial. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (Ed.). *Enzimas como agentes biotecnológicos*, 2004.

POZDNYAKOVA, N.N.; RODAKIEWICZ-NOWAK, J.; TURKOVSKAYA, O.V. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 30, p. 19-24. 2004.

QINNGHE, C.; ZIAOYU, Y.; TIANGUI, N. The screening of culture condition and properties of xylanase by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Proc. Biochem.*, v. 39, p. 1561-1566. 2004.

RAHÃO NETO, J. Purificação de Enzimas. In: LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. v. 3, 1ª ed. São Paulo, UrdgardBlucche, p. 377-390. 2001.

**RASERA, K., FERLA, J.; DILLON, A.J.P., RIVEIROS, R. Immobilization of laccase from *Pleurotus sajor-caju* in polyamide membranes. *Engineering with Membranes 2008*, v. 245, n. 1–3, p. 657–661. 2009.**

RIVA S. Laccases: blues enzymes for green chemistry. *Tends in Biotechnology*, v. 24, p. 221-226. 2006.

SADHASIVAM, S.; SAVITHA, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F.H. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 736-742. 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Rapid isolation of yeast DNA. In: Molecular cloning, a laboratory manual (Sambrook J and Russel DW, eds.). *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York, 631-632. 2001.

SANT'ANA, JR.; G.L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia e Bioquímica*, v. 2, 1ª ed. São Paulo, UrdgardBlucche, p.351-356. 2001.

SANTOS, F. H.. Análise Conformacional de modelos de lignina. *Química Nova*, Juiz de Fora - MG, v. 24, n. 4, p.480-490. 2001.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. ***Biotecnologia Industrial: Engenharia e Bioquímica***, vol. 2, 1ª ed. São Paulo, UdgardBluche, p. 5-18. 2001.

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

SHIN, K.S. The role of enzymes produced by white-rot fungus *I. lacteus*, in the decolorization of the textile industry effluent. ***J Microbiol.***, v. 42, p. 37-41. 2004.

SILVA, R.; GOMES, E. Ligninases. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (Ed.). ***Enzimas como agentes biotecnológicos***. Ribeirão Preto: Legis Summa. p. 349-379. 2004.

SMÂNIA, E.F.A. Optimal Parameters For Cinnabarin Synthesis By *Pycnoporus sanguineus*. ***J. Chem. Biotechnol.***, v. 70, p.57-59. 1997.

SOARES, A.; JONASSON, K.; TERRAZAS, E.; GUIEYSSE, B.; MATTIASSON, B. The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol. ***Appl. Microbiol. Biotechnol.***, v. 66, p. 719-725. 2005.

SOUZA, H.Q.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, v. 28, p. 116-124. 2008.

STOLP, H. ***Microbial ecology: organisms, habitats, activities***. 1988. Cambridge: Cambridge University Press, 280p.

SUPRABHA, N.G; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, S. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation in conditions. ***African Journal of Microbiology Research***, v. 2, p. 82-86. 2008.

TINOCO, R.; PICKARD, M.A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. ***Letters in Applied Microbiology***, v. 32, p. 331-336. 2001.

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

TRUFEM, S.F.B.; BONONI, V.L.R.. Fungos micorrízicos vesículoarbusculares em culturas introduzidas em áreas de cerrado. ***Rickia***, v. 12, p. 165-187. 1985.

UREK, R.; PAZARLIOGLU, N. Purification and partial characterization of manganese peroxidase from immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. ***Process Biochem.*** v. 39, p. 2061-2068. 2004.

WATANABE, E.O. ***Estudo da precipitação de tripsina com uso de sais voláteis***. 2004. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

WELINDER, K.G.; GAJHEDE. M. *Structure and evolution of peroxidases*, p. 35-42. In K. G. Welinder, S. K. Rasmussen, C. Penel, and H. Greppin (ed.), *Plant peroxidases: biochemistry and physiology*. University of Copenhagen and University of Geneva, Geneva, Switzerland. 1993.

WELINDER, K.G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v. 2, p. 383-393. 1992.

WHITE, T.J.T.; BRUNS, S.; LEE, J.W. TAYLOR. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White [eds.], *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 315–322. Academic Press, New York, New York, USA. 1990.

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

TUOMELA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, v. 72, n. 2, p. 169-183. 2000.

WARD, G.; HADAR, Y.; DOSORETZ, C. The biodegradation of lignocellulose by white rot fungi. In: ARORA, D. (Ed.). *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications. Mycology*. 1 ed., p. 393-407. 2003.

YAVER, D.S.; GOLIGHTLY, E.J. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. *Gene*, v. 181, n. 1-2, p. 95-102. 1996.