UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

SÉRGIO LUIZ MOREIRA NETO

**Caracterização de lacase de *Peniophora cinerea* e estudo do
potencial de aplicação biotecnológica**

Lorena – SP

2012

SÉRGIO LUIZ MOREIRA NETO

**Caracterização de lacase de *Peniophora cinerea* e estudo do
potencial de aplicação biotecnológica**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial na área de Microbiologia aplicada

Orientadora: Prof^ª. Dra. Adriane Maria Ferreira
Milagres

Edição reimpressa e corrigida

Lorena – SP

Maio, 2012

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

Catálogo na Publicação

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Moreira Neto, Sérgio Luiz

Lacases: screening, produção, purificação, propriedades, mecanismos reacionais e aplicações na descoloração de efluentes têxteis e tratamento do bagaço de cana-de-açúcar. / Sérgio Luiz Moreira Neto. –ed. reimpr., corr.– 2012.

168 p. : il.

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

Orientadora: Adriane Maria Ferreira Milagres

1. *Peniophora cinérea* 2. Lacase 3. Enzimas 4. Bagaço de cana-de-açúcar 5.

Hidrólise enzimática. I. Título

Ao meu filho Raul Moreira,

A minha esposa Juliana Sundfeld Penido

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A profa Adriane Milagres pela orientação, incentivos, oportunidades, pelas críticas e sugestões e pela amizade.

Aos professores Dácio Matheus (Universidade Federal do ABC), Kátia Machado (Universidade Católica de Santos) e Vera Vitali (Instituto de Botânica) pelas pesquisas no projeto têxtil, contribuições no presente, pelas críticas e sugestões e pela amizade.

Aos professores André Ferraz e Walter Carvalho do Departamento de Biotecnologia da EEL pelas contribuições, colaboração no trabalho, pelas críticas e sugestões e pela amizade.

Ao professor catedrático José Teixeira e a professora Solange Mussato, do Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia/Centro de Engenharia Biológica (IBB/CEB) da Universidade do Minho, Portugal, pelas contribuições, colaboração no presente estudo, pelas críticas e sugestões e pela amizade.

A professora Regina Monteiro (CENA-USP) pelas críticas e sugestões neste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia e Bioquímica, Débora Laurito, Djalma Primo, Cecéu Santi Jr, Fernanda Machado, Germano Siqueira, Joseana Rocha, Michel Brienzo, Paula Esteves, Robson Almeida, Valdeir Arantes e Vitor Tabosa pela amizade e pelas contribuições no presente estudo.

Aos amigos do Departamento de Biotecnologia da EEL pela amizade, ajuda e colaboração no presente estudo e pelos melhores momentos durante a passagem por esse grande ensinamento, especialmente, André Aguiar, Boutros Sarroudd, Bruno Guedes, Carolina Dell'Áquila, Cláudio Donato, Dani Cortez, Dani Gurpilhares, Dani Borba, Daniel Queissada, Diana Cabral (UMinho), Fernanda Oliveira, Fernando Moreira Oliveira, Fernando Masarin, Flávio Ferraz, Gina Seabra, Giovani Carvalho, João Paulo Silva, Juan Rivaldi, Juliana Furlani, Larissa

Canilha, Levi Ezequiel, Livia Carneiro, Livia Souza, Marcelo Domingos, Priscila Vaz, Vinicius Fernandes e William Villar.

Aos amigos do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Portugal: Emerson Santos (UNESP de Rio Claro), Giuliano Dragone, Hector Ruiz, Lina Fernanda, Lina Agudelo, Marlene Lopes, Silvia Martins, e especialmente a colaboradora deste trabalho, Sara Silvério.

Ao professor e filósofo Macedo, da Universidade do Minho, pela amizade durante a passagem por Braga, Portugal.

Ao Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo pela colaboração da maior parte deste trabalho, especialmente aos funcionários André Prado, Ângelo (*in memorian*), José Carlos, José Moreira, Lucinha Aparecida e Nicanor de Assis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da EEL e aos professores Maria Bernadete de Medeiros, Eleonora de Carvalho, George Jackson Rocha, Inês Conceição Roberto, Marco de Alcântara e Maria das Graças Felipe.

A Universidade Católica de Santos pela colaboração na parte inicial deste trabalho.

A Universidade do Minho pela colaboração de parte deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa pela concessão da bolsa de doutorado.

As famílias Penido e Sundfeld, especialmente ao Sr. Rubens Antônio Penido e Dra. Andréa Sundfeld, pela grande ajuda.

Aos meus irmãos, e tios do Raul, Guilherme e Leonardo, por cuidarem do Raul enquanto ele enchia a fralda.

A minha esposa, Juliana S.P. Moreira, pela revisão do manuscrito, pela paciência e pelo amor.

Aos meus pais, Sr. Luiz Moreira, o Sr. Moreira, e Dona Suely de Souza, por levarem este trabalho junto comigo, e toda minha família.

RESUMO

MOREIRA-NETO, S. L. **Caracterização de lacase de *Peniophora cinerea* e estudo do potencial de aplicação biotecnológica.** 2012. 168 p. il. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo – Lorena, São Paulo, 2012.

No presente estudo, fungos ligninolíticos isolados de ecossistemas brasileiros foram avaliados quanto a capacidade de descolorir corantes reativos e, a linhagem *Peniophora cinerea*, selecionada, teve seu sistema ligninolítico caracterizado. As lacases deste fungo foram avaliadas para duas aplicações: descoloração de efluentes têxteis e auxílio na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Lacase foi a única enzima ligninolítica extracelular detectada nos cultivos de *P. cinerea*. A produção de lacase por *P. cinerea* foi avaliada em meios sintético e complexo, de forma a obter melhores níveis de produção da enzima. Em meio complexo (milhocina 0,5%, sacarose 0,5% e cobre como indutor de lacase) *P. cinerea* produziu cerca de aproximadamente 1000 U/l de lacase. Em meio sintético, contendo xilidina e tween 80, *P. cinerea* imobilizado (em esponja de poliuretano) produziu 3505 U/l de lacase em cultivo em Erlenmeyer e somente 150 U/l em reator de tanque com agitação por pás. Lacases produzidas por *P. cinerea* foram purificadas e caracterizadas. O sobrenadante do meio de cultivo foi aplicado em coluna de troca aniônica, DEAE-Sephacel CL-6B, e três picos com atividade de lacase foram observados e aplicados separadamente em Mono Q (coluna de troca aniônica). Oito isoenzimas de lacase, com massas entre 30 e 70 kDa e ponto isoelétrico (pI) entre 3 e 6 foram reveladas em géis de eletroforese em condições desnaturantes e não desnaturantes e por focalização isoelétrica (IEF). Algumas isoenzimas apresentaram alta termoestabilidade a 50°C, pH ótimo entre 2,6 e 4,0 e K_m para o ABTS entre 12,7 e 20 μ M, dependendo do tipo de lacase. Diferentes mediadores de lacases de *P. cinerea* foram avaliados (HBT, HBA, 2,3 DHBA, DOPAC, ABTS, siringaldeído, oxalato de sódio e Mn^{2+}). O sistema composto por lacase, siringaldeído, oxalato de sódio e Mn^{2+} produziu a maior descoloração do Reactive Blue 19. As lacases foram utilizadas para descoloração de um efluente simulado, preparado com 100 mg/l de Reactive Red 271, hidrolisado em NaOH 2 M, e um efluente real, fornecido por uma indústria têxtil. O efluente simulado foi totalmente descolorido, em 24h, pelo extrato enzimático. A partir desta constatação, o efluente real foi tratado com os extratos de *P. cinerea* e mais de 60% de descoloração foi obtida com o uso de lacase e mediadores. Lacases produzidas por *P. cinerea* foram também utilizadas para hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. As amostras de bagaços foram obtidas de tratamentos com sulfito ácido, sulfito alcalino, ácido sulfúrico, clorito de sódio ou sem tratamento (in natura). Duas formas de tratamento foram avaliadas: tratamento simultâneo, ou seja, lacases foram adicionadas juntamente com um preparado comercial de celulases; ou num tratamento sequencial, em que a polpa do bagaço foi previamente tratada com lacase para depois ser hidrolisada com celulases. O tratamento simultâneo com lacase e celulase resultou em menor conversão de celulose, devido a possível inativação das celulases pela ação oxidativa de lacase. A aplicação sequencial das enzimas nos bagaços pré-tratados por sulfito ácido ou por sulfito alcalino favoreceu à hidrólise da celulose. Estudos futuros para tratamento sequencial de lacase à hidrólise de bagaço de cana devem considerar aspectos reacionais básicos: maior carga enzimática, temperatura, tempo de reação e mediadores. Lacases são excepcionalmente versáteis para aplicações biotecnológicas e a produção em larga escala integrará o uso da enzima em diferentes processos industriais.

Palavras-chave: *Peniophora cinerea*. Lacase. Halotolerante. Bagaço de cana de açúcar. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

MOREIRA-NETO, S. L. **Characterization of *Peniophora cinerea* laccase and study of the potential for biotechnological applications**. 2012. 168 p. il. PhD Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo - Lorena, São Paulo, 2012.

In the present study, ligninolytic fungi isolated from Brazilian ecosystems were evaluated for the ability to decolorize reactive dyes and a selected strain of *Peniophora cinerea* had its ligninolytic system characterized. Laccases from this fungi were evaluated for two biotechnology applications: decolorization of textile effluents and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *P. cinerea* produced an halotolerant laccase activity, unique feature with the data available in the literature and with potential for biotechnological applications, making it the object of our studies. Laccase was the only ligninolytic enzyme detected in the extracellular extract from *P. cinerea*. The production of laccase by *P. cinerea* was evaluated in synthetic and complex media, in order to obtain higher levels of enzyme production. In complex medium (corn steep liquor 0.5%, sucrose 0.5% and copper, as inducer of laccase) *P. cinerea* produced about 1000 U/l of laccase. In synthetic medium containing tween 80 and xylydine, *P. cinerea* immobilized in polyurethane foam produced 3505 U/l of laccase in culture in flasks; in STR reactor *P. cinerea* produced only 150 U/l. Laccases produced by *P. cinerea* were purified and characterized. The supernatant of the culture medium was loaded on an anion exchange column, DEAE-Sepharose CL-6B, and three peaks with laccase activity were detected and applied separately on a Mono Q column. Eight isoenzymes of laccases with molecular weight between 30 and 70 kDa and isoelectric point (pI) between 3 and 6 were revealed on electrophoresis gels at denaturing, native conditions and isoelectric focussing (IEF). Some isoenzymes showed high thermostability at 50°C, optimal pH between 2.6 and 4.0, and K_m for the ABTS between 12.7 and 20 μ M., depending on the type of laccase. Different mediators for laccases of *P. cinerea* were evaluated (HBT, HBA, 2,3 DHBA, DOPAC, ABTS, syringaldehyde, sodium oxalate and Mn^{2+}). The system laccase, syringaldehyde, sodium oxalate and Mn^{2+} produced the highest decolorization of Reactive Blue 19. Laccases produced by *P. cinerea* were used for decolorization of a simulated effluent prepared with 100 mg/l of Reactive Red 271 hydrolyzed with NaOH 2 M and a real effluent, provided by a textile industry. The simulated effluent was completely decolorized within 24 hours by the enzymatic extract. In face of that, the real effluent was evaluated for decolorization by the extracts of *P. cinerea* and more than 60% of decolorization was obtained by laccase-mediator system. Laccases produced by *P. cinerea* were also used to hydrolyze the sugar cane bagasse. Sugarcane bagasse samples were obtained by acid sulfite, alkaline sulfite, sulfuric acid, sodium chlorite or untreated (*in natura*). Two forms of treatment were evaluated: simultaneous treatment, ie, laccases have been added along with a commercial cellulase complex for hydrolysis of sugarcane bagasse, or a sequential treatment, in which bagasse was pre-treated with laccase followed by cellulases. Simultaneous treatment with both enzymes resulted in lower conversion of cellulose than sequential treatment due to possible inactivation of cellulases by the oxidative action of laccase. Future studies of sequential treatment with laccase and hydrolysis of sugarcane bagasse should consider additional basic concepts of reactions such as: increase of enzyme load, temperature, reaction time and mediators. Laccases are exceptionally versatile for biotechnological applications and the production in large scale integrate the use of the enzyme in different industrial processes.

Keywords: *Peniophora cinerea*. Laccase. Halotolerant. Sugar cane bagasse. Enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Oxidação de <i>o</i> -difenoil por lacase.....	19
Figura 2. Formação de peróxido de hidrogênio por basidiomicetos ligninolíticos.....	23
Figura 3. Sítio ativo de lacase de <i>Bacillus subtilis</i>	24
Figura 4. Ciclo catalítico de lacase.....	25
Figura 5. Mediador redox na atividade de lacase.....	27
Figura 6. Oxidação de um composto modelo de lignina (dímero), com ligação β -O-4, à um composto α -carbonila (A) e oxidação de outro dímero de lignina, com ligação β 1 (B) a veratraldeído, benzaldeído ou α -carbonila.....	28
Figura 7. Compostos sintéticos que atuam como mediadores de lacase, incluindo do tipo -N(OH)-.....	30
Figura 8. Exemplos de mediadores naturais de lacase.....	30
Figura 9. Estrutura Íntron/Éxon dos genes de lacase.....	38
Figura 10 Curva binodal e linha de amarração (tie-line) obtidas a 23°C para os sistemas: UCON-tampão fosfato de potássio pH = 7 e UCON-tampão fosfato de sódio pH = 7.....	44
Figura 11. Corantes reativos em suas formas original e hidrolisada.....	55
Figura 12. Degradação do Reactive Blue 19 por lacase imobilizada de <i>Trametes pubescens</i>	58
Figura 13. Oxidação de azo corante fenólico por lacase.....	59
Figura 14. Foto ilustrativa do crescimento de <i>P. cinérea</i> em forma de <i>pellets</i>	70
Figura 15. Reator utilizado para produção de lacase por <i>P. cinérea</i>	71
Figura 16. Coluna cromatográfica contendo resina de troca aniônica DEAE-Sepharose CL-6B (5 mL) após adsorção de lacases obtidas de extrato de <i>P. cinérea</i>	81
Figura 17. Cinética de descoloração do efluente têxtil simulado (pH 9,1) por extratos livres de micélio obtidos de <i>Pleurotus ostreatus</i> (Po), <i>Trametes villosa</i> CCB176 (Tv6), <i>T. villosa</i> CCB291 (Tv1), <i>T. villosa</i> CCB165 (Tv5), <i>Peniophora cinérea</i> (Pec), <i>Psilocybe castanella</i> (Psc) e <i>Lentinus villosus</i> (Lv).....	96
Figura 18. Atividades de lacase em diferentes concentrações de NaCl (mM) por extratos de <i>P. ostreatus</i> , <i>P. cinérea</i> e <i>T. villosa</i> cultivados em meio sintético.....	98
Figura 19. <i>Peniophora cinérea</i> em tronco de floresta tropical.....	99
Figura 20. Desenvolvimento de <i>P. cinérea</i> em meios complexos, contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio.....	101
Figura 21. Crescimento, pH e atividade de lacase durante cultivo de <i>P. cinérea</i> em sacarose e milhocina sem (A) e com (B) adição do CuSO ₄ 1 mM para indução.....	102
Figura 22. pH do meio e atividade de lacase durante cultivo de <i>P. cinérea</i> em bagaço de cana e milhocina sem (A) e com (B) adição do CuSO ₄ 1 mM para indução.....	103
Figura 23. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes de lacases obtidas de diferentes condições de cultivo.....	104
Figura 24. Produção de lacase por <i>P. cinérea</i> em meio Kirk, pH do meio e biomassa.....	105
Figura 25. Produção de lacase por <i>P. cinérea</i> livre e imobilizado em espumas de poliuretano em meio definido para <i>Trametes</i>	106
Figura 26. Micrografia eletrônica de varredura mostrando a imobilização de <i>P. cinérea</i> em esponjas de poliuretano por adesão.....	107
Figura 27. Biorreator após a inoculação (A) e com 10 dias de cultivo de <i>P. cinérea</i> (B)...	108
Figura 28. Produção de lacase por <i>P. cinérea</i> em reator com meio MDT.....	109
Figura 29. (A) Perfil de eluição em DEAE-Sepharose de lacases do extrato de <i>P. cinérea</i> . (B) SDS-Page e (C) gel de atividade frações obtidas após DEAE-Sepharose.....	111
Figura 30. Purificação de isoenzimas de lacases de <i>P. cinérea</i> . A. Perfil de eluição de lacase e absorbância a 280 nm, após eluição com gradiente de 0-0,2 M de NaCl em	113

coluna DEAE-Sepharose, das frações coletadas. B. Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida das amostras obtidas dos picos da purificação em DEAE-Sepharose. C. Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida das amostras dos diferentes picos de purificação. D. IEF nativa a partir de amostras dos picos de atividade de lacase eluída da coluna DEAE-Sepharose.....	
Figura 31. Purificação de lacases por cromatografia de troca iônica. Eluição das lacase em uma coluna Mono Q, equilibrada em pH 5,8 (A) e pH 4,7 (B) com um gradiente de NaCl 0-0,2 M. Atividade de lacase e absorbância a 280 nm foram monitoradas. (C) IEF nativo. (D) Gel de atividade.....	114
Figura 32. Coeficientes de partição obtidos para lacase de <i>P. cinerea</i> nos SDFA estudados, sais de potássio e UCON.....	116
Figura 33. Efeito do NaCl na atividade (A) e estabilidade a NaCl 1M (B) de lacases de <i>P. cinerea</i> , lacase comercial e lacase de <i>Aspergillus</i>	120
Figura 34. Efeito de oxalato de Mn^{3+} e siringaldeído na descoloração do Reactive Blue 19 por lacase de <i>P. cinerea</i>	123
Figura 35. Descoloração de Reactive Blue 19 por diferentes sistemas. Nos ensaios foram usadas lacase de <i>P. cinerea</i> (0,1 U) e MnP de <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> (0,1 U) na presença de ácidos orgânicos, oxalato (15 mM) ou lactato (15 mM), Mn^{2+} (0,1 mM) e SA (siringaldeído, 1 mM).....	125
Figura 36. Geração de H_2O_2 resultante da oxidação de Mn^{2+} por lacase, na presença de oxalato, e a contribuição para atividade de MnP.....	126
Figura 37. Correlação entre atividades de lacase e descoloração do Reactive Blue 19 por extrato contendo lacases obtidos com 7 (A) e 14 dias de cultivo (B) em diferentes meios complexos.....	127
Figura 38. A. Cinética de descoloração do Reactive Blue 19 (140 $\mu g/ml$) por lacase (0,1 ou 0,2 U) com e sem siringaldeído (1 mM). B. Varredura espectral, 200-700 nm, após reação de descoloração do Reactive Blue 19 com lacase e mediadores.....	128
Figura 39. A. Varredura espectral, 200-700 nm, após reação de descoloração do Reactive Red 271 com lacase e mediadores. B. Cinética de descoloração do Reactive Red (70 $\mu g/ml$) por lacase (0,1 ou 0,2 U) com e sem siringaldeído (1 mM).....	130
Figura 40. Crescimento (círculos), pH do meio (quadrados) e atividade de lacase (triângulos) durante o cultivo de <i>P. cinerea</i> em em sacarose e milhocina com pH inicial 8,4 (A) e sem ajuste de pH (pH = 4,5).....	132
Figura 41. (A) Varredura espectral (200-700 nm) indicando descoloração do Reactive Red (100 $mg\ l^{-1}$) por extratos de <i>P. cinerea</i> , in vitro (0-24h) e por cultivo fúngico, in vivo (0-96h). (B) Foto: descoloração do Reactive Red após 24h.....	133
Figura 42. Crescimento (círculos), pH (quadrados) e atividade de lacase (triângulos) durante o cultivo de <i>P. cinerea</i> em meio complexo, com adição de efluente sintético no 10º dia (indicado por seta) (A) e controle, sem adição de efluente (B).....	134
Figura 43. Descoloração de efluentes têxtil real pelo sistema lacase-siringaldeído-oxalato de Mn^{2+}	136
Figura 44. Conversão da celulose de bagaço de cana pré-tratado com clorito, após tratamento sequencial por lacase, lacase-mediador ou peroxidação lipídica com lacase, após lavagem do bagaço com água (A) ou a extração com NaOH, seguido pela hidrólise. Controle: hidrólise sem tratamento prévio com lacase.....	141
Figura 45. Conversão de celulose após hidrólise enzimática com Cellubrix e Beta-glicosidase, após tratamento sequencial de bagaços de cana com lacases, com bagaços obtidos de diferentes pré-tratamentos químicos.....	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Indução de lacases de basidiomicetos por cobre.....	34
Tabela 2 - Produção de lacases por basidiomicetos em reatores.....	35
Tabela 3 – Produção de lacases em vetores heterólogos.....	39
Tabela 4 – Etapas de purificação de diferentes lacases.....	42
Tabela 5 – Temperatura ótima de lacases de alguns basidiomicetos.....	45
Tabela 6 – Imobilização de lacases.....	47
Tabela 7 – Descoloração de corantes têxteis por enzimas ligninolíticas.....	56
Tabela 8 – Características dos corantes utilizados no presente estudo.....	65
Tabela 9 – Composição do meio Kirk modificado.....	67
Tabela 10 – Composição do meio complexo.....	68
Tabela 11 – Composição da milhocina.....	68
Tabela 12 – Composição do meio MDT.....	69
Tabela 13 – Meio para produção de inóculo.....	70
Tabela 14 – Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador.....	76
Tabela 15 – Reagentes utilizados na preparação do gel separador.....	77
Tabela 16 – Reagentes utilizados na preparação do tampão da amostra.....	77
Tabela 17 – Marcadores de baixa e alta massa molar.....	78
Tabela 18 - Reagentes utilizados na preparação do gel separador para eletroforese em condição não desnaturante.....	79
Tabela 19 – Composição do bagaço de cana após pré-tratamentos químicos.....	88
Tabela 20 – Taxa de extensão micelial e taxa de descoloração de mistura de dois corantes reativos durante crescimento de fungos basidiomicetos em meio sólido.....	92
Tabela 21 – Descoloração in vivo e in vitro de efluente têxtil simulado após 24 h.....	93
Tabela 22 – Biomassa, pH final do meio e atividades de lacase, manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e álcool veratrílico oxidase (VAO) após crescimento de basidiomicetos por sete dias.....	94
Tabela 23 – Influência da concentração de tartarato de amônia na descoloração de efluente simulado por extratos de basidiomicetos selecionados.....	97
Tabela 24 – Influência da concentração de extrato de levedura na descoloração de efluente simulado por extratos de basidiomicetos selecionados.....	97
Tabela 25 – Influência da concentração de extrato de levedura na descoloração de efluente simulado por extratos de basidiomicetos selecionados.....	98
Tabela 26 – Atividades de lacase de <i>P. cinerea</i> obtidos em diferentes condições de cultivo com 7 e 14 d.....	101
Tabela 27 – Purificação de lacase de <i>P. cinerea</i> após DEAE-Sepharose.....	112
Tabela 28 – Influência dos constituintes de SDFA na atividade de lacase de <i>P. cinerea</i> ...	115
Tabela 29 – Recuperação de lacase de <i>P. cinerea</i> (%) na fase inferior dos SDFA UCON-sais de fosfato.....	116
Tabela 30 – Propriedades bioquímicas de isoenzimas de lacases de <i>P. cinerea</i>	117
Tabela 31 – Propriedades físico químicas de lacases.....	118
Tabela 32 – Influência de diferentes sais nas atividades relativas de lacases (%) de <i>P.</i> <i>cinerea</i> , <i>T. versicolor</i> e lacase comercial (Sigma).....	121
Tabela 33 – Seleção de mediadores de lacase de <i>P. cinerea</i> baseado utilizando Reactive Blue 19 como substrato.....	122
Tabela 34 – Descoloração do Reactive Blue 19 e Reactive Blue 13 ($\mu\text{mol}/\text{min.L}$) por extratos de <i>P. cinerea</i> obtidos em diferentes condições de cultivo com 7 e 14 d.....	127
Tabela 35 – Descoloração do Reactive Blue 19 por lacases.....	129
Tabela 36 – Descoloração de efluentes simulados e reais por basidiomicetos.....	135

Tabela 37 – Atividade relativa de celulases (preparação comercial Cellubrix, 0,2 FPU), na presença de lacase de <i>P. cinerea</i> e mediadores, após 1 h de reação.....	138
Tabela 38 – Atividade relativa (%) de lacase de <i>P. cinerea</i> (0,5 U / mL) após 1h de incubação com Cellubrix (0,2 FPU).....	139
Tabela 39 – Atividade residual de celulases e lacases (%) após 8 h de tratamento simultâneo de bagaço de cana-de-açúcar deslignificado com clorito.....	139
Tabela 40 – Hidrólise por 24h do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado com clorito...	140

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1	CARACTERÍSTICAS DO SISTEMA LIGNINOLÍTICO DE BASIDIOMICETOS.....	22
2.1.1	Mediadores de lacase e a oxidação de compostos recalcitrantes.....	26
2.2	EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE LACASES.....	31
2.2.1	Indutores de lacases.....	32
2.2.2	Produção de lacases por basidiomicetos em reatores.....	34
2.2.3	Produção heteróloga de lacases recombinantes.....	37
2.3	PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DE LACASES.....	41
2.4	APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE LACASES.....	52
2.5	DEGRADAÇÃO DE CORANTES REATIVOS E DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTES POR LACASES.....	54
2.6	POLIMERIZAÇÃO E DEGRADAÇÃO DA LIGNINA DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS POR LACASES.....	60
3	OBJETIVOS.....	63
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.1	LINHAGENS DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS E MANUTENÇÃO.....	64
4.2	ENZIMAS.....	64
4.3	CORANTES.....	64
4.4	EFLUENTES TÊXTEIS: SIMULADO E REAL.....	66
4.5	BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E RESÍDUO DE EUCALIPTO	66
4.6	CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	66
4.6.1	Meio Kirk (meio sintético).....	67
4.6.2	Meio complexo.....	67
4.6.3	Meio MDT (meio definido para <i>Trametes</i>).....	68
4.6.4	Imobilização do micélio.....	69
4.6.5	Cultivo em Bioreator de tanque agitado.....	69
4.6.5.1	Produção de inóculo.....	69
4.6.5.2	Operação do reator e amostragem.....	70
4.7	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	71
4.7.1	Biomassa fúngica.....	71
4.7.2	pH.....	71
4.7.3	Glicose.....	71
4.7.4	Atividades enzimáticas.....	72
4.7.4.1	Atividade de lacase.....	72
4.7.4.2	Atividade de manganês peroxidase.....	72
4.7.4.3	Atividade de lignina peroxidase e aril álcool oxidase.....	72
4.7.4.4	Atividade de celobiose desidrogenase.....	73
4.7.4.5	Atividade de celulases totais.....	73
4.7.4.6	Atividade de β -glicosidase.....	74
4.7.4.7	Atividade de oxidação do Mn^{2+}	74
4.7.4.8	Atividade redutora de Fe^{3+}	74
4.7.4.9	Atividades de descoloração dos corantes reativos por enzimas.....	75
4.7.4.10	Cálculo de atividade.....	75

4.7.5	Determinação de proteína total pelo método de bradford.....	75
4.7.6	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-Page).....	76
4.7.6.1	Preparo dos géis.....	76
4.7.6.2	Preparo das amostras.....	77
4.7.6.3	Preparo do tampão da amostra.....	77
4.7.6.4	Coloração com Nitrato de Prata.....	78
4.7.7	Eletroforeses nativas (Page).....	78
4.7.8	Focalização isoeletrica (IEF).....	79
4.8	CONCENTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	80
4.8.1	Obtenção e concentração do extrato enzimático.....	80
4.8.2	Cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose CL-6B.....	80
4.8.3	Cromatografia de troca iônica: Mono Q.....	81
4.8.4	Sistemas de duas fases aquosas.....	81
4.8.4.1	Coeficiente de partição de lacase.....	82
4.9	CARACTERIZAÇÃO DE LACASE DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS...	82
4.9.1	Determinação da massa molar.....	82
4.9.2	Efeito do pH na atividade.....	82
4.9.3	Estabilidade à temperatura.....	83
4.9.4	Parâmetros cinéticos – constante de Michaelis-Menten (Km).....	83
4.9.5	Atividade e estabilidade em NaCl.....	83
4.9.6	Efeito de sais na atividade enzimática.....	83
4.9.7	Avaliação de mediadores de lacase.....	84
4.9.8	Avaliação do efeito sinérgico lacase-MnP.....	84
4.10	APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.....	84
4.10.1	Descoloração de corantes por fungos ligninolíticos em meio sólido.....	84
4.10.2	Descoloração do efluente simulado pelos cultivos fúngicos (in vivo).....	85
4.10.3	Descoloração de efluente real.....	85
4.10.4	Utilização de lacase para auxílio na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.....	86
4.10.4.1	Pré-tratamentos químicos do bagaço de cana-de-açúcar.....	86
4.10.4.1.1	<i>Clorito de sódio em meio ácido.....</i>	86
4.10.4.1.2	<i>Sulfito alcalino.....</i>	86
4.10.4.1.3	<i>Sulfito ácido.....</i>	87
4.10.4.1.4	<i>Hidrólise ácida.....</i>	87
4.10.4.2	Efeito de lacase e mediadores na atividade celulolítica.....	88
4.10.4.3	Tratamento simultâneo lacase-celulases para auxílio a hidrólise enzimática..	88
4.10.4.4	Tratamento sequencial lacase-celulases para auxílio a hidrólise enzimática..	89
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
5.1	SELEÇÃO DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS PARA BIODESCOLORAÇÃO.....	90
5.1.1	Descoloração de corantes reativos em meio sólido em placas.....	91
5.1.2	Descoloração de efluente simulado com corantes reativos.....	92
5.1.3	Avaliação de fontes de nitrogênio nos cultivos de linhagens selecionadas para aumento da descoloração de efluente simulado.....	96
5.2	PRODUÇÃO DE LACASE POR <i>Peniophora cinerea</i>.....	99
5.2.1	Produção de lacase em meio complexo.....	100
5.2.2	Cinética de produção de lacase em cultivo com meio complexo.....	101
5.2.3	Cultivo de <i>P. cinerea</i> em meio sintético e imobilização do micélio.....	105
5.2.4	Produção de lacase por <i>P. cinerea</i> em biorreator.....	108

5.3	RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ISOENZIMAS DE LACASE DE <i>P. cinerea</i>	109
5.3.1	Cromatografia de Troca Iônica	110
5.3.2	Recuperação de lacase de <i>P. cinerea</i> por sistemas de duas fases aquosas	114
5.4	CARACTERIZAÇÃO DE LACASES DE <i>P. cinerea</i>	117
5.4.1	Propriedade das isoenzimas de lacase de <i>P. cinerea</i>	117
5.4.2	Estabilidade e tolerância de lacase de <i>P. cinerea</i> ao NaCl	119
5.4.3	Atividade de lacases de <i>P. cinerea</i> na presença de diferentes sais	121
5.4.4	Eficiência de mediadores de lacase de <i>P. cinerea</i>	122
5.4.5	Sinergia entre lacase de <i>P. cinerea</i> e MnP	124
5.5	DESCOLORAÇÃO DE CORANTES REATIVOS POR LACASE DE <i>P. cinerea</i>	126
5.6	DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTES TÊXTEIS, SIMULADO E REAL, POR LACASE DE <i>P. cinerea</i>	131
5.7	HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA COM AÇÃO SIMULTÂNEA OU SEQUENCIAL DE LACASE E CELULASES.....	138
5.7.1	Atividades de celulases na presença de <i>P. cinerea</i>	138
5.7.2	Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com ação sequencial de lacase e celulases	140
6	CONCLUSÕES	144
	REFERÊNCIAS	145

1 INTRODUÇÃO

Lacases são enzimas excepcionalmente versáteis, largamente produzidas principalmente por fungos de decomposição branca da madeira, catalisando reações com diferentes substratos orgânicos e inorgânicos, alguns destes recalcitrantes. São enzimas do grupo das oxidoredutases (EC 1.10.3.2), com mecanismo de reação mostrado na Figura 1.

Figura 1. Oxidação de *o*-difenoil por lacase

As lacases apresentam potencial para um grande número de aplicações biotecnológicas, tais como: processamento de vinho e sucos, deslignificação e branqueamento de polpa celulósica, tratamento de efluentes industriais, aumento da digestibilidade de materiais lignocelulósicos para ração animal, biorremediação de solos, formulação de biosensores, catalisadores em células de biocombustíveis, síntese de fármacos, entre outros.

A presença de isoformas de lacase é bem comum entre fungos de decomposição branca da madeira. As isoformas podem apresentar diferentes propriedades bioquímicas, apesar das estruturas primárias destas proteínas serem muito similares. No entanto, existem casos em que as propriedades bioquímicas das lacases são similares enquanto as estruturas primárias mostram-se diferentes, mesmo sendo elas provenientes do mesmo organismo.

Num plano estratégico para desenvolvimento de um processo biotecnológico, posteriormente à descoberta de novas enzimas, procede-se a caracterização da enzima (propriedades catalíticas, condições de reação e informações estruturais), seguido pela engenharia enzimática, aplicação, recuperação do produto (*downstream*) e finalmente o desenvolvimento de um novo processo (incluindo nesta etapa a avaliação de risco e o planejamento econômico) (SCHMID et al., 2001).

Efluentes coloridos quando lançados aos corpos d' água sem tratamento adequado podem ser extremamente prejudiciais aos ecossistemas. Os corantes, devido a sua estrutura

química, são resistentes à fotodegradação, atividade biológica e outras condições ambientais de degradação. Corantes reativos, a maior classe de corantes comercialmente produzidos, não são adequadamente removidos dos efluentes por processos biológicos convencionais, como o tratamento por lodo ativado, frequentemente utilizado no Brasil. A eficiência microbiana para descoloração requer a adaptação de microrganismos selecionados bem como enzimas capazes de atuar frente às características do efluente.

A segunda geração de biocombustíveis, como: bioetanol, biodiesel, biohidrogênio e metano é obtida a partir de resíduos da biomassa lignocelulósica. Muitas pesquisas estão sendo direcionadas para a remoção de lignina do material lignocelulósico, que além de causar um menor rendimento durante a hidrólise enzimática, seja por inibição das enzimas hidrolíticas ou por adsorção das mesmas, os produtos de degradação da lignina, principalmente compostos fenólicos, muitas vezes são tóxicos aos microrganismos utilizados na conversão de açúcares monoméricos a etanol. Assim, lacase representa uma alternativa promissora para o tratamento de lignocelulósicos.

Juntamente com a lacase, certos compostos químicos, chamados de mediadores, podem ser utilizados, uma vez que o efeito catalítico da lacase sozinha é insuficiente para muitos processos industriais. O tamanho molecular da lacase não permite a sua penetração na parede celular do material lignocelulósico, restringindo a ação da enzima sobre a lignina. O uso de compostos mediadores torna possível a biodeslignificação destes materiais, uma vez que um maior leque de estruturas aromáticas pode ser oxidado com o uso em conjunto da lacase e mediadores.

A oxidação de unidades não-fenólicas de lignina, por lacase, ocorre somente pela ação sinérgica com mediadores, que incluem substratos artificiais (BOURBONNAIS; PAICE, 1990; CALL; MÜCKE, 1997), metabólitos fúngicos (EGGERT et al., 1996) ou compostos derivados de lignina (CAMARERO et al., 2005). Um mediador ideal deve ser um bom substrato para lacase, suas formas oxidadas e reduzidas devem ser estáveis durante o ciclo redox do mediador, desempenhando desta forma muitos ciclos de reação sem sua degradação. O mediador amplia o potencial de oxidação do substrato, aumentando a eficiência catalítica de lacase (MOROZOVA et al., 2007).

Uma grande vantagem da utilização de enzimas *versus* o tratamento microbiano é que a principal limitação da utilização dos fungos ligninolíticos em bioprocessos é a baixa velocidade de reação, o que requer um investimento significativo de tempo (FARACO et al. 2009). No caso do tratamento de efluentes têxteis, por exemplo, os fungos geralmente apresentam baixa tolerância ao efluente. Já para o pré-tratamento de lignocelulósicos visando

obtenção de biocombustíveis, os fungos filamentosos e os ligninolíticos necessitam de açúcares para seu metabolismo, consequentemente reduzindo a recuperação do produto final, somada a essa desvantagem, o pré-tratamento com fungos filamentosos de lignocelulósicos também é lento.

Desta forma, é necessário adotar outras estratégias visando reduzir o tempo de tratamento biológico ou bioquímico. No caso de tratamento de efluentes têxteis, destaca-se a busca por linhagens de fungos capazes de produzir um sistema extracelular eficiente para reagir em condições de pH elevado e alta força iônica (ALCADE et al., 2006; KAUSHIK; MALIK, 2009). Posteriormente, as enzimas de interesse podem ser facilmente obtidas pela expressão heteróloga em organismos eficientes na fermentação, o que aumenta consideravelmente a produção da enzima. Tal prática já vem sendo utilizada por grandes corporações; na maioria dos casos, as lacases comercializadas provêm de organismos geneticamente modificados.

O crescente interesse em processos biotecnológicos com lacases tem resultado na busca de novas enzimas, através da bioprospecção de microrganismos, isolados de ambientes naturais, buscando propriedades bioquímicas distintas, por exemplo: elevada catálise de compostos recalcitrantes, termoestabilidade, estabilidade em solventes orgânicos, alta glicosilação, estabilidade à elevada força iônica, atuação em ampla faixa de pH, etc.

Neste sentido, no presente estudo, foram realizados vários estudos para subsidiar a avaliação da utilização de lacase em processos biotecnológicos. Foi realizada a seleção de linhagens de fungos basidiomicetos com capacidade de descolorir corantes têxteis em condições de alcalinidade e salinidade elevadas. A produção de lacase pela linhagem selecionada foi estudada em diferentes meios e condições de cultivo e realizada a purificação e caracterização da enzima. Por fim, duas aplicações potenciais para lacases foram avaliadas: a descoloração de corantes comumente presentes em efluentes têxteis e a atuação de lacases juntamente com celulasas para melhorar a hidrólise de bagaço de cana de açúcar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS DO SISTEMA LIGNINOLÍTICO DE BASIDIOMICETOS

O mecanismo de secreção de proteínas vem sendo conservado durante o processo evolutivo, inclusive em fungos filamentosos. Especula-se que a lignina peroxidase (LiP), uma das enzimas oxidativas de fungos ligninolíticos, foi inicialmente formada com a função de destoxificação intracelular e, posteriormente, sua secreção possibilitou a degradação da lignina. Em especial, os basidiomicetos causadores da decomposição branca da madeira desenvolveram um mecanismo capaz de degradar eficientemente a lignina.

O mecanismo de degradação da lignina não é o mesmo em todos os basidiomicetos ligninolíticos, devido a composição e particularidades encontradas no sistema enzimático destes fungos, além da grande influência das condições de cultivo na expressão dos componentes do sistema ligninolítico (RABINOVICH et al., 2004; HOFRICHTER, 2002; FABBRINI et al., 2002).

Os componentes chave do sistema ligninolítico são as enzimas oxidorreduzases: lacase, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP), que numa atuação com compostos de baixa massa molar, promovem a degradação da lignina. A maioria dos basidiomicetos produzem lacase e MnP, enquanto LiP parece ser de distribuição mais rara (VALDERRAMA et al., 2003; HAVE et al., 1997; SILVA et al. 2008). A LiP é inicialmente oxidada pelo H_2O_2 e oxida estruturas fenólicas e não fenólicas de lignina, gerando radicais catiônicos. Estes reagem espontaneamente com nucleófilos (primariamente H_2O) e com oxigênio molecular, onde ligações C-C e C-O são quebradas, despolimerizando a lignina. Esta enzima é uma glicoproteína que contém ferro protoporfirínico IX como grupo prostético, dependente de H_2O_2 para sua atividade (PIONTEK et al., 2001).

A manganês peroxidase (peroxidase dependente de manganês, MnP) catalisa a oxidação de Mn^{2+} à Mn^{3+} , necessitando de ácidos orgânicos como quelantes do instável Mn^{3+} , geralmente os ácidos málico ou oxálico. O complexo Mn^{3+} -quelante é capaz de oxidar diretamente a lignina ou ácidos graxos insaturados e seus hidroperóxidos e gerar radicais acil e peroxil, respectivamente, com isso aumentando a taxa de degradação de lignina. Este último mecanismo é conhecido como peroxidação lipídica (KAPICH et al., 1999; WATANABE et al., 2000; SREBOTNIK; BOISSON, 2005).

arabinose (YAROLOV et al., 1994). Níveis de glicosilação de 32% e 44% foram detectados para lacases de *Coriopsis fulvocinnerea* (SHLEEV et al., 2004) e *Pleurotus pulmonarius* (DE SOUZA; PERALTA, 2003), respectivamente. Todavia, baixo conteúdo de glicosilação foi verificado para duas lacases de *Pleurotus eryngii*, 7% e 1% (MUNOZ et al., 1997).

Geralmente, o sítio ativo de lacases contém quatro íons de cobre, determinantes na atividade catalítica da enzima, classificados em três tipos: cobre T1 ou tipo 1, tipo 2 (T2) e tipo 3 (T3) (MOROZOVA et al., 2007). O cobre T1 é o aceptor primário de elétrons durante a catálise. Este cobre tipo 1 possui uma coordenação trigonal, com duas histidinas e uma cisteína com ligações equatoriais conservadas e uma outra posição axial variável, podendo ser uma fenilalanina, metionina, glicina ou leucina (CALL; MUCK, 1997). Esta ligação na posição axial influencia fortemente a capacidade oxidativa da enzima, regulando sua atividade. Uma mutação de fenilalanina para metionina reduziu significativamente a capacidade oxidativa de lacase de *Trametes villosa* (KUMAR et al., 2003). O cobre T1 confere a coloração azul, típica de proteínas multi-cobres, que resultam em absorbância à 600 nm, causada pela ligação covalente cobre-cisteína. Devido ao seu potencial redox, de cerca de aproximadamente 790 mV, o cobre T1 é o sítio onde ocorre a oxidação do substrato. Dois átomos de cobre T3, são posicionados estrategicamente junto com o cobre T2, formando um centro trinuclear, coordenados por histidinas, onde ocorre a redução de O₂ e liberação de H₂O (Figura 3) (CALL; MUCK, 1997; CLAUS, 2004; BALDRIAN, 2006).

Figura 3. Sítio ativo de lacase de *Bacillus subtilis* (ENGUITA et al., 2003) (a distância entre as moléculas é apresentada em ângstrom).

O ciclo catalítico das lacases compreende várias etapas, onde ao final do ciclo, quatro substratos são oxidados, com redução de O_2 à H_2O no final do ciclo. Os substratos fenólicos são oxidados pelo sítio de cobre T1 e os elétrons extraídos são transferidos, pela sequência conservada de tripeptídeo His-Cis-His, aos sítios T2 e T3, onde o oxigênio molecular é reduzido à água (BALDRIAN, 2006). Torres e col. (2003) apresentam um modelo do ciclo catalítico de lacases mais detalhado, demonstrando as possíveis rotas dos elétrons entre os átomos de cobre no sítio ativo da enzima (Figura 4). Neste ciclo, começando do estado nativo da enzima (intermediária nativa), uma molécula de substrato reduz o sítio T1. A partir deste ponto, dois mecanismos diferentes podem proceder: (A) o sítio T1 transfere seus elétrons ao sítio T2 e o sítio T1 é reduzido novamente por uma segunda molécula de substrato; os sítios T1 e T2 transferem seus elétrons aos sítios T3. O sítio T1 é reduzido por uma terceira molécula de substrato e um elétron é outra vez transferido ao sítio T2. Este processo re-oxida o sítio T1, que é então reduzido por uma quarta molécula de substrato. Como resultado, uma forma completamente reduzida da enzima é obtida; na outra via (B), o agrupamento trinuclear é sequencialmente reduzido durante três passos de transferência de elétrons do sítio T1, que é reduzido por uma molécula de substrato, finalizando no estado reduzido da enzima.

Figura 4. Ciclo catalítico da lacase (TORRES et al., 2003).

Com relação a capacidade oxidativa do sítio T1 de lacases, responsável pela oxidação do substrato, tais enzimas podem ser incluídas em grupos de baixa, média e alta capacidade oxidativa. Lacases de baixo potencial apresentam o cobre T1 abaixo de 430 mV; médio potencial entre 470 e 710 mV; e lacases com alto potencial, acima de 710 mV. Lacases oxidam diretamente somente compostos com potencial de ionização que não excedem (ou excedem insignificativamente) o potencial redox do cobre T1 da enzima. O potencial de ionização de estruturas não-fenólicas de lignina, álcool veratrílico, 1,2-dimetoxibenzeno e outros, são altos ($>1,4$ V) (MOROZOVA et al., 2007).

Lacases participam de outros eventos ligninolíticos de grande importância, que foram primeiramente atribuídos a outras enzimas do sistema ligninolítico. Esses eventos incluem a oxidação de unidades não fenólicas de lignina, a geração de H_2O_2 , a formação de radical hidroxila e a geração de Mn^{3+} (SCHLOSSER; HÖFER, 2002; HÖFER; SCHLOSSER, 1999). Hidroquinonas derivadas de lignina são oxidadas por lacase e geram espécies reativas de oxigênio. A oxidação de Mn^{2+} por lacase, pela redução do cobre T1 da enzima, pode ocorrer diretamente ou também por oxidação de hidroquinonas como consequência da geração de $O_2^{\bullet-}$ (MUNOZ et al., 1997; GONZALES et al., 2002; SAPARRAT et al., 2002; ZHOU et al., 2009). Ácidos orgânicos reduzem mediadores de lacase, resultando na formação de H_2O_2 , indicando a formação de radical superóxido ânion como intermediário, o qual reduz o mediador (COLLINS et al., 1998); a velocidade da reação depende do tipo de ácido orgânico utilizado como quelante: oxalato, malonato ou pirofosfato (SCHLOSSER; HÖFER, 2002).

O crescente aumento nas pesquisas com lacases tem apontado essa enzima como um dos principais componentes do sistema ligninolítico degradador da lignina. A elucidação dos mecanismos enzimáticos, de diferentes linhagens de fungos ligninolíticos, envolvidos na degradação da lignina, tem sido objeto de pesquisas, bem como a procura de novos metabólitos, incluindo novas enzimas ligninolíticas, para utilização de um eficiente sistema oxidativo com diferentes aplicações biotecnológicas.

2.1.1 Mediadores de lacase e a oxidação de compostos recalcitrantes

Juntamente com a lacase, certos compostos orgânicos, chamados de mediadores, podem ser utilizados, uma vez que o efeito catalítico da lacase é insuficiente para atuar em muitos substratos. Quando os mediadores são acoplados às reações com lacase a capacidade oxidativa aumenta consideravelmente, oxidando substratos os quais as lacases não oxidariam

sozinhas. No processo de biodegradação, o tamanho molecular da lacase, assim como outras enzimas, não permite a sua penetração na parede celular do material lignocelulósico intacto. O uso do mediador torna possível a biodeslignificação destes materiais, uma vez que são pequenos, atuando assim em locais onde as enzimas não penetrariam. Além disso, devido a inespecificidade por substratos, o sistema lacase-mediador pode oxidar um maior leque de estruturas aromáticas.

Os mediadores da lacase incluem substratos artificiais, ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfônico) (ABTS) e 1-hidroxibenzotriazol (HBT) (BOURBONNAIS; PAICE, 1990; CALL; MÜCKE, 1997), metabólitos fúngicos como o ácido 3-hidroxi-antranílico (EGGERT et al., 1996) e compostos derivados de lignina, principalmente compostos fenólicos (CAMARERO et al., 2005). Um mediador redox ideal deve ser um bom substrato para lacase, suas formas oxidadas e reduzidas devem ser estáveis durante o ciclo redox do mediador, desempenhando desta forma muitos ciclos de reação sem sua degradação. O mediador aumenta a eficiência catalítica da enzima (Figura 5) (MOROZOVA et al., 2007).

Figura 5. Mediador redox na atividade de lacase.

A oxidação de compostos orgânicos pelo sistema lacase/mediador depende de fatores como: tipo de enzima, tipo de mediador, substrato alvo utilizado, tipo de sistema tampão e pH da reação. Bourbonnais e col. (1997) foram um dos primeiros a descrever o sistema lacase-mediador na oxidação de lignina. Os autores observaram que HBT e ABTS foram mediadores eficientes de lacase de *Trametes versicolor*. A oxidação de um composto modelo dímero de lignina com ligação β-O-4 à um composto α-carbonila (Figura 6 A) foi maior por lacase/HBT (40%), do que lacase/ABTS (12%), ambos na proporção enzima/mediador de 0,5 UmL⁻¹/1mM. Um outro dímero de lignina, com ligação β1 (Figura 6 B) foi transformado em veratraldeído e benzaldeído em percentual maior pelo sistema lacase/ABTS. Álcool veratrílico também foi oxidado por duas isoenzimas, juntamente com mediadores: lacase/HBT (93 e 95%) e lacase/ABTS (95 e 80%) após 24 h, com diferenças na taxa de oxidação entre elas (BOURBONNAIS et al., 1997).

Figura 6. Oxidação de um composto modelo de lignina (dímero), com ligação β -O-4, à um composto α -carbonila (A) e oxidação de outro dímero de lignina, com ligação β 1 (B) a veratraldeído, benzaldeído ou α -carbonila.

Compostos fenólicos gerados a partir da degradação de substratos lignocelulósicos por fungos têm sido usados como modelos de mediadores de lacase para descoloração de corantes reativos (CAMARERO et al., 2005). Inicialmente os autores realizaram uma seleção de mediadores naturais de lacase, a partir de 44 compostos, utilizando o corante Reactive Black 5 como substrato. Dez compostos fenólicos foram selecionados e a eficiência destes mediadores para a descoloração de seis corantes de diferentes classes foi avaliada, em diferentes razões mediador/corante e tempo de reação por até 6 h, utilizando duas lacases: *Pycnoporus cinnabarinus* e *Trametes villosa*. Uma comparação foi realizada com mediadores sintéticos comumente usados nos estudos de lacase-mediador (Figura 7). Dentre os seis tipos de corantes avaliados, somente o corante Reactive Blue 38 (ftalocianina) foi recalcitrante ao tratamento lacase/mediador. Acid Blue 74 (indigo), Reactive Blue 19 (antraquinônico) e Aniline Blue (triarilmetano) foram parcialmente descoloridos na reação contendo somente lacase, embora a descoloração tenha sido muito mais rápida na presença de mediador. Reactive Black 5 (diaz) e Azure B (heterocíclico) foram descoloridos por lacases somente na presença de mediadores. A eficiência de cada mediador dependeu do tipo de corante utilizado e do tipo de mediador. Os melhores mediadores foram aldeídos fenólicos, cetonas, ácidos e ésteres relacionados às estruturas de lignina: os compostos ácido *p*-cumárico, vanilina, acetovanilina, metil vanilato, siringaldeído (SA) e acetosiringona. Estes dois últimos foram considerados promissores, promovendo elevadas taxas de descoloração em 5 à 30 min de reação, dependendo do tipo de corante utilizado.

Posteriormente, Camarero e col. (2007) realizaram uma seleção de mediadores naturais fenólicos (Figura 8) para deslignificação de polpa usando lacase de *Pycnoporus cinnabarinus*. Os testes basearam-se na capacidade de descoloração de dois corantes recalcitrantes, Azure B (heterocíclico) e Reactive Black (diazóico), por lacase/mediador. Os melhores resultados foram obtidos com acetosiringona como mediador de lacase, resultando em 90% de descoloração do Reactive Black 5 e 30% do Azure B, em menos de 30 min de reação. SA mostrou eficiência similar à acetosiringona para mediação com lacase na descoloração do Reactive Black 5. Em reação com ácido *p*-cumárico, 20% de descoloração do Azure B foi observada, porém em tempo de reação maior (6 h). A menor eficiência na descoloração foi obtida com o mediador sintético HBT, descrito na literatura como um dos melhores mediadores de lacase, sendo necessárias 6 horas de reação para obtenção de 15 e 50% de descoloração do Azure B e Reactive Black, respectivamente. Outros compostos fenólicos (2,6-dimetilfenol, 2,4,6- trimetilfenol, etil vanilina, acetovanilona, vanilina e álcool vanílico) tiveram baixa eficiência na descoloração comparados à acetosiringona e SA. Posteriormente, os autores avaliaram a deslignificação de polpa com lacase/mediador. Ácido *p*-cumárico juntamente com lacase não reduziu o número kappa (estimativa do conteúdo de lignina), ao passo que, acetosiringona ou SA, promoveram um decréscimo no número kappa da polpa. Através de técnicas de pirólise analítica foram observadas modificações na composição da lignina residual, em unidades fenilpropano, após tratamento das polpas com lacase-mediador.

As desvantagens na aplicação de mediadores sintéticos em processos biotecnológicos são o elevado custo e a possível toxicidade de compostos do tipo -N(OH)- e seus produtos de reação (CAMARERO et al., 2007). Além do baixo custo e possivelmente menor toxicidade, mediadores naturais podem ser facilmente obtidos a partir de líquido resultante do processamento de lignocelulósicos ou diretamente dos materiais lignocelulósicos (GUTIERREZ et al., 2007). Alternativamente os mediadores naturais podem ser obtidos da fermentação. *Pycnoporus cinnabarinus*, que produz lacase como única enzima ligninolítica, produz um metabólito, ácido 3-hidroxiantranílico, que atua como mediador natural de lacase (EGGERT et al., 1996).

Figura 7. Compostos sintéticos que atuam como mediadores de lacase, incluindo do tipo - N(OH)- (CAMARERO et al., 2005). A - ABTS, B - 1-hidroxibenzotriazol (HBT), C - ácido violúrico, D - 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1- oxil (TEMPO), E - ácido 2-nitroso-1-naftol-4-sulfônico (HNNS), F - ácido 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfônico (NNDS), G - Promazina (PZ).

Figura 8. Exemplos de mediadores naturais de lacase (modificado de CAMARERO et al., 2007).

2.2 EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE LACASES

Vários parâmetros afetam a produção de enzimas ligninolíticas durante o cultivo de basidiomicetos, os quais incluem: pH do meio, temperatura de incubação, disponibilidade de oxigênio, agitação, fonte e concentração de carbono e nitrogênio, microelementos e indutores específicos destas enzimas (LI et al., 1995; ARORA; GILL, 2001; COUTO et al., 2002; KAHRAMAN; GURDAL, 2002; IKEHATA et al., 2004).

O pH ótimo de crescimento micelial e de produção de enzimas podem diferir, mas no geral, o pH ótimo de cultivo de basidiomicetos situa-se numa faixa entre 4,5 e 5,5. *Phanerochaete chrysosporium* possui temperatura ótima de incubação de 37 °C, enquanto a maioria dos basidiomicetos a faixa de temperatura de incubação situa-se entre 25-30 °C. A agitação do meio pode afetar a produção de enzimas ligninolíticas; o estresse mecânico pode comprometer a produção das enzimas (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007).

Vitaminas e aminoácidos estimulam a produção de lacases de alguns fungos. Triptofano aumentou a produção de lacase em culturas de *Trametes trogii* (LEVIN; FORCHIASSIN, 2001). Dhawan e Kuhad (2002) avaliaram o efeito de 23 aminoácidos e 6 vitaminas para produção de lacase por *Cyathus bulleri* e evidenciaram que metionina, triptofano, glicina, valina, biotina, riboflavina e piridoxina tiveram efeito positivo na produção de lacase.

A produção extracelular de enzimas ligninolíticas dispensa o uso de técnicas de extração intracelular, que geralmente promovem perda de rendimento. E ainda, a extração de enzimas a partir do cultivo em meio líquido é mais fácil e permite a extração total das enzimas extracelulares produzidas, enquanto que durante cultivo em estado sólido, etapas adicionais são necessárias para obtenção do extrato enzimático (BARR; AUST, 1994).

A partir da década de 70, com o descobrimento e caracterização de LiP de *P. chrysosporium*, grande interesse tem sido despertado sobre o potencial biotecnológico do sistema ligninolítico de basidiomicetos e muitos estudos têm sido realizados para elucidar os mecanismos e o aumento da produção de enzimas ligninolíticas. O meio líquido sintético descrito por Kirk e col. (1978) tem sido utilizado por muitos autores para estudos de fisiologia e bioquímica de basidiomicetos. Entretanto, a composição deste meio foi inicialmente descrita para *P. chrysosporium*, sendo necessário ajuste na composição quando utilizadas outras espécies e linhagens.

A imobilização do micélio em suportes como: espuma de nylon, espuma de poliuretano e esponja vegetal, também é uma estratégia eficiente para cultivo de

basidiomicetos em reatores, protegendo o micélio contra estresse de valores extremos de pH e presença de compostos tóxicos. A descoloração de corantes reativos foram realizadas em reatores com basidiomicetos imobilizados (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007).

A operação em batelada e controle na adição de nutrientes são eficientes para produção de lacases em biorreatores. Esta estratégia permite o controle no crescimento, regulando a concentração de substrato para evitar repressão catabólica no metabolismo de açúcares (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007).

Em geral, a utilização de substratos lignocelulósicos estimulam a produção de enzimas ligninolíticas, que fornecem uma condição próxima à encontrada no ambiente natural de fungos ligninolíticos. Bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de madeira de eucalipto, palha de milho, grãos enriquecidos com nutrientes misturados à serragem, milhocina, farelo de trigo, farelo de arroz, etc., promovem aumento na produção de enzimas ligninolíticas (ARORA; GILL, 2001; GILL; ARORA, 2003). A adição de substratos lignocelulósicos aumentam consideravelmente a produção de enzimas ligninolíticas, no entanto, produtos de degradação do material lignocelulósico dificultam o processo de purificação e podem interferir em análises durante a quantificação e caracterização das enzimas. Indutores de enzimas ligninolíticas, como cobre, e compostos fenólicos têm sido utilizados no cultivo de basidiomicetos com sucesso e promovem aumento significativo na produção das enzimas, permitindo assim o isolamento das enzimas e sua caracterização, dispensando o uso de substratos lignocelulósicos no cultivo fúngico.

2.2.1 Indutores de lacases

Em geral, as enzimas ligninolíticas são codificadas por uma família de genes. Collins e Dobson (1997) observaram aumento na transcrição de genes de lacase de *Trametes versicolor* por Cu^{2+} , 2,5 xilidina e nitrogênio. Indução de lacases por cobre foi também detectada em culturas de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Pleurotus ostreatus* (KARAHANIAN et al., 1998; PALMIERI et al., 2000).

Compostos aromáticos como: álcool veratrílico, ácido vanílico, 2,5 xilidina, ácido ferúlico, siringaldazina e guaiacol e o cobre induzem a produção de lacases. Estes indutores podem promover a síntese de isoformas de enzimas ligninolíticas (CALL; MÜCKE, 1997; TERRON et al., 2004; COUTO; TOCA-HERRERA, 2007). O cobre induz a transcrição de lacase e ainda aumenta a atividade da enzima. A indução tem sido relacionada ao estresse oxidativo provocado pela adição do metal aos cultivos (GALHAUP; HALTRICH, 2001).

O cobre é um microelemento necessário para síntese de lacase, já que este metal compõe o sítio ativo da enzima. O tempo de adição de cobre ao cultivo e a concentração utilizada são fundamentais para indução. Em geral, para induzir a produção de lacase por cobre, tem-se adicionado CuSO_4 , após 3 ou 4 dias (durante a fase exponencial), ao cultivo dos fungos. Outros trabalhos também têm demonstrado indução e/ou estímulo de lacase por cobre em cultivos de basidiomicetos (Tabela 1). Galhaup e Haltrich (2001) avaliaram o efeito da adição de cobre à culturas de *Trametes pubescens*, numa faixa de 0,1 à 2 mM de CuSO_4 , após a inoculação do fungo ou após 4 ou 8 dias de cultivo. Maior atividade de lacase foi detectada pela adição de 2 mM de cobre após 4 dias de cultivo, quando glicose foi quase totalmente consumida. A adição de 2 mM de cobre após a inoculação inibiu parcialmente o crescimento fúngico. Efeito similar foi observado em culturas de *T. multicolour* e *T. trogii* (HESS et al., 2002; LEVIN et al., 2002), com concentração ótima de cobre para indução entre 0,5 mM à 2,0 mM. Isoformas de lacases também foram obtidas após indução por cobre em culturas de *P. ostreatus* (PALMIERI et al., 2003).

Em cultivo do ascomiceto *Podospora anserina*, mRNA de lacase foi aumentado em resposta à adição de cobre e compostos aromáticos (FERNANDEZ-LARREA; STAHL, 1996). Os autores deste estudo também constataram que lacase foi produzida como um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo provocado pela adição de cobre.

Desde que a adição de indutores aumentam consideravelmente a produção de lacase, a utilização destas substâncias pode subsidiar a produção desta enzima em larga escala, para diversas aplicações industriais (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007).

Tabela 1 – Indução na produção de lacases de basidiomicetos por cobre

Organismo	Concentração de cobre no meio (μM)	Atividade de lacase (U/ml)	Tipo de cultivo	Referência
<i>Trametes trogii</i>	667	45,32	Glicose/asparagina	Levin et al. (2005)
<i>Lentinula edodes</i>	250	30	10g glicose, 2,6mM NH_4NO_3 e elementos traço	Cavallazi et al. (2005)
<i>Trametes pubescens</i>	2000	68,5	Reator, 20g/L glicose, 5 g/L extrato levedura, 5g/L peptona e elementos traços. Agitação de 110 rpm	Galhaup e Haltrich (2001)
<i>Trametes trogii</i>	300	20	10 g glicose, 5 g peptona, 1 g extrato levedura, 2 g tartarato amônio, 0,5 g KH_2PO_4 e elementos traços	Zouari-Mechichi et al. (2006)
<i>Cerrena unicolor</i>	50	4	Meio Kirk	Michniewicz et al. (2006)

2.2.2 Produção de lacases por basidiomicetos em reatores

Um dos fatores que limitam a aplicação em larga escala de lacases fúngicas é a falta de um sistema de produção eficiente em escala de biorreatores. As diferentes formas de crescimento dos fungos filamentosos têm um efeito significativo sobre a reologia do caldo de fermentação e, conseqüentemente, no desempenho do biorreator. Os estudos dos efeitos da reologia do caldo sobre a transferência na massa e a transferência de calor dentro de um biorreator são mencionados na revisão de Rodríguez-Couto e Toca-Herrera (2007). Culturas com crescimento filamentoso normalmente exibem uma alta viscosidade e reologia não-newtoniana. Em níveis moderados a elevados de biomassa, estes caldos apresentam característica de pseudoplasticidade. Estes efeitos podem ter um número de resultados indesejáveis, tais como pobre transferência de massa, o que diminui a produtividade. Além disso, o controle da extensão das hifas é de grande importância para operar o biorreator em modo contínuo. Nos últimos anos as técnicas de cultivo e diferentes estratégias foram usadas

para produzir lacase em escala de biorreatores por linhagens selvagens de fungos filamentosos (RODRÍGUEZ COUTO; TOCA-HERRERA, 2007). A Tabela 2, retirada na íntegra da revisão de Rodríguez Couto e Toca-Herrera (2007), reporta a máxima produção de lacase por fungos basidiomicetos em diferentes reatores (Tabela 2). As maiores atividades foram obtidas para linhagens de *Trametes* (*T. hirsuta*, *T. versicolor* e *T. pubescens*), *Pycnoporus cinnabarinus* e *Neurospora crassa*.

Tabela 2 – Produção de lacases por diferentes fungos em biorreatores

Fungo	Tipo de reator	Caracterização do cultivo	Indutor	Atividade max. lacase (U/L)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Leito fluidizado de 10 L	SmF, imobilizado cubos de nylon	10 mM VA	280
<i>Trametes pubescens</i>	STR de 20 L (150 rpm)	SmF, livre	2 mM Cu ⁺²	61.900
<i>Neurospora crassa</i>	Membrana capilar	SmF, imobilizado em suporte de membrana	1 µM Cicloheximida	10.000
<i>Phanerochaete flavidio-alba</i>	Fermentador em batelada com feed (975 mL ^a ; 70 rpm)	SmF, células livres	OMW	72
<i>T. pubescens</i>	STR de 20 L (100 rpm)	SmF, células livres	2 mM Cu ⁺²	333.000
<i>T. pubescens</i>	STR de 20 L (100 rpm)	SmF, células livres em batelada alimentada	2 mM Cu ⁺²	740.000
<i>Trametes multicolor</i>	STR	SmF	-	-
<i>Coriolus hirsutus</i>	Fermentador de 10-L (160 rpm)	SmF, células livres, semi-contínuo	0,25 g/L Cu ⁺²	83.830 (1st fermentation)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Fermentador de 2 L (Biostat C)	SmF	16 mM VA	460
<i>P. sanguineus</i>	Biostat C de 15L (8 L; 250 rpm)	SmF, células livres	16 mM VA	8131
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Fermentador de 3 L (200 rpm)	SmF, células livres	OMW	65
<i>Panus tigrinus</i>	STR de 3 L (2 L; 250 rpm)	SmF, células livres	OMW	4600
<i>P. tigrinus</i>	ALR de 3 L (2.5 L)	SmF, células livres	OMW	4300
<i>P. tigrinus</i>	RDR de 20 L	SSF (palha de milho)	OMW	1309
<i>Trametes versicolor</i>	Biostat Q (sistema de 4 reator de 330 mL cada)	SmF (pellets)	-	-
<i>Trametes versicolor</i>	Leito fluidizado 0,5 L	SmF (pellets)	-	1187
<i>T. versicolor</i>	Leito pulsado de 0,5 L	SmF (pellets)	-	16.000
<i>Irpex lacteus</i>	Leito empacotado (27 mL)	SmF (imobilizado em PUF)	-	-
<i>T. versicolor</i>	ALR (2 L)	SmF, cels livres	Tween 80	1670

Continua

Fungo	Tipo de reator	Tipo de cultivo	Indutor	Atividade max. lacase (U/L)
<i>T. versicolor</i>	Imerso (2.5 L)	SSF (esponja de nylon)	Tween 80	229
<i>T. versicolor</i>	Imerso (2.5 L)	SSF	Tween 80	600
<i>T. versicolor</i>	Leito expandido (300 mL)	SSF (esponja de nylon)	Tween 80	126
<i>T. versicolor</i>	Leito expandido (300 mL)	SSF	Tween 80	600
<i>T. versicolor</i>	Bandeja (1 L)	SSF (esponja de nylon)	Tween 80	343
<i>T. versicolor</i>	Bandeja (1 L)	SSF (farelo de cevada)	Tween 80	3500
<i>T. versicolor</i>	Leito fluidizado (1,5 L)	SmF (pellets)	-	1685
<i>P. ostreatus</i>	Substrato sólido	Filme sólido	Bagaço de cana-de-açúcar	3500
<i>Bjerkandera adusta</i>	STR (5 L)	SmF (imobilizado em rede de nylon)	-	4
<i>Trametes hirsuta</i>	Leito fixo de 1L	SmF (imobilizado em esponja de aço)	Cu ⁺²	2206
<i>T. hirsuta</i>	Imersão de 0,5 L	SSF	Cu ⁺²	4892
<i>P. cinabarinus ss3</i>	STR (12 L, 150 rpm)	SmF	-	2800
<i>T. versicolor</i>	Fluidizado, com pulsos de ar (10 L)	SmF pellets	-	2700
<i>T. hirsuta</i>	ALR (2 L)	SmF (imobilizado em esfera de alginato)	4 mM Álcool veratrílico	1043
<i>P. ostreatus</i>	Packed-bed (280 mL)	SmF (imobilizado em PUF)	Cu ⁺²	1403
<i>T. pubescens</i>	ALLR (3,5 L)	Pellets	Efl. fenólico	11.800
<i>T. versicolor</i>	Leito fluidizado, com pulsos de ar (1,5 mL)	Pellets	-	1160
<i>T. versicolor</i>	RITA® System	SSF (palm oil fibre)	-	138,6
<i>T. versicolor</i>	RITA® System	SSF (pine wood chips)	-	54
<i>Phanerochaete chrysosporium NCIM 1197</i>	Biorreator em escala de bancada (800 mL)	Batch fermentation	30 mM Cu ⁺²	30,2
<i>P. cinnabarinus ss3</i>	Biorreator com vapor (300 mL; 18 L)	SSF (bagaço de cana)	Vapor de etanol	10.000
<i>P. ostreatus</i>	ALLR (5 L)	SmF - pellets	OMW	1200

Continua

Conclusão

Fungo	Tipo de reator	Tipo de cultivo	Indutor	Atividade max. lacase (U/L)
<i>Funalia trogii</i>	STR de 2 L	Imobilizado em alginate de sódio	-	1000
<i>T. hirsuta</i>	Bandeja (0.2 L)	SSF (esponjas de nylon)	-	6898
<i>T. hirsuta</i>	Bandeja (0,2 L)	SSF (semente de uva)	-	18.715
<i>T. hirsuta</i>	Imerso (0,5 L)	SSF (semente de uva)	-	12.877
<i>T. hirsuta</i>	ALLR (6 L)	SmF células livres	Cu ⁺² , glicerol	19.400
<i>T. versicolor</i>	STR (1L)	SmF	30 µM xildina	11.403
<i>T. versicolor</i>	Leito fluidizado, com pulsos de ar (1,5 mL)	Pellets	-	2123
<i>T. hirsuta</i>	Leito fluidizado de 250 mL (200 mL)	SSF	5 mM Cu ⁺²	3000
<i>T. hirsuta</i>	Bandeja de 1,8 L (200 mL)	SSF	5 mM Cu ⁺²	12.000
<i>T. versicolor</i>	STR de 5 L(1,25 L)	SmF (pellets)	-	1385

STR: Reator de tanque agitado (*Stirred tank reactor*); ALR: reator do tipo air-lift; ALLR: reator air-lift com loop (*air-lift loop reactor*); RDR: Reator de tambor rotatório (*rotatory drum reactor*).

SSF: Fermentação em estado sólido; SmF: Fermentação submersa; PUF: Espumas de poliuretano; VA: Álcool veratrílico; OMW: resíduo de óleo de oliva.

^a - O volume entre parênteses refere-se ao volume de trabalho

2.2.3 Produção heteróloga de lacases

Os primeiros genes de lacase foram sequenciados há 20 anos, nos fungos *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Coriolus hirsutus* e *Phlebia radiata*. Desde então, o número de genes de lacase sequenciados aumentou consideravelmente. Um gene típico de lacase codifica uma proteína de aproximadamente 500 a 600 aminoácidos. As regiões codificantes de lacases fúngicas são usualmente interrompidas por 8 a 13 íntrons de 50 a 60 pares de bases cada um.

Muitos genomas de fungo contêm mais de um gene de lacase. *Trametes villosa*, por exemplo, apresenta pelo menos cinco genes de lacase (YAVER et al., 1996), *Coprinus cinereus* pelo menos oito e *Rhizoctonia solani*, *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus ostreatus* pelo menos quatro genes de lacase. A quantificação precisa dos genes de lacase é complicada devido à existência de diferentes genes alelos dessa enzima nos cromossomos, pois a maioria

dos fungos produtores de lacase estudada é diplóide. Lacases e seus genes codificadores são identificados pela presença de quatro regiões altamente conservadas de ligação de cobre, todas envolvendo a sequência HXH e contendo dez histidinas e uma cisteína conservadas (YAVÉR et al. 1996; EGGERT et al. 1998)

Duas lacases foram purificadas de *Trametes villosa* e isolados os genes *lcc1* e *lcc2*, que codificam estas proteínas respectivamente. As proteínas maduras de *lcc1* e *lcc2* são 80% idênticas ao nível dos aminoácidos e são diferentemente reguladas. Os níveis de RNAm de *lcc1* foram induzidos por 2,5-xilidina no meio de cultivo do fungo, enquanto que os níveis do RNAm de *lcc2* não foram induzidos pelas mesmas condições. Foram realizados o isolamento e a caracterização de três genes adicionais de lacase de *T. villosa* (*lcc3*, *lcc4* e *lcc5*), e discutida a organização da família de genes de lacase (YAVÉR et al., 1996).

A posição de alguns íntrons em todos os genes *lcc* de *T. villosa*, assim como para *A. hirsutus* (*Ch*) e *Phlebia radiata* (*Pr*), e nos genes de *T. versicolor* (*Tvers*) são conservadas (Figura 9). As posições dos três primeiros íntrons nos sete genes de lacase são conservadas. As posições dos íntrons são mais divergentes nas extremidades 3' dos genes. A posição dos dez íntrons é conservada nos genes *lcc2* e *Ch*. A estrutura do gene *lcc1* é idêntica a dos anteriormente citados, exceto na extremidade 3' onde em um terço do gene faltam dois dos íntrons. Os genes *lcc3*, *lcc4* e *lcc5* têm estruturas muito similares; a posição dos primeiros e dos últimos íntrons são conservadas. Foi proposto que, baseado na estrutura íntron/éxon, os genes de *T. villosa* podem ser divididos em 2 subfamílias que podem ser diferentemente reguladas: uma consiste nos genes *lcc1* e *lcc2*, e outra nos genes *lcc3*, *lcc4* e *lcc5* (YAVÉR et al., 1996).

Figura 9. Estrutura Íntron/Éxon dos genes de lacase. Os éxons estão indicados pelas linhas pretas sólidas, e os íntrons pelas caixas abertas. As linhas verticais indicam posições conservadas dos íntrons. *Ch*, *A. hirsutus*; *Tv lcc1*, (*T. villosa lcc1*); *Tv lcc2*, (*T. villosa lcc2*); *Tv lcc3* (*T. villosa lcc3*); *Tv lcc4* (*T. villosa lcc4*); *Tv lcc5* (*T. villosa lcc5*); *Tvers* (*T. versicolor lcc1*); *Pr*. (*P. radiata*) (YAVÉR et. al., 1996, modificado).

O estado atual da arte acerca das pesquisas com lacases tem focado na obtenção de enzimas com elevada capacidade oxidativa a partir de estudos de evolução dirigida, após seleção de milhares de clones (ALCADE et al., 2010). A Tabela 3, retirada de uma revisão de patentes de lacases (KUNAMNENI et al., 2008), apresenta a produção de lacases por organismos recombinantes.

Tabela 3 – Produção de lacases em vetores heterólogos

Gene de lacase	Vetor de produção	Produção de lacase (mg/l)	Referência
<i>Ceriporiopsis subvermispora lcs-1</i>	<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus niger</i>	1,5 1,5	Larrondo e col. (2003b) Larrondo e col. (2003b)
<i>Coprinus cinereus lcc1</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	135	Yaver e col. (1999)
<i>Melanocarpus albomyces lac1</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	920	Kiiskinen e col. (2004)
<i>Myceliophthora thermophila lcc1</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19 18	Berka e col. (1998a; 1998b) Bulter e col. (2003)
<i>Phlebia radiata lac1</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	20	Saloheimo e Niku-Paavola (1991)
<i>Pleurotus sajor caju lac4</i>	<i>Pichia pastoris</i>	4,9	Soden e col. (2002)
<i>Pycnoporus cinnabarinus lac1</i>	<i>Pichia pastoris</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Schizophyllum commune</i>	8 70 80 1200	Otterbein e col. (2000) Record e col. (2002) Sigoillot e col. (2004) Alves e col. (2004, 2005)

Brown e col. (2002) expressaram uma lacase de *Trametes versicolor* em *Pichia pastoris*, a qual não é normalmente expressa por *T. versicolor* em condições de cultivo. O objetivo foi verificar se a enzima possuía alguma propriedade distinta das lacases expressas constitutivamente por *T. versicolor*. A lacase expressa em *P. pastoris* apresentou propriedades similares às lacases constitutivas de *T. versicolor*. Lacases de *Pleurotus sajor-caju* também foram expressas em *P. pastoris* (SODEN et al., 2002); os autores do estudo obtiveram 4,85 mg/l de lacases.

Aeromonas hydrophila foi isolada de lodo ativado, de uma planta industrial de tratamento de efluentes têxteis. Um gene que codifica lacase foi clonado e caracterizado. Quando expressa em *E. coli*, lacase foi produzida em elevados níveis, no citoplasma e em

forma solúvel (WU et al., 2010). No entanto, os autores não informam a concentração de proteína produzida. A enzima apresentou um Km para o ABTS de 0,94 mM.

Piscitelli (2008) estudou a expressão heteróloga de duas lacases de *Pleurotus ostreatus* em *Saccharomyces cerevisiae* e *K. lactis*. Diferentes níveis de expressão foram observados entre as leveduras. A autora apresenta algumas vantagens de utilização de *K. lactis*, como a expressão de proteínas não-hiperglicosiladas.

Yaver e colaboradores (1996) identificaram dois genes de lacase em *Trametes villosa* e expressaram um deles em *Aspergillus oryzae*. A proteína recombinante apresentou características semelhantes à enzima nativa. Os autores ressaltam que ambas lacases, recombinante e nativa, apresentaram as mesmas características de espectro UV, perfil de atividade quanto variação do pH, pI, atividade específica, diferindo somente no conteúdo de glicosilação (0,5 e 10%, para forma nativa e recombinante, respectivamente). Entretanto, o conteúdo adicional de carboidratos durante a expressão heteróloga não teve efeito na atividade enzimática.

Lacase de *Pycnoporus cinnabarinus* foi expressa em *Y. lipolytica* (MADZAK et al., 2005). A produção da enzima foi estimada em 20 mg/L.

Lacase de *Melanocarpus albomyces* foi expressa em *T. reesei*. A fermentação em escala de laboratório atingiu cerca de 920 mg/l de proteína (KIISKINEN et al., 2004). *T. reesei* são eficientes na expressão de lacases, expressando enzimas com propriedades muito similares às lacases nativas, representando uma vantagem sobre procariotos, que apresentam alguns mecanismos indesejáveis: modificações pós-traducionais, subsequente incorporação de cofactores e íons Ca^{2+} estruturais e formação de pontes dissulfeto (LI et al., 2007; ALCADE et al., 2010). Além disso, *T. reesei* é conhecido por secretar proteínas recombinantes, na presença de baixos níveis de proteínas nativas, como proteases, contribuindo assim para facilitar os procedimentos de obtenção e purificação da proteína heteróloga.

Um eficiente sistema de expressão foi desenvolvido para o basidiomiceto *P. cinnabarinus*. Este sistema foi usado para transformar uma linhagem monocariótica deficiente em lacase com um gene homólogo *lacI*. A concentração foi de 1200 mg/l de enzima, representando a maior produção de lacase relatada por cepas fúngicas recombinantes (ALVES et al., 2004; ALVES et al., 2005).

2.3 PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DE LACASES

Vários métodos têm sido utilizados para purificação de lacases de cultivos de basidiomicetos. Frequentemente, a purificação consiste em quatro ou cinco passos: inicialmente o extrato de cultivo é concentrado, por precipitação das proteínas com sulfato de amônio ou ultrafiltração, seguindo-se por troca iônica, permeação em gel e/ou cromatografia de afinidade (Tabela 4). Muitos fungos produzem pigmentos, o que pode interferir nos procedimentos de purificação e na atividade da enzima. Em geral, os pigmentos são eliminados pela precipitação com sulfato de amônio ou durante a cromatografia de troca iônica (FUKUSHIMA; KIRK, 1995). Isoenzimas de lacases são separadas por troca iônica, quase sempre, como reportado na literatura, utilizando a coluna com resina de troca aniônica Mono Q (SAPARRAT et al., 2002).

Isoformas de lacases têm sido relatadas a décadas (ESSER; MINUTH, 1971). Em parte, essas isoformas estão relacionadas ao grau e natureza de glicosilação da enzima. Antorini e col. (2002) após purificarem lacase de *Pycnoporus cinnabarinus* em DEAE-Sepharose, observaram que o perfil de eluição revelou duas isoenzimas (dois picos com atividade de lacase). Um dos picos foi submetido à focalização isoelétrica e cinco isoformas foram obtidas, com *pI* na faixa de 3,4-3,8.

Alternativamente aos métodos convencionais de purificação, a extração líquido-líquido utilizando sistemas de duas fases aquosas (SDFA), pode ser uma alternativa promissora. Sabe-se que uma fração considerável dos custos de produção (50-90%) vem desde as fases de extração e purificação (DIAMOND et al., 1992). Assim, o desenvolvimento de metodologias e processos eficientes para reduzir esses custos e garantir altos níveis de qualidade (pureza, atividade, estabilidade, etc) tornou-se uma prioridade.

Os SDFA fornecem condições adequadas para a maioria das biomoléculas e permite a recuperação com alta pureza e sem perda da atividade biológica. Estes sistemas são tradicionalmente formados pela mistura de soluções aquosas de dois polímeros ou um polímero e um sal. A água é o solvente para as duas fases e está presente em alta porcentagem (~70-90%), proporcionando assim um ambiente ameno, com chances reduzidas de desnaturação. Além disso, SDFA tem baixa tensão superficial, que permite a transferência de biomoléculas por meio da interface com um risco mínimo de mudanças estruturais (SILVA 2006; ZASLAVSKY, 1994). Outra característica importante do SDFA é a possibilidade de controlar o pH do meio com utilização de soluções tampão.

Tabela 4 – Etapas de purificação de diferentes lacases

Organismo	Cultivo	Etapas de purificação	Atividade (U)	Proteínas (mg)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator purificação	Observações	Referência
<i>Peniophora</i> sp. UD4	Cultivo em meio Kirk, por 14 dias	1. liofilização (800 mL)	4020	862	5	100	1,0	Lacase termoe estável	Jordaan e col. (2004)
		2. Troca iônica Super Q 650 M	2290	69	33	57	7,1		
		3. Congelamento-Descongelo e diálise	1180	58	30	29	4,3		
		4. Troca iônica Super Q 650 M	473	9	52	12	11,2		
Linhagem não identificada (I-4), família Chaetomiaceae	Batata dextrose (200 mL), 30°C, 150 rpm, 7 dias	1. extrato bruto (2.389 mL)	1455	139	10,5	100	1,0	única banda SDS-Page, com 73kDa	Saito e col. (2003)
		2. precip. sulfato amônio (134 mL)	950	37,1	25,6	65,3	2,4		
		3. Troca iônica HiPre 16/10 Q FF (17,6 mL)	386	12,7	30,4	26,5	2,9		
<i>Trichophyton rubrum</i> LKY-7	<i>Pellets</i> inoculados em 50 mL de meio com glicose (30g/L) peptona (10g/L) com 2,5µM xilidina	1. Extrato bruto (5.400 mL)	13.500	0,25	10	100	1,0	Massa molar de 65kDa e pI 4,0	Jung e col. (2002)
		2. Ultrafiltração 10kDa (52 mL)	10.900	2,7	78	81	8		
		3. Q-Sepharose (25 mL)	8.600	2,5	173	64	17		
		4. Phenil-Sepharose (20 mL)	6.400	1,5	210	48	21		
		5. Superdex-75 (10 mL)	5.400	1,8	300	40	30		

Continua

Conclusão

Organismo	Cultivo	Etapas de purificação	Atividade (U)	Proteínas (mg)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator purificação	Observações	Referência
<i>Marasmius quercophilus</i>		1. Extrato bruto (2.000 mL)	800	144	5,6	100	1,0		Dedeyan e col. (2000)
			718	106,2	6,9	90	1,2		
		2. Ultrafiltração (50 mL)	401	39	10,3	50	1,9		
		3. Q-Sepharose (26 mL)	289	26	11,1	36	2,0		
		4. Sephacyl S-200 (20 mL)	245	18,8	13	31	2,4		
<i>Rigidoporus lignosus</i>		5. Chelating Sepharose (Cu) (20 mL)							Cambria e col. (2000)
		1. Extrato bruto (1.200 mL)	432	0,6	0,65	100	1,0		
			231	8,75	3,1	53,5	4,8		
		2. Precipitação com sulfato de amônio (8,5 mL)	81,2	14,5	5,6	18,8	8,7		
			65,5	8,5	15,4	15,1	23,7		
<i>Cerrena unicolor</i>	Meio Kirk modificado, com indução por cobre	3. DEAE-Sephacel (1 mL)						Isoenzimas com 64 e 57 kDa e pI de 3,6 e 3,7,	Michniewicz e col. (2006)
		4. Mono-Q (0,5 mL)							
		1. Extrato Bruto (2200 mL)	6094	90,2	67,6	100	1,0		
			4780	4,5	1062	78	15,7		
		2. Ultrafiltração (4mL)	784	1,6	488	13	7,2		
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Meio sóldio: palha de trigo	3. Mono Q Lac I (0,39 mL)	531	2,6	206	9	3		de Souza e Peralta (2003)
		4. Mono Q Lac II (0,345 mL)							
		1 Extrato bruto	85000	25,4	3346	100	1,0		
		2 Precipitação com acetona	76300	18,7	4080	90	1,2		
			15156	nd	Nd	17,8			
		3 Troca iônica pico I	51630	3,0	17200	60,9	5,1		
		Troca iônica pico II	41480	2,1	19750	49	5,9		
		4 Permeação em gel pico II							

Ao escolher um SDFA adequado para aplicações industriais, atenção tem que ser dedicada ao custo dos componentes, bem como para as suas possibilidades de reciclagem. Polímeros são muitas vezes mais caros do que sais, assim, a reciclagem de polímeros tem especial atenção nos processos de extração utilizando SDFA (KUMAR et al., 2007; WANG et al., 2008).

Para a utilização de SDFA é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Para isto são efetuados os diagramas de fases para os componentes, nos quais as composições dos constituintes para a separação das fases são determinadas. A Figura 10 apresenta um exemplo de diagrama de fases mostrando a composição das fases em equilíbrio. Na Figura 10 está representada uma curva binodal para um sistema polietileno glicol/citrato de sódio. A curva que divide a região em duas fases é chamada de curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada de bifásica e a abaixo, monofásica. As linhas são chamadas “tie-lines” ou linhas de amarração e qualquer ponto sobre ela representa um sistema com a mesma composição, porém com diferentes volumes das fases superior e inferior.

A composição dos sistemas é expressa em porcentagem mássica (% m/m), a razão entre a massa do polímero na fase superior e a massa do sal na fase inferior (ESMANHOTO, 2002). Quanto mais a composição do sistema se aproxima do ponto crítico menor é a diferença entre as fases, ou seja, no ponto crítico as composições e os volumes entre as fases teoricamente são iguais. No entanto, nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas provocam drásticas mudanças, levando o sistema de uma para duas fases e vice-versa (KAUL, 2002).

Figura 10. Curva binodal e linha de amarração (tie-line) obtidas a 23°C para os sistemas:
UCON-tampão fosfato de potássio pH = 7 (-▼-) e
UCON-tampão fosfato de sódio pH = 7 (-●- -) (SILVERIO et al., 2010).

Poucos trabalhos realizaram a recuperação de lacases com SDFA. A partição de lacase comercial em SDFA composto por UCON (polímero de oxido de etileno) e fosfato foi previamente avaliada por SILVÉRIO e col. (2010b) revelou que estes sistemas bifásicos pode ser uma alternativa promissora para a recuperação de lacase a partir de caldos fermentados. Mayolo-Deloisa e col. (2010) avaliaram o uso de SDFA para a recuperação de lacase produzida *Agaricus bisporus* em fermentação sólida em composto para frutificação do cogumelo. O uso de SDFA resultou em uma única etapa de recuperação da atividade de lacase, com rendimento de 95%.

Diversas lacases tem sido purificadas e suas propriedades elucidadas (BALDRIAN, 2006). A temperatura ótima de lacases de basidiomicetos situa-se na faixa de 40 à 70°C (Tabela 5). Acima da temperatura ótima de atividade, a velocidade de catálise cai, devido à desnaturação da enzima pelo calor. A desnaturação térmica de enzimas multi-cobres azuis é irreversível. Muitas lacases de fungos são estáveis à temperaturas próximas à 60°C. Lacases termoestáveis dos fungos termófilos *Myceliophthora thermophila* e *Coprinus cinereus* apresentaram cerca de 70% de sua atividade à 60°C após 1 h (XU, 1997; SCHNEIDER et al., 1999). Jordaan e col. (2004) observaram que lacase termoestável de uma linhagem de basidiomiceto não identificada (linhagem UD4) não apresentou perda de atividade com 9 h de incubação à 60°C. Podem ocorrer mudanças conformacionais nos sítios de cobre, que representam o núcleo mais estável da enzima. Os átomos de cobre possuem um papel importante na estabilização da estrutura de lacases (KOROLEVA-SKOROBGATKO et al., 1999; KOROLEVA et al., 2001; RAGUSA et al., 2002).

Tabela 5 – Temperatura ótima de lacases de alguns basidiomicetos

Fonte de lacase	Temperatura ótima (°C)	Referência
<i>Cerrena máxima</i>	>50	Shleev e col. (2004)
<i>Coprinus cinereus</i>	60-70	Schneider e col. (1999)
<i>Coriopsis fulvocinerea</i>	>50	Shleev e col. (2004)
<i>Coriolus hirsutus</i>	45	Shin e Lee (2000)
Linhagem I-4 (família Chaetomiaceae)	42	Saito e col. (2003)
Linhagem UD4	70	Jordaan e col. (2004)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	45-65	Palmieri e col. (1997)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	62	Ryan e col. (2003)
<i>Trametes hirsuta</i>	>50	Shleev e col. (2004)
<i>Trametes ochraceae</i>	>50	Shleev e col. (2004)
<i>Trametes</i> sp. linhagem AH28-2	50	Xiao e col. (2003)

Com relação aos inibidores, azida sódica (NaN_3) é considerada um dos inibidores mais eficientes de lacases, pois atua em metaloenzimas (HEINZKILL et al., 1998; JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000; JORDAAN et al., 2004; NIKU-PAAVOLA et al., 2004). A ligação de NaN_3 aos sítios de cobres T2 e T3 afeta a transferência interna de elétrons, inibindo a atividade da enzima (RYAN et al., 2003). Enquanto EDTA, ácido tioglicólico e SDS causam apenas inibição parcial na atividade da enzima (FUKUSHIMA; KIRK, 1995; HEINZKILL et al., 1998; SHIN; LEE, 2000; SAITO et al., 2003; JORDAAN et al., 2004; NIKU-PAAVOLA et al., 2004). Cisteína e ácido tioglicólico não foram inibidores eficientes de lacase de *T. versicolor* (JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000). Jordaan e col. (2004) descrevem que o ácido tioglicólico causou uma inibição inicial de lacase (durante aproximadamente 100 seg), posteriormente a atividade foi detectada novamente durante oxidação do ABTS. Os autores descrevem que o ácido tioglicólico inibiu competitivamente a lacase atuando como quelante do oxigênio, sendo o oxigênio o aceptor final de elétrons para a reação.

O cobre, dependendo da concentração, pode causar inibição pela interação com grupos $-\text{SH}$ da enzima (DE SOUZA; PERALTA, 2003; LORENZO et al., 2005).

Embora lacases apresentem atividade numa faixa estreita de pH, próximo à 4, a imobilização da enzima em determinados suportes pode aumentar a faixa de pH de atividade, acima de 7, além de aumentar a estabilidade da enzima em temperatura acima de 50°C . Vários suportes têm sido utilizados para imobilização de lacases e a degradação de diversos compostos tem sido investigada, como: fenóis, clorofenóis e anilinas (BAYRAMOGLU; ARICA, 2009). Alguns suportes são sumarizados na Tabela 6, retirada na íntegra do trabalho de Duran e colaboradores (2002).

Tabela 6 – Imobilização de lacases em diferentes suportes (DURAN et al., 2002). Nesta Tabela, cada linha tarjada representa a avaliação de uma lacase, de um determinado organismo, frente à oxidação de diferentes substratos, em diferentes suportes.

Origem	Substrato	Suporte	Comentário	Imobilização
<i>Aspergillus</i> sp.	Siringaldazina	Vidro, vidro em pó, sílica gel, membrana de nylon 66	V ₀ , atividade crescente	Adsorção
<i>Botrytis cinerea</i>	Ácido clorogênico	Silica gel, DEAE-celulose, Alumina G, Sepharose 4B, CNBr-Sepharose 4B	60-100% imobilizada, 5-28% ativa	Covalente-Glutaraldeído, adsorção, Covalente- Glutaraldeído, adsorção, covalent-CNBr
<i>Cerrena maxima</i>	Fluidos biológicos	Matriz sólida	Patente	Adsorção
<i>Cerrena unicolor</i>	Fenóis, Siringaldazina	Esferas de vidro, esferas de vidro porosas silanizadas, CPG-ativada, CPG coberto, camadas de dextran	Propriedades livre e imobilizada pH, t ₀ , 95% atividade Km, Vmax, t ₀ estável	Covalent-APTES- Glutaraldeído Covalent-APTES- Glutaraldeído Covalent-APTES- Glutaraldeído
<i>Corioloopsis gallica</i>	Corante Reactive blue 198, ABTS	Agarose ativada (Affi-Gel-15)	85% atividade (depois 10 ciclos), mediador HBT, coluna empacotada	Derivatizada de éster covalente, cross-link
<i>Coriolus hirsutus</i>	Fluídicos biológicos Catecóis	Matriz sólida, Poli alquilados poli(etilenamina)/ brometo de cetila	Patente t ⁰ estável	Adsorção, Complexo micelas reversas
<i>Coriolus versicolor</i>	Fenóis	Eletrodo de grafite	Biosensor, Km, Vmax	
	Licor negro de polpa celulósica	Contas alginadas, co-polímero/tirosina	48% eficiência	Alginato, Co-polimerização tirosina
	2,6 Dimetoxifenol Efluente E1 Fluídicos biológicos	Carbano ativado Matriz sólida	pH, t ⁰ , 30% oxidação, 85% imobilização reator, 89% ativo Patente	Covalent-APTES- Glutaraldeído Adsorção
<i>Fomes fomentarius</i>	Siringaldazina, ácido ferulico, ácido sinapílico	Vidro poroso (ativado)	Km, Vmax, pH estável	Covalent-APTES- Glutaraldeído

Continua

Origem	Substrato	Suporte	Comentário	Imobilização
<i>Geotrichum candidum</i>	Fenóis	Solo	13-98% redução	Adsorção
<i>Lentinula edodes</i>	Fenóis, efluente Fenóis, ABTS, efluente	Quitonasa (ativado) Eupergit® C	Redução toxicidade, t ₀ e pH estável, seletividade 45% imobilizado, 60% ativos t ₀ , pH estável, Km, V _{max} , pH estável	Adsorção seguido por Glutaraldeído Oxirano Covalentemente ativado
<i>Neurospora crassa</i>	Fenóis	Sefarose 4B (ativado), concanavalin A-sefarose	pH estável, Km, V _{max}	CNBr Covalentemente ativado
<i>Phlebia radiata</i>	Fenóis aromáticos	Contas de vidro (ativada)	Estabilidade, Km, 98% imobilização, 96% atividade	Covalente-APTES- Glutaraldeído
<i>Pleorotus ostreatus</i>	Fenóis, ABTS, DMP	Eupergit® C	Estabilidade, t ₀ , pH, reator	Oxirano Covalentemente ativado
<i>Pleorotus eryngii</i>	Unidades fenólicas de lignina	Gel de alginato, gel sefarose 6B-aldeído	Cinética	Adsorção covalente
<i>Polypus versicolor</i>	Hidroquinona, ferrocianida, ácido ascórbico Catequina Fenóis (suco maçã) Fenóis (suco maçã) Fenóis (suco maçã) Flavonóides	Gelatina, poliuretano Sefarose 4B-Epi-IDA-Cu ²⁺ Sefarose 4B-Epi-IDA-Cu ²⁺ Sefarose 4B-Epi-IDA-Cu ²⁺ Sefarose 4B-Epi-IDA-Cu ²⁺ epibromidrina, ácido iminodiacético, sais metálicos	Cinética 75% removido 39% removido fenóis 48% removidos Flavonóides Cinética Cinética	Adsorção, confinamento

Continua

Origem	Substratos	Suporte	Comentário	Imobilização
<i>Pyricularia oryzae</i>	Catequinas, Ácido clorogênico, Fenóis	Sílica gel, VA-hydroxy biosynth, sefarose CNBr ativada, Peneira molecular, sílica gel DEAE-celulose, alumina-G, Sefarose 4B, CNBr-sefarose 4B CH-sefarose 4B, CNBr-sefarose 4B, VA-hidroxi, VA-epoxi, sílica gel, florisil, sílica coloidal Mikroperl, Polyclar (pilivinilpolipirrolidona) Membrana polietersulfonada	estabilidade estocagem, 50 a 100% imobilizada, 5 a 63% ativada	Covalente- Glutaraldeído, co-polímero vinil, acetato/di- etileno-urea, CNBr covalente
<i>Rhizoctonia praticola</i>	Fenóis, clorofenóis	Celite®	4-10% clorofenóis, 100% metoxifenol, 3-100% de remoção de fenóis	Aminopropiltrietoxissilano covalente (APTES)/glutaraldeído,
<i>Rhus vernicifera</i>	Urushiol de árvores laquíferas, Fenóis, Catecol, Chá tanino, Propilamina, albumina, alfa-amilase, Proteína ligada, ABTS	Gel poliacrilamida, Ágar ativado, Suporte Agarose p-Benzoquinona ativado (agarose, álcool polivinílico, quitosana) Agarose p-Benzoquinona ativado, Metais transição, óxido hidróxido Sílica/ZrCl ₄ Uroshiol resin/Al ³⁺ Eletrodos de ouro	Propriedades	Adsorção, Poliacrilamida confinamento, p aminobenzeno sulfoniletil (ABSE) covalente, interação eletrostática
<i>Trametes hirsuta</i>	Corante têxtil, efluente	Alumina	Cinética	Adsorção
<i>Trametes</i> sp.	Fenóis, catequinas	Esferas de vidro	Cinética, calorimétrica, FIA	Covalente-APTES- Glutaraldeído
<i>Trametes versicolor</i>	Fenóis	Esferas de vidro	100% imobilizada, 90% atividade, t ⁰ estabilidade, seletiva	Covalente-APTES- Glutaraldeído

Continua

Origem	Substrato	Suporte	Comentário	Imobilização
	Fenóis	Caolinita, esmeolita, montmorilonita	95% imobilizada, 74% remoção de 2,4-DCP, estabilizada	Covalente-APTES- Glutaraldeído
	Fenóis	Sepharose CL-6B	60-70% imobilizada, Km, estabilidade	Adsorção
	Fenóis	Vidro poroso	Comparação livre e imobilizada	Covalente-APTES- Glutaraldeído
	Siringaldazina, ácido ferúlico, ácido sinápico	Vidro poroso (ativado)	Km, Vmax, estabilidade ao pH	Covalente-APTES- Glutaraldeído
	Catecóis	Vidro poroso, Va-epoxi biosynth	Reator	Covalente-APTES- Glutaraldeído
	Fenóis, Lignina	Sepharose CL-6B	Estabilidade	Adsorção
	Fenóis, Catecóis	Agarose (ativado), sílica (ativada)	Reator, pH	Hidroxisucinimida covalente, derivado de Ester cross-linking em gel de agarose (Affi-Gel-10 ou 15)
	2,6 dimetilfenol	Caolita, esferas de vidro	56-73% imobilizada, Km, Vmax	Adsorção polietilenamina
	2,4 DCP	Montimoriolita	Razão gelatina/lacase, seletividade ao pH	Ativação/ Glutaraldeído
	Fenóis, aminas aromáticas	Gel de gelatina	Efluente Kraft E1	Covalente-APTES- Glutaraldeído
	Fenóis	Vitrocerâmicas		Micelas reversas
	Fenóis	Esfera de vidro	Propriedades livres e imobilizadas	Covalente-APTES- Glutaraldeído
	Compostos aromáticos	Gel orgânico	25-32% perda de atividade, concentração gelatina	Covalente-APTES- Glutaraldeído
	Azida, Fenóis	Eletrodo redox de hidrogel	Biosensor	
	Azida, Fenóis	Polímero redox de ósmio	Estabilidade ao pH	Adsorção
	Fenóis	Resina, Vitrocerâmicas	Cinética	Adsorção
	Ácido 4-metil-3-hidroxi antranílico, siringaldazina	Gel de poliacrilamida 80%	40% de atividade	Adsorção

Continua

Conclusão

Origem	Substratos	Suporte	Comentário	Imobilização
	Pesticida fenilurea	PVDF hidrofílico, membrana de microfiltração	Estabilidade, Km, Vmax	
	Catecol	Microeletrodos de fibra de carbono	Biosensor, estabilidade, parâmetros cinéticos	Imobilização covalente
Não específico	Fenóis	Carbono Black	90% de retenção	Adsorção, cross-linking, ligação covalente
	Fenóis	Sepharose CL-6B	Patente	Adsorção
		Polímero ativo	Patente	Covalente não específica
	Antígeno livre	Grafite	Biosensor, imunoespécies	Adsorção

2.4 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE LACASES

Devido às suas propriedades de estabilidade e ao mecanismo básico de reação, a oxidação de compostos fenólicos, lacases têm sido utilizadas para, por exemplo: estabilização de bebidas, devido a remoção de compostos fenólicos e oxigênio das bebidas envazadas; branqueamento de polpa celulósica, pela degradação de lignina residual; tratamento de efluentes industriais pela degradação de compostos xenobióticos; descoloração de corantes têxteis recalcitrantes; deslignificação de substratos lignocelulósicos para produção de biocombustíveis, aumentando a hidrólise de lignocelulósicos, devido à remoção de compostos fenólicos e lignina que inativam celulasas; aumento da digestibilidade de materiais lignocelulósicos para ração animal; biorremediação de solos pela degradação de xenobióticos; formulação de biosensores para detecção de compostos fenólicos, representando uma alternativa de análise rápida, de baixo custo e considerável reprodutibilidade; e recentemente, síntese de fármacos, devido à especificidade para determinados compostos (WESENBERG et al., 2003; COUTO; HERRERA, 2006; KUNAMNENI et al., 2008; WIDSTEN; KANDELBAUER, 2008; KAUSHIK; MALIK, 2009; MIKOLASCH; SCHAUER, 2009).

O potencial de aplicação de lacases pode ser observado através das diversas patentes que vêm sendo depositadas, desde mecanismos de reação, desenvolvimento de mutantes até formulação de produtos biotecnológicos como: detergentes, cosméticos, óleos e fármacos. No *United States Patent Office* (USPTO, 2011) foram encontrados 39 registros de patentes com a palavra “laccase” no título e 1207 com a palavra “laccase” em texto ou figuras. No órgão europeu, *European Patent Office* (EPO, 2011), são encontrados 58 patentes com lacase no título. No órgão brasileiro, Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI, 2011), são encontrados 12 processos com a palavra lacase no título. Na maior parte, as patentes pertencem a grandes corporações: Novozymes S/A, Genencor International Inc, Novo Nordisk A/S, L'Oréal e órgãos governamentais.

O sucesso da aplicação de lacases depende da produção de elevada quantidade da enzima à um custo baixo e ajuste das condições de cultivo dos fungos. Atualmente, a redução de custos está baseada na otimização das condições de cultivo e na expressão de genes de lacase em outros fungos com maior capacidade de expressão de proteínas, como leveduras e procariotos (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007).

A aplicação de lacases na área de biosensores, por exemplo, oferece algumas vantagens, como: fácil preparação, necessidade de baixa quantidade de amostra, seletividade, sensibilidade, reprodutibilidade, custo relativamente baixo, rápido tempo de resposta, elevada

meia-vida, fácil armazenamento. Os métodos analíticos usuais para detecção quantitativa e qualitativa de polifenóis em sucos de fruta, chás, azeite e vinho envolvem técnicas de HPLC e GC-MS, técnicas trabalhosas e de custo consideravelmente alto (GOMES; REBELO, 2003).

Além do uso em biosensores, lacases têm sido utilizadas em fase livre dentro de reatores para descoloração de corantes, branqueamento de polpa, destoxificação de efluentes e biorremediação.

Outra vantagem na utilização de lacase, diferente das peroxidases, é que o H_2O_2 reacional é dispensável. Além disso, enzimas que usam o O_2 como aceptor de elétrons são mais interessantes pela facilidade de introdução do O_2 como aceptor primário e a possibilidade de controle da atividade pela regulação nos níveis de O_2 (HILDÉN et al., 2009), ou ainda a remoção de oxigênio do produto biotecnológico, recomendado para maior preservação das características de vinhos e cervejas (OSMA et al., 2010a).

Os aspectos relevantes na utilização de lacases no tratamento de efluentes são a necessidade de se ter enzimas com alta estabilidade à temperatura, baixa inibição para compostos orgânicos, catálise em reações de alta força iônica; geralmente as enzimas são drasticamente afetadas pela composição dos efluentes industriais. Vários métodos foram propostos para superar tais limitações, sendo a imobilização da enzima um método bem sucedido. Comparando com enzimas livres, enzimas imobilizadas apresentam algumas vantagens: resistência às mudanças ambientais, recuperação da enzima e produto, reuso da enzima, operação contínua do processo enzimático, rápido término de reações e grande variedade na configuração de bioreatores (KATURI et al., 2009).

2.5 DEGRADAÇÃO DE CORANTES REATIVOS E DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTES POR LACASES

Um dos problemas associados à coloração de tecidos é a baixa eficiência de agregação do corante à fibra, contribuindo para o descarte destas espécies nos efluentes, principalmente os corantes ácidos, reativos e dispersos. Somado à geração de resíduos altamente coloridos e com grande carga orgânica, o setor têxtil ainda consome uma grande quantidade de água. Por exemplo, para o processamento de cada quilograma de algodão consome-se em média 200 L de água e cerca de 120 L para a seda (CARNEIRO, 2007).

Durante a etapa de tingimento do tecido, até 30% da concentração inicial dos corantes aplicados permanecem em sua forma hidrolisada, que não possuem afinidade ao tecido e resultando em efluente colorido. Corantes reativos são altamente solúveis em água e recalcitrantes sob as condições aeróbicas típicas encontradas em sistemas de tratamentos biológicos convencionais. Corantes reativos liberados no ambiente são fonte de interesse público pois interferem na qualidade dos ecossistemas aquáticos, gerando desequilíbrio à biota, afetando a taxa fotossintética, devido a coloração, e produzindo também efeitos tóxicos aos organismos. A emissão de efluentes contendo corantes é regulada por agências de controle ambiental (EPOLITO et al., 2005).

Corantes reativos contém um grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxilas das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tiol das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas. Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm a função azo e antraquinona como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos (Figura 11). Neste tipo de corante, a reação química se processa diretamente através da substituição do grupo nucleofílico pelo grupo hidroxila da celulose (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Os corantes reativos são aplicados à fibra através de ligações covalentes entre grupos reativos presentes em suas estruturas e os grupos R-OH ou RNH₂, usualmente presentes nas fibras naturais de celulose e seda. Estas reações são favorecidas em condições alcalinas e temperatura de 80°C, contendo de 25 a 100 g L⁻¹ de NaCl ou Na₂SO₄ e de 2 a 50 g L⁻¹ de Na₂CO₃ (ou a combinação de Na₂CO₃ e NaOH), as quais também proporcionam reações paralelas entre o grupo reativo e os grupos OH⁻, proveniente dos álcalis no banho de tingimento, levando as reações de hidrólise, que inativam o grupo reativo frente à fibra (BERGAMINI et al., 2005). Assim, efluentes contendo corantes reativos exibem pH alcalino entre 11 e 13.

Figura 11. Corantes reativos em suas formas original e hidrolisada (REHOREK; PLUM, 2007).

Corantes reativos do tipo azo representam cerca de 60% dos corantes utilizados pela indústria têxtil atualmente e, outras classes, como antraquinônicos, são utilizados na formulação de outros corantes (EPOLITO et al., 2005).

A eficiente descoloração de corantes por enzimas ligninolíticas depende basicamente do tipo de enzima e da estrutura do corante. Muitos trabalhos foram realizados com descoloração de corantes por lacases, e estão sumarizados na revisão de Wesenberg e colaboradores (2003) (Tabela 7). Vários fatores influenciam no processo de descoloração, como: pH e temperatura de reação, força iônica, presença de mediadores redox, tipo e concentrações de enzima e corante (STOLZ, 2001; CRISTÓVÃO et al., 2008). Champagne e Ramsay (2005) purificaram MnP e lacase de *Trametes versicolor* e observaram que MnP descoloriu azo corantes (amaranth, Reactive Black 5) porém foi incapaz de descolorir o corante Reactive Blue 19; enquanto lacase descoloriu eficientemente o Reactive Blue 19. Alguns trabalhos mostram que lacases e MnP podem atuar sinergicamente na descoloração, aumentando a eficiência da catálise (CHAMPAGNE; RAMSAY, 2005; SUSLA et al., 2008; KATURI et al., 2009).

Tabela 7 – Descoloração de corantes têxteis por enzimas ligninolíticas (adaptado de WESENBERG et al., 2003)

Fungo	Enzima ligninolítica	Corante
<i>Bjerkandera adusta</i>	LiP e MnP	Reactive Orange 96, Reactive Violet 5, Reactive Black 5, Reactive Blue 15, Reactive Blue 38, RBBR, Poly R-478, Reactive Violet 5.
<i>Bjerkandera sp.</i>	MnP	Orange II, Reactive Blue 38, Poly R-478.
<i>Dichomitus squalens</i>	Lac e MnP	Brilliant Green, Cresol Red, Crystal Violet, Congo Red, Orange II
<i>Irpex lacteus</i>	Lac, LiP e MnP	Methyl red, Congo Red, Naphtol Blue, RBBR, Bromophenol blue, Copper (II) phthalocyaninetetrasulfonic acid tetrasodium salt, Poly R-478.
<i>Lentinus tigrinus</i>	Lac e MnP	Orange II, Reactive Blue 38, Poly R-478.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	LiP e MnP	Remazol Turquoise Blue, Azure Blue, Cresol Red, Crystal Violet, Bromophenol blue, Acid Green 27, Copper phtalocyanine tetrasulphonic acid tetrasodium salt, Indigo Carmine, Neutral Red, Acid Red 106, Mordant Yellow 10, Brilliant Yellow, Chrysophenine, Chlorazol Yellow, Cibacron Brilliant Yellow 3 (Reactive Yellow 2), Cibacron Brilliant Red 3 (Reactive Red 4), Orange II, Crystal Violet, Brilliant Green, RBBR, Indigo
	MnP	Amaranth, New Coccine, Orange G, Tartrazine, Reactofix Orange, Reactofix Golden Yellow, Reactofix Blue HE2R, Navilene Black, Sulphur Green, Sulphur Red, Navione Blue, Vat Brown, Red 2B, Congo Red, Reactive Orange 96, Reactive Violet 5, Reactive Black 5, Reactive Blue 15, Reactive Blue 38, Everzol Turquoise Blue G, Everzol Yellow 4GL, Everzol Red RBN, Orange K-GL, Everdirect Supra Yellow PG, Orange II, Reactive Blue 38, Poly R-478.
<i>Phanerochaete sordida</i>	MnP	Orange II, Reactive Blue 38, Poly R-478.
<i>Phlebia tremellosa</i>	Lac, LiP e MnP	Cibacron Red, Remazol Navy Blue, Remazol Red, Cibacron Orange, Remazol Golden Yellow, Remazol Blue, Remazol Turquoise Blue, Remazol Black B, Mixture.
<i>Phlebia radiata</i>	Lac e MnP	Orange II, Reactive Blue 38, Poly R-478, Crystal Violet, Congo Red, Orange II.
<i>Pleurotus eryngii</i>	LiP e MnP	Reactive Violet 5, Reactive Black 5, Reactive Blue 38.
<i>Pleurotus ostreatus</i>	MnP?	RBBR, Poly R-478, Acid Green 27, Copper phtalocyanine tetrasulphonic acid tetrasodium salt, Indigo Carmine, Neutral Red, Mordant Yellow 1, Brilliant Yellow, Chrysophenine, Cibacron Brilliant Yellow 3G-P (Reactive Yellow 2); Cibacron Brilliant Red 3 (Reactive Red 4), Orange II, Crystal Violet, Brilliant Green
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Lac	Amaranth, New Coccine, Orange G, Tartrazine.
	MnP?	Índigo.
<i>Polyporus ciliatus</i>	Lac e MnP	Orange II, Reactive Blue 38, Poly R-478.
<i>Stereum hirsutum</i>	Lac e MnP	Orange II, Reactive Blue 38, Poly R-478.
<i>Trametes versicolor</i>	Lac, LiP e MnP	Everzol Turquoise Blue G, Everzol Yellow 4GL, Everzol Red RBN, Orange K-GL, Everdirect Supra Yellow PG, Acid Green 27, Copper phtalocyanine tetrasulphonic acid tetrasodium salt, Indigo Carmine, Neutral Red, Acid Red 106, Mordant Yellow 10, Brilliant Yellow, Chrysophenine, Chlorazol Yellow, Cibacron Brilliant Yellow 3G-P (Reactive Yellow 2), Cibacron Brilliant Red 3 (Reactive Red 4), Orange II, Crystal Violet, Brilliant, Amaranth, Remazol Black, RBBR, Reactive Blue 15, Tropaeolin, Remazol Orange, Remazol Brilliant Red BB, Reactive Orange 96, Reactive Violet 5, Reactive Black 5, Reactive Blue 15, Reactive Blue 38, Poly R-478.

Alguns corantes são resistentes à oxidação por lacase, devido ao impedimento físico do grupo funcional da molécula do corante ou simplesmente não serve como substrato para a enzima, neste caso, o uso de mediadores pode favorecer a catálise (MURUGESAN et al., 2009). Alternativamente ao uso de mediadores, a enzima CDH tem sido avaliada em sinergismo com lacase para descoloração de corantes (ENAYATZAMIR et al., 2009).

A estrutura dos corantes é determinante na capacidade de descoloração por enzimas ligninolíticas (CASAS et al., 2009). Corantes com grupos mono ou polifenólicos em posições *orto* ou *para* ou com aminas aromáticas em sua estrutura são descoloridos mais fácil e rapidamente do que corantes com estruturas não-substituintes nos grupos (THURSTON, 1994; YAROLOV et al., 1994). Vinte e dois corantes azo foram sintetizados a partir da estrutura de ácido 2,7-dihidroxi-1-fenilazonaftaleno-3,6-dissulfônico e a cinética de descoloração por lacase/mediador foi avaliada por Almansa e col. (2004). Corantes com substituintes hidroxi foram mais susceptíveis à ação do sistema lacase/mediador.

C.I. Reactive Blue 19 ou Azul Brilhante de Remazol R (RBBR, ácido 1-amino-9,10-dihidro-9,10-dioxi-4-[(3-{[2- (sulfoxi) etil] sulfonil} fenil) amino]-2-antracenosulfônico) é um corante antraquinônico utilizado na síntese de corantes poliméricos. Trabalhos demonstram que a descoloração do Reactive Blue 19 está relacionada com a ação de LiP, MnP e lacase (DEVECI et al. 2004; PALMIERI et al., 2005).

As vias e produtos de degradação de corantes antraquinônicos e azóicos foram estudados (MCMULLAN et al., 2001; LOPEZ et al., 2004; NACHIYAR; RAJAKUMAR, 2004; ZHAO; HARDIN, 2007). No entanto, os mecanismos de oxidação são difíceis de estabelecer, devido ao envolvimento de radicais livres nas reações de degradação. A via de degradação do Reactive Blue 19, antraquinônico, por lacase é demonstrada na Figura 12 e a degradação de azo corante fenólico por lacase é demonstrado por Chivukula e Renganathan (1995) na Figura 13.

Produtos de degradação de outros corantes atuaram como mediadores de enzimas ligninolíticas (WONG; YU, 1999). Ácido benzóico e dietilamina foram identificados como produtos de degradação do Brilliant Green 1 por lacase comercial, em reação tamponada com ácido 2,2 dimetil succínico (CASAS et al., 2009). Estes produtos podem atuar como mediadores de lacase, aumentando a taxa de degradação.

Lacases descolorem eficientemente efluentes têxteis reais. No entanto, a atuação de lacase nestes efluentes parece não exercer influência significativa na redução da demanda química de oxigênio (KHOUNI et al., 2011), assim como observado para o tratamento de efluentes têxteis por reações foto-Fenton (KANG et al., 2000).

A perspectiva para utilização de lacases no tratamento de efluentes têxteis está baseada na combinação com outros tratamentos, incluindo tratamentos físicos, fotocatalise, reação de Fenton e outros tratamentos biológicos, como bioissorção (VERMA et al., 2011). O tratamento ideal deve sempre considerar o custo, eficiência, riscos ao meio ambiente e é desejável a reutilização da água no processo industrial têxtil.

Figura 12. Degradação do Reactive Blue 19 por lacase imobilizada de *Trametes pubescens* (OSMA et al., 2010b). Os valores apresentados em cada composto corresponde a razão m/c detectados em CG/MS, pelo método usado pelos autores.

2.6 POLIMERIZAÇÃO E DEGRADAÇÃO DA LIGNINA DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS POR LACASES

A degradação da lignina apresenta grande importância econômica para processos industriais tais como a polpação e branqueamento de fibras celulósicas para obtenção de papel. Mais recentemente, atenção tem sido dada à degradação de lignina em matérias primas usadas para a obtenção de biocombustíveis de segunda geração (HAYKIR, 2009). Em ambos os processos, os polissacarídeos que formam a parede celular vegetal junto com a lignina, ficam disponíveis e podem ser eficientemente utilizados.

O biobranqueamento de polpas celulósicas com lacases está baseado na capacidade dessa enzima em oxidar alguns mediadores que, por sua vez, atuam como agentes oxidantes da lignina residual presente em polpas químicas de baixo número kappa. A redução do número kappa nas polpas e a perda de viscosidade intrínseca está diretamente associada à degradação dos polissacarídeos da polpa. Esta perda de viscosidade não é desejável para a fabricação do papel, uma vez que altera as propriedades mecânicas da polpa branqueada. O balanço de todos estes fatores dita a eficiência do processo de branqueamento.

A lacase sozinha apresenta um baixo potencial de oxidação, podendo apenas oxidar os fragmentos fenólicos da lignina (FABBRINI et al., 2002). O sistema lacase-mediador degrada dímeros de compostos não fenólicos de lignina, com ligações β -O-4 (CHO et al., 2008). Assim, alguns estudos têm utilizado diversas estratégias para possibilitar o uso de mediadores em larga escala. O licor negro obtido durante polpação, com elevado conteúdo de compostos fenólicos livres, é frequentemente usado como combustível na caldeira de recuperação, onde os produtos químicos de cozimento no licor negro são regenerados. Este licor negro contém uma quantidade significativa de compostos aromáticos interessantes, decorrentes principalmente da degradação da lignina, que poderia ter um maior valor agregado se usados como produtos químicos, como lignosulfonados, por exemplo. Alternativamente, este licor pode auxiliar na atividade de lacase, devido à presença de muitos compostos fenólicos, que atuam como mediadores da enzima (ELEGIR et al., 2007). Durante estudos da oxidação de lignina em polpa kraft por lacase, Elegir e col. (2005) observaram que lacase oxidou facilmente grupos fenólicos, no entanto, grupos metilados não-fenólicos não foram oxidados, nem mesmo na presença dos mediadores HBT e ABTS. Porém, a adição de surfactantes (Tween 20 e Tween 80, 1%) à mistura reacional contribuiu para a oxidação das estruturas não fenólicas de lignina com ligações β -O-4. Contudo, a natureza da lignina residual influencia na eficiência do sistema lacase mediador (CHAKAR; RAGAUSKAS, 1999), bem como a

incorporação do tratamento com lacase em determinada etapa do processo de polpação, por exemplo, tratamento com lacase-HBT entre os estágios de dupla oxigenação e quebração, o qual resultou em melhoras nas propriedades de polpa (IBARRA et al., 2006). O estágio de tratamento de polpas Kraft com peróxido de hidrogênio também pode trazer resultados significativos após tratamento prévio com lacase (FILLAT; RONCERO, 2010).

Embora mediadores naturais sejam desejáveis para as aplicações biotecnológicas, como branqueamento de polpa, devido principalmente a toxicidade de mediadores sintéticos (FILLAT; RONCERO, 2010), sua eficiência depende do material lignocelulósico a ser tratado e muitas vezes o uso desses mediadores pode trazer resultados indesejáveis. Radicais fenóxi, que são as formas ativas dos mediadores fenólicos, são conhecidos por serem os agentes de reações oxidativas em lignina (CHANDRA; RAGAUSKAS, 2002). Grupos cromóforos foram formados em polpas após tratamento com lacase e mediadores naturais, aumentando o número kappa e diminuindo o brilho de diversas polpas: polpa de eucalipto (MOLDES et al., 2008), sisal (ARACRI et al., 2009), linho (FILLAT et al., 2010) e *kenaf* (*Hibiscus cannabinus*) (ANDREU; VIDAL, 2011). Cada tipo de mediador natural desempenha um tipo de ligação à lignina (ARACRI et al., 2010). Ainda, os mediadores sintéticos, juntamente com lacases, podem ser mais eficientes do que mediadores naturais para branqueamento de polpas (ARACRI et al., 2009). Contudo, o efeito do sistema lacase-mediador natural dependerá do equilíbrio entre a degradação oxidativa e as reações de acoplamento (ASTOLFI et al., 2005). Por isso, a alvura final, número kappa e as propriedades óticas da fibra de celulose alcançada no tratamento com lacase/mediador dependem da estrutura química do mediador natural especificamente utilizado.

Novas propriedades em polpas celulósicas, após uso de lacase mediador, baseada em ligações de acoplamento na lignina estão sendo exploradas (GARCIA-UBASART et al., 2011). Polpas kraft de madeira mole foram tratadas com aminoácidos e lacase visando aumentar a carga aniônica, através da adição de grupos carboxílicos. O tratamento da polpa com lacase-histidina mostrou aumento na propriedade de força do papel (WITAYAKRAN; RAGAUSKAS, 2009). A funcionalização de polpas celulósicas (via acoplamento de radical) por lacase-mediador natural pode acarretar na melhora de outras propriedades como atividade antimicrobiana, antioxidante e propriedades óticas (ARACRI et al., 2009). A oxidação de polpa de sisal pelo sistema lacase-TEMPO resultou em uma melhora muito importante de resistência à umidade dos papéis, sugerindo a formação de uma quantidade substancial de grupos aldeídos nas cadeias de celulose, favorecendo a ligação interfibras através da formação de ligações hemiacetal (ARACRI et al., 2011). E ainda, o uso de lacases em lignocelulósicos,

para a funcionalização da lignina, tem despertado o interesse na produção de novos produtos, que substituem produtos à base de petróleo, como adesivos para placas e laminados (WIDSTEN; KANDELBAUER, 2008).

Lacases apresentam desempenho satisfatório na destoxificação dos hidrolisados de materiais lignocelulósicos que contém muitos compostos inibidores do processo fermentativo. Lacase de *Trametes versicolor* foi estudada para destoxificação de um hidrolisado lignocelulósico de madeira de salgueiro, pré-tratado com vapor e SO₂ e, posteriormente, *Saccharomyces cerevisiae* foi empregado para a fermentação etanólica dos hidrolisados. Os resultados deste estudo mostraram remoção de compostos fenólicos monoaromáticos por lacase, consumo mais rápido da glicose por *S. cerevisiae* e um aumento da produtividade do etanol nas amostras tratadas com lacase (JONSSON et al., 1998). O tratamento de hidrolisados de palha de trigo com lacase também favoreceu a fermentação destes hidrolisados, devido à remoção de compostos fenólicos, inibidores do processo fermentativo (JURADO et al. 2009).

A possibilidade de utilização de lacase para a deslignificação de lignocelulósicos visando obtenção de biocombustíveis é promissora. Palonen e col. (2004) observaram que a hidrólise de madeira mole pré-tatada por vapor, para a obtenção de etanol celulósico, aumentou sua eficiência quando utilizados preparados de enzimas hidrolíticas contendo celulasas e xilanases (Celucast) juntamente com lacase. O tratamento sequencial, lacase – Celucast resultou em um aumento de 21% de conversão de celulose.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi selecionar linhagens de basidiomiceto, com expressão de sistema ligninolítico de elevada capacidade oxidativa em ambientes alcalinos e halofílicos, para aplicação na descoloração de corantes reativos, efluentes têxteis e oxidação de substratos lignocelulósicos.

Os objetivos específicos foram:

- Selecionar, a partir de doze linhagens de basidiomicetos nativos, uma linhagem com elevada capacidade de descoloração de um efluente têxtil simulado, contendo corantes reativos, elevada concentração de sal, pH alcalino e umectante comercial;
- Estabelecer condição de cultivo do fungo que resulte em maior produção de enzimas ligninolíticas, em frasco frascos e biorreator, utilizando meio complexo, contendo substratos lignocelulósicos, e meios sintéticos;
- Recuperar e purificar as enzimas ligninolíticas produzidas pela linhagem selecionada;
- Determinar as propriedades das enzimas purificadas;
- Avaliar mecanismos reacionais da enzima utilizando corantes reativos como substratos;
- Avaliar a descoloração de efluentes têxteis por enzima ligninolítica;
- Avaliar o uso de lacase na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, adicionando-a à mistura reacional contendo celulase comercial, de forma simultânea e sequencial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS E MANUTENÇÃO

Foram utilizadas as linhagens *Hygrocybe* sp. CCIBT2679, *Lentinus bertieri* CCIBT2592, *Lentinus villosus* CCIBT2608, *Peniophora cinerea* CCIBT2541, *Pleurotus flabellatus* CCIBT2733, *Pleurotus ostreatus* CCIBT2347, *Psilocybe castanella* CCIBT2781, *Pycnoporus sanguineus* CCIBT2610, *Rigidoporus microoporus* CCIBT2671, *Trametes villosa* CCIBT2502, *Trametes villosa* CCIBT2513 e *Trametes villosa* CCIBT2628, depositados na Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica, São Paulo (CCIBT). Estas linhagens foram previamente selecionadas, a partir de cento e vinte e cinco basidiomycetos com capacidade de descoloração do corante Reactive Blue 19 (OKINO et al., 2001; MACHADO et al., 2005). As culturas foram mantidas em placas com batata dextrose ágar (BDA) (2%) por repiques sucessivos, à 25°C.

4.2 ENZIMAS

Lacases de *Trametes versicolor* foram obtidas como descrito por Tavares e col. (2006) ou adquirida da Sigma. Lacase de *Aspergillus* modificado geneticamente foi obtida da Novozymes. Uma lacase comercial de procedência não identificada foi fornecida por uma indústria de papel. Manganês peroxidase foi obtida de *Ceriporiopsis subvermispora* (MASARIN, 2010). Celulases (Cellubrix - ALF Latino-America) e Beta-glicosidase (Novozym 188, Sigma) foram usadas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

4.3 CORANTES

Foram usados os corantes reativos Reactive Blue 13 (Cibacron Brilliant Blue H-GR, antraquinônico, $\lambda_{\max}$ 625 nm), Reactive Red 271 (Cibacron Red FN-2BL, azóico, $\lambda_{\max}$ 525 nm), fornecidos por Ciba Geise, com estrutura não revelada, e o corante Reactive Blue 19 (Remazol Brilliant Blue R, antraquinônico, $\lambda_{\max}$ 592 nm), obtido da Sigma, utilizado como referência (Tabela 8). Os corantes Reactive Blue 13 e Reactive Red 271 foram diluídos em água destilada esterilizada, na concentração de 1 g L⁻¹, e hidrolisados à 80°C, por 4h, com NaOH 2M mantendo pH em 8,1, 9,1 ou 12, conforme especificado no texto.

Tabela 8 – Características dos corantes utilizados no presente estudo

Nome usual	Nome IUPAC	nome Color Index (CI)	Nº CI	nº CAS	Fórmula	Grupo cromóforo	Grupo reativo	PM (g/mol)	ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{max} (nm)	Referências
RBBR	ácido 1-amino-9,10-dihidro-9,10-dioxo-4-[(3-{[2-(sulfoxi)etil]sulfonil}fenil)amino]-2-antracenosulfônico (sal disódio)	Reactive Blue 19	ne	ne	ne	antraquinônico	vinilsulfônico	626,60	16.000	592	Sugano e col. (2006)
Cibacron Azul Brilhante H-GR	ácido 1-amino-4-[[3-[[4-cloro-6-(3-sulfofenil)amino]-1,3,5-triazina-2-il]amino]-4-sulfofenil]amino]-9,10-dioxoantraceno-2-sulfônico	Reactive Blue 13	61205:1	16823-51-1	C ₂₉ H ₂₀ ClN ₇ O ₁₁ S ₃	antraquinônico	monoclorotriazina	774,16	8.000	625	Keharia e col. (2004), Verma e Madamwar (2003), Sugano e col. (2006)
Cibacron Vermelho FN-2BL	ne	Reactive Red 271	ne	ne	ne	Azóico	monoclorotriazina	ne	ne	525	Almansa e col. (2004)

ne = não encontrado

4.4 EFLUENTES TÊXTEIS: SIMULADO E REAL

Primeiramente, um efluente têxtil simulado foi preparado e utilizado para realizar a seleção de fungos ligninolíticos com capacidade de descoloração deste efluente. A solução estoque do efluente continha (em água destilada esterilizada): 1 g L⁻¹ de Reactive Blue 13, 1 g L⁻¹ Reactive Red 271, 100 g L⁻¹ de NaCl, 50 mg L⁻¹ de umectante comercial (Goldwet NE, fornecido por Ciba Geise). O pH foi mantido à 8,1 ou 9,1, durante a hidrólise dos corantes com NaOH 2,0 M à 80°C, por 4 horas. O λ_{max} do efluente foi 625 nm.

O segundo efluente sintético foi preparado apenas com o corante Reactive Red 271 (azóico) hidrolisado com NaOH 2 M (pH 12, 80°C, por 4 horas). A descoloração deste efluente foi avaliada pela linhagem fúngica selecionada previamente, tanto pelo extrato enzimático, quanto pela cultura fúngica.

Um efluente têxtil real, fornecido por uma indústria têxtil do estado de São Paulo, foi utilizado para descoloração por lacases da linhagem fúngica selecionada. O efluente apresenta composição variada, dependendo do processo de tingimento têxtil. Em sua composição final o efluente possui corantes reativos, sais, agentes auxiliares de tingimento, como surfactantes e outros detergentes.

4.5 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana de açúcar foi fornecido pela Companhia Vale do Rosário, de Orlândia, SP. Para utilização do bagaço no meio de cultivo, o bagaço foi moído e peneirado a 20 mesh.

4.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para a seleção dos fungos ligninolíticos, todas as linhagens de basidiomicetos foram cultivadas em frascos de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido sintético, aqui denominado “meio Kirk” (YAMANAKA et al., 2008, modificado a partir de KIRK et al., 1978).

A partir da modificação do meio Kirk, um meio complexo foi elaborado, avaliando diferentes fontes nutricionais complexas, como: extrato de levedura e substratos lignocelulósicos, para melhoramento das condições de cultivo da linhagem fúngica selecionada (meio complexo).

Para efeito comparativo, o meio MDT, meio definido para *Trametes versicolor* (ROY; ARCHIBALD, 1993), foi avaliado para cultivo da linhagem fúngica selecionada.

Todos os meios de cultura, soluções e materiais foram esterilizados a 121°C durante 20 minutos. A glicose e a sacarose foram autoclavadas separadamente para evitar a parcial degradação (CRUEGER; CRUEGER, 1990). Para o inóculo foram usados três discos (Ø 7mm) do crescimento fúngico em meio sólido em placas de Petri (7-10 dias, 25°C). A incubação foi de forma estacionária ou com agitação (120 rpm), à 28°C, por até 30 dias, com micélio imobilizado ou livre, dependendo do experimento.

Em determinados intervalos de tempo, o conteúdo dos frascos de cultivo foi filtrado e o extrato livre de micélio (extrato enzimático) utilizado para as determinações analíticas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.6.1 Meio Kirk (meio sintético)

A composição do meio Kirk modificado está descrita na Tabela 9.

Tabela 9. Composição do meio Kirk modificado

Nutriente	Concentração
Glicose	5 g/l
Tartarato de amônio	0,45 ou 4,5 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,05 g/l
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,013 g/l
MnSO ₄ H ₂ O	0,016 g/l
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,2 mM

4.6.2 Meio complexo

O meio complexo foi elaborado a partir do meio Kirk, alterando a fonte de carbono e a fonte de nitrogênio. A composição do meio está descrita na Tabela 10. A milhocina, resíduo no processamento do milho, foi utilizada como fonte nutricional no meio. A composição da milhocina é apresentada na Tabela 11.

Para induzir a produção de lacase por cobre, o meio foi inicialmente preparado sem sulfato de cobre. Após 4 dias de crescimento, 1 mM de CuSO₄ 5H₂O foi adicionado ao cultivo da linhagem selecionada.

Nos cultivos alcalinos, o pH do meio foi ajustado com NaOH 2 M, após esterilização, obtendo-se valor de 8,4. Reactive Red 271 hidrolisado (100 mg l⁻¹) foi adicionado após dez dias de cultivo de *P. cinerea*.

Tabela 10 – Composição do meio complexo

Nutriente	Concentração
Fonte de carbono (somente uma das quatro)	
<i>Glicose</i>	5 g/l
<i>Sacarose</i>	5 g/l
<i>Bagaço de cana de açúcar moído</i>	1 % (m/v)
<i>Resíduo de eucalipto moído</i>	1 % (m/v)
Fonte de nitrogênio (somente uma das duas)	
<i>Extrato de levedura</i>	0,05, 0,1, 2,0 ou 5,0 g/l
<i>Milhocina</i>	0,5 % (m/v)
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,05 g/l
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,013 g/l
MnSO ₄ H ₂ O	0,016 g/l
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,2 ou 1 mM

Tabela 11. Composição da milhocina

Substância	Porcentagem
Milhocina em base seca	50,7
pH	3,9
Proteína	40,8 (base seca)
Ácido láctico	16,0 (base seca)
Açúcares redutores	12,8 (base seca)
Compostos variados	30,4 (base seca)

4.6.3 Meio MDT (meio definido para *Trametes*)

O meio definido para *Trametes*, MDT, foi preparado conforme Roy e Archibald (1993), com modificações feitas por Tavares e col. (2006). A composição do meio MDT é apresentada na Tabela 12, incluindo na composição 1,0 mL/L da solução de elementos traços. Tween 80 (0,5% m/v) foi adicionado visando estimular a produção de lacase.

Tabela 12 – Composição do meio MDT

Composição do meio MDT		Composição da solução de microelementos do meio MDT	
Nutriente	Concentração	Nutriente	Concentração
Glicose	9 g/L	FeSO ₄ .7H ₂ O	20 µM
Glutamina	5 mM	CuSO ₄ .5H ₂ O	2 µM
NaCl	5mM	ZnCl ₂	5 µM
KH ₂ PO ₄	5 mM	CoCl ₂ .6H ₂ O	6 µM
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 mM	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,1 µM
CaCl ₂	0,1 mM	MnSO ₄ .H ₂ O	20 µM
2,2-dimetil succinato	10 mM	(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,5 µM
Tween 80	0,5 % (m/v)		
xilidina	30 µM		

4.6.4 Imobilização do micélio

Três discos do crescimento da linhagem selecionada em placa ($\varnothing = 7\text{mm}$) foram inoculados em 50 mL de meio MDT em Erlenmeyer de 250 mL, contendo suporte para imobilização. O suporte consistiu de cubos ($0,2\text{ cm}^2$) de esponjas de poliuretano, adicionadas ao sistema de cultivo na proporção de 1 g/100 ml de meio.

Análises de micrografia eletrônica de varredura foram realizadas para verificar o tipo de adesão pelo fungo ao suporte.

4.6.5 Cultivo em Bioreator de tanque agitado

4.6.5.1 Produção de inóculo

Para a preparação do inóculo, 15 discos do crescimento de *P. cinerea* ($\varnothing 7\text{mm}$) foram inoculados em meio para produção de inóculo (Tabela 13), em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 125 mL de meio MDT. A incubação foi à 28°C, sob agitação rotatória a 180 rpm, por 3 dias, para formação da massa micelial peletizada que serviu de inóculo (Figura 14).

A biomassa produzida foi determinada por medida direta da massa seca (item 4.7.1) e este dado foi usado para estimar o volume de micélio necessário para inocular o reator de forma que a concentração fosse 70 mg/L de micélio (TAVARES et al., 2006).

Tabela 13 – Meio para produção de inóculo.

Nutriente	Concentração (g/L)
Glicose	10
Extrato de Malte	10
Peptona	2
Extrato de levedura	2
Asparagina	1
KH ₂ PO ₄	2
Tiamina	0,001
MgSO ₄	1

Figura 14. Foto ilustrativa do crescimento de *P. cinerea* em forma de *pellets*.

4.6.5.2 Operação do reator e amostragem

Foi utilizado um biorreator com capacidade de 2 L (Autoclavable Benchtop Fermenter Type R'ALF, Bioengineering AG, Switzerland), equipado com controle de temperatura, agitação mecânica por pás e controle de pH, operado em modo descontínuo por 9 dias (Figura 15). A aeração foi feita através de uma alimentação contínua de ar comprimido (3 L/h), filtrado em filtro estéril com porosidade de 0,2 µm. O cultivo foi monitorado com eletrodo de pH, que foi mantido em 5,0 por adição automática com soluções de NaOH 1M ou H₃PO₄ 1M. A temperatura foi mantida a 28°C através de uma resistência de aquecimento.

O meio utilizado para cultivo em reator foi o meio MDT (item 4.6.3). Inoculou-se o reator com biomassa crescida durante três dias em meio para produção de inóculo (70 mg/L de biomassa). Anti-espumante foi adicionado ao meio (200 µL, Antifoam Y-30 Emulsion, Sigma A6457). Os experimentos foram conduzidos durante 9 dias e o volume de trabalho foi de 1,0 L. Retiraram-se cerca de 5 mL de amostra com seringas estéreis em cada dia e as amostras foram filtradas sob vácuo em papel de fibra de vidro e centrifugadas (10.000 rpm durante 10 minutos). Determinaram-se a atividade da lacase e o consumo de glicose.

Figura 15. Reator de tanque agitado utilizado para produção de lacase por *P. cinerea*.

Laboratório de Fermentações, Departamento de Engenharia Biológica, Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia/Centro de Engenharia Biológica (IBB/CEB), Universidade do Minho, Portugal.

4.7 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.7.1 Biomassa fúngica

Calculou-se a concentração da biomassa por secagem da massa micelial. No fim de cada experiência filtrou-se o meio de cultura em filtros de papel de filtro sob vácuo. A biomassa retida no filtro foi seca em estufa a 80°C durante 24 h. Ao fim desse período, os filtros foram armazenados em um dessecador durante 2 a 3 horas e só depois pesados. A massa seca final foi determinada pela diferença entre a massa do papel de filtro com a biomassa.

4.7.2 pH

Fez-se a determinação do pH do meio de cultura através de um medidor de pH (Quimis), previamente calibrado com soluções padrão para cada pH (pH = 4 e pH = 7).

4.7.3 Glicose

Amostras obtidas do cultivo em reator foram passadas através de cartuchos do tipo SEP-PACK C18 para a retenção de compostos fenólicos e analisados quanto aos teores de glicose por cromatografia líquida. A análise cromatográfica foi feita, em um cromatógrafo

líquido de alta eficiência, utilizando-se uma coluna BIORAD AMINEX HPX – 87H, com H_2SO_4 5 mM a 0,6 ml/min como eluente e detecção por índice de refração (Shimadzu, modelo C- R7A). A concentração de glicose foi determinada através da calibração preparada com padrões, de grau analítico.

4.7.4 Atividades enzimáticas

4.7.4.1 Atividade de lacase

A atividade de lacase foi medida através da oxidação de ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico) (BOURBONNAIS et al., 1997). As reações foram realizadas diretamente em cubetas de 1 mL contendo 0,3 mL de tampão fosfato 200 mM/citrato 100 mM de sódio a pH 4,0; 0,1 mL de água; 0,5 mL de extrato enzimático e 0,1 mL de ABTS 1,0 mM. As reações foram monitoradas a 420 nm em intervalos de 10 s até completarem 5 min (ϵ do ABTS oxidado $36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.7.4.2 Atividade de manganês peroxidase

A atividade de MnP foi medida através da oxidação de vermelho de fenol. As reações foram realizadas em tubos de ensaio de 30 mL contendo 3,0 mL de tampão succinato de sódio 50 mM, pH 4,5; 3,0 mL de lactato de sódio 50 mM; 1,0 mL de MnSO_4 1,0 mM; 1,0 mL de vermelho de fenol 1 g L^{-1} ; 0,5 mL de albumina bovina 10 g L^{-1} ; 1,0 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de H_2O_2 2,0 mM. Em intervalos de 1 min foram retirados 2 mL desta mistura reacional para reação com 60 μL de NaOH 6,5 M. A absorbância foi medida a 610 nm em um espectrofotômetro Hitachi U-2001 (ϵ do vermelho de fenol oxidado = $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (KHINDARIA et al., 1994).

4.7.4.3 Atividade de lignina peroxidase e aril álcool oxidase

Atividade de lignina peroxidase (LiP) e aril álcool oxidase (AAO) foram determinadas pela oxidação de álcool veratrílico (1 mM) na presença e ausência de H_2O_2 2 mM na mistura reacional, respectivamente ($\epsilon_{310 \text{ nm}} = 9.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (TIEN; KIRK, 1984). A reação foi iniciada com H_2O_2 e a variação de absorbância acompanhada por até 10 min. Uma unidade enzimática foi definida pela formação de $1 \mu\text{mol}$ de produto por min (U.L $^{-1}$).

4.7.4.4 Atividade de celobiose desidrogenase (CDH)

A atividade de CDH foi determinada pelo método descrito por Baminger e col. (1999). A reação foi conduzida em cubetas de 3 mL contendo 1 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4), 400 μ L de extrato enzimático, 200 μ L de NaF 40 mM, 200 μ L de lactose 300 mM e 200 μ L de 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) 3 mM. Para o branco, DCPIP foi substituído por água destilada. A redução de DCPIP foi monitorada por 5 min em 520 nm (ϵ do DCPIP oxidado = 6800 M⁻¹ cm⁻¹).

4.7.4.5 Atividade de celulases totais

A atividade de celulases totais foi determinada segundo a metodologia descrita por Ghose (1987). A reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio de 30 mL contendo 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8, uma tira de papel de filtro 1 x 5 cm (aproximadamente 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático (Celluclast 1,5L Novo-Nordisk) nas diluições de 1/100, 1/200, 1/300 e 1/400. Os tubos de ensaios foram aquecidos em banho a 45°C por 60 minutos. Após esse tempo, adicionaram-se 3,0 mL de DNS e a mistura foi fervida por 5 minutos (MILLER, 1959). Foram adicionados então 20 mL de água destilada em cada tubo e agitou-se a mistura para que ficasse homogênea. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Foram feitos controles para cada amostra, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos em massa de glicose através da curva de calibração e usados para construir um gráfico relacionando as diluições da enzima com a quantidade de glicose liberada. A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 2,0 mg de glicose. O valor de 0,37 foi dividido por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de celulases totais do extrato FPU/mL, de acordo com a equação (1).

A curva de calibração usada no cálculo da atividade de FPU foi preparada uma solução de glicose de 10 mg/mL. Alíquotas de 1,0 mL dessa solução foram adicionadas em 4 tubos e a em cada um desses tubos foram adicionadas diferentes volumes (4,0; 2,0; 1,0 e 0,1 mL) de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. A curva de calibração de glicose foi construída através da relação entre massa de glicose em 0,5 ml (1,0; 1,6; 2,5 e 3,4 mg) e a absorbância em 540 nm, utilizando 0,5 mL de cada solução, 1,0 mL de tampão e 3,0 mL de DNS.

$$\text{FPU/mL} = \frac{0,37}{\text{concentração enzimática que libera 2 mg de glicose}} \quad (1)$$

4.7.4.6 Atividade de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada segundo Tan, Mayers e Saddler (1987), através da liberação de p-nitrofenol durante a hidrólise do reagente comercial p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG).

Uma alíquota de 0,8 mL de pNPG 0,1% foi adicionada a 0,2 mL do extrato enzimático devidamente diluído e a mistura foi incubada a 50°C por 30 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de bicarbonato de sódio 10% e a absorbância foi medida a 410 nm. O branco foi preparado da mesma forma, adicionando-se, no entanto, o bicarbonato antes do extrato enzimático.

Uma unidade de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de p-nitrofenol por minuto, a 45°C.

4.7.4.7 Atividade de oxidação do Mn^{2+}

A atividade de oxidação do íon Mn^{2+} foi determinada por incubação de solução de MnSO_4 1 mM e oxalato de sódio 100 mM com 1 U/mL de lacase em tampão acetato de sódio pH 4,5 e monitorada a Abs durante a cinética, por até 90 min. A concentração do complexo Mn^{3+} -oxalato formado pela oxidação de lacase purificada foi determinada a 270 nm ($\epsilon_{270} = 5,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (KUAN et al., 1993).

4.7.4.8 Atividade redutora de Fe^{3+}

A capacidade dos extratos enzimáticos em reduzir Fe^{3+} à Fe^{2+} foi avaliada pelo ensaio com ferrozina. Um volume de 330 μL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,5, 375 μL de extrato enzimático e 25 μL de FeCl_3 foi incubado por 30 minutos e em seguida 70 μL de NaF (1%) e 200 μL de ferrozina foram adicionados e determinada absorbância em 562 nm ($\epsilon = 27.900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O controle foi preparado com H_2O no lugar da amostra (ARANTES; MILAGRES, 2007).

4.7.4.9 Atividade de descoloração dos corantes reativos por enzimas

A mistura de reação continha (em 1 mL): 500 μL de amostra contendo enzimas; 300 μL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0; 100 μL de água ultrapura; e 100 μL de solução de cada corante (com concentração final na reação: 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Reactive Blue 19; 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Reactive Blue 13; 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Reactive Red 271).

As reações foram monitoradas, nos comprimentos de onda de máxima absorbância de cada corante, em intervalos de 10 s até completarem 10 min. As atividades de descoloração foram expressas em $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{l}^{-1}$ (UL^{-1}), considerando $\varepsilon = 16.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para Reactive Blue 19 e $\varepsilon = 8.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para Reactive Blue 13.

4.7.4.10 Cálculo de atividade

Todas atividades, realizadas por espectrofotometria, foram baseadas na Lei de Lambert-Beer:

$$V1 = \varepsilon \cdot l \cdot V2 \quad (2)$$

Onde:

$V1$ – velocidade de reação [Abs/min];

ε – absorvidade molar [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$];

l – caminho ótico [cm];

$V2$ – velocidade de reação [M min^{-1}];

Para o cálculo da atividade utiliza-se a equação abaixo, com resultados expressos em $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{l}$ de substrato consumido ou produto formado:

$$\text{Atividade (U/ml)} = \frac{\Delta\text{ABS} \times \text{volume de reação (ml)}}{\varepsilon (\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times \text{volume de enzima na reação (ml)}} \quad (3)$$

4.7.5 Determinação de proteína total pelo método de Bradford

Este método baseia-se na reação das proteínas com o corante Coomassie Blue R-250 resultando a coloração azul intensa (BRADFORD, 1976) que pode ser quantificada espectrofotometricamente a 595 nm. Este método é sensível a concentrações de proteína na

faixa de 2 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. 100 μL de amostra foram incubados com 1 mL de reagente de Bradford por 5 min e feita leitura a 595 nm. A curva de calibração foi feita com soroalbumina bovina (BSA). Alternativamente as proteínas foram determinadas por absorvância de 280 nm, utilizando curva de calibração feita com BSA (ZAIA et al., 2008).

4.7.6 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As eletroforeses sob condições desnaturantes foram realizadas em gel de poliacrilamida de duas fases com diferentes porosidades e valores de pH, na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio). As corridas foram realizadas em duas etapas. Na etapa de concentração, o gel foi submetido a 100 V e 30 mA. Já na etapa de separação, aplicou-se ao gel 150 V e 50 mA. O aparelho utilizado foi um Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150 (Pharmacia Fine Chemicals). Os géis foram montado em placas de vidro (10 x 10 cm) com 1 mm de espessura. Para o preenchimento da cuba foi utilizado tampão Tris/glicina pH 8,9, com SDS, antes do início da corrida (ALFENAS et al., 1991).

4.7.6.1 Preparo dos géis

Géis de poliacrilamida foram produzidos por copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida (Bis) na presença de persulfato de amônio e tetrametiletilenodiamina (TEMED). Os componentes acrílicos foram preparados segundo Laemmli (1970), em duas fases, que consiste em géis concentrador e separador, preparados conforme as Tabelas 14 e 15.

Tabela 14 – Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador.

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

Tabela 15 – Reagentes utilizados na preparação do gel separador.

Soluções	Concentração 10%
<i>Acrilamida: Bis-acrilamida</i> (36,5:1)	2,5 mL
<i>Tris-HCl 0,6173 M pH 6,8</i>	0,75 mL
<i>Água deionizada</i>	4,2 mL
<i>SDS 10 % (p/v)</i>	50 µL
<i>Persulfato de amônio 10 %</i> (p/v)	125 µL
<i>TEMED</i>	20 µL

4.7.6.2 Preparo das amostras

Amostras obtidas de extratos brutos, das diferentes condições de cultivo de *P. cinerea*, foram concentradas cem vezes por liofilização.

As amostras para as corridas eletroforéticas foram preparadas em tubos eppendorf de 0,5 mL, colocando 20 µL de amostra e 10 µL de tampão da amostra. Os tubos foram colocados em banho-maria a 100 °C por 5 minutos. Após o resfriamento, as amostras foram cuidadosamente injetadas em canaletas formadas no gel concentrador.

4.7.6.3 Preparo do tampão da amostra

O tampão da amostra foi preparado de acordo com a Tabela 16. Os marcadores (Tabela 17) foram dissolvidos em 100 µL de tampão da amostra, fervidos por 15 min e armazenados no congelador. Em cada gel foram aplicados, em uma canaleta, 7 µL da solução padrão.

Tabela 16 – Reagentes utilizados na preparação do tampão da amostra.

Reagentes	Quantidades
Tris-HCl 1 M pH 6,8	2,0 mL
SDS 10% (m/v)	4,0 mL
β-Mercaptoetanol	2,0 mL
Glicerol	5,0 mL
Azul de Bromofenol	10 mg

Tabela 17 – Marcadores de baixa e alta massa molar.

Marcadores de baixa massa molar (kDa)		Marcadores de alta massa molar (kDa)	
Fosforilase	97 kDa	Miosina	212 kDa
Albumina	66,0 kDa	α_2 -macroglobulina	170 kDa
Ovoalbumina	45,0 kDa	β -galactosidase	116 kDa
Anidrase Carbônica	30,0 kDa	Transferina	76 kDa
Inibidor de tripsina	20,1 kDa	glutâmico desidrogenase	53 kDa
α -lactoalbumina	14,4 kDa		

4.7.6.4 Coloração com Nitrato de Prata

Após a corrida eletroforética as bandas protéicas presentes no gel foram reveladas por impregnação com nitrato de prata. O gel foi incubado por 30 min em solução contendo 20 mL de etanol, 5 mL de ácido acético e água destilada para completar 50 mL de solução.

Em seguida, o gel foi novamente incubado por mais 30 minutos, numa solução contendo 15 mL de etanol, 0,25 mL de glutardialdeído (25%), 2 mL de tiosulfato de sódio (5%), 3,4 g de acetato de sódio e água destilada em quantidade suficiente para 50 mL de solução. O gel foi então lavado com água destilada (3x), durante 5 min para cada lavagem.

Após as lavagens, o gel foi mantido por 20 minutos, ao abrigo da luz, numa solução contendo 5 mL de nitrato de prata (2,5%), 0,02 mL de formaldeído (37%) e água destilada até o volume de 50 mL. O gel foi novamente lavado com água destilada por 2 vezes e em seguida levado a uma solução reveladora contendo 1,25 g de carbonato de sódio, 0,02 mL de formaldeído (37%) e água destilada em quantidade suficiente para 50 mL de solução, no qual permaneceu até o aparecimento das bandas de proteínas. A reação foi interrompida pela adição de uma solução contendo 3,65 g de EDTA em 250 mL de água destilada. Todas as soluções foram preparadas no momento do uso.

4.7.7 Eletroforeses nativas (PAGE)

As eletroforeses nativas foram realizadas em gel de poliacrilamida de duas fases com diferentes porosidades e valores de pH (ALFENAS et al., 1991), conforme descrito anteriormente, porém, na ausência de SDS.

Os géis de poliacrilamida utilizados para a determinação da atividade de lacase foram preparados por copolimerização de acrilamida e Bis-acrilamida na presença de persulfato de amônio e tetrametiletenodiamina (TEMED), de acordo com a Tabela 18.

Tabela 18 – Reagentes utilizados na preparação do gel separador para eletroforese em condição não desnaturante.

Soluções	Concentração 10%
Acrilamida: Bis-acrilamida (36,5:1)	2,5 mL
Tris-HCl 0,6173 M pH 6,8	0,75 mL
Água deionizada	4,2 mL
Persulfato de amônio 10% (m/v)	0,125 mL
TEMED	20 µL

Para o preenchimento da cuba foi utilizado tampão Tris/glicina pH 8,9, na ausência de SDS. As amostras foram aplicadas diretamente no gel, sem a preparação de um tampão de amostra como na eletroforese desnaturante.

Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0, por 10 min, 25°C, para que houvesse a troca de pH do gel. O tampão foi removido e o gel foi colocado em uma solução de ABTS 1 mM até a revelação das bandas (LARRONDO et al., 2003; ERKURT et al., 2007; MURUGESAN et al., 2007; TOSVALET et al., 2007).

4.7.8 Focalização isoeétrica (IEF)

Para IEF foi utilizado equipamento *PhastSystem*, para eletroforese de alta resolução, constituído de uma unidade de separação e controle e uma unidade de coloração. Os géis (5% T/ 3% C; 43 × 50 × 0,45 mm), compostos por anfólitos, possuem uma faixa de separação de *pI* entre 3 e 9. Primeiramente, uma etapa de pré-focalização é usualmente corrida antes da aplicação da amostra. Este tempo de pré-focalização é geralmente programado no método como o total de horas percorridas antes que as amostras sejam colocadas em contato com o gel. As amostras foram então aplicadas com auxílio de suporte e iniciada a corrida eletroforética. Ao fim da corrida o gel foi retirado e diretamente incubado em solução de ABTS 1 mM, numa placa de Petri, até que as bandas fossem observadas. Imediatamente o perfil eletroforético foi registrado com fotos ou scaneados.

4.8 CONCENTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

4.8.1 Obtenção e concentração do extrato enzimático

O sobrenadante do cultivo fúngico, obtido de meio complexo, foi filtrado em membrana de 0,45 μm antes das etapas de purificação. Alternativamente, o extrato foi concentrado por precipitação com sulfato de amônio (80% de saturação): agitação branda, *overnight* à 4°C. Em seguida o extrato foi centrifugado (8000 rpm, por 20 min) e o precipitado foi coletado, ressuspensão em tampão acetato de sódio 10 mM pH 4,5, e dialisado contra água deionizada a 4°C por 20 h.

4.8.2 Cromatografia de troca iônica: DEAE-Sepharose CL-6B

Inicialmente foram aplicados 100 mL de extrato enzimático, não concentrado, à uma coluna de troca aniônica (1,5 $\times$ 12 cm), com 5 mL do gel DEAE-Sepharose CL-6B (Figura 16), à um fluxo de 0,1 mL min⁻¹, previamente equilibrada com tampão fosfato 10 mM, pH 8,0. Após aplicação do extrato enzimático, a coluna foi lavada com 10 mL de tampão fosfato 10 mM, pH 8, em seguida, as proteínas foram eluídas com 25 mL de tampão fosfato 10 mM e 0,1 M de NaCl. Frações de 5 mL foram coletadas. Alternativamente, para separação das isoenzimas, o extrato concentrado por precipitação em sulfato de amônio foi aplicado à coluna DEAE-Sepharose, previamente equilibrada como descrito acima e as enzimas adsorvidas foram eluídas com concentrações crescentes de NaCl (5 mL 0,01 M; 5 mL 0,025 M; 5 mL 0,05 M; 5 mL 0,075 M; 25 mL 0,1 M). As frações coletadas (5 mL cada) foram analisadas para a atividade de lacase e proteínas totais. As proteínas foram analisadas quanto à distribuição dos padrões protéicos por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) sob condições desnaturantes e não desnaturantes e por focalização isoeletrica (IEF) durante as etapas de purificação.

Figura 16. Coluna cromatográfica contendo resina de troca aniônica DEAE-Sepharose CL-6B (5 mL) após adsorção de lacases obtidas de extrato de *P. cinerea*.

4.8.3 Cromatografia de troca iônica: Mono Q

Lacases purificadas em DEAE-Sepharose foram aplicadas em uma coluna de troca aniônica Mono-Q (6,4 x 30 mm; GE Healthcare). As lacase foram eluídas com gradiente linear de 0 a 0,2 M de NaCl em tampão acetato de sódio, 10 mM (pH 4,7 ou 5,8), à um fluxo de 0,5 mL min⁻¹. A absorbância foi monitorada em 280 nm. Todos os passos cromatográficos utilizaram um sistema FPLC (AKTA). As frações coletadas, com atividade de lacase, foram analisadas em SDS-Page, gel de atividade e IEF. As isoenzimas isoladas foram caracterizadas.

4.8.4 Sistemas de duas fases aquosas

Sistemas de duas fases aquosas foram avaliados para a recuperação de enzimas obtidas de cultivo em meio complexo. O sistema imiscível foi composto por um polímero e um sal. O polímero utilizado foi o UCON 50-HB-5100, um copolímero aleatório (Mr = 3900) com 50% de óxido de etileno e 50% de óxido de propileno. Sais de fosfato de potássio foram utilizados (KH₂PO₄, K₂HPO₄ e tampão KH₂PO₄/K₂HPO₄).

As suspensões foram preparadas a partir de soluções estoque de UCON e fosfatos de potássio. UCON foi usado como descrito por Silvério et al (2010). Para garantir a precisão experimental, as soluções foram mensuradas em massa, secando-se as soluções de sais em placa de aquecimento (50°C) até massa constante e as soluções de UCON foram liofilizadas. Os sistemas foram preparados para obtenção de 1 g de suspensão final como segue. Cerca de 1 a 250 mg de proteína total do extrato de lacase de *P. cinerea* foi adicionado ao sistema.

Água foi adicionada para perfazer o sistema até 1g. Após pesagem, os tubos foram agitados em um agitador vortex, por 30s, e imediatamente centrifugados a 20 ° C por 5 min a 1000g. Os ensaios foram realizados em três sistemas com sais de fosfato de potássio e UCON: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 e tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$. Amostras das duas fases, superior e inferior, foram retiradas com uma pipeta automática e a atividade de lacase e proteínas totais foram determinadas. A maior distância possível do ponto crítico da *tie line* foi adotada, a fim de obter o maior coeficiente de partição (SILVÉRIO et al., 2010a). A estabilidade de lacases nos sistemas de duas fases aquosas foi avaliada após 24 horas, determinado a atividade residual. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.8.4.1 Coeficiente de partição de lacase

Os coeficientes de partição (K) para lacase foram calculados pela inclinação da reta obtida através do plote da concentração de lacase na fase rica em polímero *versus* a fase rica em sal, ambos corrigidos com os fatores de diluição (DF) correspondente, conforme equação (4):

$$K = \frac{\text{Conc.}(\text{polymer}) \times DF_{\text{polymer}}}{\text{Conc.}(\text{salt}) \times DF_{\text{salt}}} \quad (4)$$

4.9 CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

4.9.1 Determinação da massa molar

As massas molares das proteínas presentes foram estimadas por SDS-PAGE, utilizando-se do gráfico dos logaritmos das massas molares (log PM) das proteínas padrões pelas suas respectivas mobilidades eletroforéticas (cm).

4.9.2 Efeito do pH na atividade

O pH ótimo de reação de enzimas purificadas foi determinado no ensaio padrão de lacase (com ABTS, à 25°C), em tampão citrato fosfato 50 mM (pH 2,5-7,0) e fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0-8,0).

4.9.3 Estabilidade à temperatura

A estabilidade térmica foi avaliada após incubação da enzima ($0,5 \text{ U mL}^{-1}$) por períodos de 30 min a 8 horas à 50°C . A atividade residual de lacase foi determinada utilizando o ensaio padrão de oxidação do ABTS.

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) das enzimas a 50°C - o tempo no qual após incubação a a atividade residual da enzima foi de 50 % da atividade original foi determinada pela equação (5):

$$t_{1/2} = 0,693/k_d \quad (5)$$

O coeficiente de velocidade de termoinativação (k_d) é determinado pela regressão linear do plote do logaritmo da atividade residual ($\ln A_r$) *versus* o tempo de pré-incubação na temperatura indicada, nos quais as enzimas foram inativadas. O k_d é o valor absoluto da inclinação da linha de regressão.

4.9.4 Parâmetros cinéticos – constante de Michaelis-Menten (K_m)

Atividade de lacase foi determinada em reação padrão, com diferentes concentrações de ABTS: 0,1 a 5 mM. A K_m foi determinada através de gráficos de duplos recíprocos (LINEWEAVER; BURK, 1934).

4.9.5 Atividade e estabilidade em NaCl

Atividades de lacase foram determinadas em concentrações variadas de NaCl (0, 200, 400, 600, 800 e 1000 mM, em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,0, conforme o ensaio padrão de determinação da atividade de lacase. A estabilidade ao NaCl foi realizada após incubação da enzima ($0,5 \text{ U mL}^{-1}$) com NaCl 1M, em intervalos de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180, 240 minutos, e determinada a atividade residual, no ensaio padrão de atividade de lacase (NIVADELI et al., 2008).

4.9.6 Efeito de sais na atividade enzimática

Sais foram avaliados no ensaio de atividade de lacase. Lacase de *P. cinerea* foi previamente incubada com sais (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , Na_2SO_4 ,

(NH₄)₂SO₄, C₆H₅O₇Na₃ × 2H₂O, e C₆H₈O₇ × H₂O – em duas concentrações de cada sal, mencionadas no texto) por 30 min. Os valores de atividade relativa (%) foram expressos em relação ao controle obtido incubando a enzima com água deionizada. Para efeito comparativo duas outras lacases de *T. versicolor* foram avaliadas simultaneamente nas mesmas condições.

4.9.7 Avaliação de mediadores de lacase

A avaliação de diferentes mediadores de lacase foi baseada na descoloração de corantes pela enzima (CAMARERO et al., 2005). Diferentes mediadores de lacase foram avaliados, em duas concentrações cada (0,1 e 1 mM): 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído (siringaldeído), 1-hidroxibenzotriazol (HBT), ácido 4-hidroxibenzóico (HBA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido 2,3-dihidroxibenzóico (2,3DHBA) e ABTS, nas reações de descoloração, em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0, 25°C, por 10 min (conforme item 4.7.4.9). O melhor mediador foi selecionado com base na maior taxa de oxidação de 140 µg/mL de Reactive Blue 19 (em µmol.min/l). O mediador selecionado foi então avaliado em reação com lacase de *P. cinerea*, oxalato de sódio (15 mM) e Mn²⁺ (0,1 mM), na reação padrão de descoloração dos corantes Reactive Blue 19 e Reactive Red 271 (item 4.7.4.9). Varredura espectral (200 à 700 nm) foi realizada no início e final das reações.

4.9.8 Avaliação do efeito sinérgico lacase-MnP

Diferentes reações foram conduzidas para investigar o possível efeito sinérgico entre lacase e MnP. As reações consistiram na combinação de diferentes componentes reacionais em determinadas concentrações, no ensaio padrão de descoloração do Reactive Blue 19 (item 4.7.4.9) por 5 min à 25°C: MnP (0,1 U), lacase (0,1 U), H₂O₂ (1 mM), oxalato de sódio (15 mM), lactato de sódio (15 mM), sulfato de manganês (1 mM), siringaldeído (1 mM).

4.10 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

4.10.1 Descoloração de corantes por fungos ligninolíticos em meio sólido

Discos (Ø 7 mm) do crescimento fúngico, de cada uma das treze linhagens, em placas com BDA, foram transferidos ao centro de placas Petri (Ø 9 cm) contendo 20 ml de BDA em meio sólido com 100 mg L⁻¹ de Reactive Blue 13 e 100 mg L⁻¹ de Reactive Red 271, em

triplicata. A taxa de extensão micelial e a taxa de descoloração (cm dia^{-1}) foram determinadas pela medida (cm) em duas direções perpendiculares da placa, a cada 24 h, por até 12 dias, à 25 °C (MACHADO et al. 2006).

4.10.2 Descoloração do efluente simulado pelos cultivos fúngicos (in vivo)

Para descoloração *in vivo*, 5 mL de solução estoque de efluente têxtil simulado foi adicionada aos frascos de cultivo das linhagens fúngicas (após sete ou dez dias de cultivo, conforme especificado no texto) e a descoloração monitorada após 24-72 h. Como controle de adsorção dos corantes ao micélio, descoloração *in vitro* foi realizada: o conteúdo dos frascos de cultivo foi filtrado, para remoção de biomassa e obtenção do extrato livre de micélio, logo em seguida solução de efluente foi adicionada (5 mL) à 45 mL de extrato livre de micélio e a descoloração monitorada por até 24 h. A redução da cor foi analisada por espectrofotometria no comprimento de onda de máxima absorbância do efluente na região visível. A descoloração (%) foi determinada pela redução na absorbância do λ_{max} , conforme equação (6):

$$\% \text{ de descoloração} = \frac{(A_0 - A) \times 100}{A_0} \quad (6)$$

onde: A_0 = absorbância do meio abiótico (não inoculado)

A = absorbância após cultivo fúngico.

Frascos de cultivo não inoculados foram preparados para controle. Os experimentos foram realizados em duplicata. Varredura espectral (200 a 700 nm) foi realizada após 24-72 h.

4.10.3 Descoloração de efluente real

Descoloração de efluente real por extrato enzimático obtido da linhagem selecionada foi realizado em tubos de ensaio, num volume final de reação de 5 mL. A reação continha 2 mL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,5, 2,5 mL de extrato enzimático (diluído para obter 1,0 U/ml) e 0,5 mL de efluente real (com pH ajustado para 5,5), a 25°C por até 72 horas. Reações com mediadores de lacases foram conduzidas com siringaldeído, oxalato de sódio e

sulfato de manganês. Em determinados intervalos de tempo, varredura espectral (entre 200 e 700 nm) foi realizada para monitorar a descoloração.

4.10.4 Utilização de lacase para auxílio na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar

4.10.4.1 Pré-tratamento químico do bagaço de cana-de-açúcar

Foram utilizadas amostras de bagaço de cana obtidas de diferentes tratamentos. Os pré-tratamentos foram: hidrólise ácida (H_2SO_4 2% m/m, a 150°C por 30 minutos), sulfito ácido (H_2SO_4 e Na_2SO_3 5% m/m; pH 2,13, a 10% m/m, 150°C , por 2 h), sulfito alcalino (NaOH 2,5% m/m, com sulfito de sódio 5%, m/m, 121°C por 2 h) e clorito de sódio.

4.10.4.1.1 *Clorito de sódio em meio ácido*

Os bagaços com teores reduzidos de lignina foram preparados segundo a metodologia de Browning (1967) para preparo de holocelulose. O método baseia-se na solubilização da lignina por soluções ácidas de clorito de sódio.

Para cada grama de bagaço de cana-de-açúcar, foram utilizadas 0,3 g de clorito de sódio (Fluka), 0,1 mL de ácido acético e 32 mL de água destilada. O frasco foi colocado em banho aquecido com temperatura entre 70 - 80°C . A cada hora de reação foram adicionados mais 0,1 mL de ácido acético e 0,3 g de clorito de sódio, com o tempo de 1 ou 2 horas. As amostras foram resfriadas a 10°C , filtradas em filtros de placa porosa nº 2 e lavadas com 80 mL de água destilada e 20 mL de acetona (SIQUEIRA, 2011).

4.10.4.1.2 *Sulfito alcalino*

O processo foi iniciado por uma impregnação a vácuo do bagaço por 15 min com solução sulfito alcalina (NaOH 2,5% e Na_2SO_3 5%, m/m). A proporção de bagaço para líquido foi de 1:10 (m/v) e a reação foi conduzida em autoclave a 121°C por 2 h. Após esta etapa foi feita a lavagem do material em coluna de PVC, recirculando a água de lavagem para retenção dos finos, até que a água de lavagem estivesse sem turbidez. Posteriormente, o material foi lavado com água e centrifugado para se obter uma consistência de 30% (p/p). O material lavado foi suspenso em 25 L de água (2,4% consistência) e refinado no refinador de disco Bauer MD-300. Após esta etapa repetiu-se o processo de retenção de finos em coluna de

PVC e a centrifugação em centrífuga de roupas Arno por aproximadamente 15 minutos (MENDES, 2010).

4.10.4.1.3 *Sulfito ácido*

Vinte gramas de bagaço foram colocados dentro de um kitassato de 500 mL e mantidos sob vácuo por 30 min. O tratamento foi iniciado pela impregnação do bagaço com uma solução de sulfito ácido (H_2SO_4 2,5% e Na_2SO_3 5% m/m; pH 2,13), sob vácuo por 15min. A proporção de bagaço para líquido foi de 1:10 (p/v) e a reação foi conduzida por 2h em êmbolos de aço inox de 800 ml aquecidos em banho de óleo mineral à 150°C. Após esta etapa, o material foi lavado em funil de Büchner e filtro de papel, recirculando a água para retenção dos finos, até que a água de lavagem estivesse sem turbidez. Posteriormente, o material foi lavado com água até a neutralidade e filtrado, até uma consistência de aproximadamente 30% (p/p). O material lavado foi suspenso em 700 mL de água (2,4% consistência) e desfibrado em um liquidificador industrial. O bagaço pré-tratado foi centrifugado a 4000 rpm por 15min, seco a temperatura ambiente, até que sua umidade estivesse entre 65-75% e congelado a -20°C, em sacos plásticos fechados. O rendimento do processo foi calculado com base na massa seca da amostra.

4.10.4.1.4 *Hidrólise ácida*

O bagaço de cana-de-açúcar foi submetido a hidrólise ácida como um pré-tratamento alternativo, realizado em êmbolos de aço de 200 mL, mantidos em banho termostatzado. O bagaço foi hidrolisado com H_2SO_4 diluído 2%, m/v, a 150°C por 30 minutos de residência.

Após cada etapa de pré-tratamento, a composição química dos bagaços pré-tratado foi determinada quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina. A composição do bagaço após cada pré-tratamento é sumarizada na Tabela 19.

Tabela 19 – Composição do bagaço de cana após pré-tratamentos químicos (%).

Tratamento	celulose	hemicelulose	lignina	Referência
Bagaço.usina	42,59	26,65	24,51	-
Hidrolise ácida	55,2	7,5	30	Monte (2011)
Sulfito-acido	59,2	13,9	25	Monte (2011)
Sulfito alcalino	47	19	27,7	Mendes (2010)
Clorito 1 h	43,57	26,94	20,07	Siqueira (2011)
Clorito 2 h	45,18	27,58	15,31	Siqueira (2011)

4.10.4.2 Efeito de lacase e mediadores na atividade celulolítica

A inativação de celulases por lacase ou lacase-mediadores foi avaliada na presença e na ausência do substrato bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com clorito de sódio (item 4.10.4.1.1). Na ausência do substrato, Cellubrix (0,2 FPU) foi diretamente incubada com lacase de *P. cinerea* (0,5 U/ml), com acetato de sódio pH 4,8 em volume final de 2 ml, por 1 h, e determinada a atividade residual de lacase e celulases totais. Da mesma forma, outros dois sistemas com mediadores de lacase foram avaliados na atividade celulases: a) lacase (0,5 U/ml) e siringaldeído (10 mM) ou b) lacase (0,5 U/ml)-siringaldeído (10 mM)-oxalato de sódio (1 mM)-sulfato de manganês (1mM)-ácido linolêico (0,05%). A inativação da atividade de celulases por mediadores foi avaliada sob as mesmas condições, na ausência de lacase. Para o efeito de lacases e mediadores na atividade celulolítica na presença do bagaço de cana, lacase (10 U/g bagaço) e Cellubrix (10 FPU/g bagaço) foram incubadas com 0,2 g de bagaço de cana pré-tratado com clorito por 2 h (consistência de 2%) a 45°C, e determinada a atividade residual de celulase e lacase, por 8 h. As concentrações de mediadores da reação foram as mesmas descritas acima. As atividades enzimáticas foram expressas como atividade relativa (%).

4.10.4.3 Tratamento simultâneo do bagaço de cana-de-açúcar com lacase-celulases

Lacases e celulases foram adicionadas ao bagaço de cana pré-tratado com clorito por 2 h (0,2 g). Para cada grama de bagaço foram usados: cellubrix (10 FPU/g bagaço), Novozym

188 - β -glicosidase comercial (20 U) e lacases de *P. cinerea* (10 U), em reação tamponada com acetato de sódio 50 mM, pH 4,8, por 2, 8 e 24 h, 45°C, 120 rpm.

Dois sistemas lacase mediador foram avaliados durante o tratamento simultâneo com celulases: 1) lacase (10 U/g) e siringaldeído (10 mM), ou 2) lacase (10 U/g), siringaldeído 5 mM, oxalato de sódio 10 mM, sulfato de manganês 1 mM e ácido linoléico 0,05%. Após o tratamento, a glicose liberada no sobrenadante foi analisada e usada para o cálculo de conversão de celulose.

4.10.4.4 Tratamento sequencial do bagaço de cana-de-açúcar com lacase-celulases

No tratamento sequencial foram utilizados os bagaços obtidos a partir de quatro pré-tratamentos diferentes (itens 4.10.4.1.2, 4.10.4.1.3 e 4.10.4.1.4), e com o bagaço in natura, este último apenas lavado com água destilada. O bagaço pré-tratado foi primeiramente tratado somente com lacase (10 U/g bagaço), em tampão acetato de sódio pH 4,8, 50°C, 120 rpm por 6 h, em reação com volume final de 10 mL. Os dois sistemas lacase mediador citados no item anterior também foram avaliados no tratamento sequencial. Após o tratamento com lacase, o bagaço foi lavado com água destilada ou realizada extração alcalina (NaOH 0,1%, por 1h a 60°C), seguido por lavagem com água novamente. O bagaço foi então hidrolisado com Cellubrix (10 FPU) e Novozym (20 U) a 45 °C, 120 rpm. Nos tempos de por 24, 48 e 72 h foram retiradas amostras para análise de glicose e realizado o cálculo de conversão da celulose. A conversão de celulose foi determinada conforme a equação (7):

$$Cc = \{[(Cg \times Vr) \times 0,90] / Mi\} \times 100 \quad (7)$$

Onde Cg é a concentração de glicose na reação, Vr o volume de reação e Mi a massa inicial de celulose adicionada à reação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS PARA BIODESCOLORAÇÃO

Fungos basidiomicetos isolados de ecossistemas brasileiros, para estudos de descoloração de efluente têxtil contendo um corante reativo (MOREIRA NETO et al., 2011). Inicialmente, foi avaliada a capacidade de vinte e cinco basidiomicetos para descoloração do corante Reactive Blue 19, empregando-se condições de cultivo dos fungos com características encontradas em efluentes têxteis: alcalinidade ou presença de NaCl. As vinte e cinco linhagens fúngicas foram cultivadas por até 30 dias em meio Kirk, com 200 mg L⁻¹ de Reactive Blue 19, com pH inicial ajustado para 7,0, 8,0 ou 9,0. Seis linhagens fúngicas, entre elas, *Peniophora cinerea*, foram capazes de descolorir o corante quando cultivados em meio com pH inicial 8,0. Somente *P. cinerea* foi capaz de descolorir 90% do Reactive Blue 19 durante cultivo em pH 9,0 (MOREIRA NETO et al., 2011).

Paralelamente ao estudo de seleção de fungos para descoloração em cultivo com pH na região alcalina, as vinte e cinco linhagens foram avaliadas para descoloração do Reactive Blue 19 em meio Kirk modificado, contendo 0, 10 ou 30 g L⁻¹ de NaCl (pH inicial 5). Treze linhagens descoloriram o corante em meio com 10 g L⁻¹ de NaCl, sendo que o tempo para total descoloração variou entre as linhagens (MOREIRA et al., 2011).

Comparando os resultados de seleção de fungos destes dois estudos mencionados acima, *Pleurotus ostreatus*, *Peniophora cinerea* e *Trametes villosa* foram as linhagens capazes de descolorir o corante em cultivo com pH inicial 8,0 ou em cultivo com 10 g L⁻¹ de NaCl. Estas três linhagens foram então avaliadas para descoloração do corante em cultivo com as duas variáveis, pH inicial 8,0 juntamente com 10 g L⁻¹ de NaCl. Não foi observado crescimento dos fungos e descoloração após 20 dias de cultivo nesta condição. Uma outra estratégia foi usada nos testes de descoloração do corante em condições próximas às encontradas em efluentes têxteis. A estratégia baseou-se na adição de uma solução de efluente simulado (contendo Reactive Blue 19, pH 8,0, 10 g/L de NaCl e 5 mg de umectante), após determinado tempo de cultivo dos fungos (0, 5, 7 e 9 dias). A idade fisiológica dos fungos influenciou na descoloração. O efluente adicionado após sete dias foi estabelecido como tempo ideal para cultivo dos fungos e descoloração do efluente (MOREIRA NETO et al., 2011).

Devido à mudança de estratégia para descoloração do efluente simulado com Reactive Blue 19, adicionando o efluente após sete dias de cultivo, concluiu-se que seria necessário,

para os estudos de descoloração com os corantes comerciais, realizar nova seleção de fungos, a partir das linhagens pré-selecionadas, utilizando efluente simulado com os corantes reativos comerciais Reactive Blue 13 e Reactive Red 271, de forma à assegurar que outras linhagens potencialmente promissoras não fossem descartadas. Além da diferença estrutural entre corantes reativos comerciais e o Reactive Blue 19, cujos mecanismos fúngicos (das diferentes linhagens) envolvidos na descoloração do Reactive Blue 19 podem apresentar diferenças devido ao tipo de corante.

5.1.1 Descoloração de corantes reativos em meio sólido em placas

As linhagens usadas neste estudo foram previamente selecionadas pela capacidade de descoloração do corante antraquinônico Reactive Blue 19, a partir de mais de cem linhagens (MACHADO et al., 2005). Uma nova avaliação do potencial destas linhagens em descolorir outros corantes reativos (Cibacron, Tabela 8) foi feita usando a mistura de dois corantes reativos estruturalmente diferentes, antraquinônico (Reactive Blue 13) e azo (Reactive Red 271). Os resultados mostraram que todas as linhagens foram capazes de crescer e descolorir a mistura de corantes em meio sólido, em placas de Petri, sendo observada visualmente total perda de coloração (Tabela 20). O tempo necessário para crescimento e descoloração dos corantes reativos foi diferente entre as linhagens avaliadas. Alguns fungos mostraram taxa de extensão micelial e taxa de descoloração superior a $1,0 \text{ cm dia}^{-1}$. Este resultado foi observado para as três linhagens de *Trametes villosa* e para as linhagens de *Peniophora cinerea*, *Hygrocybe* sp. e *Psilocybe castanella*.

A seleção dos fungos em placas com ágar é um método eficiente e simples para determinar o potencial para descoloração de corantes (OKINO et al., 2001; CHANDER et al. 2004; DHOUIB et al. 2005; MACHADO et al., 2005, MACHADO et. al., 2006; NOVOTNY et. al., 2001; JAROSZ-WILKOLAZKA et. al., 2002; EICHLEROVA et. al., 2005), porém, para uma exploração mais detalhada do sistema extracelular dos fungos é necessário investigar os metabólitos produzidos durante o cultivo. Sendo assim, as linhagens foram cultivadas em meio líquido, adicionando efluente simulado, preparado com os corantes Reactive Blue 13, Reactive Red 271, NaCl e umectante comercial.

Tabela 20 – Taxa de extensão micelial (cm dia^{-1}) e taxa de descoloração (cm dia^{-1}) de mistura de dois corantes reativos (Reactive Blue 13 e Reactive Red 271) durante crescimento de fungos basidiomicetos em meio sólido (BDA), à 25°C.

Linagem	Taxa extensão micelial (cm dia^{-1})	Taxa de descoloração (cm dia^{-1})
<i>Hygrocybe</i> sp. CCIBT2679	$1,20 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,01$
<i>Lentinus bertieri</i> CCIBT2592	$0,77 \pm 0,00$	$0,90 \pm 0,00$
<i>Lentinus villosus</i> CCIBT2608	$0,65 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,02$
<i>Peniophora cinerea</i> CCIBT2541	$1,03 \pm 0,03$	$1,16 \pm 0,02$
<i>Pleurotus flabellatus</i> CCIBT2733	$0,84 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,01$
<i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBT2347	$1,06 \pm 0,04$	$1,17 \pm 0,04$
<i>Psilocybe castanella</i> CCIBT2781	$0,63 \pm 0,00$	$0,80 \pm 0,00$
<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCIBT2610	$0,55 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,05$
<i>Rigidoporus microoporus</i> CCIBT2671	$1,07 \pm 0,02$	$1,23 \pm 0,01$
<i>Trametes villosa</i> CCIBT2502	$1,03 \pm 0,00$	$1,23 \pm 0,01$
<i>Trametes villosa</i> CCIBT2513	$0,86 \pm 0,01$	$1,05 \pm 0,01$
<i>Trametes villosa</i> CCIBT2628	$1,20 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,01$

¹A concentração de cada corante no meio sólido foi de 100 mg L^{-1}

5.1.2 Descoloração de efluente simulado com corantes reativos

Todas as linhagens avaliadas foram capazes de descolorir o efluente simulado nos dois modos de tratamento avaliados: *in vivo* (efluente adicionado aos cultivos fúngicos, após sete dias) e *in vitro* (efluente adicionado à extratos livres de células, obtido após sete dias de cultivo) (Tabela 21). Os melhores resultados de descoloração *in vivo* foram obtidos por sete das doze linhagens: *Lentinus villosus*, *Peniophora cinerea*, *Pleurotus ostreatus*, *Psilocybe castanella* e as três linhagens de *Trametes villosa*. Para a maioria dos fungos avaliados, o tratamento *in vivo* resultou em maior descoloração, comparado ao tratamento *in vitro*. *R. microoporus* apresentou um baixo desempenho em relação aos demais fungos, com descoloração de 25% e 12% para os tratamentos *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. Para os outros fungos foi observada descoloração entre 66 e 77% (*in vivo*) e entre 52 e 74% (*in vitro*).

Fatores associados à biomassa, como adsorção e absorção, podem estar envolvidos na descoloração do efluente, o que justificaria o aumento no percentual de descoloração *in vivo* quando comparado ao tratamento *in vitro*, como observado em outros trabalhos (SWAMY; RAMSAY, 1999; SVOBODOVA et al., 2008). Entretanto, neste estudo, não se observou uma relação direta entre a descoloração *in vivo* e o aumento da biomassa fúngica. Para sete linhagens foi observada descoloração *in vivo* entre 74% e 78% (Tabela 21), com variação ampla entre os valores de biomassa destes fungos (entre $0,54$ e $1,35 \text{ g l}^{-1}$) (Tabela 22).

Tabela 21 – Descoloração in vivo e in vitro (%) de efluente têxtil simulado após 24 h.

Linhagem	Descoloração in vivo (%)	Descoloração in vitro (%)	In vivo vs. In vitro (Teste de Tukey)¹
<i>Hygrocybe</i> sp. CCIBT2679	67 ± 5	55 ± 5	$p < 0,05$
<i>Lentinus bertieri</i> CCIBT2592	67 ± 4	60 ± 3	$p > 0,05$
<i>Lentinus villosus</i> CCIBT2608	76 ± 4	62 ± 1	$p < 0,05$
<i>Peniophora cinerea</i> CCIBT2541	74 ± 1	63 ± 1	$p < 0,05$
<i>Pleurotus flabellatus</i> CCIBT2733	66 ± 2	52 ± 2	$p < 0,05$
<i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBT2347	77 ± 0	67 ± 0	$p < 0,05$
<i>Psilocybe castanella</i> CCIBT2781	77 ± 2	74 ± 4	$p > 0,05$
<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCIBT2610	66 ± 3	55 ± 1	$p < 0,05$
<i>Rigidoporus microoporus</i> CCIBT2671	25 ± 1	12 ± 0	$p > 0,05$
<i>Trametes villosa</i> CCIBT2502	76 ± 2	63 ± 0	$p < 0,05$
<i>Trametes villosa</i> CCIBT2513	77 ± 2	65 ± 1	$p < 0,05$
<i>Trametes villosa</i> CCIBT2628	78 ± 5	65 ± 3	$p < 0,05$

Efluente simulado (concentração final no meio ou reação): 100 mg L⁻¹ de Reactive Blue 13, 100 mg L⁻¹ de Reactive Red 271, 10 g L⁻¹ de NaCl, 5 mg L⁻¹ de umectante comercial, solução hidrolisada em pH 8,1.

O sistema multienzimático envolvido na descoloração de corantes é constituído de combinações de diferentes enzimas ligninolíticas, sendo a ocorrência de lacase entre fungos em geral maior que MnP e LiP (VALDERRAMA et. al., 2003). Este dado se confirma entre as linhagens avaliadas no presente estudo, sugerindo que a lacase esteja envolvida na descoloração do efluente. Com exceção do *R. microoporus*, todos os fungos produziram lacase. MnP foi detectada somente em *R. microoporus* e três linhagens de *T. villosa*, porém em níveis muito baixos. LiP foi detectada em *L. bertieri* e *T. villosa* CCIBT2502 e VAO somente em *P. ostreatus* (Tabela 22).

Não se observou uma relação direta entre a descoloração *in vivo* ou *in vitro* (Tabela 21) e o nível de enzima ligninolítica produzida pelas diferentes linhagens (Tabela 22). Por exemplo, *Hygrocybe* sp. e *Pleurotus flabellatus* foram eficientes na descoloração (67 e 66%, respectivamente), porém produziram baixos níveis de lacase (6 e 17 UI⁻¹, respectivamente). Em muitos estudos não se encontraram evidências experimentais que forneçam um modelo generalizado do envolvimento de enzimas ligninolíticas na decoloração de corantes por culturas de basidiomicetos. Novotný e col. (2004) não obtiveram resultados conclusivos para o envolvimento de enzimas ligninolíticas na descoloração por *Irpex lacteus*.

Tabela 22 – Biomassa, pH final do meio e atividades de lacase, manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP) e álcool veratrílico oxidase (VAO) após cultivo de basidiomicetos por sete dias, 25°C.

Linhagem	Biomassa (g l ⁻¹)	pH	Lacase (UI ⁻¹)	MnP (UI ⁻¹)	LiP ¹ (UI ⁻¹)	VAO ¹ (UI ⁻¹)
<i>Hygrocybe</i> sp. CCIBT2679	0,92 ± 0,01	3,8 ± 0,1	6 ± 2	0,0	0,0	0,0
<i>Lentinus bertieri</i> CCIBT2592	0,95 ± 0,21	5,0 ± 0,3	14 ± 5	0,0	0,36 ± 0,01	0,0
<i>Lentinus villosus</i> CCIBT2608	0,80 ± 0,23	3,8 ± 0,6	21 ± 3	0,0	0,0	0,0
<i>Peniophora cinerea</i> CCIBT2541	1,35 ± 0,14	3,7 ± 0,0	56 ± 1	0,0	0,0	0,0
<i>Pleurotus flabellatus</i> CCIBT2733	0,54 ± 0,03	5,2 ± 0,1	17 ± 4	0,0	0,0	0,0
<i>Pleurotus ostreatus</i> CCIBT2347	0,78 ± 0,06	4,8 ± 0,0	168 ± 8	0,0	0,0	1,21 ± 0,01
<i>Psilocybe castanella</i> CCIBT2781	0,65 ± 0,16	4,5 ± 0,0	45 ± 0	0,0	0,0	0,0
<i>Pycnoporus sanguineus</i> CCIBT2610	0,62 ± 0,15	5,3 ± 0,2	31 ± 8	0,0	0,0	0,0
<i>Rigidoporus microoporus</i> CCIBT2671	0,95 ± 0,36	5,7 ± 0,0	1 ± 0	0,90 ± 0,03	0,0	0,0
<i>Trametes villosa</i> CCIBT2502	0,93 ± 0,22	3,7 ± 0,2	165 ± 12	0,62 ± 0,04	0,27 ± 0,01	0,0
<i>Trametes villosa</i> CCIBT2513	0,68 ± 0,05	3,6 ± 0,1	94 ± 0	0,93 ± 0,04	0,0	0,0
<i>Trametes villosa</i> CCIBT2628	0,96 ± 0,06	3,9 ± 0,3	61 ± 19	0,77 ± 0,03	0,0	0,0
Abiotic control	Nd	5,0 ± 0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Os valores representam a média entre triplicatas e o desvio padrão.

¹ Atividades enzimáticas determinadas com o substrato álcool veratrílico na presença (LiP) e ausência de H₂O₂ (VAO).

A capacidade de descoloração varia entre espécies e entre cada linhagem, dependendo ainda das condições de cultivo para produção das enzimas ligninolíticas. O corante Reactive Blue 13 é antraquinônico, fornecendo o pico de absorbância em 625 nm, predominante no efluente simulado. Corantes antraquinônicos são mais susceptíveis à descoloração por lacase do que por MnP (MIELGO et al., 2003; CHAMPAGNE; RAMSAY, 2005; PALMIERI et al., 2005). Além disso, as condições de cultivo dos fungos neste estudo não foram favoráveis para expressão de MnP, sendo necessário adicionar indutores de MnP, como substratos lignocelulósicos (SUSLA et al., 2008).

Diferentes vias de descoloração de Orange G e Reactive Blue 19 por *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinosum* e *Pleurotus calyptratus* foram descritas por Eichlerova e col. (2005). Em *I. resinosum* e *P. calyptratus* a descoloração do Orange G foi relacionada com lacase enquanto a descoloração do Reactive Blue 19 atribuída à MnP. Entretanto, o sinergismo entre lacase e MnP foi responsável pela descoloração do Orange G e Reactive Blue 19 por *D. squalens*. Erkut e col. (2007) mostraram que lacase foi a única enzima responsável pela descoloração do Reactive Blue 19 por *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus versicolor* e *Funalia trogii*. Outros autores reportam que os níveis de enzimas ligninolíticas não parecem ser fator limitante na descoloração (SWAMY; RAMSAY, 1999; NOVOTNY et al., 2004). Nosso estudo obteve percentual de descoloração semelhante entre alguns fungos, com diferentes valores de biomassa e diferentes níveis de atividades ligninolíticas, o que demonstra a complexidade dos mecanismos e reforça a hipótese de outros fatores estarem envolvidos na descoloração de corantes, além das enzimas ligninolíticas. Por exemplo, a produção de H₂O₂ como sugerido por Moreira e col. (2000), e uma variedade de compostos de baixa massa molar secretados por fungos de decomposição branca, incluindo ácidos orgânicos, ácidos graxos insaturados e compostos com capacidade de redução de Fe³⁺ estão envolvidos na descoloração de corantes (CAMARERO et al., 2005; ARANTES; MILAGRES, 2007; CIULLINI et al., 2008). Além disso, tem sido revelado que alguns fungos de decomposição branca podem eficientemente degradar corantes sem produzir todas as enzimas ligninolíticas (WESENBERG et al., 2003), realçando a complexidade do mecanismo ligninolítico extracelular envolvido na descoloração.

Como critério para selecionar entre as sete linhagens com maior capacidade de descoloração do efluente simulado, aquelas que conseguem atuar em efluente com maior alcalinidade, os corantes reativos do efluente simulado foram hidrolisados com NaOH 2 M, para obter pH 9,1, pois, efluentes têxteis comumente apresentam pH superior a 8,0. O sobrenadante do cultivo dos fungos produzidos em diferentes dias de cultivo foi usado para

avaliar a descoloração do efluente alcali-salino. Extratos de *Pleurotus ostreatus*, *Trametes villosa* CCB176 e *Peniophora cinerea* foram mais eficientes na descoloração do efluente simulado, com 55% de descoloração ocorrendo em 1 h (Figura 17).

Figura 17. Cinética de descoloração do efluente têxtil simulado (pH 9,1) por extratos livres de micélio obtidos de *Pleurotus ostreatus* (Po), *Trametes villosa* CCIBT2513 (Tv6), *T. villosa* CCIBT2628 (Tv1), *T. villosa* CCIBT2502 (Tv5), *Peniophora cinerea* (Pec), *Psilocybe castanella* (Psc) e *Lentinus villosus* (Lv). As barras representam o desvio médio entre duplicatas.

5.1.3 Avaliação de fontes de nitrogênio nos cultivos de linhagens selecionadas para aumento da descoloração de efluente simulado

Os três fungos, *Pleurotus ostreatus*, *Peniophora cinerea* e *Trametes villosa* CCIBT2513, previamente selecionados pela maior capacidade de descolorir o efluente textol simulado foram cultivados em meios contendo as fontes de nitrogênio, tartarato de amônio ou extrato de levedura, fornecidos em quantidades baixas ou elevadas, com o objetivo de verificar a possibilidade de estimulação do sistema ligninolítico e assim obter, maiores valores de descoloração do efluente por extratos livres de células. A expressão do sistema ligninolítico de basidiomicetos é regulada pelas condições de cultivo, sendo a fonte e

concentração de nitrogênio uma das variáveis de maior importância nesta regulação (ARORA; GIL, 2001; COUTO et. al., 2002; KAHRAMAN; GURDAL, 2002; IKEHATA et. al., 2004).

Extratos livres de micélio obtidos do cultivo com tartarato de amônio, 4,5 g L⁻¹, produziram a mesma descoloração do efluente que extratos produzidos em uma concentração dez vezes menor, exceto para *T. villosa* (Tabela 23). Quando se usou no meio o extrato de levedura em substituição ao tartarato de amônio houve maior descoloração do efluente com os extratos do cultivo em 0,1 g L⁻¹ de extrato de levedura, obtendo-se valores de 80 e 79% de descoloração por *P. cinerea* e *P. ostreatus*, respectivamente (Tabela 24), sendo o tratamento com estes dois fungos significativamente diferente de *T. villosa* CCIBT2513 (Tabela 25). Este resultado pode ser atribuído a natureza orgânica da fonte de nitrogênio e também a presença de microelementos e vitaminas essenciais para o bom crescimento das linhagens e produção de metabólitos.

Tabela 23 – Influência da concentração de tartarato de amônio na descoloração in vitro de efluente simulado por extratos de basidiomicetos selecionados.

Fungo	Tartarato de amônio (g/L)	
	0,45	4,5
<i>Pleurotus ostreatus</i>	66,57 a	67,11 a
<i>Peniophora cinerea</i>	62,50 a	63,34 a
<i>Trametes villosa</i> CCIBT2513	62,21 a	58,49 b

Efluente simulado: 1 g L⁻¹ de Reactive Blue 13, 1 g L⁻¹ de Reactive Red 271, 100 g L⁻¹ de NaCl, 50 mg L⁻¹ de umectante comercial, hidrolisados em pH 9,1.

Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste Tukey, $p < 0,05$) dentro de cada tratamento fúngico.

Tabela 24 – Influência da concentração de extrato de levedura na descoloração in vitro de efluente simulado por extratos de basidiomicetos selecionados.

Fungo	Extrato de levedura (g/L)			
	0,05	0,10	2,00	5,00
<i>Pleurotus ostreatus</i>	41,30 a	79,65 ab	62,57 ac	19,56 d
<i>Peniophora cinerea</i>	56,71 a	80,60 ab	64,40 ac	68,32 ac
<i>Trametes villosa</i> CCIBT2513	39,31 a	76,61 ab	68,67 ac	70,50 ac

Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste Tukey, $p < 0,05$) dentro de cada tratamento fúngico.

Tabela 25 – Influência do extrato de levedura na descoloração de efluente simulado por extratos de basidiomicetos selecionados.

Fungo	Extrato de levedura ($0,1\text{g L}^{-1}$)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	$79,65 \pm 2,17$ a
<i>Peniophora cinerea</i>	$80,60 \pm 1,41$ a
<i>Trametes villosa</i> CCIBT2513	$76,61 \pm 1,41$ b

Letras diferentes indicam diferença significativa (Teste Tukey, $p < 0,05$) entre todos os valores.

Esteves e col. (2007, 2009) caracterizaram as atividades de lacases presentes em extratos brutos, produzidas por estas mesmas três linhagens foram caracterizadas quanto a estabilidade ao NaCl. Neste estudo, foi evidenciado a presença de lacase com atividade estável ao NaCl ($>50\%$ à 1 M de NaCl), produzida por *P. cinerea* (Figura 18), característica rara quando comparado aos dados disponíveis na literatura. Desta forma, *P. cinerea* foi escolhido para prosseguir com os estudos de produção, purificação e caracterização de lacases e oxidação de substratos lignocelulósicos. Este fungo pertence à família Peniophoraceae, com basidioma ressupinado (cresce sobre a madeira), típico de florestas tropicais (Figura 19). Espécies de *Peniophora* são decompositoras de lascas de pinheiro, polpa de madeira e outros substratos lignocelulósicos (NIKU-PAAVOLA et al., 2004). Este último trabalho foi o primeiro a reportar a produção de lacase por uma espécie de *Peniophora*.

Figura 18. Atividades de lacase em diferentes concentrações de NaCl (mM) por extratos de *P. ostreatus*, *P. cinerea* e *T. villosa* cultivados em meio sintético (ESTEVES et al., 2007, 2009).

Figura 19. Foto ilustrativa de *Peniophora cinerea* em tronco de floresta tropical.

A espécie *Peniophora cinerea* produz pigmentos, incluindo a penioforina. Estudos de biopolpação foram realizados com espécies do mesmo gênero (WOLFAARDT et al., 2004) e um estudo de descoloração (LUCAS et al., 2008). LiP (VARELA et al. 2000), piranose oxidases (HECKMANN-POHL et al. 2006) e lacases termoestáveis (NIKU-PAAVOLA et al. 2004) foram detectadas em espécies de *Peniophora*. Recentemente a produção de bioetanol por *Peniophora cinerea* a partir de fermentação aeróbia e semi-aeróbia, a partir de diversas hexoses (glicose, manose, frutose, galactose, sacarose, maltose e celobiose) foi descrita (OKAMOTO et al., 2010). O rendimento de etanol atingiu 0,45 g por g de hexose.

No esforço desta revisão não foram encontrados trabalhos reportando a produção de MnP por espécies de *Peniophora*.

5.2 PRODUÇÃO DE LACASE POR *Peniophora cinerea*

Meios complexos para fungos ligninolíticos contendo resíduos agroindustriais são de baixo custo, fator desejável para bioprocessos, e promovem produção significativa de lacase, no entanto, dependendo do processo biotecnológico é desejável a remoção de resíduos da composição do meio que comprometem a estabilidade da enzima (compostos fenólicos e metais por exemplo). Meios sintéticos são geralmente mais "limpos" e com menor concentração de compostos que inativam lacases. Além disso, em meios sintéticos pode-se obter maior produtividade (U/l.dia).

Para uso dos extratos enzimáticos brutos em processos industriais, como biopolpação, deslignificação de lignocelulósicos, tratamento de efluentes e resíduos lignocelulósicos, a produção enzimática pode ser feita a partir de meios complexos. Para bioprocessos como formulação de biosensores, purificação e análise, remoção de compostos fenólicos em

bebidas, síntese de fármacos, aplicação em células de combustível, são recomendadas as formulações enzimáticas com maior grau de pureza, o que é facilitado quando obtido extrato enzimático a partir do meio sintético. Neste sentido foi avaliada a produção de lacase por *P. cinerea* em meios complexo e sintético.

5.2.1 Produção de lacase em meio complexo

Em um trabalho realizado com uma linhagem de *P. cinerea* cultivada em meio com farinha de soja 10 g L⁻¹, glicose 20 g L⁻¹, e elementos traço, pH 5,0, 30°C, 150 rpm, o fungo produziu baixas concentrações de lacase (0,056 mg mL⁻¹) (NIKU-PAAVOLA et al., 2004). Em geral, o uso de substratos lignocelulósicos estimulam a produção de enzimas ligninolíticas, que proporcionam uma condição mais próxima à encontrada no ambiente natural dos fungos ligninolíticos. Bagaço de cana, aparas de madeira de eucalipto, palha de milho, trigo enriquecido com nutrientes misturado com serragem, licor de milho, farelo de trigo e farelo de arroz promoveram o aumento da produção de enzimas ligninolíticas (ARORA; GILL, 2001; GILL ; ARORA, 2003; COUTO; SANROMÁN, 2005; KAHRAMAN; GURDAL, 2002; LORENZO et al., 2002). Com o objetivo de aumentar a produção de lacase por *P. cinerea*, e possivelmente, expressar outras enzimas ligninolíticas, o fungo foi cultivado em meio contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio: glicose, sacarose, bagaço de cana-de-açúcar moído, aparas de eucalipto moído, extrato de levedura e milhocina, constituindo assim um meio complexo. Bagaço de cana-de-açúcar, milhocina e aparas de eucalipto estimularam a produção de lacase, com as maiores atividades detectadas em glicose e milhocina (477 UL⁻¹), sacarose e milhocina (472 UL⁻¹) e bagaço de cana-de-açúcar e milhocina (412 UL⁻¹), os quais apresentaram um aumento superior a 10 vezes nas atividades de lacase detectadas em glicose e extrato de levedura (37 UL⁻¹) (Tabela 26). Visualmente é observado um aspecto morfológico diferente de *P. cinerea* para cada composição do meio de cultivo (Figura 20).

Atividade redutora de ferro foi detectada em todos os extratos avaliados, no entanto, em valores muito baixos, inferiores a 10 µmol.L⁻¹ Fe²⁺. Atividades de celobiose desidrogenase, lignina peroxidase e manganês peroxidase não foram detectadas. Em outras espécies de *Peniophora* descritas na literatura também não foram encontrados dados reportando a produção de MnP.

Tabela 26 – Atividade de lacase de *P. cinerea* em diferentes condições de cultivo com 7 e 14 dias (d)

Condição de cultivo	7d	14d
Glic + EL	30	37
Glic + Mil	305	477
Sac + Mil	265	472
BgC + EL	137	164
BgC + Mil	413	303
Euc + EL	58	64
Euc + Mil	200	197

*Glic: glicose, Sac: sacarose, EL: extrato de levedura, Mil: milhocina, BgC: bagaço de cana moído, Euc: eucalipto moído.

Figura 20. Desenvolvimento de *P. cinerea* em meios complexos, com diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

5.2.2 Cinética de produção de lacase em cultivo em meio complexo

Desde que o cobre é considerado um dos principais indutores de lacase, o efeito da adição de sulfato de cobre foi avaliado na produção de lacase por *P. cinerea*, em cultivos com sacarose ou bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e milhocina como fonte de

nitrogênio (Figuras 21 e 22). Os resultados mostram uma produção significativa de lacase a partir do quinto dia, com atividades próximas a 200 UL^{-1} . Apesar de não ter sido observada grandes diferenças na produção de lacases nos tempos iniciais de cultivo, nos estágios mais avançados a produção de lacase foi maior no meio com sacarose. A sua produção foi máxima em 20 dias, chegando a 994 UL^{-1} .

Figura 21. Crescimento (círculos), pH (quadrados) e atividade de lacase (triângulos) durante cultivo de *P. cinerea* em sacarose e milhocina com (A) e sem (B) adição do CuSO_4 1 mM para indução.

Figura 22. pH do meio (quadrados) e atividade de lacase (triângulos) durante cultivo de *P. cinerea* em bagaço de cana e milhocina com (A) e sem (B) adição do CuSO_4 1 mM para indução.

O crescimento foi quantificado como massa micelial seca apenas no meio com sacarose, em função da facilidade de separação do micélio neste meio, o mesmo não sendo possível no meio com bagaço. O crescimento foi muito semelhante no meio composto por sacarose e milhocina na presença ou ausência de cobre. Nos dois casos, o pico de produção de lacase ocorreu durante a fase estacionária do crescimento. Nos cultivos nestes meios complexos, contendo milhocina, observa-se o aumento do pH inicial de 4 para aproximadamente 6, principalmente na fase final do cultivo.

Compostos aromáticos como o álcool veratryl, ácido vanílico, 2,5 xilidina, ácido ferúlico, guaiacol e siringaldazina, e o cobre, induzem a produção de lacases. Estes indutores podem promover a síntese de isoformas de enzimas ligninolíticas (CALL; MUCKE, 1997; TERRON et al., 2004; COUTO; TOCA-HERRERA, 2007). Cobre induz a transcrição de lacase e aumenta a atividade da enzima. Resultados de eletroforese confirmaram que o cobre induziu a expressão de mais de uma lacase nos cultivos (Figura 23). Nos cultivos com bagaço de cana, sem adição de 1 mM de sulfato de cobre, também observa-se duas bandas com atividade de lacase, o que não ocorreu em cultivo com sacarose e milhocina, sem cobre, sugerindo que o bagaço de cana-de-açúcar pode induzir estas lacases, provavelmente por conter resíduos de metal. A indução foi inicialmente relacionada ao estresse oxidativo induzido pela adição de metal às culturas fúngicas (GALHAUP; HALTRICH, 2001).

Da mesma forma, isoformas de lacases foram obtidas após a indução por cobre em culturas de *Pleurotus ostreatus* (PALMIERI et al., 2003). A indução de uma determinada isoenzima de lacase, POXA1b, por cobre foi observada, mas a não indução de outra isoenzima, POXA1a, por cobre sugere a existência de diferentes mecanismos de regulação para a indução e distintas funções fisiológicas desempenhadas pelas isoenzimas (GIARDINA et al., 1999).

Figura 23. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes de amostras obtidas de diferentes condições de cultivo. O gel foi revelado com ABTS para detecção das bandas com atividade de lacase.

O tempo de adição de cobre ao cultivo e a concentração utilizados são essenciais para a indução. Em geral, para induzir a produção de lacase por cobre, é adicionado CuSO_4 , após 3 ou 4 dias (durante a fase exponencial) no cultivo dos fungos ligninolíticos. Galhaup e Haltrich (2001) avaliaram o efeito da adição de cobre para as culturas de *Trametes pubescens*, em uma

faixa de 0,1 a 2 mM CuSO_4 , após a inoculação do fungo ou depois de 4 ou 8 dias de cultivo. A maior atividade de lacase foi detectada quando adicionado 2 mM de cobre após 4 dias de cultivo, quando a glicose foi quase totalmente consumida do meio. A adição de 2 mM de cobre após a inoculação inibiu parcialmente o crescimento do fungo. Um efeito semelhante foi observado em culturas de *T. multicolor* e *T. trogii* (HESS et al., 2002; LEVIN et al., 2002), com concentração ideal para indução de cobre estabelecida entre 0,5 mM e 2,0 mM. Desta forma, um meio complexo foi estabelecido no presente estudo, composto basicamente de sacarose e milhocina, com a adição de cobre como indutor, o qual possibilitou boa produção de lacase por *P. cinerea*.

5.2.3 Cultivo de *P. cinerea* em meio sintético e imobilização do micélio

P. cinerea foi cultivado por 30 dias em meio Kirk modificado, um dos meios mais utilizados em estudos com fungos ligninolíticos. Neste meio, *P. cinerea* produziu somente 205 U/l de lacase, com 30 dias, e biomassa de 2,43 g/l (Figura 24), valores bem inferiores aos observados durante cultivo em meio complexo. O pH do meio reduziu durante o cultivo.

Figura 24. Produção de lacase por *P. cinerea* em meio Kirk (triângulos), pH do meio (quadrados) e biomassa (círculos). As barras indicam o desvio médio entre triplicatas.

Alternativamente, *P. cinerea* foi cultivado em meio definido para *Trametes* (MDT), um meio sintético que contém xilidina como indutor e Tween 80 que auxiliam na excreção de enzimas. As condições de cultivo incluíram agitação de 180 rpm, à 28°C e a imobilização do

micélio em espumas de poliuretano. A imobilização do micélio protege as hifas contra o estresse mecânico e fornecem um suporte para adesão do fungo, o que de certa forma auxilia no seu desenvolvimento, assim como ocorre naturalmente com este grupo de fungos, durante a colonização da madeira.

Neste meio MDT, *P. cinerea* produziu 122 U/l de lacase, quando cultivado sem suporte. A imobilização foi muito eficiente na produção de lacase. Neste meio MDT, com micélio imobilizado, *P. cinerea* atingiu a maior produção de lacase, chegando a 3505 U/l, com 15 dias de cultivo (Figura 25).

Figura 25. Produção de lacase por *P. cinerea* livre (círculos abertos) e imobilizado em espumas de poliuretano (círculos fechados) em meio definido para *Trametes*. As barras indicam o desvio médio entre duplicatas.

A imobilização do micélio de *P. cinerea* foi responsável pela elevada produção de lacase. Como verificado por microscopia eletrônica de varredura, as hifas de *P. cinerea* são imobilizadas no suporte, que possui uma superfície irregular, de aspecto rugoso, por simples adesão (Figura 26). Conforme *P. cinerea* desenvolve-se, uma trama de hifas é formada. Desde que a nutrição de fungos ligninolíticos e a secreção de metabólitos são realizadas nas extremidades das hifas, a formação de um micélio, com a menor fragmentação de hifas, protegidas pelo suporte, promove um melhor desenvolvimento fisiológico do fungo e menor gasto de energia para recuperação de hifas danificadas por cisalhamento.

Diante dos resultados expressivos, com a maior produção de lacase em meio definido, este meio MDT, juntamente com o micélio imobilizado de *P. cinerea*, foi utilizado para produção de lacase em um fermentador, um reator de tanque agitado.

Figura 26. Micrografia eletrônica de varredura mostrando a imobilização de *P. cinerea* em esponjas de poliuretano por adesão. (A e B) controle, espuma sem fungo (aumento de 200x); (C-L) micrografias com diferentes aumentos mostrando *P. cinerea* imobilizado (C e D, aumento de 200x; E aumento de 205x; F, G e H, aumento de 1000x; I, J e K, aumento de 13000x; L, aumento de 25000x).

5.2.4 Produção de lacase por *P. cinerea* em biorreator

Um reator de tanque agitado, operado em modo batelada, com agitação por pás, aeração, controle de pH e temperatura foi utilizado para produção de lacase por *P. cinerea*. O reator foi previamente esterilizado em autoclave, juntamente com o suporte para imobilização. Logo após a inoculação, todo o micélio ficou aderido ao suporte. Ao final de 10 dias de cultivo, uma extensa massa micelial havia sido formada sobre o suporte, ocorrendo também perda de volume de meio (Figura 27).

Figura 27. Biorreator após a inoculação (A) e com 10 dias de cultivo de *P. cinerea* (B).

A produção de lacase foi monitorada diariamente e o máximo de atividade foi de 130 U/l, com 9 dias de cultivo (Figura 28).

Figura 28. Produção de lacase por *P. cinerea* (círculos preenchidos) e concentração de glicose (círculos abertos) em reator com meio MDT.

Embora se tenha obtido cerca de 3500 U/l neste meio, em experimentos em Erlenmeyer de 250 mL, os níveis de produção de lacase não foram reproduzidos em biorreator, devido, provavelmente, às condições de operação do reator, como agitação e aeração. Neste caso não se observou a imobilização do micélio na espuma, ao contrário, houve a formação de uma densa massa micelial, que dificulta a difusão de oxigênio para todo micélio, reduzindo a produção da lacase. Lu e col. (1996) reportaram a existência de uma forte correlação entre as hifas ramificadas e a expressão e secreção de lacase. A adição de celobiose pode induzir mais ramificações das hifas em certas espécies de *Pycnoporus* e, consequentemente, aumentar a atividade lacase. Esta informação abre novos horizontes para trabalhos futuros de produção de lacase por *P. cinerea* em outros tipos de reatores, como por exemplo, um reator de agitação por bolhas, ou reatores do tipo air-lift, juntamente com a imobilização do micélio em espumas.

5.3 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ISOENZIMAS DE LACASE DE *P. cinerea*

Vários métodos têm sido utilizados para purificação de lacases de cultivos de fungos ligninolíticos. Frequentemente, a purificação consiste em quatro ou cinco passos: inicialmente o extrato de cultivo é concentrado, por precipitação das proteínas com sulfato de amônio ou ultrafiltração, seguindo-se por troca iônica, permeação em gel e/ou cromatografia de afinidade.

Assim como *P. cinerea*, muitos fungos produzem pigmentos, o que pode interferir nos procedimentos de purificação e na atividade da enzima. Em geral, os pigmentos são eliminados pela precipitação com sulfato de amônio ou durante a cromatografia de troca iônica (FUKUSHIMA; KIRK, 1995).

Como passo inicial de concentração de lacases de *P. cinerea*, o extrato (obtido de meio complexo: sacarose 0,5%, milhocina 0,5% e 1 mM de CuSO_4) foi concentrado de três formas: 1) apenas liofilizado; 2) congelado/descongelado/ filtrado, precipitado com sulfato de amônio (80% de saturação) e dialisado; e 3) o extrato filtrado em membrana 0,45 μm foi aplicado diretamente em DEAE-Sepharose e as frações obtidas foram ultrafiltradas em membrana de 3kDa. Das etapas de concentração do extrato com lacases avaliadas, a liofilização não foi recomendada devido ao menor rendimento (48%). Para obtenção de preparados concentrados de lacases, a precipitação com sulfato de amônio configurou-se como bom método, devido ao rendimento e elevada atividade (> 80% de rendimento).

5.3.1 Cromatografia de Troca Iônica

Para separação e purificação das lacases de *P. cinerea*, 100 ml do sobrenadante de cultivo foi aplicado em coluna DEAE-Sepharose, e as frações foram eluídas de duas formas: diretamente com tampão fosfato e 0,2M de NaCl ou através de adições crescentes de NaCl. Na primeira forma, o perfil de eluição na troca aniônica revelou um único pico com atividade de lacase, coletado em três frações (Figura 29 A). SDS-Page e gel de atividade revelaram neste pico, frações com diferentes bandas de proteínas que corresponderam a diferentes isoenzimas de lacase (Figura 29 B e C). Estas frações foram aplicadas em um gel de eletroforese e diferentes bandas puderam ser visualizadas no gel, com massas moleculares entre 91 e 77 kDa e outras duas menores, com massa molar maior que 30 kDa (Figura 29 B). A eletroforese em condições não desnaturantes, revelada com ABTS, evidencia bandas com atividade enzimática na mesma região da eletroforese SDS-Page, evidenciando que a maior parte das proteínas secretadas por *P. cinerea* são lacases (Figura 29 C). O rendimento das três frações com atividade de lacase somam mais de 100%, com um bom fator de purificação, obtendo-se assim um extrato purificado de lacase de 15 mL (6 x menos que o volume inicial de extrato aplicado à coluna de purificação), contendo 13,5 mg de proteínas com atividade total de 55 U (Tabela 27). A concentração de extratos de lacase em DEAE-Sepharose foi considerada excelente, devido ao alto rendimento e purificação.

Figura 29. (A) Perfil de eluição em DEAE-Sepharose de lacases do extrato de *P. cinerea*. Eluição das proteínas com tampão fosfato 10 mM, pH 8,0, 0,2 M de NaCl (frações 22-24). (B) SDS-Page e (C) gel de atividade, com ABTS das frações 22, 23 e 24, obtidas após DEAE-Sepharose. *M* = marcadores moleculares; *CE* = extrato bruto.

Tabela 27 – Purificação de lacase de *P. cinerea* após DEAE-Sepharose.

Etapa	Atividade (U)	Proteínas (mg)	Atividade específica (U mg⁻¹)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	51	105	0,48	100	1,0
<i>Frações após DEAE-Sepharose</i>					
22	8	3,3	2,43	16	5,0
23	34	4,3	8,06	67	16,7
24	13	5,9	2,25	26	4,7

Com o objetivo de separar e caracterizar as isoenzimas de lacases, procedeu-se dois passos cromatográficos para purificação, ambos utilizando colunas de troca aniônica (DEAE-Sepharose e Mono Q). O extrato bruto de *P. cinerea* foi aplicado na mesma coluna de troca iônica, DEAE sepharose CL6B, no pH 8,0, porém a eluição foi feita com concentrações crescentes de NaCl. Após eluição das enzimas, três picos com atividade de lacase foram obtidos (Figura 30 A), os quais apresentaram diferentes bandas em SDS-Page (Figura 30 B), gel de atividade para lacase (Figura 30 C) e IEF (Figura 30 D), obtendo-se uma separação de isoenzimas nesta primeira etapa de purificação.

O pico 1 apresentou uma banda em SDS-PAGE de 72,6 kDa, com *pI* próximo a 6. As frações obtidas no pico 2 foram aplicadas na coluna de troca aniônica Mono Q, pH 5,8, e uma lacase com *pI* próximo de 4 foi separada de outras duas, com *pI* entre 4,5 e 5,25 (Figura 31 A). O pico 3 também foi aplicado separadamente na Mono Q, pré-equilibrada em pH 4,7, e três picos com atividade de lacase foram eluídos (Figura 31 B). No total *P. cinerea* produziu oito isoenzimas de lacase com propriedades diferentes, embora não tenha sido possível isolar todas as isoenzimas (Figura 31 C e D). Lacases com *pI* semelhantes não foram totalmente purificadas a partir de extrato fúngico, à semelhança dos resultados obtidos por Antorini e col. (2002), que encontrou dois picos com atividade de lacase após eluição de extratos de *Pycnoporus cinnabarinus* em DEAE-Sepharose e várias isoenzimas com diferentes *pI*.

Após purificação das lacases em Mono Q o rendimento foi muito baixo (<10%), devido a utilização de amostra com baixo rendimento, consequentemente, com baixa atividade. Desta forma, a etapa inicial de concentração das enzimas é de grande importância, caso o objetivo do trabalho seja a identificação e separação de isoenzimas de lacases. Contudo, foi possível identificar parte do sistema ligninolítico de *P. cinerea*, composto por, no mínimo, oito isoenzimas de lacases. No trabalho realizado com uma espécie de *Peniophora* cinco isoenzimas de lacases foram detectadas por focalização isoeletrica (IEF), com valores de *pI* de: 3,7, 3,8, 4,0, 4,1 e 4,2 (NIKU-PAAVOLA et al. 2004).

No presente estudo também foram avaliados outros componentes do sistema ligninolítico deste fungo: manganês peroxidase, lignina peroxidase, celobiose desidrogenase e atividade redutora de Fe^{3+} . Nenhuma destas atividades foi significativa, exceto lacase, o qual se tornou objeto de estudo.

Figura 30. Purificação de isoenzimas de lacases de *P. cinerea*. A. Perfil de efluência de lacase (U/mL) (linha preta) e absorbância a 280 nm (linha cinza), após eluição com gradiente de 0-0,2 M de NaCl (linha pontilhada) em coluna DEAE-Sepharose, das frações coletadas (0,5 mL). B. Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%, das amostras correspondentes aos picos 1, 2 e 3 obtidas da purificação em DEAE-Sepharose. A revelação do gel foi feita com nitrato de prata. C. Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida 12% das amostras dos diferentes picos de purificação. A revelação foi realizada com ABTS 1 mM em tampão acetato de sódio (pH 4,5, 100 mM). D. IEF nativa a partir de amostras dos picos de atividade de lacase eluída da coluna DEAE-Sepharose. O gel foi revelado com ABTS 1 mM. 1, 2 e 3 = picos detectados após eluição em DEAE-Sepharose. M = marcadores de massa molecular (kDa), CE = extrato bruto.

Figura. 31. Purificação de lacases por cromatografia de troca iônica. Eluição das lacase em uma coluna Mono Q, equilibrada em pH 5,8 (A) e pH 4,7 (B) com um gradiente de NaCl 0-0,2 M. Atividade de lacase (linha preta) e absorbância a 280 nm (linha cinza) foram monitoradas. (C) IEF das amostras correspondentes aos picos de 1 a 5 eluídos nas colunas cromatográficas. (D) Gel de atividade. 1 e 2 = picos eluídos da Mono Q em pH 5,8; 3, 4 e 5 = picos eluídos da Mono Q em pH 4,7.

5.3.2 Recuperação de lacase de *P. cinerea* por sistemas de duas fases aquosas

A extração líquido-líquido utilizando sistemas de duas fases aquosas (SDFA) pode ser uma alternativa promissora aos métodos convencionais de purificação. SDFA tradicionais são preparados pela mistura de soluções aquosas de dois polímeros ou um polímero e um sal. As soluções imiscíveis formam-se a partir de algumas condições críticas, como a temperatura ou a concentração e, conseqüentemente, forma-se um sistema bifásico. Ambas as fases do sistema são compostas principalmente por água (70-90%) e cada fase é enriquecida com um componente diferente. O alto percentual de água presente no SDFA proporciona um ambiente para a recuperação e purificação de materiais biológicos sensíveis, tais como proteínas, células, fragmentos celulares e ácidos nucleicos. A purificação é alcançada quando a

molécula-alvo é predominantemente particionada para uma fase, enquanto as substâncias interferentes particionada para a fase oposta do sistema.

Neste estudo, a recuperação de lacase de *P. cinerea* utilizando fosfato de potássio e o polímero UCON foi avaliada. UCON 50-HB-5100 é um copolímero aleatório ($M_r = 3900$) com 50% de óxido de etileno e 50% de óxido de propileno. A fim de avaliar a interferência de cada componente de SDFA na atividade de lacase de *P. cinerea*, a atividade de lacase foi avaliada juntamente com sais e UCON, nas mesmas concentrações presentes nas fases de equilíbrio ou em concentrações superiores (Tabela 28). Os sais de fosfato revelaram diferentes interferências na atividade de lacase de *P. cinerea*: KH_2PO_4 aumenta a atividade enzimática, enquanto K_2HPO_4 e tampão fosfato de potássio (KPB) inibiram fortemente a atividade. O pH das soluções dos sais pode desempenhar um papel importante na atividade de lacase. Desde que lacases são enzimas com maior atividade em meio ácido, nenhuma atividade enzimática foi observada na presença de sais de fosfato com pH mais elevado. Na presença de KH_2PO_4 , a atividade de lacase de *P. cinerea* foi estimulada. De acordo com os resultados, UCON causa pouca interferência na atividade enzimática quando presente em concentração próxima a encontrada nas fases de equilíbrio.

Tabela 28 – Influência dos constituintes de SDFA na atividade de lacase de *P. cinerea*.

Constituinte	pH	Teor do constituinte (%)	Atividade relativa (%)
KH_2PO_4	4,60	7,5	153
		15	161
K_2HPO_4	9,46	10	0
		20	0
KPB	7,09	14	2
		7	1
UCON	-	25	89
		50	24

A partição de lacase comercial em SDFA constituído de sais fosfato e UCON foi previamente avaliada (SILVÉRIO et al., 2010a), bem como o diagrama de fases estabelecido para estes sais e UCON (SILVÉRIO et al. 2010b). A partição de lacase de *P. cinerea* em extrato obtido de cultivo em meio complexo é mostrada na Figura 32. Os coeficientes de partição (k) foram obtidos a partir da razão entre a concentração de proteína na fase superior

pela concentração de proteína na fase inferior. A partição de lacase ocorreu preferencialmente para a fase inferior, fase salina.

Figura 32. Coeficientes de partição obtidos para lacase de *P. cinerea* nos SDFA estudados, sais de potássio e UCON.

A recuperação da atividade de lacase de *P. cinerea* na fase inferior foi calculada para todos os SDFA como a relação entre as unidades de atividade de lacase (U), medido na fase de fundo, e unidades de atividade de lacase adicionado ao sistema bifásico. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 28. Elevados valores de recuperação foram obtidos nos SDFA UCON/KPB e UCON/KH₂PO₄ (como mostrado na Tabela 29). Este fato pode ser explicado pela possível eliminação, para a fase superior, de algumas impurezas (como pigmentos), que poderiam inibir a atividade enzimática. Os espectros de varredura obtidos nas fases superior e inferior apoiam essa teoria, que demonstraram maiores valores de ABS a 280 nm na fase superior (dados não mostrados). Ainda, o sistema tamponado, em pH 7,0, favoreceu a recuperação da atividade de lacase.

Tabela 29 – Recuperação de lacase de *P. cinerea* (%) na fase inferior dos SDFA UCON-sais de fosfato.

Sistema de duas fases aquosas	Recuperacao (%)
UCON / K ₂ HPO ₄	68
UCON / KPB	191
UCON / KH ₂ PO ₄	89

P. cinerea produz níveis consideráveis de lacase em meio complexo. No entanto, os resíduos e impurezas presentes no extrato bruto são indesejáveis para algumas aplicações. Nesta etapa do trabalho, os SDFA compostos por UCON e sais de fosfato de potássio foram avaliados em continuidade aos estudos de Silvério e col. (2010a) e Silvério e col. (2010b) para a recuperação e purificação de lacases. Os resultados obtidos mostraram alta recuperação de lacase na fase inferior em um sistema com UCON e tampão fosfato de potássio, enquanto algumas impurezas pareciam ser eliminadas na fase superior. Mais estudos devem ser realizados para confirmar a eficiência da purificação de lacase de *P. cinerea* por SDFA. Contudo, nesta abordagem preliminar, SDFA demonstrou ser uma alternativa promissora para a recuperação e purificação de lacase.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DE LACASES DE *P. cinerea*

5.4.1 Propriedade das isoenzimas de lacase de *P. cinerea*

As propriedades das isoenzimas de lacases de *P. cinerea* purificadas foram estabelecidas. As isoformas de lacase apresentaram diferenças na massa molar, pH ótimo, parâmetros cinéticos, estabilidade a 50°C, *pI* e diferentes graus de inibição pelo NaCl. Aqui denominamos lacases A, B, C, D, E e F, conforme a ordem de purificação (Tabela 30). As características das lacases purificadas estão de acordo com dados disponíveis na literatura (Tabela 31).

Tabela 30 – Propriedades bioquímicas de isoenzimas de lacases de *P. cinerea*.

Lacases	MM (kDa)	<i>pI</i>	pH ótimo	T _{1/2} 50°C (h)	K _m (μM)	I ₅₀ NaCl (mM)
Lacase A	53.6	6,0	4,0	19,4	12,7	421
Laccase B	51.9	4,0	3,0	<0,5	20,0	312
Lacase C	57.2	3,0	3,2	34,4	15,6	358
Lacases D, E	51.9	4,5, 5,25	2,6	11,9	-	-
Lacases F, G,H	45.5, 38.6, 37.4	3,0	2,6	8,3	-	-

Tabela 31 – Propriedades físico-químicas de lacases

Fonte de lacase	MM (kDa)	pI	pH ótimo	Substrato para atividade (K_m em mM)	Referência
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> L1	71	3,4	3	ABTS (0,03) Guaiacol (1,6) ac. siríngico (0,13)	Fukushima e Kirk (1995)
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> L2	68	4,8	3	ABTS (0,02) Guaiacol (0,44) ac. siríngico (0,1)	Fukushima e Kirk (1995)
<i>Coprinus friesii</i>	~60	3,5	5	ABTS (0,0414)	Heinzkill e col. (1998)
<i>Coprinus cinereus</i>	58	4	4 6,5	ABTS (0,023) Siringaldazina (0,026)	Schneider e col. (1999)
<i>Coriolus hirsutus</i>	73	7,4	2,5 4	ABTS (0,0567) DMF (0,053) Siringaldazina (0,1427) ac. ferúlico (0,0168) Guaiacol (0,0109) Catecol (0,0399) ac. sinapílico (0,0112) <i>p</i> -fenilenodiamina (0,0501) Dimetoxihidroxiacetofenona (0,0605)	Shin e Lee (2000)
<i>Coriolopsis rígida</i>	66	3,9	2,5 3	ABTS (0,012) DMF (0,328)	Saparrat e col. (2002)
Linhagem I-4 (Chaetomiaceae)	73 à 80	3,5	7	Siringaldazina (0,009) ABTS (0,652) Guaiacol (0,016) DMF (0,012) Catecol (1,015) Hidroquinona (0,123) Pirogalol (0,023)	Saito e col. (2003)
<i>Panaeolus sphinctrinus</i>	~60	<3,55	3	ABTS (0,0324)	Heinzkill e col. (1998)
<i>Panaeolus papilionaceus</i>	~60	≤3,6	3	ABTS (0,0506)	Heinzkill e col. (1998)
<i>Peniophora</i> sp.	63	4,1	4	Guaiacol	Niku-Paavola e col. (2004)
<i>Peniophora</i> sp. UD4	62	nd	4 6 6 4,5	ABTS (0,0123) Guaiacol (0,251) DMAB-MBTH (7,974) Ácido siríngico (0,026)	Jordaan e col. (2004)
<i>Phellinus ribis</i>	76	nd	4-6 5 6	DMF (0,038) ABTS (0,207) Siringaldazina (0,011)	Min e col. (2001)
<i>Pleurotus ostreatus</i> D1	nd	nd	4 4 7	ABTS (0,11) DMF (0,43) Siringaldazina (0,0087)	Pozdnyakova e col. (2004)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (POXA1)	61	6,7	3	ABTS (0,09)	Palmieri e col. (1997)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (POXA2)	67	4	3 6	ABTS (0,12) Guaiacol (3,1)	Palmieri e col. (1997)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (POXC)	nd	nd	3 6	ABTS (0,28) Guaiacol (1,2)	Palmieri e col. (1997)
<i>Polyporus pinsitus</i>	66	≤3,5	3	ABTS (0,0223)	Heinzkill e col. (1998)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	81	3,7	4	Guaiacol (0,75)	Eggert e col. (1996)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	55	5,2	2,4	ABTS (0,22)	Ryan e col. (2003)

Continua

Conclusão

Fonte de lacase	MM (kDa)	pI	pH ótimo	Substrato para atividade (K_m , em mM)	Referência
<i>Trametes trogii</i>	62	4,3 e 4,5	2	ABTS (0,05 e 0,03)	Zouari-Mechichi e col. (2006)
<i>Trametes versicolor</i>	85	nd	5,5	ABTS	Brown e col. (2002)
<i>Trametes villosa</i>	63	3,5 e 6 à 6,5	5 a 5,5	Siringaldazina	Yaver e col. (1996)
			≤2,7	ABTS	
<i>Trichophyton rubrum</i> LKY-7	65	4	3	ABTS (0,045)	Jung e col. (2002)
			3,5	Guaiacol	

5.4.2 Estabilidade e tolerância de lacase de *P. cinerea* ao NaCl

Neste ensaio de halotolerância ao NaCl foram utilizadas as lacases de *P. cinerea*, que eluíram em um único pico da coluna DEAE-Sepharose (Figura 29 A). Além da lacase de *P. cinerea* (*lac Pc*), duas lacases comerciais, uma obtida de *Aspergillus* da Novozymes (*lac novo*) e outra comercial fornecida por uma indústria de papel e celulose (*lac comercial*), foram avaliadas. *Lac novo* e *lac comercial* mantiveram apenas 16 e 25% da atividade em reação com ABTS contendo 1 M de NaCl, respectivamente, enquanto a *lac Pc* teve 47% da atividade (Figura 33 A). Em 10 min de incubação de *lac novo* e *lac comercial* em 1 M de NaCl, apenas 27 e 16% de atividade residual foi detectada, respectivamente, permanecendo nesse percentual até o final de 24h. *Lac Pc* manteve 100% da atividade até 4h em 1 M de NaCl (Figura 33 B) e 70% ao final de 24h.

Figura 33. Efeito do NaCl na atividade (A) e na estabilidade (B) de lacases de *P. cinerea* (triângulos abertos), lacase comercial (círculos abertos) e lacase de *Aspergillus* (Novozymes) (círculos fechados).

A baixa inibição de lacases por NaCl pode ser atribuída ao acesso limitado ao agrupamento dos átomos de cobre tipo 2 e 3 (T2/T3) no sítio ativo, onde ocorre redução do oxigênio molecular à água. A ligação dos sais no sítio trinuclear de cobre, T2/T3, é diferente entre várias lacases (SHLEEV et al., 2004; SHLEEV et al., 2005).

A variação observada na I_{50} ao NaCl de lacases de *P. cinerea* indica uma diferença significativa entre as lacases produzidas. Enquanto a lacase de planta *Rhus* poderia ter um canal "bem aberto", que conduz ao sítio T2/T3, lacases fúngicas parecem ter canais T2/T3 com um "cut-off de diâmetro" mais definido, que corresponde ao diâmetro do Cl^- hidratado. Lacases de *Sclerotium rolfsii* e *Coprinus cinereus* apresentaram I_{50} NaCl de 52 e 200 mM,

respectivamente (SCHNEIDER et al., 1999; RYAN et al., 2003). Contudo, a inibição parece ser reversível.

5.4.3 Atividade de lacases na presença de diferentes sais

Devido a característica de tolerância de lacase de *P. cinerea* ao NaCl, outros sais foram avaliados para efeito na atividade da enzima. Xu (1996) mostrou que lacases diferentes podem ter tolerância muito diferente para a inibição de haletos de várias espécies. A inibição é limitada principalmente pelo tamanho do suposto canal que leva ao sítio T2/T3.

A hidrogenação dos sais, os quais definem o pH em solução, influenciaram a atividade das lacases. A lacase não foi ativa quando o tipo de sal promoveu a alcalinidade do meio. Alguns sais como o sulfato de amônio, dihidrogenofosfato de potássio, dihidrogenofosfato de sódio e o ácido cítrico, estimularam a atividade da lacase de *P. cinerea*, apesar de não estimularem as atividades das outras lacases avaliadas (Tabela 32).

Tabela 32 – Influência de diferentes sais nas atividades relativas de lacases (%) de *P. cinerea*, *T. versicolor* e lacase comercial (Sigma).

Solução de sais	pH	%	Lacases		
			<i>P. cinerea</i>	<i>T. versicolor</i>	comercial
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,75	10	173	98	96
		20	192		75
KH ₂ PO ₄	4,60	7,5	153	103	109
		15	161		120
K ₂ HPO ₄	9,46	10	0	0	0
		20	0		0
Tampão KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	7,09		2	0	0
NaH ₂ PO ₄	4,23	10	161	107	116
		20	167		95
Na ₂ HPO ₄	9,11	4	0	0	0
		7	0		0
Tampão Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	7,12		2	0	1
C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O	1,78	10	175	34	36
		20	44		20
C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ .2H ₂ O	8,46	10	9	2	5
		20	1		2
Tampão C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ .2H ₂ O/ C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O	7,10		60	72	51

5.4.4 Eficiência de mediadores de lacase de *P. cinerea*

Na maioria das aplicações biotecnológicas com lacase exige-se um mecanismo catalítico com mediador. No presente estudo, diferentes mediadores, naturais e sintéticos, foram avaliados na atividade de lacase de *P. cinerea*. A seleção de mediadores baseou-se na descoloração do corante Reactive Blue 19 pela enzima. Foram avaliados os mediadores, HBT, ABTS, HBA, siringaldeído (SA), DOPAC e 2,3DHBA (Tabela 33). Entre estes mediadores, SA foi o mediador mais eficiente, com uma taxa de descoloração de aproximadamente três vezes maior do que o HBT ou o HBA. Nenhuma atividade notável foi detectada com DOPAC e 2,3 DHBA. Os resultados são consistentes com o estudo de Camarero e col. (2007) que constatou que o siringaldeído foi mais eficiente que o HBT para descoloração de corante recalcitrante. SA e acetosiringona foram anteriormente descritos como mediadores naturais de lacase, menos tóxico do que os mediadores sintéticos, como o ABTS e HBT (CAMARERO et al., 2005). Apesar do HBT ser considerado o mediador de lacase mais eficiente para descoloração de corantes, biobranqueamento, deslignificação e biorremediação (COUTO; HERRERA, 2006; KUNAMNENI et al., 2008; WIDSTEN; KANDELBAUER, 2008), sabe-se que a oxidação do HBT gera um intermediário altamente instável, um radical N-OH, que rapidamente se decompõe em produto (s) secundário (s) cataliticamente inativo, como o benzotriazol, o que representa um aspecto negativo no tratamento de efluentes (MOROZOVA et al., 2007).

Tabela 33 – Seleção de mediadores de lacase de *P. cinerea* baseado na descoloração de Reactive Blue 19 como substrato.

Mediador	Concentração do mediador (mM)			
	0,1		1,0	
	Atividade ($\mu\text{mol/min.L}$)	Atividade relativa (%)	Atividade ($\mu\text{mol/min.L}$)	Atividade relativa (%)
Controle	36,47	100	36,47	100
HBT	39,71	109	39,71	108
HBA	35,66	98	52,19	143
Siringaldeído	106,16	291	134,42	369
2,3 DHBA	1,62	4	10,53	29
DOPAC	4,86	13	29,98	82

O efeito de oxalato de Mn^{2+} foi avaliado em reação com lacase e o mediador natural SA para descoloração do Reactive Blue. Este sistema associado à lacase de *P. cinerea*,

promoveu a descoloração 4,8 vezes maior ($178 \text{ mmol min}^{-1} \text{ L}^{-1}$) do que o controle com apenas lacase (Figura 34). Lacases de *P. cinerea* foram capazes de oxidar diretamente Mn^{2+} , como revelado pelo aumento da absorbância a 270 nm. A reação do Mn^{3+} formado com oxalato de sódio (1 mM) e lacase (1 U/mL) produziu $53,1 \text{ } \mu\text{M}$ de oxalato- Mn^{3+} , similar aos resultados obtidos por Schlosser e Höfer (2002), com lacase de *S. rugosoannulata*. No entanto, a capacidade de lacase em oxidar Mn^{2+} na ausência de mediador parece estar restrita a algumas poucas lacases, como lacases de *Pleurotus eryngii* (MUÑOZ et al., 1997) e *Trametes versicolor* (HOFFER; SCHLOSSER, 1999).

Figura 34. Efeito de oxalato de Mn^{3+} e siringaldeído (SA) na descoloração do Reactive Blue 19 por lacase de *P. cinerea*. Controle: reação com lacase sem mediador.

A oxidação de diferentes fenóis e hidroquinonas aos respectivos radicais fenoxi e semiquinones, catalisada pela lacase, também pode levar à formação de Mn^{3+} a partir de Mn^{2+} (HOFFER; SCHLOSSER, 1999; SCHLOSSER; HÖFER, 2002). Em reação com mediador, provavelmente, o radical fenoxi de SA oxida Mn^{2+} a Mn^{3+} que, juntamente com lacase de *P. cinerea*, aumenta a taxa de descoloração do corante. Este sistema tem um potencial redox alto o suficiente para oxidar compostos geralmente não oxidados por lacase sozinha. Além disso, este sistema, na presença de determinados ácidos orgânicos, pode gerar peróxido de hidrogênio e contribuir para atividade de MnP, numa ação sinérgica.

5.4.5 Sinergia entre lacase de *P. cinerea* e MnP

As enzimas do complexo lignocelulolítico geralmente atuam de forma cooperativa, possibilitando assim a completa conversão de substratos lignocelulósicos. As enzimas hidrolíticas atuam sinergicamente para sacarificação da biomassa (LEONOWICZ et al. 1999). As enzimas oxidativas também atuam de forma sinérgica na oxidação de substratos embora alguns mecanismos ainda estão sendo esclarecidos.

Glioxal oxidases e superóxido dismutases geralmente atuam de forma coordenada, cooperando com as enzimas ligninolíticas, celulasas e hemicelulasas (LEONOWICZ et al. 1999, HENRIKSSON et al., 2000; GONZALES et al. 2002; HARREITHER et al., 2009). Ação sinérgica entre CDH e lacase foi observada em reações utilizando corantes reativos como substratos, promovendo maior percentual de descoloração comparada à lacase isoladamente (VANHULLE et al., 2007; CIULLINI et al., 2008; ENAYATZAMIR et al., 2009).

Uma ação sinérgica entre lacase de *P. cinerea* e MnP de *Ceriporiopsis subvemispora* foi demonstrada utilizando o Reactive Blue 19 como substrato da reação. A Figura 35 apresenta a catálise do Reactive Blue 19 por diferentes reações: MnP + H₂O₂ + Mn²⁺ lactato ou lactato (reação padrão de MnP); lacase, mediadores e Mn²⁺ quelados (reação padrão de lacase) e lacase, mediadores, Mn²⁺, MnP e ausência de H₂O₂, considerando que o H₂O₂ é gerado pela ação de lacase durante degradação de ácido orgânico na presença de Mn²⁺ (efeito sinérgico). O H₂O₂ gerado nesta última reação permite uma contribuição de atividade de MnP durante a catálise.

A MnP de *Ceriporiopsis subvemispora* não descoloriu significativamente o corante quando lactato é utilizado como quelante (Figura 35, linha vermelha), no entanto, quando oxalato é usado como quelante uma taxa de descoloração é observada (linha rosa), quase na mesma velocidade de reação que lacase sozinha descolore o corante (linha azul). Lacase com SA e Mn²⁺ com quelante descolore eficientemente o corante (linhas azuis claro e escuro), porém quando ambas enzimas são adicionadas à reação, ocorre aumento na velocidade de catálise (linhas verdes). Nas reações com lacase junto com MnP, H₂O₂ não foi adicionado a mistura de reação, e uma aumento na velocidade de catálise foi observado, o que não ocorre com MnP sozinha, que necessita de H₂O₂ para sua atividade. Assim, é evidenciada uma ação sinérgica entre as duas enzimas.

Figura 35. Descoloração de Reactive Blue 19 por diferentes sistemas. Nos ensaios foram usadas lacase de *P. cinerea* (0,1 U) e MnP de *Ceriporiopsis subvermispora* (0,1 U) na presença de ácidos orgânicos, oxalato (15 mM) ou lactato (15 mM), Mn^{2+} (0,1 mM) e SA (siringaldeído, 1 mM).

Lacases são capazes de degradar ácidos orgânicos, como oxálico e málico, através da geração de Mn^{3+} . A decomposição do ácido orgânico gera espécies reativas de oxigênio, ao final das reações subsequente, gera-se H_2O_2 , conforme mecanismo descrito por HOFFER e SCHLOSSER (1999), contribuindo assim para a atividade de MnP. O mecanismo de geração de H_2O_2 através da degradação de ácido oxálico é demonstrado abaixo:

Um esquema de geração de H_2O_2 através da degradação de oxalato por lacase é mostrado na Figura 36. Todos estes mecanismos oxidativos aumentam a atuação de lacases e eficientemente degradam até mesmo as estruturas mais recalcitrantes de lignina.

Figura 36. Geração de H_2O_2 resultante da oxidação de Mn^{2+} por lacase, na presença de oxalato, e a contribuição para atividade de MnP (SCHLOSSER; HÖFER, 2002).

O resultado de descoloração de Reactive Blue 19 com lacase e MnP abre a possibilidade de utilização conjunta destas enzimas sem a requisição da adição de H_2O_2 às reações, característica desejável para bioprocessos, já que o peróxido de hidrogenio se degrada facilmente e neste caso teria que ser adicionado continuamente durante as reações. Ambas enzimas possuem praticamente o mesmo potencial de oxidação em reações com mediadores. A incorporação de outros mediadores eficientes, como o ácido linolêico favorece tanto a atuação de lacase quanto MnP. Contudo a adição de ácidos orgânicos e Mn^{2+} é necessária na reação, e uma grande limitação é a produção em larga escala de MnP.

5.5 DESCOLORAÇÃO DE CORANTES REATIVOS POR LACASE DE *P. cinerea*

A descoloração de corantes reativos por lacases fúngicas é estudada há quase três décadas. Com o passar do tempo muitos mecanismos bioquímicos foram elucidados durante a biodescoloração. Enzimas, compostos de baixa massa molecular e reações não enzimáticas, como Fenton, participam da descoloração. Porém, baixa correlação entre os níveis de atividade de lacase e a descoloração dos corantes reativos são reportados devido à complexidade do metabolismo fúngico, como a regulação da secreção de enzimas, participação de enzimas intracelulares, adsorção de corantes ao micélio nos estudos in vivo, compostos inibidores enzimáticos e compostos de baixa massa molecular (MILAGRES et al.,

2002; TINOCO et al., 2001; ARANTES; MILAGRES, 2007; MOLDES et al., 2004; CIULLINI et al. 2008). No entanto, os extratos de *P. cinerea*, obtidos de diferentes condições de cultivo em meio complexo, demonstraram uma boa correlação entre os níveis de atividade de lacase (estas ultimas demonstradas anteriormente na Tabela 26) e a descoloração do Reactive Blue 19 (Figura 37), revelando as maiores taxas de descoloração do Reactive Blue 19 e do Reactive Blue 13 (Tabela 34) com extratos provenientes de cultivos suplementados com milhocina.

Figura 37. Correlação entre atividades de lacase e descoloração do Reactive Blue 19 por extrato contendo lacases obtidos com 7 (A) e 14 dias de cultivo (B) em diferentes meios de cultivo.

Tabela 34 – Descoloração do Reactive Blue 19 e Reactive Blue 13 (μmol/min.l) por extratos de *P. cinerea* obtidos em diferentes condições de cultivo com 7 e 14 d.

Condição de cultivo*	Reactive Blue 19 (UI ⁻¹) ¹		Reactive Blue 13 (UI ⁻¹) ²	
	7d	14d	7d	14d
Glic + EL	0,6	0,9	31	29
Glic + Mil	5,8	10,0	131	269
Sac + Mil	6,4	9,3	126	167
BgC + EL	3,6	4,4	109	98
BgC + Mil	8,3	10,1	210	367
Euc + EL	1,7	1,8	75	40
Euc + Mil	5,2	8,2	296	188

*Glic = glicose, Sac = sacarose, EL = extrato de levedura, Mil = milhocina, BgC = bagaço de cana-de-açúcar moído, Euc = aparas de madeira de eucalipto moída. A reação foi conduzida em cubetas de 1 ml, contendo 140 μg/ml de Reactive Blue 19 ou 75 μg/ml de Reactive Blue 13.

Lacases de *P. cinerea* (eluídas em um só pico da coluna de DEAE-Sepharose – Figura 29 A) foram avaliadas para descoloração do Reactive Blue 19 (140 $\mu\text{g/ml}$), em diferentes atividades de lacase na reação (0,1 a 0,5 U/ml), evidenciando uma maior descoloração com as maiores concentrações de lacase (Figura 38 A). Observa-se que ocorre um aumento da velocidade de reação quando siringaldeído é adicionado, no entanto, o produto final apresenta uma absorbância intensa a 530 nm, indesejável para descoloração de corantes e efluentes (Figura 38 B).

Figura 38. A. Cinética de descoloração do Reactive Blue 19 (140 $\mu\text{g/ml}$) por lacase (0,1 ou 0,2 U) com e sem siringaldeído (1 mM). B. Varredura espectral, 200-700 nm, após reação de descoloração do Reactive Blue 19 com lacase e mediadores.

A descoloração do Reactive Blue 19 por lacases isoladas tem sido evidenciada em diversos estudos (CHAMPAGNE; RAMSAY, 2005; WONG; YU 1999; SOARES et al., 2001; NAGAI et al., 2002; MECHICHI et al., 2006; LU et al., 2007). *P. cinerea* apresentou valores de catálise do Reactive Blue 19 muito superiores aos dados disponíveis na literatura (Tabela 35).

Tabela 35 – Descoloração do Reactive Blue 19 por lacases

Origem da lacase	Concentração do corante	Atividade de lacase	Descoloração	Tempo de descoloração	Referência
<i>Fome lignosus</i> expressa em <i>Pichia pastoris</i> GS115 (Lse)	40 µM	0,6 U/mL	30% e 100% com mediador (ácido violúrico 200 µM)	6h (sem mediador) 1h (com mediador)	Hu e col. (2009)
<i>Trametes trogii</i>	100 mg/L	0,2 U/mL	97%	2,5h (sem mediador)	Mechichi e col. (2006)
<i>Trametes trogii</i> (lac imobilizada)	133 mg/L	0,5 U/mL	44%	42h	Osma e col. (2010b)
Mistura de duas lacases de <i>Pleurotus ostreatus</i> (POXC/POXA3)	150 µM	1 U/mL	~90%	100 min	Palmieri e col. (2005)
<i>Aspergillus</i> modificado (Novo Nordisk)	20 mg/L	10 U/mL	20%	20 min com mediador (ácido violúrico, 5.7mM); sem mediador não houve descoloração	Soares e col. (2001)
<i>Dichomitus squalens</i>	150 mg/L	3,23 mU de MnP e 0,20 mU de Lac	~90%	75 min	Susla e col. (2008)

Outro corante têxtil, utilizado na indústria, Reactive Red 271 (azóico), não foi descolorido em reações somente com lacase, porém, o corante foi completamente descolorido pelo sistema lacase-siringaldeído ou pelo sistema conjunto com oxalato de Mn^{2+} , em menos de 10 min (Figura 39). Contudo, a velocidade de reação atingiu seu máximo com mediadores,

impossibilitando diferenciar os tratamentos lacase-siringaldeído e lacase-siringaldeído-oxalato de Mn^{2+} .

Figura 39. A. Cinética de descoloração do Reactive Red (70 $\mu\text{g/ml}$) por lacase (0,2 U) com e sem siringaldeído (1 mM). B. Varredura espectral, 200-700 nm, após reação de descoloração do Reactive Red 271 com lacase e mediadores.

O corante Reactive Red 271 foi recalcitrante à atuação de lacase sozinha, provavelmente devido a dois fatores, impedimento estérico e capacidade oxidativa da lacase, como observado para outras lacases. Com adição de siringaldeído à reação, o corante azóico foi totalmente descolorido em 5 min de reação com 0,5 U de lacase. A maioria das lacases oxida corantes azóicos somente na presença de mediador (MURUGESAN et al., 2006). Por outro lado, MnP pode não descolorir corantes antraquinônicos, porém descolore eficientemente corantes azóicos (MIELGO et al., 2003; CHAMPAGNE; RAMSAY, 2005).

A capacidade oxidativa destas lacases de *P. cinerea* pode ser considerada atraente para o desenvolvimento de um bioprocesso com estas enzimas, comparado aos resultados obtidos com outras lacases fúngicas (Tabela 34).

5.6 DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTES TÊXTEIS, SIMULADO E REAL, POR LACASE DE *P. cinerea*.

Os efluentes de indústrias têxteis apresentam um pH elevado, limitando a ação de muitos fungos e suas enzimas. Para tanto, foi avaliado o desenvolvimento de *P. cinerea* em meio complexo, com sacarose e milhocina, mas com pH inicial 8,4.

P. cinerea foi capaz de crescer e produzir lacase durante o cultivo em pH 8,4, embora os níveis de lacase sejam inferiores aos observados em meio controle, sem ajuste do pH (Figura 40). Com 10 dias de cultivo observou-se redução do pH para 6,7, e redução para 6,0 ao final do cultivo. A maior atividade de lacase ocorreu quando o pH do meio estava em 6,0 e não havia mais variação significativa. A análise de ácidos orgânicos, analisados por HPLC, detectou a presença do ácido oxálico, málico e succínico no cultivo de *P. cinerea* em condições alcalinas, enquanto o mesmo não ocorreu com amostras provenientes de cultivo sem ajuste de pH. Esta característica do fungo em crescer e reduzir o pH do meio é importante devido a possibilidade de tratamento de efluentes têxteis com fungos. Os efluentes podem apresentar pH acima de 8,0.

Em seguida foi preparado um efluente simulado contendo o corante azóico Reactive Red 271 hidrolisado (pH 12) e avaliada a descoloração pelos cultivos de *P. cinerea*, bem como suas respostas fisiológicas à introdução do efluente durante o cultivo. *P. cinerea* foi então inoculado em meio complexo (sacarose, milhocina e cobre) e após 10 dias de incubação o efluente foi adicionado ao cultivo. Como controle de adsorção foi avaliada a descoloração por extratos livres de micélio, após remoção do fungo por filtração. O corante foi totalmente descolorido após 24 h, ocorrendo transformação em sua estrutura, devido a um aumento na absorbância na região do UV até 72 h. Após 96 h o pico detectado na região do UV decresce novamente (Figura 41 A). Na descoloração in vitro, nas mesmas condições, porém, sem a presença do fungo, o extrato fúngico contendo lacases obtiveram o mesmo perfil de descoloração em 24 h. Assim, podemos afirmar que a descoloração envolvendo o micélio fúngico é realizada predominantemente por lacases extracelulares, com pouco ou nenhuma influência de adsorção ao micélio. Ainda, comprando a descoloração in vivo com in vitro, observamos que durante a descoloração in vivo o fungo permanece ativo, em fase estacionária e produzindo lacases, porém em níveis menores ao observado em cultivo sem fungo (Figura 41 B).

Figura 40. Crescimento (círculos), pH do meio (quadrados) e atividade de lacase (triângulos) durante o cultivo de *P. cinerea* em em sacarose e milhocina com pH inicial 8,4 (A) e sem ajuste de pH (pH = 4,5) (B).

Figura 41. (A) Varredura espectral (200-700 nm) indicando descoloração do Reactive Red (100 mg L^{-1}) por extratos de *P. cinerea*, in vitro (0-24h) e por cultivo fúngico, in vivo (0-96h). (B) Foto: descoloração do Reactive Red após 24h.

O efluente simulado com Reactive Red, além de rapidamente descolorido por *P. cinerea*, não inibiu seu crescimento, porém, máxima produção de lacase foi de 675 UL^{-1} (Figura 42).

Os resultados obtidos no presente estudo são de grande relevância e promissores para futura aplicação em escala industrial, uma vez que tem sido desejado o desenvolvimento do processo de descoloração de efluente com redução do tempo de tratamento, para diminuir os custos de investimento (FARACO et al., 2009). Algumas técnicas foram desenvolvidas para amenizar o impacto negativo do efluente ao tratamento fúngico. Além disso, os resultados obtidos no presente estudo são similares ou melhores comparado com outros estudos (Tabela 36).

A

B

Figura 42. Crescimento (círculos), pH (quadrados) e atividade de lacase (triângulos) durante o cultivo de *P. cinerea* em meio complexo (sacarose 0,5%, milhocina 0,5% e CuSO_4 1 mM), com adição de efluente sintético no 10º dia (indicado por seta) (A) e controle, sem adição de efluente (B). O efluente com Reactive Red foi hidrolisado (80°C por 4h com 2M NaOH, para pH 12,0). A produção de lacase foi induzida por cobre (1 mM) no quarto dia de cultivo.

Tabela 36 – Descoloração de efluentes simulados e reais por basidiomicetos.

Organismo	Efluente	Descoloração (% e tempo)	Referencia
Enzimas de <i>Irpex flavus</i>	Reactive Red	90% - 2h	Chander e col. (2004)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Efluente simulado	45% - 24h 60% - 7d	Faraco e col. (2009)
<i>Bjerkandera adusta</i>	Efluente simulado	94% - 7d	Mohorcic e col. (2006)
<i>Trametes versicolor</i>	Efluente real com corantes antraquinônicos	95% - 10h	Ramsay e Goode (2004)
<i>Clitocybula dusenii</i>	Efluente real diluído (4x)	20d	Wesenberg e col. (2002)
Extratos enzimáticos combinados de <i>Pleurotus florida</i> e <i>Agaricus bisporus</i>	Efluente de industria de papel	90% - 24h	Shanmugam e col. (2005)
<i>P. sajor-caju</i>	Efluente municipal contendo corantes reativos	100% - 15d	Dellamatrice e col. (2005)

Extrato livre de células apresenta algumas vantagens em relação à utilização de células microbianas em biocatálise, por exemplo, especificidade por substrato único, capacidade de atividade catalítica na presença de substâncias tóxicas, atividade em diferentes condições ambientais (temperatura, pH, alta força iônica, alta e baixa concentrações de compostos orgânicos). Porém, se a enzima for utilizada para tratamento de compostos tóxicos, atenção deve ser dada para verificar se produtos menos nocivos sejam realmente formados (KATURI et al., 2009).

Ainda, no caso de corantes reativos, reações de C-hidroxilação, N-hidroxilação e desmetilação podem ocorrer entre os grupos nucleofílicos do DNA, como por exemplo, no nucleosídeo guanossina, assim, os corantes reativos podem ocasionar mutação induzida nos fungos (CARNEIRO, 2007). Certamente, esse aspecto representa uma vantagem na utilização de preparações enzimáticas contra a utilização de culturas fúngicas, suscetíveis à toxicidade e mutagenicidade de um efluente real.

O uso de preparações de extratos enzimáticos brutos contendo enzimas ligninolíticas ou enzimas purificadas e imobilizadas é considerado promissor para a descoloração dos efluentes têxteis (COUTO et al., 2005; MURUGESAN et al., 2007; MURUGESAN et al., 2009; MECHICHI et al., 2006; MURUGESAN et al., 2006; NYANHONGO et al., 2002; RODRÍGUEZ et al., 1999). MnP purificada de *Bjerkandera adusta* foi mais eficiente em

descolorir corantes têxteis do que o cultivo fúngico, o qual exigiu baixas concentrações dos corantes para crescimento (MOHORČIČ et al., 2006).

As lacases de *P. cinerea* obtidas da eluição em um único pico da coluna em DEAE-Sephadex foram avaliadas para a descoloração do efluente têxtil real. Nenhuma descoloração do efluente por lacase foi observada em reação sem mediador. Porém, em reações com mediadores, em reação com siringaldeído e oxalato de Mn^{2+} , conforme verificado anteriormente, evidenciou-se a eficiência desse sistema oxidativo com lacase de *P. cinerea* na descoloração. Este modo de tratamento foi eficiente, ocorrendo descoloração gradual do efluente, atingindo cerca de 54,6% de descoloração com 72 h de tratamento (Figura 43).

Figura 43. Descoloração de efluentes têxtil real pelo sistema lacase-siringaldeído-oxalato de Mn^{2+} .

Uma das vantagens da utilização de lacase, diferente de peroxidases, é que as reações não necessitam de H_2O_2 para atividade enzimática. Além disso, as enzimas que utilizam O_2 como aceptor de elétrons são mais interessantes devido a fácil introdução do O_2 nas reações e possibilidade de controlar a atividade enzimática pelo ajuste dos níveis de O_2 (HILDEN et al., 2009). A elevada termoestabilidade de lacase também é uma característica importante, pois a hidrólise dos corantes reativos para fixação às fibras é realizada em temperatura elevada, assim, os efluentes inicialmente estão com temperaturas elevadas, o que destaca a procura de enzimas termoestáveis para o tratamento.

Lacases produzidas por *P. cinerea* são promissoras para aplicação na descoloração de corantes reativos. No esforço da realização deste trabalho não foram encontradas informações

técnicas ou científicas descrevendo o tratamento de efluente têxtil, na planta industrial, com lacases. Assim como lacases, muitos estudos demonstram a aplicação de processos oxidativos avançados no tratamento de efluentes têxteis, como fotocatalise, reação de Fenton e utilização de semi-condutores (KANG et al., 2000; KHOUNI et al., 2011). Todos estes processos podem ser combinados com lacases. A perspectiva é a implementação de processos que reduzam custos e impactos ao ambiente, o que provavelmente utilizara tais processos de forma integrada. Ainda, no tratamento de efluente têxtil, a toxicidade do efluente deve ser monitorada, devido a possível formação de produtos ainda mais tóxicos durante o tratamento.

5.7 HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA COM AÇÃO SIMULTÂNEA OU SEQUENCIAL DE LACASE E CELULASES

O grau de conversão de polissacarídeos do bagaço de cana é intimamente dependente da remoção da lignina. Bagaços com baixo teor de lignina são mais susceptíveis à hidrólise enzimática com celulases. Inicialmente o bagaço de cana obtido de usina foi parcialmente deslignificado com clorito de sódio em meio ácido e o teor de lignina diminuiu, passando de 24% para 19% após o tratamento por 1-h (SIQUEIRA et al., 2011). Posteriormente, o bagaço de cana de açúcar tratado com clorito, foi sequencialmente ou simultaneamente tratado com lacase de *P. cinerea* e preparação comercial de celulases. O tratamento do bagaço de cana com lacase foi realizado na presença ou ausência de mediadores (siringaldeído e ácido linoleico).

5.7.1 Atividade de celulases na presença de lacase de *P. cinerea*

Foram realizados ensaios de atividade de celulase na presença de lacase e mediadores a fim de avaliar se havia alguma alteração na atividade das enzimas. A reação na presença de lacase reduz a atividade da celulase. Os mediadores, mesmo na ausência de lacase, provocam perda na atividade de celulases (Tabela 37). Na presença de mediadores de lacase o percentual de inativação das celulases foi maior.

Tabela 37 – Atividade relativa de celulases (preparação comercial Cellubrix, 0,2 FPU), na presença de lacase de *P. cinerea* e mediadores, após 1 h de reação.

Tratamento	Atividade relativa (%)
Controle (somente Cellubrix)	100
Lacase	95
Siringaldeído	95
Siringaldeído + Mn ²⁺ -oxalato	82
Siringaldeído + Mn ²⁺ -oxalato + ac linoleico	80
Lacase + siringaldeído	49
Lacase + siringaldeído + Mn ²⁺ -oxalato	26
Lacase + siringaldeído e + Mn ²⁺ -oxalato + ac linoleico	34

Ainda assim, a lacase foi estável com sua atividade permanecendo durante 1 h de incubação com as celulasas e mediadores. Os mediadores causaram um aumento na atividade de lacase (Tabela 38).

Tabela 38 – Atividade relativa (%) de lacase de *P. cinerea* após 1h de incubação com Cellubrix (0,2 FPU).

Tratamento	Atividade relativa (%)
Cellubrix + lacase	119
Cellubrix + lacase + siringaldeido	164
Cellubrix + lacase + siringaldeido + Mn^{2+} -oxalato	168
Cellubrix + lacase + siringaldeido + Mn^{2+} -oxalato + ac linoleico	159

Um estudo semelhante foi feito com lacase e xilanase (Bende et al., 2008), que demonstraram a inativação oxidativa de xilanase de *Thermomyces lanuginosus* por lacase e o mediador HBT. O sistema oxidativo lacase-HBT oxidou resíduos de triptofano, resultando em rápida perda de atividade da xilanase.

Alguns autores têm discutido a capacidade de substratos lignocelulósicos de proteger celulasas da inativação causada pela atividade oxidativa da lacase e mediadores (PALONEN; VIIKARI, 2004), bem como proteger a própria atividade da lacase contra a inativação (ARACRI et al., 2009). Entretanto, quando as lacases e celulasas foram adicionadas simultaneamente ao bagaço de cana-de-açúcar foi observada a redução da atividade das celulasas durante a hidrólise do bagaço, revelando que este material lignocelulósico não protegeu as celulasas do sistema oxidativo de lacase de *P. cinerea* (Tabela 39). Consequentemente, a hidrólise da celulose foi reduzida na presença de lacase (Tabela 40). Os sistemas lacase-mediador e peroxidação lipídica proporcionaram maior redução nas atividades de celulasas e menor hidrólise da celulose.

Tabela 39 – Atividade residual de celulasas e lacases (%) após 8 h de tratamento simultâneo de bagaço de cana-de-açúcar deslignificado com clorito.

Tratamento	Celulasas	Lacase
Celulasas + lacase	107	99
Celulasas + lacases + siringaldeido	56	39
Celulasas + lacases + siringaldeido + oxalato- Mn^{2+} + ac linoleico	47	106

Tabela 40 – Hidrólise por 24 h do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado com clorito

Tratamento	Conversão de celulose (%)
Somente Celulases	72,90
Celulases + lacase	59,88
Celulases + lacases + siringaldeído	28,55
Celulases + lacases + siringaldeído + oxalato-Mn ²⁺ + ac linoleico	35,78

Tabka e col. (2006) demonstraram que o tratamento simultâneo de lacase e celulase promoveu uma menor conversão de celulose da palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor se comparada à hidrólise apenas com celulase. Entretanto, o tratamento sequencial com lacase e celulase deu um resultado positivo. Os autores atribuíram o resultado à liberação de compostos fenólicos pela lacases. Depois da retirada desses compostos, que causam inibição das enzimas hidrolíticas e diminuem a atividade de celulase e outras hidrolases, observa-se uma maior hidrólise da celulose.

5.7.2 Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com ação sequencial de lacase e celulase

O tratamento sequencial foi realizado com lacase (10 U/g), juntamente com o mediador siringaldeído e também usando o sistema de peroxidação do ácido linoléico pela lacase. Após o tratamento das amostras de bagaço com lacase por 6 h, foi feita a lavagem com água ou tratado com NaOH (60 °C, 1h) e então realizada a hidrólise com celulases por 24, 48 e 72 h. A Figura 44 mostra que o tratamento com lacase não resultou em uma hidrólise significativa. Somente a extração alcalina revelou uma pequena melhora na taxa inicial de conversão de celulose.

Figura 44. Conversão da celulose de bagaço de cana pré-tratado com clorito (por 1h), após tratamento sequencial por lacase (triângulos abertos), lacase-mediador (triângulos fechados) ou peroxidação lipídica com lacase (quadrados abertos), após lavagem do bagaço com água (A) ou a extração com NaOH (60 °C, 1 h) (B), seguido pela hidrólise (10 FPU, 24, 48 e 72 h, 45 °C). Controle: hidrólise sem tratamento prévio com lacase (círculos fechados).

A eficiência de lacase na oxidação de lignina depende da composição da lignina no material lignocelulósico. Nesse sentido, foi avaliada o tratamento sequencial com lacases-celulases a partir de bagaços de cana tratados por hidrólise ácida, sulfito ácido e sulfito alcalino. Como controle, o bagaço sem pré-tratamento também foi avaliado (Figura 45).

Figura 45. Conversão de celulose após hidrólise enzimática com Cellubrix e Beta-glicosidase, após tratamento sequencial de bagaços de cana com lacases, com bagaços obtidos de diferentes pré-tratamentos químicos.

O tratamento sequencial aplicado em bagaços de cana previamente tratados por hidrólise ácida ou sem tratamento (in natura) não apresentou diferença significativa quanto a conversão de celulose com e sem tratamento sequencial com lacase. No entanto, quando o bagaço foi pré-tratado por sulfito ácido ou sulfito alcalino, observou-se um favorecimento à hidrólise, demonstrado pelo aumento no percentual de conversão de celulose com 72 horas de hidrólise. A sulfonação da lignina decorrente destes pré-tratamentos pode ter favorecido a atuação da enzima, uma vez que o sulfito liga-se a lignina em sítios onde as enzimas atuam, reduzindo a adsorção improdutiva. Além disso amostras tratadas com sulfito são mais hidrofílicas e portanto apresentam maior grau de inchamento das fibras o que favorece a atuação das enzimas (MENDES, 2010; SIQUEIRA, 2011). Parte da lignina é solubilizada em função de quebras em sua estrutura. Este efeito também pode favorecer a ação da lacase em

pontos específicos, que não estariam disponíveis antes do pré-tratamento (RODRIGUES, 2007).

Contrariamente, outros trabalhos demonstraram que o tratamento realizado com lacase, antes da hidrólise enzimática, resulta em menor recuperação de glicose em palha de trigo (JURADO et al., 2009). A recuperação mais baixa de glicose após o tratamento com lacase tem sido explicada pela liberação de compostos fenólicos que podem inibir as enzimas hidrolíticas (AKIN et al., 1996; GAMBLE et al., 2000).

Além disso, a eficiência do tratamento com lacase, simultâneo ou sequencialmente à hidrólise, pode depender, em parte, das características do material lignocelulósico, distribuição e teor de lignina e tipo de tratamento prévio. Palonen e Viikari (2004) observaram que os tratamentos simultâneos e sequenciais, com lacase de *Trametes hirsuta* e celulasas comerciais aumentaram a produção de açúcares durante hidrólise enzimática de madeira mole pré-tratada por vapor. O maior aumento foi observado quando o tratamento sequencial foi aplicado (21%). O tratamento com lacase na ausência de mediador também melhorou a hidrólise. Porém, análises de superfícies do substrato lignocelulósico, antes e após os tratamentos de lacase e celulasas, revelaram um enriquecimento de lignina e aumento dos grupos carboxílicos na superfície do resíduo após hidrólise.

Lacase são oxidorreductases eficientes na remoção da lignina. O tratamento enzimático oxidativo para melhorar a hidrólise de materiais lignocelulósicos é promissor. No entanto, as condições de tratamento para evitar a desativação de celulase devem ser ajustadas, bem como compreender de fato o tipo de modificação causada no material pela ação da lacase e quais compostos são susceptíveis à oxidação pela lacase. Estudos futuros para tratamento sequencial de lacase à hidrólise de bagaço de cana devem considerar aspectos reacionais básicos: maior carga enzimática, temperatura, tempo de reação e mediadores.

6. CONCLUSÕES

- A identificação de linhagens fúngicas e/ou enzimas ligninolíticas capazes de atuar nas condições encontradas nos efluentes têxteis são de grande interesse biotecnológico. O presente estudo revelou que três linhagens: *Peniophora cinerea*, *Trametes villosa* e *Pleurotus ostreatus*, que apresentaram melhor desempenho para biodescoloração;
- A maior produção de lacase por *P. cinerea* ocorreu em meio líquido definido. Ao total, esse fungo produziu oito isoenzimas de lacases, que foram parcialmente caracterizadas;
- Lacases produzidas por *P. cinerea* foram eficientes na descoloração dos corantes reativos e apresentam potencial para aplicação têxtil;
- Lacases purificadas de *P. cinerea* apresentaram elevada estabilidade ao NaCl e tolerância à diferentes sais, o que caracteriza tais enzimas como halotolerantes, relevante na catálise de compostos orgânicos em reações com alta força iônica. Estudos estruturais da enzima, juntamente com estudos cinéticos, poderiam esclarecer estas propriedades de halotolerância da enzima;
- A extração de lacases de *P. cinerea* em sistemas de duas fases aquosas foi um método eficiente para recuperação da atividade enzimática, bem como a cromatografia de troca iônica para purificação;
- Um protocolo de obtenção de extratos de lacase de *P. cinerea* a partir de meios complexos poderia basear-se em duas ou três etapas, dependendo do objetivo e grau de pureza pretendido: concentração do extrato, SDFA e/ou DEAE-Sepharose;
- O uso de lacase de *P. cinerea* não melhorou a eficiência da hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado por clorito, de forma simultânea ou sequencial;
- O tratamento sequencial do bagaço pré-tratado com ácido com lacases e celulases não aumentou a conversão de celulose;
- Bagaços pré-tratados com sulfito ácido ou sulfito alcalino foram mais susceptíveis à hidrólise enzimática e tiveram maior conversão de celulose quando tratados sequencialmente com lacases e celulases.

REFERÊNCIAS

- AKIN, D.E., MORRISON, W.H., RIGSBY, L.L., GAMBLE, G.R., SETHURAMAN, A., ERIKSSON, K.E.L.,. Biological delignification of plant components by the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispota* and *Cyathus stercoreus*. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 63, p. 305-321, 1996.
- ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules**. Wiley-Interscience, New York, 346 p., 1986
- ALCALDE, M.; FERRER, M.; PLOU, F.J.; BALLESTEROS, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 281-287, 2006.
- ALCADE, M. Engineering strategies for the directed evolution of ligninolytic oxidoreductases., 2010, Santiago de Compostela, Espanha, In: **Proceedings of the Oxidative Enzymes as Sustainable Industrial Biocatalysts**.
- ALFENAS, A.C.; PETUS, I.; BRUNE, W.; PASSADOS, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991, 242p.
- ALMANSA, E.; KANDELBAUER, A.; PEREIRA, L.; CAVACO-PAULO, A; GUEBITZ, G.M. Influence of Structure on Dye Degradation with Laccase Mediator Systems. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, n. 5 e 6, p. 315-324, 2004.
- ALVES, A.M.C.R.; RECORD, E.; LOMASCOLO, A.; SCHOLTMEIJER, K.; ASTHER, M.; WESSELS, J.G.H.; WOSTEN, H.A.B. Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6379-6384, 2004.
- ALVES, A.; RECORD, E.; LOMASCOLO, A.; SIGOILLOT, J.C.; ASTHER, M.; WOSTEN, H.A.B. Method for overproducing a specific recombinant protein with *P. cinnabarinus* monokaryotic strains. Patente. **FR2865216 A1**, 2005.
- ANDREU, G.; VIDAL, T. Effects of laccase–natural mediator systems on kenaf pulp. **Bioresource Technology**, v.10, p. 5932-5937, 2011.
- ANTORINI, M.; HERPOËL-GIMBERT, I.; CHOINOWSKI, T.; SIGOILLOT, J.C.; ASTHER, M.; WINTERHALTER, K.; PIONTEK, K. Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1594, p. 109-114, 2002.
- ARACRI, E.; COLOM, J.F.; VIDAL, T. Application of laccase-natural mediator systems to sisal pulp: An effective approach to biobleaching or functionalizing pulp fibres? **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5911-5916, 2009.

ARACRI, E.; FILLAT A.; COLOM, J.F.; GUTIÉRREZ A.; DEL RIO, J.C.; MARTINEZ, A.T.; VIDAL, T. Enzymatic grafting of simple phenols on flax and sisal pulp fibres using laccases. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8211-8216, 2010.

ARACRI, E.; VIDAL, T. Xylanase- and laccase-aided hexenuronic acids and lignin removal from specialty sisal fibres. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1355-1362, 2011.

ARANTES, V.; MILAGRES, A.M.F. The effect of a catecholate chelator as a redox agent in Fenton-based reactions on degradation of lignin-model substrates and on COD removal from effluent of an ECF kraft pulp mill. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, 273-279, 2007.

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.

ASTOLFI, P.; BRANDI, P.; GALLI, C.; GENTILI, P.; GERINI, M.F.; GRECI, L.; LANZALUNGA, O. New mediators for the enzyme laccase: mechanistic features and selectivity in the oxidation of non-phenolic substrates. **New Journal Chemistry**, v. 29, p. 1308-1317, 2005

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

BAMINGER, U.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D.; HALTRICH, D. A simple assay for measuring cellobiose dehydrogenase activity in the presence of laccase. **Journal Microbiology Methods**, v. 35, p. 253-259, 1999.

BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 78-87, 1994.

BARRASA, J.M.; MARTÍNEZ, A.T.; MARTÍNEZ, M.J. Isolation and Selection of Novel Basidiomycetes for Decolorization of Recalcitrant Dyes. **Folia Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 59-66, 2009.

BAYRAMOGLUA, G.; ARICA, M.Y. Immobilization of laccase onto poly(glycidylmethacrylate) brush grafted poly(hydroxyethylmethacrylate) films: Enzymatic oxidation of phenolic compounds. **Materials Science and Engineering**, v. C 29, p. 1990-1997, 2009.

BENDL, R.F., KANDEL, J.M., AMODEO, K.D., RYDER, A.M., WOOLRIDGE, E.M. Characterization of the oxidative inactivation of xylanase by laccase and a redox mediator. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 149-156, 2008.

BERGAMINI, M.F.; OLIVEIRA, F.C.M.; ZANONI, M.V.B. Análise voltamétrica do corante têxtil do tipo antraquinona empregando eletrodos de carbono impresso. **Eclética Química**, v. 30, n. 2, p. 53-59, 2005.

BERKA, R.M.; BROWN, S.H.; XU, F.; SCHNEIDER, P. Purified myceliophthora laccases and nucleic acids encoding same. **US5795760**, 1998a.

BERKA, R.M.; THOMPSON, S.A.; XU, F. Purified scytalidium laccase and nucleic acids encoding same. **US5843745**, 1998b.

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

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G.; FREIERMUTH, B.; BODIE, E.; BORNEMANN, S. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4627-4632, 1997.

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

BROWN, M.A.; ZHAO, Z.; MAUK, A.G. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. **Inorganica Chimica Acta**, v. 331, p. 232-238, 2002.

BULTER, T.; ALCALDE, M.; SIEBER, V.; MEINHOLD, P.; SCHLACHTBAUER, C.; ARNOLD, F.H. Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 987-995, 2003

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

CAMARERO, S.; IBARRA, D.; MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T. Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, 1775-1784, 2005.

CAMARERO, S.; IBARRA, D.; MARTÍNEZ, Á.T.; ROMERO, J.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J.C. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1264-1271, 2007.

CAMBRIA, M.T.; CAMBRIA, A.; RAGUSA, S.; RIZZARELLI, E. Production, Purification, and Properties of an Extracellular Laccase from *Rigidoporus lignosus*. **Protein Expression and Purification**, v. 18, p. 141-147, 2000.

CARNEIRO, P.A. Determinação Cromatográfica e Degradação Fotoeletrocatalítica do corante Disperso Dispersol Black CVS. 178 p., 2007. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CASAS, N.; PARELLA, T.; VICENT, T.; CAMINAL, G.; SARRÀ, M. Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase. **Chemosphere**, v. 75, p. 1344-1349, 2009.

CHAKAR, F.S.; RAGAUSKAS, A. J. Fundamental investigation of laccase mediator delignification on high lignin content kraft pulps. In: THE TENTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON WOOD AND PULPING CHEMISTRY, 10, 1999, Yokohama, Japan.

CHAMPAGNE, P.P.; RAMSAY, J.A. Contribution of manganese peroxidases and laccase to dye decolouration by *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 276-285, 2005.

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

CHANDRA, R.P.; RAGAUSKAS, A.J. Elucidating the effects of laccase on the physical properties of high-kappa kraft pulps. **Progress Biotechnology**, v. 21, p. 165-72, 2002.

CHIVUKULA, M.; RENGAN, V. Phenolic Azo Dye Oxidation by Laccase from *Pyricularia oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 4374-4377, 1995.

CHO, N.-S.; LEONOWICZ, A.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; GINALSKA, G.; CHO, H.-Y.; SHIN, S.-J.; CHOI, Y.-J.; OHGA, S. Degradation of a Non-Phenolic β -0-4 Lignin Model Dimer by *Cerrena unicolor* Laccase and Mediators, Acetovanillone and Acetosyringone. **Journal of the Faculty of Agriculture - Kyushu University**, v. 53, n. 1, p. 7-12, 2008.

CIULLINI, I.; TILLI, S.; SCOZZAFAVA, A.; BRIGANTI, F. Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: Combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 7003-7010, 2008.

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

COLLINS, P.J.; DOBSON, A.D. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, V. 63, P. 3444-3450, 1997.

COLLINS, P.; DOBSON, A.D.W.; FIELD, J.A. Reduction of the 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2026-2031, 1998.

COUTO, S.R. Dye removal by immobilised fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 227-235, 2009.

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

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

COUTO, S.R.; TOCA-HERRERA, J.L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 558-569, 2007.

CRISTÓVÃO, R.O.; TAVARES, A.P.M.; RIBEIRO, A.S.; LOUREIRO, J.M.; BOAVENTURA, R.A.R.; MACEDO, E.A. Kinetic modelling and simulation of laccase catalyzed degradation of reactive textile dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4768-4774, 2008.

CRUEGER, W., CRUEGER, A. **Biotechnology, a text book of industrial microbiology**. 2nd ed. p.60, Sunderland, Sinauer Associates ISBN 0-87893, p. 131-137, 1990.

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

DEDEYAN, B.; KLONOWSKA, A.; TAGGER, S.; TRON, T.; IACAZIO, G.; GIL, G.; PETIT, J.L. Biochemical and Molecular Characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 925-929, 2000.

DELLAMATRICE, P.M.; MONTEIRO, R.T.R.; KAMIDA, H.M.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L.; BLAISE, C. Decolourization of municipal effluent and sludge by *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1363-1369, 2005.

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

DHAWAN, S.; KUHAD, R.C. Effect of amino acids and vitamins on laccase production by the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 35-38, 2002.

DHOUIB, A.; HAMZA, M.; ZOUARI, H.; MECHICHI, T.; H'MIDI, R.; LABAT, M.; MARTÍNEZ, .M.J.; SAYADI, S. Autochthonous fungal strains with high ligninolytic

activities from Tunisian biotopes. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 431-436, 2005.

DIAMOND, A.D.; HSU, J.T. Aqueous Two-Phase Systems for Biomolecule Separation, **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 47, Springer-Verlag, Berlin, 1992.

D'SOUZA-TICLO, D.; SHARMA, D.; RAGHUKUMAR, C. A thermostable metal-tolerant laccase with bioremediation potential from a marine-derived fungus. **Marine Biotechnology**, v. 11, p. 725-737, 2009.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K.E.L. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1151-1158, 1996.

EGGERT, C.; LAFAYETTE, P.R.; TEMP, U.; ERIKSSON, K.E.L.; DEAN, J.F.D. Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1766-1772, 1998.

EICHLEROVA, I.; HOMOLKA, L.; LISA, L.; NERUD, F. Orange G and Remazol Brilliant Blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinsum* and *Pleurotus calypttratus*. **Chemosphere**, v. 60, n. 33, p. 398-404, 2005.

ELEGIR, G.; DAINA, S.; ZOIA, L.; BESTETTI, G.; ORLANDI, M. Laccase mediator system: Oxidation of recalcitrant lignin model structures present in residual kraft lignin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 340-346, 2005.

ELEGIR, G.; BUSSINI, D.; ANTONSSON, S.; LINDSTRÖM, M.E.; ZOIA, L. Laccase-initiated cross-linking of lignocellulose fibres using a ultra-filtered lignin isolated from kraft black liquor. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 77, p. 809-817, 2007.

ENAYATZAMIRA, K.; TABANDEHC, F.; YAKHCHALI, B.; ALIKHANID, H.A.; RODRÍGUEZ COUTO, S. Assessment of the joint effect of laccase and cellobiose dehydrogenase on the decolouration of different synthetic dyes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 176-181, 2009.

ENGUITA, F.J.; MARTINS, L.O.; HENRIQUES, A.O.; CARRONDO, M.A. Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component. A Laccase with enhanced thermostability properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19416-19425, 2003.

EPO, European Patent Office. Disponível em: <http://www.epo.org/>. Acesso em 28/06/2011.

EPOLITO, W.J.; LEE, Y.H.; BOTTOMLEY, L.A.; PAVLOSTATHIS, S.G. Characterization of the textile anthraquinone dye Reactive Blue 4. **Dyes and Pigments**, v. 67, p. 35-46, 2005.

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

ESMANHOTO, E. Purificação de gentamicina através de extração em sistemas de duas fases aquosas. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Paulo/USP, São Paulo, 80p., 2002.

ESSER, K.; MINUTH, W. The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. Microheterogeneity of laccase II. **Europe Journal Biochemistry**, v. 23, p. 484-488, 1971.

ESTEVES, P. J.; MOREIRA-NETO, S. L. E MACHADO, K. M. G. Caracterização da atividade de lacase produzida por *Peniophora cinerea* CCB204 durante descoloração do corante Azul Brilhante Remazol R (RBBR). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, Recife, 5, v. 1, p. 224, 2007.

ESTEVES, P.J.; MOREIRA-NETO, S.L.; MACHADO, K.M.G. Evidência de lacase halotolerante produzida pelo fungo basidiomiceto *Peniophora cinerea* e efeito de auxiliares têxteis na descoloração do Reactive Blue 19 pela enzima. In: WORKSHOP DE BIORREMEDIÇÃO E BIODEGRADAÇÃO, Campinas, 3, 2009.

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

FARACO, V.; PEZZELLA, C., MIELE, A., GIARDINA, P., SANNIA, G. Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. **Biodegradation**, v. 20, n. 2, p. 209-220, 2009.

FERNANDEZ-LARREA, J.; STAHL, U. Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. **Molecular and General Genetics**, v. 252, p. 539-551, 1996.

FERRAZ, A.; BAEZA, J.; RODRIGUEZ, J.; FREER, J. Estimating chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 3, p. 201-212, 2000.

FILLAT, U.; RONCERO, M.B. Optimization of laccase–mediator system in producing biobleached flax pulp. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 181-187, 2010.

FUKUSHIMA, Y.; KIRK, T.K. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 872-876, 1995.

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

GAMBLE, G.R.; SNOOK, M.E.; HENRIKSON, G.; AKIN, D.E. Phenolic constituents in flax bast tissue and inhibition of cellulase and pectinase. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 741-746, 2000.

GARCIA-UBASART, J.; ESTEBANA, A.; VILA, C.; RONCERO, M.B.; COLOM, J.F.; VIDAL, T. Enzymatic treatments of pulp using laccase and hydrophobic compounds. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2799-2803, 2011.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GIARDINA, P.; PALMIERI, G.; SCALONI, A.; FONTANELLA, B.; FARACO, V.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemistry Journal**, v. 341, p. 655-663, 1999.

GILL, P.K.; ARORA, D.S. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, 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.

GONZALES, L.; HERNÁNDEZ, J.R.; PERESTELO, F.; CARNICERO, A.; FALCÓN, M.A. Relationship between mineralization of synthetic lignins and the generation of hydroxyl radicals by laccase and a low molecular weight substance produced by *Petriellidium fusoidium*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 474-481, 2002.

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

HAMMEL, K.E. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. **New Journal of Chemistry**, v. 20, p. 195-198, 1996.

HARREITHER, W.; SYGMUND, C.; DÜNHOFEN, E.; VICUÑA, R.; HALTRICH, D.; LUDWIG, R. Cellobiose Dehydrogenase from the Ligninolytic Basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2750-2757, 2009.

HAVE, R. T.; HARTMANS, S.; FIELD, J. A. Interference of Peptone and Tyrosine with the Lignin Peroxidase Assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3301-3303, 1997.

HAYKIR, I. A comparative study on lignocellulose pretreatments for bioethanol production from cotton stalk. New Biotechnology, In: EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY, 14. 2009. Barcelona, v. 25, n. 1, p. S253-S254.

HECKMANN-POHL, D.M.; BASTIAN, S.; ALTMEIER, S.; ANTES, I. Improvement of the fungal enzyme pyranose 2-oxidase using protein engineering. **Journal of Biotechnology**, v. 124, p. 26-40, 2006.

HEINZKILL, M.; BECH, L.; HALKIER, T.; SCHNEIDER, P.; ANKE, T. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1601-1606, 1998.

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

HESS, J.; LEITNER, C.; GALHAUP, C.; KULBE, K.D.; HINTERSTOISSER, B.; STEINWENDER, M.; HALTRICH, D. Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 98 e 100, p. 229-241, 2002.

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

HOFER, C.; SCHLOSSER, D. Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalyzed by a fungal laccase. **FEBS Letters**, v. 451, p. 186-190, 1999.

HOFRICHTER, M.; VARES, T.; KALSI, M.; GALKIN, S.; SCHEIBNER, K.; FRITSCHKE, W.; HATAKKA, A. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ^{14}C -Labelled lignin during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1864-1874, 1999.

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

HU, M.R.; CHAO, Y.P.; ZHANG, G.Q.; XUE, Z.Q.; QIAN, S. Laccase-mediator system in the decolorization of different types of recalcitrant dyes. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 36, p. 45-51, 2009.

IBARRA, D.; CAMARERO, S.; ROMERO, J.; MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T. Integrating laccase-mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine-free bleaching of eucalypt kraft pulp. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, v. 81, p. 1159-1165, 2006.

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

INPI, INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/>. Acesso em 28/06/2011.

JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; KOCHMANSKA-RDEST, J.; MALARCZYK, E.; WARDAS, W.; LEONOWICZ, A. Fungi and their ability to decolorize azo and Anthraquinonic dyes. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 30, p. 566-572, 2002.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. **Journal of Biotechnology**, v. 78, p. 193-199, 2000.

JÖNSSON, L.J.; PALMQVIST, E.; NILVEBRANT, N.O.; HAHN-HÄGERDAL, B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 49, p. 691-697, 1998

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

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

JURADO, M.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ-ALCALÁ, A.; MARTÍNEZ, A.T.; MARTÍNEZ, M.J. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6378-6384, 2009.

KAHRAMAN, S.S.; GURDAL, I.H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 215-217, 2002.

KAMITSUJI, H.; HONDA, Y.; WATANABE, T.; KUWAHARA, M. Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 65, p. 287-294, 2004.

KANG, S.F.; LIAO, C.H. PO, S.T. Decolorization of textile wastewater by photo-fenton oxidation technology. **Chemosphere**, v. 41, n. 8, p. 1287-1294, 2000.

KAPICH, A.; HOFRICHTER, M.; VARES, T.; HATAKKA, A. Coupling of manganese peroxidase-mediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic lignin model compounds and ¹⁴C-labeled lignins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 259, p. 212-219, 1999.

KARAHANIAN, E.; CORSINI, G.; LOBOS, S.; VICUÑA, R. Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1443, p. 65-74, 1998.

KATURI, K.P.; MOHAN, S.V.; SRIDHARC, S.; PATID, B.R.; SARMA, P.N. Laccase-membrane reactors for decolorization of an acid azo dye in aqueous phase: Process optimization. **Water Research**, v. 43, p. 3647-3658, 2009.

KAUL, A. Aqueous two-phase systems: Methods and Protocols. In: KAUL, R. H. **Methods in Biotechnology**, Totowa, NJ, Human Press Inc, v.11, 2002.

KAUSHIK, P. E., MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. **Environment International**, v. 35, p. 127-141, 2009.

KEHARIA, H.; PATEL, H.; MADAMWAR, D. Decolorization screening of synthetic dyes by anaerobic methanogenic sludge using a batch decolorization assay. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, 365-370, 2004.

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

KIISKINEN, L.-L.; KRUUS, K.; BAILEY, M.; YLOSMAKI, E.; SIIKA-AHO, M.; SALOHEIMO, M. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. **Microbiology**, v. 150, p. 3065-3074, 2004.

KHOUNI, I.; MARROT, B.; MOULIN, P.; AMAR, R.B. Decolourization of the reconstituted textile effluent by different process treatments: enzymatic catalysis, coagulation/flocculation and nanofiltration processes. **Desalination**, v. 268, n. 1-3, p. 27-37, 2011.

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

KOROLEVA, O.V.; STEPANOVA, E.V.; BINUKOV, V.I.; TIMOFEEV, V.P.; PFEIL, W. Temperature-induced changes in copper centers and protein conformation of two fungal laccases from *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1547, p. 397-407, 2001.

KOROLEVA-SKOROBOGATKO, O.V.; STEPANOVA, E.V.; GAVRILOVA, V.P.; BINIUKOV, V.I.; JAROLOV, A.I.; VARFOLOMEYEV, S.D.; SCHELLER, F.; MAKOWER, A.; OTTO, A. Laccase of *Coriolus zonatus*: I. Isolation, purification and some physicochemical properties. **Applied Biochemistry and Biotechnology A**, v. 76, p. 115-118, 1999.

KUAN, I.-C., JOHNSON, K.A., TIEN, M., Kinetic analysis of manganese peroxidase. The reaction with manganese complexes. **Journal Biology Chemistry**, v. 268, p. 20064–20070, 1993.

KUMAR, S.V.S.; PHALE, P.S.; DURANI, S.; WANGIKAR, P.P. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. **Biotechnology Bioengineering**, v. 83, p. 386–394, 2003.

KUMAR, A.; SRIVASTAVA, A.; GALAEV, I.; MATTIASSON, N. Smart polymers: physical forms and bioengineering applications. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 1205–1237, 2007.

KUNAMNENI, A.; PLOU, F.J.; BALLESTEROS, A.; ALCALDE, M. Laccases and their applications: a patent review. **Recent Patent Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 10–24, 2008.

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

LARRONDO, L.F.; SALAS, L.; MELO, F.; VICUÑA, R.; CULLEN, D. A Novel Extracellular Multicopper Oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with Ferroxidase Activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6257–6263, 2003a.

LARRONDO, L.F.; AVILA, M.; SALAS, L.; CULLEN, D.; VICUNA, R. Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns. **Microbiol**, v. 149, p. 1177–1182, 2003b.

LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO, N.S.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 175–185, 1999.

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

LEVIN, L.; FORCHIASSIN, F. Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. **Acta Biotechnology**, v. 21 n. 2, p. 179–186, 2001.

LEVIN, L.; FORCHIASSINA, F.; VIALE, A. Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1381–1387, 2005.

LI, D.; ALIC, M.; BROWN, J.A.; GOLD, R., M.H. Regulation of Manganese Peroxidase Gene Transcription by Hydrogen Peroxide, Chemical Stress, and Molecular Oxygen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 341–345, 1995.

LI, D.; ALIC, M.; GOLD, M.H. Nitrogen regulation of lignin peroxidase gene transcription. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3447-3449, 1994.

LI, J.F.; HONG, Y.Z.; XIAO, Y.H.; XU, W. FANG. High production of laccase B from *Trametes* sp. in *Pichia pastoris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 741-745, 2007.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of American Chemistry Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.

LOPEZ, C.; VALADE, A.G.; COMBOURIEU, B.; MIELGO, I.; BOUCHON, B.; LEMA, J.M. Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by ex situ ¹H nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. **Anal. Biochem.** v. 335, p. 135-149, 2004.

LORENZO, M.; MOLDES, D.; COUTO, S.R.; SANROMAN, A. improving laccase production by different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. **Bioresour Technol**, v. 82, p. 109-113, 2002.

LORENZO, M.; MOLDES, D.; COUTO, S.R.; SANROMAN, M.A. Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds. **Chemosphere**, v. 60, n. 8, p. 1124-1128, 2005.

LU, S.X.F.; JONES, C.L.; LONERGAN, G.T.. Correlation between fungal morphology and laccase expression under the influence of cellobiose induction. In: **International Biotechnology Symposium**, 10. **International Symposium on Yeasts**, 19, 1996, Sydney, Australia.

LU, L.; ZHAO, M.; ZHANG, B.-B.; YU, S.Y.; BIAN, X.-J.; WANG, W.; WANG, Y. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 1232-1239, 2007.

LUCAS, M.; MERTENS, V.; CORBISIER, A.-M.; VANHULLE, S. Synthetic dyes decolourisation by white-rot fungi: Development of original microtitre plate method and screening. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 97-106, 2008.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 246-252, 2005.

MACHADO, K.M.G.; COMPART, L.C.A.; MORAIS, R.O.; ROSA, L.H.; SANTOS, M.H. Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from brazilian ecosystem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 481-487, 2006.

MADZAK, C.; OTTERBEIN, L.; CHAMKHA, M.; MOUKHA, S.; ASTHER, M.; GAILLARDIN, C.; BECKERICH, J.M. Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 635-646, 2005.

MASARIN, F. **Estudo da degradação de lignina iniciada por metabólicos extracelulares extraídos de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota***. 2010. 107f. Tese (Doutorado em Ciências) Departamento de Biotecnologia, EEL-USP, Lorena, 2010.

MCMULLAN, G.; MEEHAN, C.; CONNEELY, A.; KIRBY, N.; ROBINSON, T.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; SMYTH, W.F. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 81-87, 2001.

MECHICHI, T.; MHIRI, N.; SAYADI, S. Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. **Chemosphere**, v. 64, p. 998-1005, 2006.

MENDES, F.M.. 2010. **Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado quimio-mecanicamente**. 2010. 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Departamento de Biotecnologia, EEL-USP, Lorena, 2010.

MICHNIEWICZ, A.; ULLRICH, R.; LEDAKOWICZ, S.; HOFRICHTER, M. The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 682-688, 2006.

MIELGO, I.; LÓPEZ, C.; MOREIRA, M. T.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M. Oxidative Degradation of Azo Dyes by Manganese Peroxidase under Optimized Conditions. **Biotechnol. Prog.** v. 19, p. 325-331, 2003.

MIKOLASCH, A.; SCHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 82, p.605-624, 2009.

MILAGRES, A. M. F.; ARANTES, V.; MEDEIROS, C. L.; MACHUCA, A. Production of metal chelating compounds by white and brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 562-565, 2002.

MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A. Topochemistry, porosity and chemical composition affecting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials, *In* BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. (Eds.). **Routes to Cellulosic Ethanol**, Springer. 2011. p. 53-72.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-431, 1959.

MIN, K.L.; KIM, Y.H.; KIM, Y.W.; JUNG, H.S.; HAH, Y.C. Characterization of a Novel Laccase Produced by the Wood-Rotting Fungus *Phellinus ribis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 392, n. 2, p. 279-286, 2001.

MOHORČIČ, M.; TEODOROVIČ, S.; GOLOB, V.; FRIEDRICH, J. Fungal and enzymatic decolourisation of artificial textile dye baths. **Chemosphere**, v. 63, p. 1709-1717, 2006.

MOLDES, D.; LORENZO, M.; SANROMÁN, M.A. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 327-330, 2004.

MOLDES, D.; DÍAZ, M.; TZANOV, T.; VIDAL, T. Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of Eucalyptus kraft pulp. **Bioresource Technology**, v. 99, 7959-7965, 2008.

MOREIRA, M.T.; MIELGO, I.; FEIJOO, G.; LEMA, J.M. Decolourisation of Remazol Brilliant Blue R via a novel *Bjerkandera* sp. Strain. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 107-111, 2000.

MOREIRA-NETO, S.L.; ESTEVES, P.J.; SANTOS, V.T.O.; PARANHOS, A.P.; CESCATO, F.; VITALI, V.M.; MACHADO, K.L.G. Novel salt and alkali tolerant neotropical basidiomycetes for dye decolorisation in simulated textile effluent. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. DOI: 10.1007/S11274-011-0740-4, 2011.

MOROZOVA, O.V.; SHUMAKOVICH, G.P.; SHLEEV, S.V.; YAROLOV, Y.I. Laccase-Mediator Systems and Their Applications: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 523-535, 2007.

MUNOZ, C.; GUILLEN, F.; MARTINEZ, A. T.; MARTINEZ, M.J. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn^{2+} oxidation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2166-2174, 1997.

MURUGESAN, K.; ARULMANI, M.; NAM, I.-H.; KIM, Y.-M.; CHANG, Y.-S.; KALAICHELVAN, P.T. Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 939-946, 2006.

MURUGESAN, K.; KIM, Y.-M.; JEON, J.-R.; CHANG, Y.-S. Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, p. 523-529, 2009.

MURUGESAN, K.; NAM, I.H.; KIM, Y.M.; CHANG, Y.S. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1662-1672, 2007.

NACHIYAR, C.V.; RAJAKUMAR, G.S. Mechanism of Navitan Fast Blue S5R degradation by *Pseudomonas auruginosa*. **Chemosphere**, v. 57, p. 165-169, 2004.

NAGAI, M.; SATO, T.; WATANABE, H.; SAITO, K.; KAWATA, M.; ENEI, H. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 327-335, 2002.

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

NIVADELI, K.N.; JACOB, N.; PREMA, P. Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: Purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 654-660, 2008.

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

NOVOTNÝ, Č.; SVOBODOVÁ, K.; ERBANOVÁ, P.; CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E.; SASEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 1545-1551, 2004.

NYANHONGO, G.S.; GOMES, J.; GÜBITZ, G.M.; ZVAUYA, R.; READ, J.; STEINER, W. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Water Research**, v. 36, p. 1449-1456, 2002.

OKAMOTO, K.; IMASHIRO, K.; AKIZAWA, Y.; ONIMURA, A.; YONEDA, M.; NITTA, Y.; MAEKAWA, N.; YANASE, H. Production of ethanol by the white-rot basidiomycetes *Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens*. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 909-913, 2010.

OKINO, L.K.; MACHADO, K.M.G.; BONONI, V.L. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 889-893, 2001.

OSMA, J.F.; TOCA-HERRERA, J.L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Review article: Uses of laccases in the food industry. **Enzyme Research**, v. 2010, article ID 918761, 8 P, 2010a.

OSMA, J.F.; TOCA-HERRERA, J.L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8509-8514, 2010b.

OTTERBEIN, L.; RECORD, E.; LONGHI, S.; ASTHER, M.; MOUKHA, S. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* 1-937 and expression in *Pichia pastoris*. **Europe Journal Biochemistry**, v. 267, p. 1619-1625, 2000.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; SCALONI, A.; CAPASSO, A.; SANNIA, G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 272, p. 31301-31307, 1997

PALMIERI, G.; CENNAMO, G.; FARACO, V.; AMORESANO, A.; SANNIA, G.; GIARDINA, P. A typical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 33, p. 220-230, 2003.

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

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, p. 920-924, 2000.

PALONEN, H.; VIKARI, L. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, p. 550-557, 2004.

PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 65-72, 2004.

PIONTEK, K.; SMITH, A.T.; BLODIG, W. Lignin peroxidase structure and function. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, n. 2, p. 111-116, 2001.

PISCITELLI, A. Recombinant expression of fungal oxidases for industrial application. Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XVII ciclo Indirizzo Biotecnologie Industriali Università di Napoli Federico, 17. Université Paul Cézanne Aix-Marseille III. 125 p.

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

RABINOVICH, M.L.; BOLOBOVA, A.V.; VASILCHENKO, L.G. Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 1-17, 2004.

RAGUSA, S.; CAMBRIA, M.T.; PIERFEDERICI, F.; SCIRE, A.; BERTOLI, E.; TANFANI, F.; CAMBRIA, A. Structure–activity relationship on fungal laccase from *Rigidoporus lignosus*: a Fourier-transform infrared spectroscopic study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1601, p. 155-162, 2002.

RAMSAY, J.A.; GOODE, C. Decoloration of a carpet dye effluent using *Trametes versicolor*. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 197-201, 2004.

RECORD E, PUNT PJ, CHAMKHA M, LABAT M, VAN DEN HONDEL CAMJJ, ASTHER M. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. **Europe Journal Biochemistry**, v. 269, p. 602-609, 2002.

REHOREK, A.; PLUM, A. Characterization of sulfonated azo dyes and aromatic amines by pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, DOI 10.1007/S00216-007-1390-0, 2007.

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

RODRIGUES, F. A. **Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de Bagaço de cana**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia Química, Campinas-SP, 2007.

ROY, B.; ARCHIBALD, F. Effects of kraft pulp and lignin on *Trametes versicolor* carbon metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1855-1863, 1993.

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

SAITO, T.; HONG, P.; KATO, K.; OKAZAKI, M.; INAGAKI, H.; MAEDA, S. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 520-526, 2003.

SALOHEIMO, M.; NIKU-PAVOLA, M.-L. Heterologous production of a ligninolytic enzyme: expression of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology**, v. 9, p. 987-990, 1991

SAPARRAT, M.; GUILLÉN, F.; ARAMBARRI, A.M.; MARTINEZ, A.T.; MARTINEZ, M.J. Induction, Isolation, and Characterization of Two Laccases from the White Rot Basidiomycete *Coriolopsis rigida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1534-1540, 2002.

SCHEEL, T.; HÖFER, M.; LUDIWIG, S.; HÖLKER, U. Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.54, p. 686-691, 2000.

SCHLOSSER, D.; HÖFER, C. Laccase-Catalyzed Oxidation of Mn^{2+} in the Presence of Natural Mn^{3+} Chelators as a Novel Source of Extracellular H_2O_2 Production and Its Impact on Manganese Peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3514-3521, 2002.

SCHMID, A.; DORDICK, J.S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, v. 409, p. 258-268, 2001.

SCHNEIDER, P.; CASPERSEN, M.B.; MONDORF, K.; HALKIER, T.; SKOV, L.K.; OSTERGAARD, P.R. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. **Enzyme Microbial Technology**, v. 25, p. 502-528, 1999.

SHAN, V.; NERUD, F. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 857-870, 2002.

SHANMUGAM, S.; PALVANNAN, T.; SATHISH KUMAR, T.; MICHAEL, A. Biological decolourization of textile and paper effluents by *Pleurotus florida* and *Agaricus bisporus* (white-rot basidiomycetes). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1149-1151, 2005.

SHIN, K.S.; LEE, Y.J. Purification and Characterization of a New Member of the Laccase Family from the White-Rot Basidiomycete *Coriolus hirsutus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 384, n. 1, p. 109-115, 2000.

SHLEEV, S.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; KHALUNINA, A.; MOROZOVA, O.; YAROLOPOV, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 67, p. 115-124, 2005

SIGOILLOT, C.; RECORD, E.; BELLE, V.; ROBERT, J.L.; LEVASSEUR, A.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.; FOURNEL, A.; SIGOILLOT, J.C.; ASTHER, M. Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 346- 352, 2004

SILVA, L.H.M. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, p. 1345-1351, 2006.

SILVA, E.; MARTINS, S.; MILAGRES, A.M.F. Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2471-2475, 2008.

SILVÉRIO, S.C.; RODRÍGUEZ, O.; TEIXEIRA, J.A.; MACEDO, E.A. Liquid-liquid equilibria of Ucon + (sodium or potassium) phosphate salt aqueous two-phase systems at 23°C. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, p. 1285-1288, 2010a.

SILVÉRIO, S.C.; RODRÍGUEZ, O.; TEIXEIRA, J.A.; MACEDO, E.A. Laccase partition in Ucon-salt aqueous two-phase systems. In: **OXIDATIVE ENZYMES AS SUSTAINABLE INDUSTRIAL BIOCATALYSTS**, 2010, Santiago de Compostela, Espanha, p. 65.

SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W.; KOCH, G.; FERRAZ, A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 7, 2011.

SIQUEIRA, G. 2011. **Efeito da composição da fibra na digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 99 p. il. Dissertação (Mestrado em Ciências) Departamento de Biotecnologia, EEL-USP, Lorena, 2011.

SOARES, G.M.B.; AMORIM, M.T.P.; COSTA-FERREIRA, M. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. **Journal of Biotechnology**, v. 89, n. 2-3, p. 123-129, 2001.

SODEN, D.M.; CALLAGHAN, J.O.; DOBSON, A.D.W. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. **Microbiology**, v. 148, p. 4003-4014, 2002.

SREBOTNIK, E.; BOISSON, J.N. Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 785-789, 2005.

STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 69-80, 2001.

SUGANO, Y.; MATSUSHIMA, Y.; SHODA, M. Complete decolorization of the anthraquinone dye Reactive blue 5 by the concerted action of two peroxidases from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 862-871, 2006.

ŠUŠLA, M.; NOVOTNÝ, Č.; ERBANOVA, P.; SVOBODOVA, K. Implication of *Dichomitus squalens* Manganese-Dependent Peroxidase in Dye Decolorization and Cooperation of the Enzyme with Laccase. **Folia Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 479-485, 2008.

SVOBODOVA, K.; MAJCHERCZYK, A.; NOVOTNÝ, Č.; KUES, U. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, 463-471, 2008.

SWAMY, J.; RAMSAY, J. A. Effects of Mn^{2+} and NH_4^+ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 391-396, 1999.

TABKA, M.G.; HERPOËL-GIMBERT, I.; MONOD, F.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J.C. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 897-902, 2006.

TAN, L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 689-692, 1987.

TAVARES, A.P.M.; COELHO, M.A.Z.; AGAPITO, M.S.M.; COUTINHO J.A.P.; XAVIER, A.M.R.B. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 134, p. 233-248, 2006.

TERRÓN, M.C., GONZÁLEZ, T., CARBAJO, J.M., YAGÜE, S., ARANA-CUENCA, A., TÉLLEZ, A., DOBSON, A.D.W., GONZÁLEZ, A.E. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. **Fungal Genetics and Biology**, 41: 954-962, 2004.

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

TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H_2O_2 -requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 81, p. 2280-2284, 1984.

TIEN, M.; TU, C.-P.D. Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Nature**, v. 326, p. 520-523, 1987. (Erratum, 328:742.).

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. 331-335, 2001.

TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES, I.; BORGNE, S.L. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 46, p. 1-15, 2003.

TOSVALET, M.; ENAUD, E.; GUIAVARC'H, Y.; CORBISIER, A.-M.; VANHULLE, S. Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 368-376, 2007.

USPTO, United States Patent Office. Disponível em <http://www.uspto.gov/>. Acesso em: 28/06/2011.

VALDERRAMA, B.; OLIVER, P.; MEDRANO-SOTO, A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, p. 289-299, 2003.

VANHULLE, S.; ENAUD, E.; TROVASLET, M.; NOUAIMEH, N.; BOLS, C.-M.; KESHAVARZ, T.; TRON, T.; SANNIA, G.; CORBISIER, A.-M. Overlap of laccases/cellobiose dehydrogenase activities during the decolourisation of anthraquinonic dyes with close chemical structures by *Pycnoporus* strains. **Enzyme Microb Technol**, v. 40, p. 1723-1731, 2007.

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

VERMA, P.; MADAMWAR, D. Decolourization of synthetic dyes by a newly isolated strain of *Serratia marcescens*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 615-618, 2003.

WANG, W.; WAN, J.; NING, B.; XIA, J.; CAO, X. Preparation of a novel light-sensitive copolymer and its application in recycling aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1205, p. 171-176, 2008.

WATANABE, T.; KATAYAMA, S.; ENOKI, M.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Bjerkandera adusta*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 4222-4231, 2000.

WESENBERG, D.; BUCHON, F.; AGATHOS, S.N. Degradation of dye-containing textile effluent by the agaric white-rot fungus *Clitocybula dusenii*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 989-993, 2002.

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

WIDSTEN, P.; KANDELBAUER, A. Laccase applications in the forest products industry: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 293-307, 2008.

WITAYAKRAN, S.; RAGAUSKAS, A.J. Modification of high-lignin softwood kraft pulp with laccase and amino acids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 176-181, 2009.

WOLFAARDT, F.; TALJAARD, J.L.; JACOBS, A.; MALE, J.R.; RABIE, C.J. Assessment of wood-inhabiting Basidiomycetes for biokraft pulping of softwood chips. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 25-30, 2004.

WONG, Y.; YU, J. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, v. 33, p. 3512-3520, 1999.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 87-113, 1988.

WU, J.; KIM, K.S.; LEE, J.H.; LEE, Y.C. Cloning, expression in escherichia coli, and enzymatic properties of laccase from *Aeromonas hydrophila* WL-11. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 4, p. 635-640, 2010.

XIAO, Y.Z.; TU, X.M.; WANG, J.; ZHANG, M.; CHENG, Q.; ZENG, W.Y.; SHI, Y.Y. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a lacase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 700-707, 2003.

XU, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. **Biochemistry**, v. 35, p. 7608-7614, 1996.

YAMANAKA, R.; SOARES C.F.; MATHEUS, D.R.; MACHADO, K.M.G. Ligninolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 1-7, 2008.

YAROLOV, A.I., SKOROBOGAT'KO, V., VARTANOV, S.S., VARFOLOMEYEV, S.D. Laccase properties, catalytic mechanism, and applicability. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 49, p. 257-280, 1994.

YAYER, D.S., XU, F., GOLIGHTLY, E.J., BROWN, K.M., BROWN, S.H., REY, M.W., SCHNEIDER, P., HALKIER, T., MONDORF, K.; DALBOGE, H. Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of Two Laccase Genes from the White Rot Basidiomycete *Trametes villosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, 834-841, 1996.

YAYER, D.S.; OVERJERO, M.J.; XU, F.; NELSON, B.A.; BROWN, K.M.; HALKIER, T.; BERNUER, S.; BROWN, S.H.; KAUPPINEN, S. Molecular characterization of laccases genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase *lccl*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4943-4948, 1999.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZASLAVSKY, B.Y. **Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical Chemistry and Bioanalytical Applications**, New York, Marcel Dekker, 1994.

ZHAO, X.; HARDIN, I.R. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. **Dyes and Pigments**, v. 73, p. 322-325, 2007.

ZHOU, G.; LI, J.; CHEN, Y.; ZHAO, B.; CAO, Y.; DUAN, X.; CAO, Y. Determination of reactive oxygen species generated in laccase catalyzed oxidation of wood fibers from Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) by electron spin resonance spectrometry. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 505-508, 2009.

ZOUARI-MECHICHI, H.; MECHICHI, T.; DHOUIB, A.; SAYADI, S.; MARTÍNEZ, A.; MARTÍNEZ, M. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 141-148, 2006.