

DETERMINAÇÃO DE LACASE APARTIR DE CEPA AMAZÔNICA *Trametes elegans* UTILIZANDO O MEIO SUPLEMENTADO COM FARINHA DE CASCA DA CASTANHA DO BRASIL (*Bertholletia excelsa*), COLETADOS NO MUNICÍPIO DE ALVARÃES/AM.

Jacó Rocha da Silva¹; Andrey Azedo Damasceno²; Adriana da Silva Nunes³

¹Graduando de Licenciatura em Ciências Biológicas – UEA/CEST.

²Doutorando em Biotecnologia – PPGBIOTEC/UFAM

³Mestre em Biotecnologia – MBT/UEA

RESUMO

Atualmente vários estudos estão sendo desenvolvidos para utilização de enzimas fúngicas em várias aplicações industriais. Poucos ou raros são estudos feitos nesse sentido com fungos pertencentes à biodiversidade Amazônica. A lacase (p-difenol; dioxigêniooxidoreductase EC 1.10.3.2) é uma polifenol oxidase que atua sobre uma variedade de doadores de hidrogênio aromáticos e espécies inorgânicas, incluindo íons Mn^{+2} . A ampla gama de substratos sobre os quais a lacase pode atuar é uma característica que direciona seu emprego na biorremediação de ambientes complexos. Dada relevância da presente pesquisa e ressaltando o aproveitamento de resíduos, que se busca incrementar pesquisas no que se refere à determinação da enzima lacase, utilizou-se o resíduo da casca da Castanha do Brasil, estes foram lavados, colocados em estufa elétrica a 40° para eliminação da umidade e em seguida triturados em moinho de facas a 60 mesh. A “farinha” produzida foi utilizada como substrato de crescimento em meio líquido; onde o meio de cultivo foi incubado a 30°C em fase estacionária e em triplicata. O substrato seringaldazina foi utilizado para determinação da enzima lacase, através do método que se baseia na oxidação do substrato enzimático seringaldazina para sua forma de quinona, o substrato de crescimento em fase estacionária apresentou atividade de lacase para a cepa Amazônica *Trametes elegans*, determinados por espectrofotômetro de absorvância.

Palavras-chave: Biorremediação; fungos; enzimas oxidativas

ABSTRACT

Currently several studies are being developed for use of fungal enzymes in various industrial applications. Few studies are rare or that direction with fungi belonging to Amazonian

biodiversity. Laccase (p-diphenol; dioxigêniooxidoreductase EC 1.10.3.2) is a polyphenol oxidase that acts on a variety of aromatic hydrogen donor and inorganic species, including two Mn ions. A wide range of substrates on which the laccase can act is a feature that directs its use in bioremediation of complex environments. Given the relevance of this study and highlighting the utilization of residues, which seeks to increase research with regard to the determination of laccase enzyme, we used the residue of the peel Brazil nuts, they were washed, placed in electric oven at 40 ° for elimination of moisture and then ground into knife mill to 60 mesh. A "flour" produced was used as a substrate for growth in liquid medium, where the culture medium was incubated at 30 ° C in stationary phase and in triplicate. The substrate syringaldazine was used for determination of laccase enzyme, the method which relies on the oxidation of syringaldazine enzyme substrate to form a quinone, the growth substrate in the stationary phase showed laccase activity for *Trametes elegans* strain Amazon determined by spectrophotometer absorbance.

Word-key: Bioremediation; mushrooms; enzymes oxidative

INTRODUÇÃO

Atualmente vários estudos estão sendo desenvolvidos para utilização de enzimas fúngicas em várias aplicações industriais, e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas tem crescido rapidamente. O interesse crescente pela enzima “manganês-peroxidase” vem em função do seu potencial de uso na indústria de celulose e papel (biopolpação e bioclarificação) assim como em processos de biorremediação (HOFRICHTER ET AL.,1998; BREEN AND SINGLETON, 1999; ROGALSKI ; SZCZODRAK E JANUSZ, 2006). Manganês-peroxidase (MnP) é uma heme-dependente manganês extracelular enzima (E. C. 1.11.1.13), geralmente relacionada à mineralização da lignina, produzida somente por basidiomicetos ligninolíticos, durante o metabolismo secundário (GOLD et al., 2000). Esta enzima catalisa Mn^{2+} para altamente reativo Mn^{3+} , este estabilizado por ácidos dicarboxílico, é um mediador difusível de baixa massa molecular, o qual oxida uma variedade de substâncias fenólicas e não-fenólicas, incluindo lignina e poluentes tóxicos (PEREZ AND JEFFRIES, 1992; MOREIRA et al., 1997a). As estruturas aromáticas são despolimerizadas via formação de radicais fenox ou cátion aril, o que finalmente resulta na quebra das moléculas (HATAKKA, 1994).

Devido ao importante potencial de degradação da manganês-peroxidase (MnP) há interesse geral em produzir essa enzima biotecnologicamente. Pesquisas nesse sentido vêm sendo realizadas buscando-se conhecer os requisitos nutricionais, fatores fisiológicos e ambientais relacionados a reativação dos sistema MnP e desenvolvimento de um eficiente sistema de produção para operações em larga escala. Produção de manganês-peroxidase (MnP) por fungo de podridão branca é altamente regulada por nutrientes. Particularmente, manganês e nitrogênio tem sido mostrado possuir forte efeito regulador na atividade de MnP (BONNARME and JEFFRIES, 1990; GOLD and ALIC, 1993). Ressalta-se, que todos esses dados referem-se a fungos da América do Norte e Europa. Poucos ou raros são estudos feitos nesse sentido com fungos pertencentes a biodiversidade amazônica. A lacase (p-difenol; dioxigêniooxidoreductase EC 1.10.3.2) é uma polifenol oxidase que atua sobre uma variedade de doadores de hidrogênio aromáticos e espécies inorgânicas, incluindo ions Mn^{+2} . A ampla gama de substratos sobre os quais a lacase pode atuar é uma característica que direciona seu emprego na biorremediação de ambientes complexos como o efluente de indústrias farmacêuticas, na indústria alimentícia, indústria de celulose e papel, indústria têxtil, etc. (MACIEL, CASTRO E SILVA e RIBEIRO, 2010).

Qualquer seja o tipo de fermentação utilizada, o sistema deve oferecer eficiência de conversão do substrato em produto e rapidez na liberação deste para o meio. Pesquisas têm mostrado que a produção enzimática por Fermentação Semi-Sólida (FSS) apresenta bons níveis de atividade e propriedades funcionais adequadas às aplicações industriais quando comparada com a Fermentação Submersa (FSm) além das enzimas apresentarem boas propriedades de estabilidade do pH e temperatura (BIANCHI et. Al., 2001; PALMA, 2003). Por outro lado, pesquisas têm mostrado que os fungos apresentam respostas diferenciadas para as mesmas classes de enzimas quando cultivadas em diferentes sistemas de fermentação (SUPRABHA et. Al., 2008; BISWAS et. al., 1990). No desenvolvimento de um processo fermentativo devem-se observar aspectos gerais importantes tais como: 1) seleção adequada de microrganismo, 2) escolha do substrato de crescimento, 3) otimização dos parâmetros do processo do fermentativo que irão influenciar a produção enzimática (pH, temperatura de incubação, método de cultivo, etc.), e 4) a recuperação e a purificação do produto (PANDEY, 2003).

De acordo com PANDEY(2003), no se refere a escolha do substrato, para este experimento foi escolhido a casaca da semente da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*). A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) é originária da região Amazônica (SOUZA; MENEZES, 2004), sendo uma espécie arbórea de grande porte, da família das lecitidáceas (*Bertholletia*

excelsa), cujo caule, de casca escura, é liso e desprovido de ramos até a fronde. As flores são grandes e alvas, os frutos são esféricos, com 12 a 25 sementes envoltas em tegumentos duro, lenhoso, rugoso, com arestas bem pronunciadas e dispostas geralmente em três séries superpostas, a planta pode chegar a 50 metros de altura (SOUZA, 2006). A produção anual em 2007 na floresta Amazônica foi de 30.000 toneladas, gerando uma quantidade enorme de cascas como resíduos (BRITO et al. 2010). Assim, buscando encontrar alternativas para a utilização deste resíduo, neste experimento foi utilizado à farinha feita a partir deste resíduo, onde os principais constituintes da casca da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) são a lignina e a holocelulose que é constituída pela celulose e hemicelulose (BONELLI et al, 2001).

O grupo dos basidiomicetos inclui os fungos que produzem esporos (basidiósporos) de origem sexuada em uma estrutura especializada denominada de basídio e popularmente chamados de cogumelos e orelhas de pau. A fase vegetativa dos basidiomicetos é denominada de micélio, que por sua vez é formada por muitos filamentos septados chamados hifas. Os basidiomicetos são caracterizados por possuírem dois tipos básicos de basidiósporos. Os denominados balisfosporos, que são liberados violentamente dos basídios e os denominados estatismosporos que são liberados passivamente (Gugliotta e Capelari, 1998). Desta forma a cepa escolhida para o experimento, foi a *Trametes elegans*, que é um basidiomiceto, e tem a sua carne dura branco; sua tampa esbranquiçada, que é irregular para o ponto de ligação e mais suave em direção à margem, e sua função ecológica, que serve para decompor a madeira morta de folhosas

Dada relevância da presente pesquisa e ressaltando o aproveitamento de resíduos se faz necessário a busca incrementar pesquisas no que se refere à produção e atividade de enzimas peroxidases. Faz se necessário explorar a diversidade fúngica em busca dessas e de outras enzimas, principalmente àquela da região do Médio Solimões, visto que as condições ambientais dessa região tropical favorecem o desenvolvimento desses microrganismos, desta forma o objetivo deste estudo é determinar atividade enzimática da cepa amazônica *Trametes elegans*, determinando a atividade de lacase utilizando como fonte de carbono o resíduo da casca de *Bertholletia excelsa*, avaliando a atividade enzimática em temperatura e pH pré-estabelecidos em 30°C e pH 5,0, verificando a secreção de lacase na fase estacionária.

MATERIAL E MÉTODO

A Coleta dos basidiocarpos (*Trametes elegans*) foi realizada no mês de março de 2011, durante o período de verão no perímetro rural do município de Alvarães-Am, na

comunidade de Nogueira (Lat.: 3°, 30', 13"; Long.: 64°, 78', 4") Estes foram coletados e acondicionados em sacos de papel, previamente identificadas, registrados, anotados os substratos e encaminhadas ao laboratório de Biologia do Centro de Estudos Superiores de Tefé – CEST/Universidade do Estado do Amazonas – UEA, para então serem devidamente isolados e recebidos às respectivas metodologias e códigos de identificação, sendo que uma amostra foi enviada a coleção de Fungos do Mestrado em Biotecnologia para identificação taxonômica.

PREPARO DO MEIO DE CULTURA

Utilizou-se o meio sintético BDA (Batata, Dextrose e Agar) Sintético, sendo 38g para 1000 ml de água destilada e com o auxílio de um bastão de vidro foi dissolvido em Enlarmeyer, de 1.000 ml. Posteriormente foi vedado e levado para autoclave a 121 °C por 20 min a 1 atm para esterilização final. Posteriormente, o meio foi vertido em placas de Petri 90x15mm, Dos basidiocarpos coletados foi retirada a amostra de fungo (30 mm), utilizada para inoculação, a qual passou por um procedimento de assepsia, que consta das seguintes etapas: mergulhar a amostra por 2 minutos em álcool 70%, em seguida em hipoclorito de sódio a 3%, logo após deixou-se o inóculo imerso por 2 minutos em água destilada . Esses procedimentos foram executados em ambiente estéril (interior da câmara de fluxo laminar adaptado) Bononi e Trufem, (1985) e Cornelis, (1987).

ISOLAMENTO DOS FUNGOS

Após estes procedimentos as amostras inoculadas, seguindo a metodologia proposta por Castro e Silva (1996), foram colocadas em placas de Petri 90x15mm com meio com BDA (batata dextrose e ágar), posteriormente lacradas com fita plástica do tipo Parafilm e devidamente identificadas. As placas de Petri inoculadas foram incubadas em BOD a 30° C (± 2°C) para o crescimento micelial.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

PREPARO DO SUBSTRATO

A casca de Castanha do Brasil foi coletada na área da comunidade de Nogueira no Município de Alvarães. Estes foram lavados, colocados em estufa elétrica a 40° para eliminação da umidade e em seguida triturados em moinho de facas a 60 mesh. A farinha formada foi autoclavada a 1,5atm por 15' a 121 C⁰, para eliminação de possíveis

microrganismos presentes na casca. A “farinha” produzida foi utilizada como substrato de crescimento em meio líquido.

MEIO DE CULTIVO

Foram retiradas três fragmentos fúngicos de aproximadamente 5mm de diâmetro das bordas das placas e transferidos para o meio de cultivo composto por 1000 ml de água destilada estéril, 1g de glicose e farinha da casca da castanha na concentração 10g/L em erlenmeyer com capacidade de 150 ml, os quais posteriormente foram incubadas em estufa BOD em condição estacionária à temperatura de 30°C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foram determinadas as atividades de lacase dos fungos *Trametes elegans* e na concentração de 2% de farinha da casca da castanha testada nos períodos de 03, 06 e 09 dias. Para determinação das atividades da enzima foi utilizado o aparelho espectrofotômetro de absorvância para leitura das amostras coletadas, onde é posto o substrato seringaldazina juntamente com a mistura reacional em uma cubeta.

ATIVIDADE DE LACASE

As alíquotas foram enviadas ao laboratório de biorgânica da Universidade do Estado do Amazonas – Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais / MBT, situada em Manaus, sendo entregue a Professora MSc. Adriana da Silva Nunes, para serem determinadas em espectrofotômetro.

O substrato seringaldazina foi utilizado para determinação da enzima lacase, utilizando-se o método proposto por Szklarz et al. (1989), que baseia-se na oxidação do substrato enzimático de seringaldazina para sua forma de quinona. A mistura reacional foi composta de 1 ml da amostra filtrada; 0,95 mL tampão tartarato de sódio pH 4,5; 0,1mL seringaldazina (produção estoque de 5mg/ 1mL de etanol) e 0,1mL de água destilada, sendo monitorado o aumento da absorvância em 525 nm durante 60 segundos, utilizando-se o coeficiente de absorção $\epsilon = 6,5 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de produto (μmol) liberada em um minuto por mL de amostra ($U = \mu\text{mol} \cdot \text{mim}^{-1}$).

RESULTADO E DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível determinar a cinética enzimática da enzima lacase obtida a partir da cepa do fungo *Trametes elegans*, sob a condição estacionária e utilizando a concentração de 2% utilizando o suplemento do resíduo da casca da castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), como fonte de carbono alternativo, fermentados em faixa de pH pré-estabelecido pH 5 e ainda dentro de um intervalo de tempo de 09 dias de atividade. A atividade enzimática foi calculada utilizando a metodologia proposta por (ANDER e ERIKSSON, 1976).

CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi calculada da seguinte maneira: (ANDER e ERIKSSON, 1976).

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{\Delta \text{ABS} \cdot 10^6}{\epsilon \cdot R \cdot \Delta T}$$

onde:

ϵ = coeficiente de absorção de cada substrato, conforme dados da literatura;

ΔABS = Absorção final – Absorção inicial;

R = Volume em ml

Δt = tempo de reação em minutos.

O basidiomiceto *Trametes elegans* produziu a enzima lacase logo no terceiro dia de atividade, evidenciando assim um pico de 14,67 U/L de cinética enzimática, resultado este que foi potencializado, na segunda leitura da amostra, que ocorreu no sexto dia de atividade, ressalta-se que houve um acréscimo nesta secreção de lacase de 29,07 U/L, no nono dia de secreção houve ainda um acréscimo na presente leitura evidenciando esta secreção destes metabólitos, obtendo ainda um pico enzimático de 38,00 U/L (figura 01).

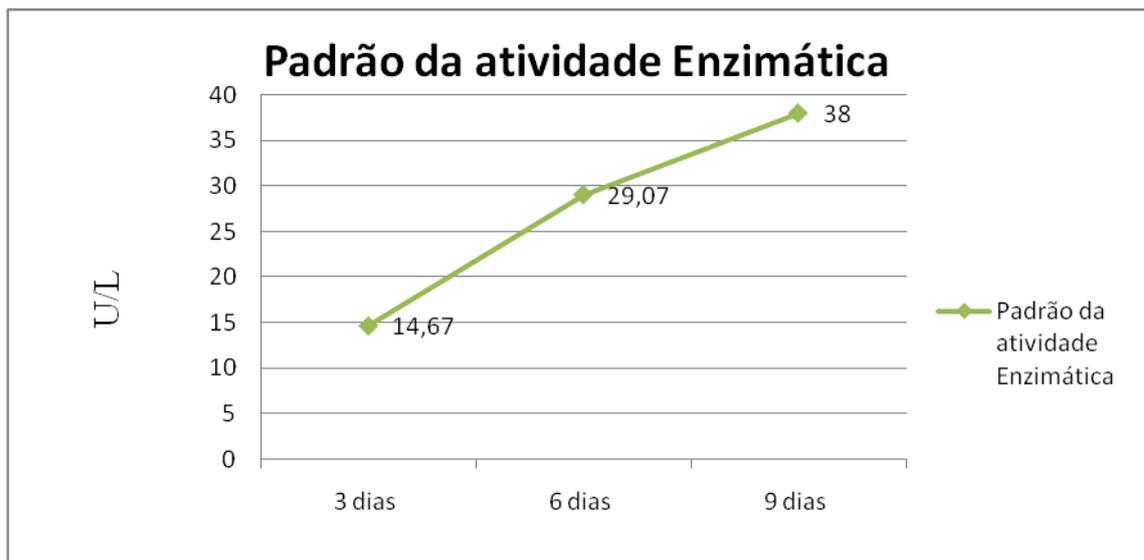


Figura 1 - Atividade Enzimática de Lacase utilizando a cepa Amazônica *Trametes elegans* a partir do meio nutricional contendo o resíduo da casca da amêndoa de *Bertholletia excelsa*.

Diversos fatores influenciam a produção de lacase e conseqüentemente a formação de produtos. Pode-se destacar entre outros: a composição do meio de crescimento, tempo de cultivo, pH, razão carbono: nitrogênio, temperatura, natureza química do substrato, luminosidade e aeração (IKEHATA *et al.*, 2004). As funções biológicas da lacase nos microorganismos ainda não estão muito claras. Em fungos há relatos sobre sua participação no rápido crescimento celular (LEONOWICZ *et al.*, 2001), esporulação (GIANFREDA *et al.*, 1999) e degradação de lignina (EGGERT *et al.*, 1996). De acordo com Rothschild *et al.* (2002) a atividade da Lipase e da Lacase tem sido relatada em alguns fungos da podridão branca.

Segundo Mayer & Staples (2002), do ponto de vista evolucionário, a lacase fúngica é uma enzima bastante antiga e a ligação da atividade enzimática associada a três diferentes sítios de cobre é um processo evolucionário muito precoce. A atividade catalítica das lacases está relacionada à presença de quatro átomos de cobre por unidade de proteína, sendo os mesmos denominados de acordo com suas características espectrofotométricas (Claus 2004; Leontievsky *et al.* 1997a).

Entre a diversidade de compostos oxidados pela lacase, a oxidação da seringaldazina na ausência de H_2O_2 é típica para identificação de lacase fúngica. A seringaldazina é um substrato fenólico dimetoxilado apresentando em sua estrutura dois átomos de nitrogênio ligados por uma dupla ligação, caracterizando assim um composto azo. A reação com a seringaldazina gera inicialmente um radical livre. Em seguida ocorre a liberação do segundo elétron através de ação enzimática e/ou desprotonação, formando

uma quinona de coloração púrpura intensa e que aparentemente não é propensa à polimerização (Thurston 1994), (figura 02).

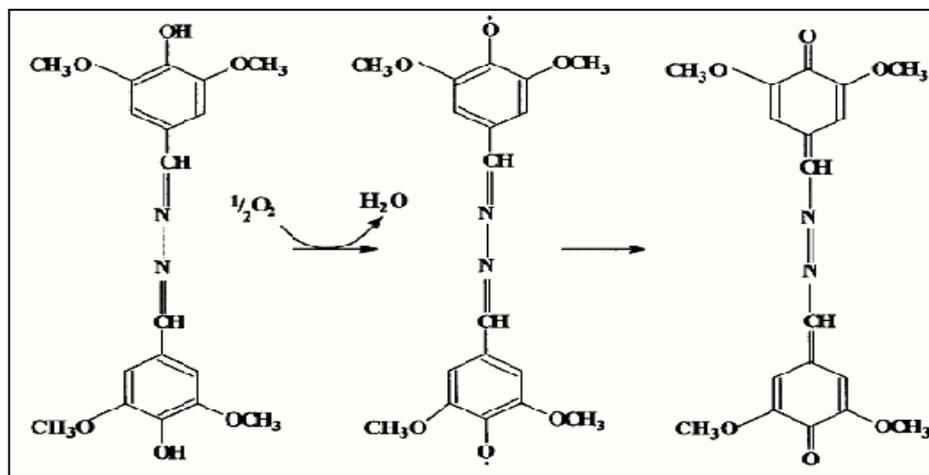


Figura 2 - Reação de oxidação da seringaldazina até formação da correspondente quinona.

Outro ponto que merece nossas considerações, foi a faixa de pH 05 utilizada neste estudo por exemplo: a faixa de pH, ótimo para basidiomicetos esta entre as faixas de 4 e 5, portanto estes organismos tem preferência por meios ácidos (DAMASCENO 2009). Cabe ainda mencionara a composição do o resíduo da casca da castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), onde seus principais constituintes são a lignina e a holocelulose que é constituída pela celulose e hemicelulose (BONELLI et al, 2001).

CONCLUSÃO

- A cepa Amazônica *T. elegans*, evidenciou uma excelente cinética enzimática no terceiro dia.
- Houve uma interação entre a Cepa Amazônica *T. elegans* e sua respectiva fonte de carbono (*Bertholletia excelsa*), evidenciando o uso do resíduo devido a sua composição, a qual possui como principais constituintes a lignina e a holocelulose que é composta por celulose e hemicelulose, os quais são afins pelo basidiomiceto estudado.
- Seu melhor pico enzimático foi no nono dia de atividade obtendo a média de 38 U/L, evidenciando seu potencial biotecnológico, o credenciando assim para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDER, P., ERIKSSON, K.-E., KOLAR, M.-C., KRINGSTAD, K., RANNUG, U., AND RAMEL, C. (1976). Studies on the Mutagenic Properties of Bleaching Effluents. *Svensk Papperstidn.* **80**:454-459.

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

BISWAS, S.R.; JANA, S.C.; MISHRA, A. K.; NANDA, G. Production, purification, and characterization of xylanases from a hyperxylanolytic mutant *Aspergillus ochraceus*. **Biotechnology and Bioengineering**, 35, 244-251, 1990.

BONELLI, P.R.; DELLA ROCCA, P.A.; CERRELLA, E.G.; CUKIERMAN, A.L. Effect of pyrolysis temperature on composition, surface properties and thermal degradation rates of Brazil Nut shells. **Bioresource Technology** 76 (2001) 15-22.

BONNARME, P., JEFFRIES, T.W., Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. **Appl. Environ. Microbiol.** 56, 210–217. 1990.

BONONI, V. L. R. & TRUFEM, S. F. B. **Cogumelos comestíveis**. São Paulo, Icone Editora Ltda, 1985. 85p.

BRITO, S. M. O.; ANDRADE, H. M. C.; SOARES, L. F. R.; AZEVEDO, P. Brazil nut shells as a new biosorbent to remove methylene blue and índigo carmine from aqueous solutions.

BREEN, A., SINGLETON, F.L., Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Curr. Opin. Biotechnol.** 10, 252–258. 1999.

CASTRO E SILVA, A. **Micromorfologia da degradação de madeira da espécie amazônica *Hura creptans* L. Por fungos lignolíticos pertencentes a classe Hymenomyces.** Tese de doutorado. Manaus: INPA/FUA. 1996.

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

EGGERT, C.;TEMP, U.;DEAN, J. F. D.;ERIKSSON, K. E. L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by lacase. *Febs Letters*, v.391 ,p.144-148, 1996.

GIANFREDA *ET AL.*; DURÁN *ET AL.*;GIANFREDA, L.; XU, F.; Bollag, Jm. *Bioremediation Journal*, v. 3, p. 1, 1999.

GOLD, M.H., ALIC, M., Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiol. Rev.** 57,605–622. 1993.

GOLD, M.H., YOUNGS, H.L., GELPKE, M.D.S., **Manganese peroxidase.** In: Sigel, A., Sigel, H. (Eds.), *Metal Ions in Biological System*. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, pp. 559–586. 2000.

GUGLIOTTA, A.M. e CAPELARI, M. **Taxonomia de basidiomicetos.** In: Bonomi, V.L.R. Grgl. *Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas*, Instituto de Botânica, São Paulo, 184 p. 1998.

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

HOFRICHTER, M., SCHEIBNER, K., SCHNEEGAB, I., FRITSCH, W., Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64, 399–404. 1998.

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

LEONOWICZ A.; CHO NS.; LUTEREK J.; WILKOLAZKA A.; WOJTAS-WASILEWSKA M.; MATUSZEWSKA A.; HOFRICHTER M.; WESENBERG D.; ROGALSKI J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal Basic Microbiol*,v.41,p.185-227, 2001.

LEONTIEVSKY, A. A., VARES, T., LANKINEN, P., SHERGILL, J. K., POZDNYAKOVA, N. N., MYASOEDOVA, N. M. , KALKKINEN, N. , GOLOVLEVA, L. A., CAMMACK, R., THURSTON, C. F. & HATAKKA, A. Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, 156; 9 – 14, 1997a.

LEONTIEVSKY, A. A., J. K., POZDNYAKOVA, N. N., MYASOEDOVA, N. M. , KALKKINEN, N. , GOLOVLEVA, L. A., Yellow Laccases of *Panus tigrinus* oxidizes non phenolic substrates without electron-transfer mediators. **FEBS Letters**, 413; 446 – 448, 1997b.

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

MAYER, A. M. & STAPLES, R.C. Review – laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, 60: 551-565, 2002.

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

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

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

Perez, J., Jeffries, T.W., Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58, 2402–2409. 1992.

ROGALSKI, J.; SZCZODRAK, J.; JANUSZ, G. (2006) Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii* *Bioresource Technology* Volume: 97, Issue: 3, February, , pp. 469-476

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

SOUZA, Maria Luzenira de; MENEZES, Hilary Castle de. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(1): 120-128, jan.-mar. 2004.

SOUZA, I. F. **Cadeia produtiva de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) no estado de Mato Grosso**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2006.

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

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

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**. 140: 19-26, 1994.