

Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas

Sugarcane bagasse: Source for the production of ligninocellulolytic enzymes

Cristiano Ragagnin de Menezes

Doutor, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP
Pesquisador convidado, Instituto de Tecnologia de Alimentos- SP
Campinas, São Paulo, Brasil, CEP 13083-862
menezes@ital.sp.gov.br

Isis Serrano Silva

Doutora, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP
Campinas, São Paulo, Brasil, CEP 13083-862
zizinha@yahoo.com

Lucia Regina Durrant

Prof. Doutora, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP
Campinas, São Paulo, Brasil, CEP 13083-862
durrant@fea.unicamp.br

Resumo

A produção de enzimas lignocelulolíticas através de *Pleurotus ssp* foi estudada em fermentação submersa utilizando bagaço de cana. Entre estas enzimas, lacase e manganês peroxidase foram detectadas. Os maiores produtores de lacase foram as linhagem *Pleurotus sp* BCCB068, com 6,23 U/L no 15º dia e a linhagem *Pleurotus sajor-caju*, com 3,52 U/L no 10º dia de incubação. Manganês peroxidase foi detectada com *Pleurotus sp* BCCB068 (31.56 U/L) no 5º dia e 23,58 U/L com *Pleurotus tailandia* no 15º dia de incubação. A produção de enzimas celulolíticas não foi significativa. Estes resultados mostram que o resíduo de bagaço de cana é uma possível fonte de enzimas ligninolíticas e possui aplicabilidade na área biotecnológica.

Abstract

The production of ligninocellulolytic enzymes by *Pleurotus ssp* was evaluated by submerged fermentation on sugarcane bagasse. Among these enzymes, Laccase and Manganese-peroxidase have been detected. The most producer of Laccase were *Pleurotus sp* BCCB068, reaching activity of 6,23 U/L on the 15th day and *Pleurotus sajor-caju*, 3,52 U/L on the 10th day of cultivation. Manganese-peroxidase was detected in the medium with *Pleurotus sp* BCCB068 (31.56 U/L) on the 5th day and 23.58 U/L with *Pleurotus tailandia* on the 15th day of incubation. The production of cellulolytic enzymes was not significant. These results showed that sugarcane bagasse residues are feasible source of ligninolytic enzymes and have applicability in the biotechnological field.

Palavras-chave: biodegradação, enzimas, **Key words:** biodegradation, enzymes, recycling.
reciclagem.

1. Introdução

Nas últimas décadas há uma crescente busca da utilização dos resíduos agroindustriais, devido a incessante demanda das atividades agrícolas. O acúmulo destes resíduos gera a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais, transformando-os em

compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc. A utilização de resíduo de bagaço de cana em bioprocessos é uma racional alternativa para produção de substratos, e uma ajuda para solucionar o problema da poluição ambiental (Pandey *et al.*, 2000).

Os resíduos lignocelulósicos são uma grande alternativa para a geração de energia, devido a sua grande disponibilidade na natureza. Atualmente, os maiores usos da lignocelulose concentram-se nas polpas e indústrias de papéis, proteína para ração, em meios tecnológicos de alimentação, além de poderem gerar energia através da produção de etanol (Ballesteros, 2001).

Os resíduos agrícolas contêm de 20 a 60% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina. O bagaço de cana contém cerca de 25 a 40% de celulose e o restante de hemicelulose (20 a 35%) e lignina (15 a 35%) (Cowling e Kirk, 1976).

Espécies de *Pleurotus* são relatados como sendo eficientes colonizadores e degradadores de lignoceluloses. Estes fungos realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela elaboração das enzimas como celulasas, β -glicosidase, xilanases, lacases, manganês-peroxidases e lignina peroxidases que estão envolvidas na degradação de lignoceluloses (Qinnghe *et al.*, 2004; Palmieri *et al.*, 2000). Estes fungos formam um grupo altamente degradativo que atuam sobre constituintes maiores de resíduos lignocelulósicos, como a celulose, a hemicelulose e a lignina (Shishido, 1992). Muitos destes microrganismos são capazes de fazer a bioconversão desses substratos lignocelulósicos em compostos de fácil assimilação para o seu metabolismo, onde as enzimas hidrolíticas tem papel fundamental nessa bioconversão, e agem conjunta e sinergisticamente na formação de um complexo com várias enzimas, destacando-se: celobiohidrolases, endoglucanases, beta-glucosidases e xilanases (Valasková e Baldrian, 2006).

Atualmente, estas enzimas são utilizadas em várias aplicações industriais e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas tem crescido rapidamente. Em 1995, o mercado mundial de enzimas superou 1 bilhão de dólares, enquanto espera-se para 2005, a comercialização de 1,7 a 2 bilhões. Cerca de 60% das indústrias que vendem enzimas encontram-se na Europa, as outras 40% estão nos Estados Unidos e no Japão. A aplicação de celulasas e xilanases começou na década de 80, primeiro em rações animais, seguida pela adição em alimentos e posteriormente em indústrias têxtil e de papel. Atualmente, essas enzimas juntamente com as pectinases, são responsáveis por 20% do mercado mundial (Bhat, 2000).

De acordo com os dados do Ministério do desenvolvimento e comércio exterior do governo federal, sobre o mercado de enzimas do Brasil, no ano de 2005, o total de importações brasileiras foi de US\$ 95,7 milhões, enquanto as exportações foram de US\$ 5,4 milhões, mostrando que o mercado brasileiro é essencialmente importador, indicando desvantagem tecnológica e estratégica em termos de produção e uso das enzimas no país. Desta forma, a utilização do bagaço para produção enzimática, é uma alternativa para as indústrias de biotecnologia obterem enzimas hidrolíticas e oxidativas com um custo mais barato em relação às enzimas que estão no mercado. Além destas vantagens mencionadas, a produção destas enzimas utilizando o bagaço de cana dispõe-se também como uma maneira viável de agregar valor a estes resíduos,

e outros com características similares ao bagaço de cana, como resíduos de palha e casca de arroz, sabugo de milho, entre outros, diminuindo assim o impacto ao meio ambiente (Valasková e Baldrian, 2006).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a produção de enzimas celulolíticas (carboximetilcelulase e avicelase), hemicelulíticas (xilanase) e ligninolíticas (lacase e manganês peroxidase) pelos fungos do gênero *Pleurotus* (*P. sp* BCCB068, *P. Tailândia* e *P. saior-caju*) através de fermentação submersa (durante 30 dias a 30°C) utilizando bagaço de cana como fonte de carbono.

2. Materiais e Métodos

O bagaço de cana foi obtido na região sucroalcooleira de Ribeirão Preto –SP, com a amostra contendo baixo teor de umidade, com a consistência das fibras em estado seco. Logo após a coleta, as fibras foram trituradas até o ponto dos grânulos ficarem do tamanho próximo a de uma farinha. O material depois de processado foi esterilizado a 121°C por 15 min e armazenado em refrigerador adequado na temperatura de -4°C, até a sua utilização no experimento.

Os fungos avaliados foram mantidos em tubos de ensaio, contendo o meio de cultivo batata dextrose ágar (BDA-Difco), esterilizado a 121°C por 15 min. Após o crescimento fúngico por 7 dias a 30°C, os tubos foram refrigerados a 4°C. O micélio fúngico cultivado em placa de Petri com agar BDA por 7 dias, foi utilizado como inóculo na forma de discos de 6 mm de diâmetro.

A fermentação submersa foi realizada em frascos Erlenmeyers contendo 30 ml de meio basal (em pH 5,5) adicionado de 1% (m/v) dos substratos avaliados. O meio basal apresenta a seguinte composição: 1,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,0 g/L de KH_2PO_4 ; 0,1 g/L de uréia; 0,3 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g/L de CaCl_2 ; 5,0 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,56 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2,0 mg/L de CoCl_2 e 1,4 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a pH 5,5. Os frascos foram fechados e esterilizados a 121°C por 15 minutos.

Após a esterilização os frascos foram inoculados com 3 discos de micélio fúngico (6 mm de diâmetro), foram incubados por 30 dias a 30°C, sem agitação (cultivo estacionário). Foram coletadas amostras em triplicatas a cada 5 dias, a partir do 5º dia de incubação, até o 30º dia. O fluido extracelular cultivado foi centrifugado a 33.450 g, a 4°C por 15 min. Os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático bruto.

2.1 Determinação da atividade enzimática

As atividades enzimáticas iniciais foram determinadas em espectrofotômetro ultravioleta, acompanhadas por controles (caldos enzimáticos e substratos analisados isoladamente), para descartar possíveis interferentes com os métodos de determinação.

2.1.1 Atividade das enzimas ligninolíticas

As atividades das enzimas lacase (Lac, EC 1.10.3.2) e manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13), foram determinadas, a partir do cálculo da diferença de absorbância, conforme descrito a seguir. Todas as atividades foram expressas em U/L.min⁻¹ (µmoles produto/min.L). Os cálculos realizados a partir da equação 1.

$$U/L = \Delta \text{ abs} \times 10^6 / E \times R \times t = U/L.\text{min}^{-1} \quad (1),$$

onde A, absorbância final - absorbância inicial; E, ε (do produto formado); R, quantidade de caldo enzimático (L); t, tempo de reação (minutos).

2.1.1.1 Atividade da lacase

A atividade da lacase foi determinada, utilizando-se siringaldazina como substrato enzimático (Szklař et al., 1989). A oxidação de siringaldazina até sua forma quinona foi acompanhada por 10 minutos a 525 nm, a temperatura ambiente. A mistura da reação foi constituída por 0,6 mL de caldo enzimático, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), 0,1 mL água destilada e 0,1 mL de siringaldazina 1,0mM preparada em etanol.

2.1.1.2 Atividade da manganês peroxidase

A atividade de peroxidase dependente de Mn(II), foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol (Kuwahara et al., 1984). A mistura de reação (1,0 mL) foi constituída por 0,5 mL de caldo enzimático, 0,1mL de lactato de sódio 0,25M, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,05 mL de MnSO₄ 2,0 mM, 0,05 mL de uma solução de H₂O₂ 2,0 mM preparada em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura foi incubada durante 5 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 40 µL de NaOH 2,0 N, com a leitura em absorbância de 610 nm.

2.1.2 Atividade de enzimas celulolíticas

Nas determinações de carboximetilcelulase e avicelase, a glicose foi utilizada como padrão. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como o número de µmoles de açúcar redutor produzido por minuto por ml de enzima.

2.1.2.1 Atividade de avicelase

A atividade de avicelase (EC 3.2.1.91) consiste na adição de 1mL do extrato enzimático bruto em 1 mL de solução 1% de celulose microcristalina (avicel), em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e incubado a 50°C, por 30 minutos. Periodicamente, o sistema sustrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a

celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com Miller (1959).

2.1.2.2 Atividade de carboximetilcelulase (CMCase)

A atividade de Carboximetilcelulase (CMCase, EC 3.2.1.4) consiste na adição de 1mL do extrato enzimático bruto em 1 mL de solução de carboximetilcelulose 1% em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e incubado a 50°C, por 30 minutos. Periodicamente, o sistema sustrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com Miller (1959).

2.1.3 Atividade de enzima xilanolítica

2.1.3.1 Atividade de xilanase

A atividade da enzima xilanase (endo-1,4- β -xilanase, EC 3.2.1.8) foi determinada segundo Miller (1959). A reação consiste na mistura contendo 1 mL de sobrenadante da cultura (extrato enzimático), 1 mL de solução de 1% de xilana (Sigma) em 0,05 M de tampão acetato pH 5,0, e 2 mL da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi incubado em 50° C por 30 minutos, e o sistema enzima-substrato foi agitado periodicamente para manter a xilana em suspensão. Os tubos contendo as reações foram lidas em espectrofotômetro em 550nm. Os valores foram expressos em U/mL , onde 1 unidade representa 1 μ mol de xilose produzido por minuto.

3. Resultados e discussão

A pesquisa de enzimas ligninocelulolíticas revelou a presença da enzima lacase, destacando-se a linhagem *Pleurotus sp* BCCB068 com as atividades de 6,23 U/L (15° dia) e 4,68 U/L (20° dia) respectivamente (Figura 1). As demais linhagens não obtiveram resultados expressivos, tendo o fungo *Pleurotus sajor-caju* obtido a atividade máxima de 3,52 U/L (10° dia) e a linhagem *Pleurotus tailandia* 1,63 U/mL (10° dia). Trabalhos realizados por Kumaran e colaboradores (1997), apresentaram para o fungo *Pleurotus sajor caju* 10,6 U/L de atividade de lacase, em substrato lignocelulósico. A enzima lacase é uma glicoproteína polifenoloxidase que contém cobre no seu sítio ativo e catalisa a redução de O₂ para água, com simultânea oxidação de substratos fenólicos. A catálise de substratos fenólicos e compostos modelos de lignina por lacase ocorrem via transferência de um elétron, conduzindo à geração de radicais fenoxila, que podem ser convertidos a quinonas (Leonowicz *et al.*, 2001).

Para a atividade de manganês peroxidase (Figura 2), novamente a maior atividade obtida foi com a linhagem *Pleurotus sp* BCCB068 com 31,56 U/L (5° dia) e 24,84 U/L (30° dia). As demais linhagens também produziram atividades consideráveis desta enzima, com a linhagem *Pleurotus sajor-caju* obtido a atividade máxima de 22,86 U/L (10° dia) e a linhagem *Pleurotus tailandia* 23,58 U/mL (15° dia). A atividade de manganês peroxidase é produzida durante o metabolismo secundário e é regulada pelas concentrações de

carbono e nitrogênio no meio de cultura. É cataliticamente dependente de H_2O_2 e íons $Mn(II)$, e α -cetoácidos que estabilizam a sua atividade oxidativa (Valasková, 2006). O substrato bagaço de cana é rico em lignina, demonstrando deste modo, que as linhagens apresentaram atividades enzimáticas ligninolíticas similares aos encontrados na literatura. Estes resultados foram também encontrados por Vikineswary *et al.* (2005), em todos os resíduos agroindustriais testados para a produção de lacase, utilizando o fungo *P. sanguineus*, que revelou-se grande produtor desta enzima em 11 dias de fermentação sólida.

Estes resultados de enzimas ligninolíticas provindos da utilização do bagaço de cana como fonte de carbono para os fungos basidiomicetos testados foram muito promissores, visto que na literatura, existem muitos relatos da dificuldade de obtenção destas enzimas pelo bagaço de cana, devido a complexidade de sua estrutura. Rajarathnam e Bano (1987) observaram em seus trabalhos, que diversas espécies de *Pleurotus* não se desenvolviam bem sobre o bagaço de cana, e justificaram este fato à incapacidade metabólica do fungo para utilizar o açúcar sacarose. Uma alternativa apontada foi a de suplementar o bagaço de cana com outros resíduos agrícolas, abundantemente produzidos, como o farelo de arroz e farelo de trigo, ricos em proteínas, lipídios, vitaminas e sais minerais, além da fração lignocelulósica, de forma a favorecer o desenvolvimento micelial fúngico (Luh, 1991).

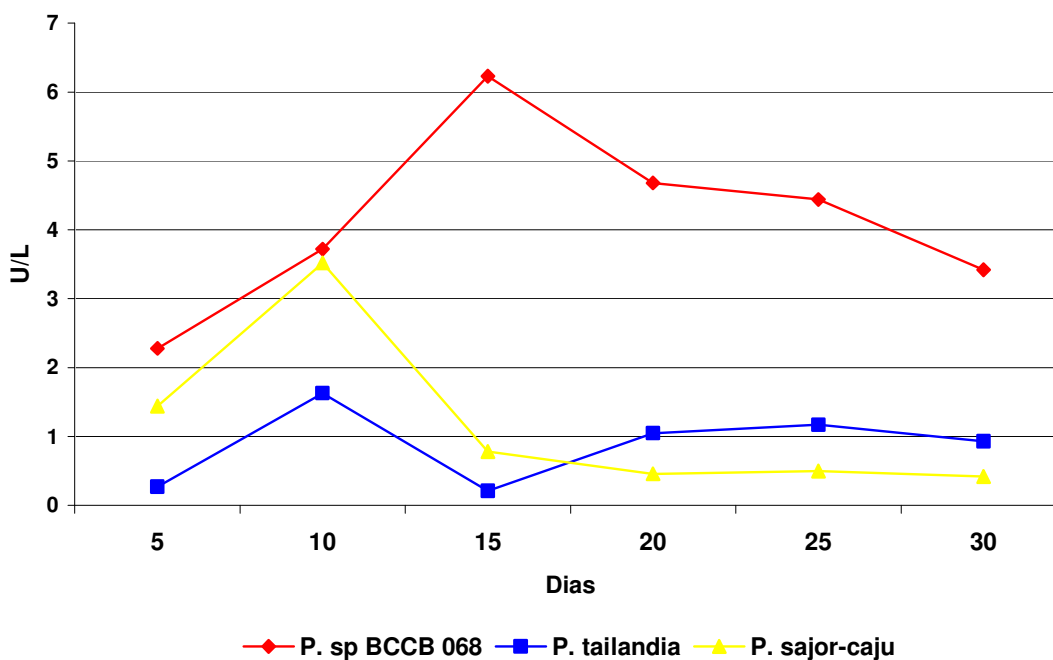


Figura 1: Atividade de lacase produzida pelas linhagens fúngicas após incubação com bagaço de cana durante 30 dias.

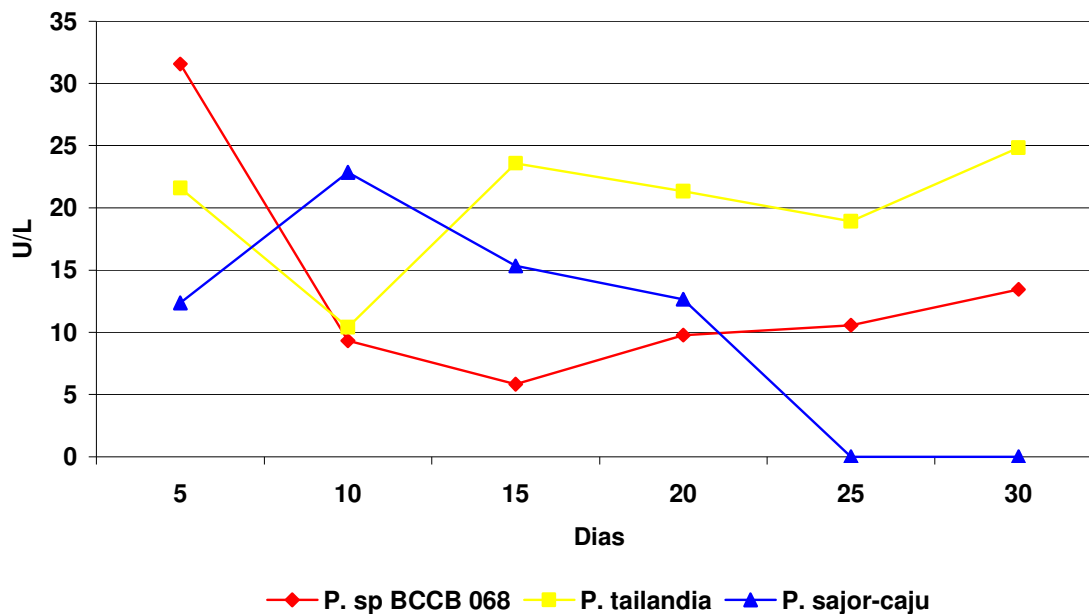


Figura 2: Atividade de manganês peroxidase produzida pelas linhagens fúngicas após incubação com bagaço de cana durante 30 dias.

Em relação as enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, os resultados não demonstraram grandes valores. Os resultados com a enzima avicelase (Figura 3) mostrou pouca atividade desta enzima por todas as linhagens em relação ao substrato testado. Sendo que a maior atividade alcançada foi com a linhagem *Pleurotus sajor-caju* com 0,08 U/mL (20° e 25° dias de incubação). De acordo com os resultados apresentados para a atividade de carboximetilcelulase (Figura 4), todas as amostras apresentaram baixas atividades desta enzima, sendo que a maior foi produzida pela linhagem *Pleurotus thailandia* com 0,06 U/mL no 10° dia de incubação. As enzimas carboximetilcelulase (endoglucanase) e avicelase (exoglucanase) formam um sistema enzimático hidrolítico importante para a degradação da celulose (Bayer e Lamed, 1992). A celulose de plantas é composta por estruturas cristalinas e amorfas, sendo que a primeira é mais resistente à degradação microbiana (Karunanandaa *et al.*, 1995). Estudos realizados por Silva (2001), demonstraram que o substrato lignocelulósico bagaço de cana não foi uma boa fonte de carbono para a produção de enzimas celulolíticas pelas linhagens do gênero *Pleurotus*. Reddy *et al.* (2003), estudaram a atividade enzimática celulolítica de fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju*, utilizando substrato de resíduos lignocelulósicos de banana em fermentação semi-sólida, obtendo também baixa atividade celulolítica, o que foi comprovado através dos resultados obtidos neste experimento.

Para a atividade de xilanase (Figura 5), as linhagem *Pleurotus thailandia* e *Pleurotus sajor-caju* apresentaram as maiores atividades com 0,11 U/mL (nos dias 10 e 20, respectivamente), sendo que os resultados não foram significativos. Estes resultados ficaram bem abaixo aos obtidos por Qinnghe *et al.*

(2004), que obteve 24,98 U/mL de atividade de xilanase, utilizando como substrato sabugo de milho e aveia utilizando fungo *Pleurotus ostreatus*- CY012 em fermentação líquida, sob condições otimizadas, e abaixo dos valores obtidos por Ximenes *et al.* (1997), com 1,2 U/mL, utilizando o microrganismo *Fumigatus fraserius* utilizando farelo de trigo.

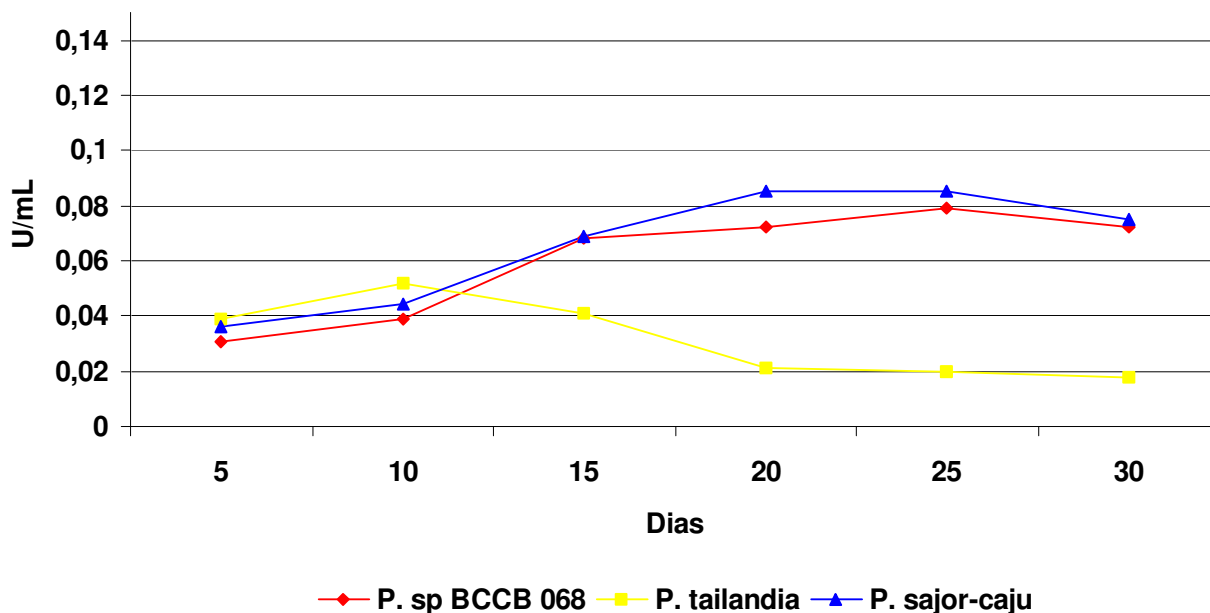


Figura 3: Atividade de avicelase produzida pelas linhagens fúngicas após incubação com bagaço de cana durante 30 dias.

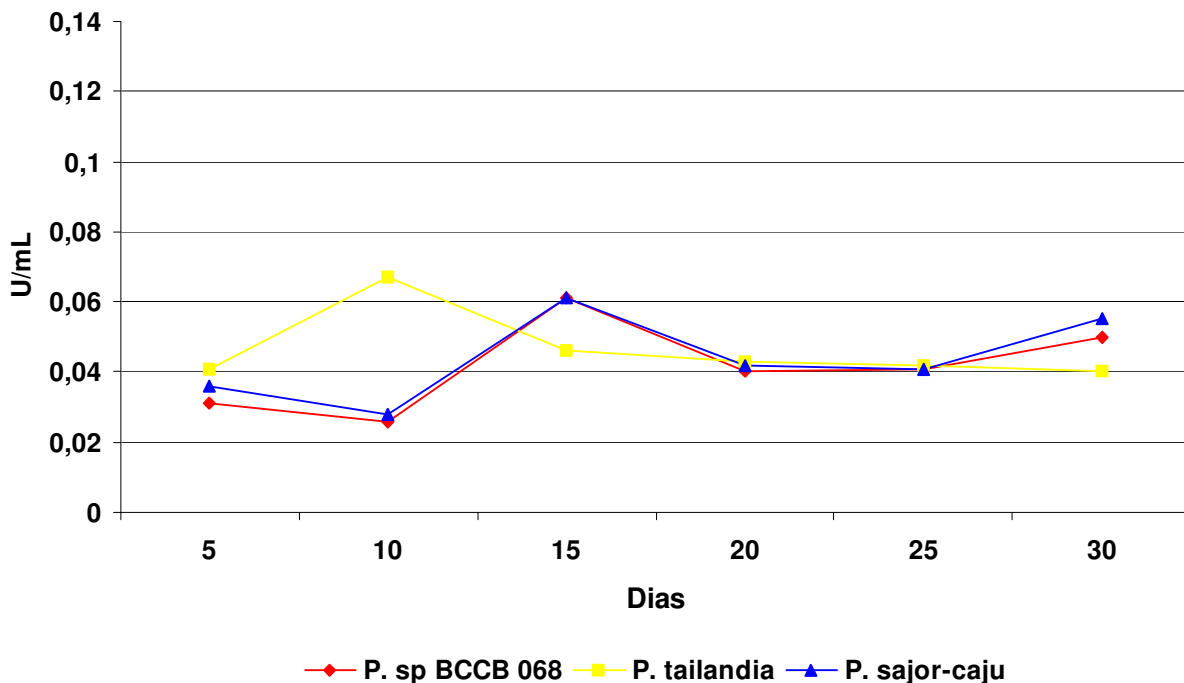


Figura 4: Atividade de Carboximetilcelulase produzida pelas linhagens fúngicas após incubação com bagaço de cana durante 30 dias.

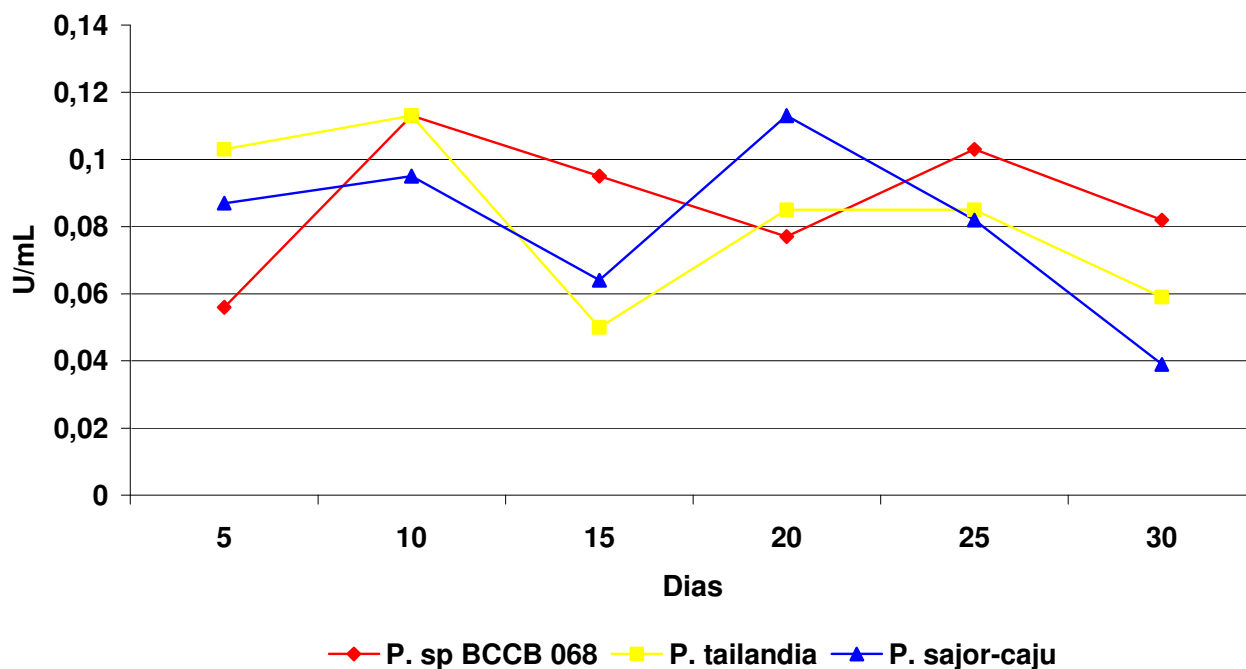


Figura 5: Atividade de xilanase produzida pelas linhagens fúngicas após incubação com bagaço de cana durante 30 dias.

4. Conclusões

Os resultados demonstraram que todos os fungos utilizados produziram enzimas lignocelulolíticas lacase e manganês peroxidase, com resultados semelhantes aos encontrados na literatura científica, com destaque para a linhagem *P. sp* BCCB068 com atividades de 6,23 U/L de lacase no 15º dia de incubação e 31,56 U/L de manganês peroxidase (5º dia). As linhagens *P. thailandia* e *P. sajor-caju* apresentaram também grandes atividades para a enzima manganês peroxidase com 22,86 U/L (10º dia) e 23,58 U/L (15º dia), respectivamente. Estes resultados já eram esperados, devido a grande quantidade de lignina contida neste tipo de resíduos.

De acordo com os estudos realizados, conclui-se que o bagaço de cana é uma fonte potencial para a produção de enzimas lignocelulolíticas para utilização em processos industriais e biotecnológicos, além possibilitar uma importante alternativa para a reciclagem de resíduos lignocelulósicos provenientes das atividades agrícolas, contribuindo assim para resolver os problemas ambientais decorrentes do acúmulo destes resíduos na natureza.

Referências

- BALLESTEROS, M. 2001. Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomasa: Biocombustibles para el sector del transporte. *Energía*, **161**(1):29-34.
- BAYER, E.A.; LAMED, R. 1992. The cellulose paradox: Pollutant *par excellence* and/or a reclaimable natural resource. *Biodegradation*, **3**:171-188.
- BHAT, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology: review. *Biotechnology Advances*, **18**:355-383.
- COWLING, E.B.; KIRK, T.K. 1976. Properties of cellulose and lignocellulose materials and substrats for enzymatic conversion processes. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, **6**:95-123.
- KARUNANANDAA, K.; VARGA, G.A.; AKIN, D.E.; RIGSBY, L.L.; ROYSE, D.J. 1995. Botanical fractions of rice straw colonized by white-rot fungi: changes in chemical composition and structure. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **55**:179-199.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, **169**:247-250.
- LEONOWICZ, A.; CHO, J.; LUTEREK, A.; WILKOLAZKA, A.; WOJTASWASILEWSKA, S.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. 2001. Fungal laccase: Properties and activity on lignin, J. *Basic Microbiol.*, **41**:185-227.
- LUH, B.S. 1991. Rice – Utilization. *Van Nostrand Reinold*, **2**(1):313- 362.
- MILLER, G.L. 1959. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for fetermination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**:426-428.
- PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; FONTANELLA, B.; SANNIA, G. 2000. Induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus Appl and Environmental Microbiology*. **1**:920-924.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MOHAN, R. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresouce Technology*, **74**:81-87.
- QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N.; CHENG, J.; QIUGANG, M. 2004. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot funfus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry*, **39**:561-1566.
- RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. 1987. *Pleurotus*, Mushrooms. Part I – A morphology, life cicle taxonomy, breeding and cultivation. *CRCC – Food Science Nutrition*, **26**:157-311.

- REDDY, G.V.; BABU, R.; KOMARAIHAH, P.; ROY, K.R.R.M.; KOTHARI, I.L. 2003. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P.ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process of Biochemistry*, **38**:1457-1462.
- SHISHIDO, K. 1992. The application of molecular genetics to oriental mushrooms. *Applied molecular genetics of filamentous fungi*, **9**:201-213.
- SILVA, E.R. 2001. *Biodegradação fúngica de resíduos agroindustriais para a produção de biomassa microbiana, enzimas ligninocelulolíticas e redução de fitatos*. Campinas, SP. Tese de doutorado. UNICAMP, 217 p.
- 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.
- VALASKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. 2006. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Pictoporus betulinus*. *Research in Microbiology*, **157**(2):119-124.
- VIKINESWARY, S.; NOORLIDAH, A.; RENUVATHANI, M.; SEKARAN, M.; PANDEY, A.; JONES, E.B.G. 2005. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology*, **97**:171-177.
- XIMENES, F.A.; FONSECA, A.S.; XIMENES, E.A.; SILVEIRA, F.Q.P.; SILVA, C.H.C.; LUCENA, S.A.; RIBEIRO, W.R.C.; FILHO, E.X.F. 1997. Xylan-degrading enzyme production by solid-state cultures of aerobic fungi. *Rev. Microbiol.*, **5**:22-28.

Submissão: 28/10/2008
Aceite: 17/02/2009