



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEONARDO GUERREIRO BORGES DOS SANTOS

**CASCA DE ARROZ PARA PRODUÇÃO DE LACASE POR
Pleurotus ostreatus EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO**

Londrina
2015

LEONARDO GUERREIRO BORGES DOS SANTOS

**CASCA DE ARROZ PARA PRODUÇÃO DE LACASE POR
Pleurotus ostreatus EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz
Ribeiro.

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Inês
Rezende.

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S237c Santos, Leonardo Guerreiro Borges dos.

Casca de arroz para produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* em fermentação em estado sólido / Leonardo Guerreiro Borges dos Santos. – Londrina, 2015.
95 f. : il.

Orientador: Mara Lúcia Luiz Ribeiro.

Coorientador: Maria Inês Rezende.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia agrícola – Teses. 2. *Pleurotus ostreatus* – Teses. 3. Casca de arroz – Teses. 4. Fermentação em estado sólido – Teses. 5. Lacases – Teses. I. Ribeiro, Mara Lúcia Luiz. II. Rezende, Maria Inês. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 663.1

LEONARDO GUERREIRO BORGES DOS SANTOS

**CASCA DE ARROZ PARA PRODUÇÃO DE LACASE POR *Pleurotus*
ostreatus EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz
Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ana Flora Dalberto Vasconcelos
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita - UNESP

Profa. Dra. Milena Martins Andrade
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Londrina, 30 de Abril de 2015.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro, orientadora, e à Profa. Dra. Maria Inês Rezende, co-orientadora, pelos conselhos, ensinamentos, orientação e pelo bom convívio durante a construção deste trabalho, possibilitando a sua concretização.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida, fato este que possibilitou a viabilização deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Biotecnologia e funcionários do Departamento de Bioquímica pelo apoio e auxílio prestados.

Aos técnicos de laboratório Nelson e Rosimeire, pela competência profissional e atenção.

Aos queridos amigos de mestrado Letícia Mileny Silva, Bettina Berquó Marks.

Aos meus pais, Walquiria e Olori pelo amor, suporte financeiro e, principalmente, emocional. À minha avó Ruth Galvão Guerreiro (*in memoriam*) por tudo o que sou.

A todos aqueles que se fizeram presentes, foram solidários e torceram por mim.

SANTOS, Leonardo Guerreiro Borges dos. **Casca de arroz para produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* em fermentação em estado sólido**. 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O Brasil é o nono produtor mundial de arroz, gerando subprodutos como a casca de arroz (CA), que tem composição lignocelulósica com potencial de aproveitamento em processos fermentativos. O *Pleurotus ostreatus* (PLO) é um basidiomiceto ligninolítico. Este estudo avaliou a produção de lacase de PLO em CA, sob fermentação em estado sólido (FES). Para avaliação do efeito do substrato na produção de lacase foram realizados cultivos com 1,5 g dos substratos: Farinha integral de soja (FIS); farelo de soja (FS); okara (OK); casca de soja (CS); casca de arroz (CA) e as misturas: SI+CA; FS+CA, OK+CA e CS+CA umedecidos com 7 mL de Meio Vogel Mínimo (MMV). A casca de arroz foi selecionada e para avaliar o efeito da suplementação da solução umedecedora, foi adicionado ao MMV 1% de glicose, 1% de glicose + 4% de extrato de levedura (YE) ou 1% de glicose + 4% de YE e CuSO_4 150 μM . Avaliou-se a produção de lacase em FES contendo 3,75 g de casca de arroz com 11,5 mL de MMV suplementado. O efeito do tempo de cultivo também foi avaliado com interrupções em 2, 4, 6, 8, 10, 14, 20 e 28 dias. Para otimizar a produção da lacase, utilizando suplementação no MMV, foi utilizado um planejamento experimental estatístico Box-Behnken 3^3 com variáveis glicose, YE e CuSO_4 . O inóculo utilizado foi esferas de 6 mm, retiradas de placas de Petri (meio BDA 39 g L^{-1}) contendo as hifas e transferidas para os substratos umedecidos. Para interrupção utilizou-se a adição de água destilada 10 mL, ou 20 mL, quando em maior escala; o conteúdo foi homogeneizado e centrifugado em 9055 xg por 10 minutos em 4 ± 2 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinações analíticas. A enzima foi caracterizada segundo valores de pH e temperatura de atividade ótimos, utilizando delineamento composto central rotacional 2^2 com triplicata no ponto central e pontos axiais. Foi avaliada a estabilidade térmica em 30°, 50° e 70° C, K_m e velocidade máxima para o substrato 2,6-Dimetoxifenol (DMP). A casca de arroz foi o melhor substrato. A melhor combinação de suplementação foi glicose, YE, e CuSO_4 ; 20 dias de incubação foi melhor tempo de incubação, produzindo 10 U mL^{-1} . Na otimização estatística da solução umedecedora todos as variáveis e interações foram significativas na produção ($p < 0,05$), exceto a interação entre glicose e CuSO_4 . Em relação a caracterização a temperatura e termos lineares de pH demonstraram-se significativos ($p < 0,05$); sendo temperatura ótima em 55° C e pH de 5,5. O valor de K_m ao substrato DMP foi de 2,71 mM e velocidade máxima de 12,64 U mL^{-1} por minuto em pH 5,5 em 55° C. A suplementação evidenciou a influência na produção de lacase, sendo o PLO cultivado em casca de arroz suplementada um potencial produtor desta enzima.

Palavras-chave: *Pleurotus ostreatus*. Casca de arroz. Fermentação em estado sólido. Lacase.

SANTOS, Leonardo Guerreiro Borges dos. **Rice husk for laccase production by *Pleurotus ostreatus* under solid state fermentation**. 95 p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Brazil is the ninth largest producer of rice, generating by-products such as rice husk (RH), which has lignocellulosic composition with use of potential fermentation processes. The *Pleurotus ostreatus* (PLO) is a basidiomycete, ligninolytic and edible. This study evaluated the production of the enzyme laccase by PLO in RH under solid-state fermentation (SSF). To evaluate the effect of the substrate in the production of laccase SSF was developed in flasks of 50 ml containing 1,5 g of substrates: soybean meal (SM); soybean bran (SB); okara (OK); soybean husks (CS); rice husk (RH) and the mixtures: SM + RH; SB + RH, OK + RH and SH + RH; moistened with 7 ml of Medium Vogel Low (MMV). The rice hull was selected and to evaluate the effect of supplementation of moisture solution was made added to MMV 1% glucose, 1% glucose plus 4% yeast extract (YE) or 1% glucose + 4% YE and 150 μ M CuSO₄. Was evaluated the laccase production in SSF containing 3.75 g of rice husk with 11.5 mL MMV supplemented. The effect of culture time was also evaluated with interruptions by 2, 4, 6, 8, 10, 14, 20 and 28 days. To optimize the production of laccase, through supplementation, was used a statistical experimental design Box-Behnken 3³ where the variables were glucose, YE and CuSO₄. The inoculum used was 6 mm beads, removed from petri plates (PDA 39 g L-1) containing hyphae and transferred to moist substrates. Used for switching the addition of 10 mL distilled water or 20 ml, in larger scale; content was homogenized and centrifuged at 9055 xg for 10 minutes at 4 \pm 2 ° C. The supernatant was used for analytical determinations. The enzyme was characterized according pH and optimal activity temperature, using statistical design central composite 2² with triplicate at the center point and axial points. Thermal stability was evaluated at 30, 50 and 70^o C, and K_m values and maximum speed for the 2,6-dimethoxyphenol substrate (DMP). Rice husk was the best substrate. The best combination of supplementation was glucose, YE, and CuSO₄, that produced 4 U ml⁻¹. 20 day incubation was best incubation time, producing 10 U ml⁻¹. In statistical optimization of moisturizing solution all the variables were significant as well the interactions (p <0.05), except the interaction between glucose and CuSO₄. In the characterization, the temperature and linear terms of pH demonstrated significant (p <0.05); and optimum temperature at 55 C and pH 5,5. The value of the DMP substrate K_m was 2,71 mM and top speed of 12.64 U mL⁻¹ per minute at pH 5,5 at 55 ° C. A supplementation showed the influence in the production of laccase, and the PLO grown rice husk supplemented potential producer of this enzyme.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*. Rice husk. Solid state fermentation. Laccase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas moleculares dos principais alcoóis constituintes da molécula de lignina.....	16
Figura 2 - Esquema simplificado do sítio ativo da lacase	23
Figura 3 - Estrutura geral da lignina.....	24
Figura 4 - Diagrama da função desempenhada pelas enzimas através da morfogênese dos basidiomicetos	33
Figura 5 - Fluxograma geral do cultivo e processo de obtenção do ELC	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Uso de substratos em FES para obtenção de produtos	19
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos de algumas lacases	30
Tabela 3 - Substratos e suas combinações utilizadas nos cultivos de Pleurotus ostreatus para produção de lacase	36
Tabela 4 - Condições de suplementação da solução umedecedora da casca de arroz e aumento da escala de cultivo para avaliar a atividade de lacase produzida por Pleurotus ostreatus	37
Tabela 5 - Delimitação experimental Box-Behnken 33 utilizado para formulação dos tratamentos dos meios em fermentação em estado sólido da casca de arroz por Pleurotus ostreatus	39
Tabela 6 - Matriz dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) 22 com as variáveis independentes pH e Temperatura, codificadas e decodificadas.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	CASCA DE ARROZ	14
3.2	PRODUÇÃO DE SOJA E COMPOSIÇÃO	16
3.3	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	17
3.4	MERCADO DE ENZIMAS	20
3.4.1	Lacase	21
3.4.1.1	Definição, propriedades, estrutura e substratos	21
3.4.1.2	Aplicações da lacase	25
3.4.1.3	Microrganismos produtores e condições de produção	25
3.4.1.4	Caracterização bioquímica de lacases	27
3.5	<i>Pleurotus ostreatus</i>	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAL	34
4.1.1	Substratos para Fermentação	34
4.2	MÉTODOS	35
4.2.1	Meios de Cultivo	35
4.2.2.1	Meio mínimo de sais de Vogel	35
4.3	CULTIVOS EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE LACASE	36
4.3.1	Preparo do Inóculo	39
4.3.2	Interrupção dos Cultivos	39
4.3.3	Otimização da Produção de Lacase em Casca de Arroz	39
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA LACASE OBTIDA EM CASCA DE ARROZ	40
4.4.1	Determinação de pH e Temperatura Ótimos	40
4.4.2	Determinação da Estabilidade Térmica	41

4.4.3	Determinação da Constante de Michaelis Menten (K_m) e Velocidade Máxima (V_{max}).....	42
4.5	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	42
4.5.1	Determinação da Atividade de Lacase.....	42
4.5.2	Determinação de Açúcares Totais Solúveis.....	43
4.5.3	Determinação de Açúcares Redutores.....	43
4.5.4	Determinação de Proteínas Totais Solúveis.....	43
4.6	FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	44
	REFERÊNCIAS.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
	ARTIGO A – Casca de arroz para produção de lacase por <i>Pleurotus ostreatus</i> em fermentação em estado sólido.....	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
	ANEXO I - Tabelas e figuras contendo resultados.....	79
	ANEXO II - Normas para submissão do artigo A na revista Brazilian Journal of Microbiology.....	86

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros relatos da utilização de enzimas eram daquelas restritas aos alimentos como queijos e bebidas alcoólicas, os quais eram preparados em condições que favoreciam o crescimento de microrganismos responsáveis pela produção das enzimas. As alterações nos alimentos são consequência do desenvolvimento microbiano e da atividade enzimática.

Lacases são polifenol oxidases (EC 1.10.3.2) produzidas por fungos, bactérias, plantas e insetos (COLLINS, DOBSON, 1997; SODEN, DOBSON, 2001; MAJEAU et al., 2010). Esta enzima apresenta baixa especificidade por substratos, permitindo sua atuação sobre compostos orgânicos ou inorgânicos diversos, incluindo fenóis, mono-, di- e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e uma série de outros compostos com estruturas aromáticas (BALDRIAN, 2006).

No metabolismo dos fungos, a lacase é utilizada principalmente para hidrólise da lignina. A lignina é um composto recalcitrante presente na parede celular dos vegetais, de diferentes pesos moleculares ligados covalentemente a celulose, facilitando a exposição e acesso de celulose por celulasas. (ANDERSON; MERRILL; KLOPFENSTEIN, 1988).

A produção de lacase por fungos ligninolíticos é um mecanismo não específico para remover a lignina (D'AGOSTINI et al., 2011). Desta forma o uso de lacases é uma alternativa para processos biotecnológicos de interesse para diversos setores industriais, como branqueamento e delignificação de polpa de celulose, descoloração de corantes têxteis, oxidação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, detoxificação de efluentes e poluentes ambientais e remoção de fenóis (BREEN; SINGLETON, 1999; TINOCO et al., 2001; GOMES; REBELO, 2003; DHAWAN et al., 2005; MUNARI et al., 2008).

As lacases também podem ser utilizadas nas indústrias cosmética, química, farmacêutica, de alimentos e bebidas, assim como na elaboração de diagnósticos clínicos, clarificação e estabilização de sucos de frutas, melhoria da qualidade de rações animais (DHAWAN et al., 2005; COUTO; HERRERA, 2006).

O fungo *Pleurotus ostreatus* é conhecido como causador da podridão branca da madeira, por degradar eficientemente a lignina dos tecidos vegetais por produzir enzimas lignocelulolíticas, principalmente lacases e Mn peroxidase (STAJIC, 2006).

Atualmente setores agroindustriais produzem grande quantidade de resíduos lignocelulósicos que representam perdas de biomassa e nutrientes, além de elevar os preços dos produtos finais, uma vez que o tratamento, transporte e a disposição final dos resíduos influencia diretamente o custo do processo (SUXIA et al., 2012). O aproveitamento de subprodutos e sua bioconversão são cada vez mais estudados e necessários para garantir a viabilidade econômica e biocompatibilidade das cadeias agroindustriais, assim como reduzir o impacto ambiental que o acúmulo destes resíduos podem provocar.

O arroz um dos cereais mais consumidos no mundo, após seu beneficiamento gera subprodutos, como a casca, que corresponde a 20 % do total do grão. A casca tem característica abrasiva, baixa densidade, elevado conteúdo de cinza/sílica, grande resistência à degradação e difícil digestibilidade (SAHA; COTTA, 2008). Porém é rica em celulose e hemicelulose com potencial para produção de bioprodutos.

Atualmente diferentes setores da agroindústria produzem grandes quantidades de resíduos lignocelulosicos e estes não apresentam destinação específica, representando perda de biomassa e nutrientes além de elevar o custo de produção uma vez que seu transporte, tratamento e a disposição final influenciam diretamente no custo do processo.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da casca de arroz e subprodutos da indústria como substratos para produção de lacase por *P. ostreatus* em fermentação em estado sólido.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar subprodutos agroindustriais da indústria de soja e de arroz como substrato para fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Pleurotus ostreatus* para a produção da enzima lacase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* em fermentação em estado sólido utilizando casca de arroz, farinha integral de soja, farelo de soja, okara e casca de soja, como substrato;
- Verificar o efeito da suplementação na solução umedecedora no substrato casca de arroz;
- Avaliar o tempo de cultivo na produção de lacase;
- Otimizar a produção de lacase por delineamento estatístico dos componentes utilizados na suplementação da solução umedecedora: Glicose, extrato de levedura e CuSO_4 ;
- Caracterizar parcialmente a enzima contida no extrato bruto enzimático, determinando: pH e temperatura ótimos de atividade; constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CASCA DE ARROZ

O arroz (*Oryza sativa*) está entre os cereais mais consumidos do mundo e o Brasil é o nono maior produtor mundial e colheu 12,769 milhões toneladas na safra 2013/2014 (FAO, 2013). O cultivo de arroz na região sul do Brasil, contribui, em média, com 77,4 % da produção nacional, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor, com 66,7 %, seguido do Mato Grosso e Santa Catarina (CONAB, 2014).

O arroz colhido e limpo é transportado para indústrias beneficiadoras onde é descascado, obtendo-se o farelo e o grão. A casca corresponde a 20 % do total do grão de arroz, sendo resíduo agrícola de natureza abrasiva, baixa densidade, elevado conteúdo de cinza/sílica, grande resistência à degradação e difícil digestibilidade (SAHA; COTTA, 2008). Essas características torna a casca de arroz um subproduto com pouco valor nutritivo. A casca de arroz pode ser eliminada pela queimada em campos abertos, desencadeando eventuais problemas ambientais e de saúde pública (LIM et al., 2012). O produto da queima da casca de arroz é rico em sílica (SiO_2), constituindo matéria-prima econômica para a produção de materiais da construção civil, como por exemplo o concreto (CARLOS; KHANG, 2008).

É um resíduo lignocelulósico, rico em celulose e hemicelulose, e com potencial para produção de bioprodutos e biocombustíveis. Assim o estudo do aproveitamento deste resíduo sem valor comercial significativo, pode ser viável para a produção de bioprodutos (SUXIA et al., 2012; ECONOMOU et al., 2011). A composição da casca de arroz varia conforme o tipo de solo e condições de cultura e os principais componentes são celulose (42 %), hemicelulose (18 %), lignina (18 %) e minerais (19 %) (RISDIANTO et al., 2012) e portanto com potencial para produção de bioprodutos e biocombustíveis.

A celulose é encontrada em abundância nas biomassas e constitui parte da estrutura da planta. É um polímero formado de unidades de glicose unidas por ligação β -glicosídica e o grau de polimerização pode atingir de 7.000 a 10.000 monômeros por molécula. A hemicelulose apresenta estrutura química similar à da celulose, porém constituída de unidades repetitivas de D-glicose, D-manose e D-

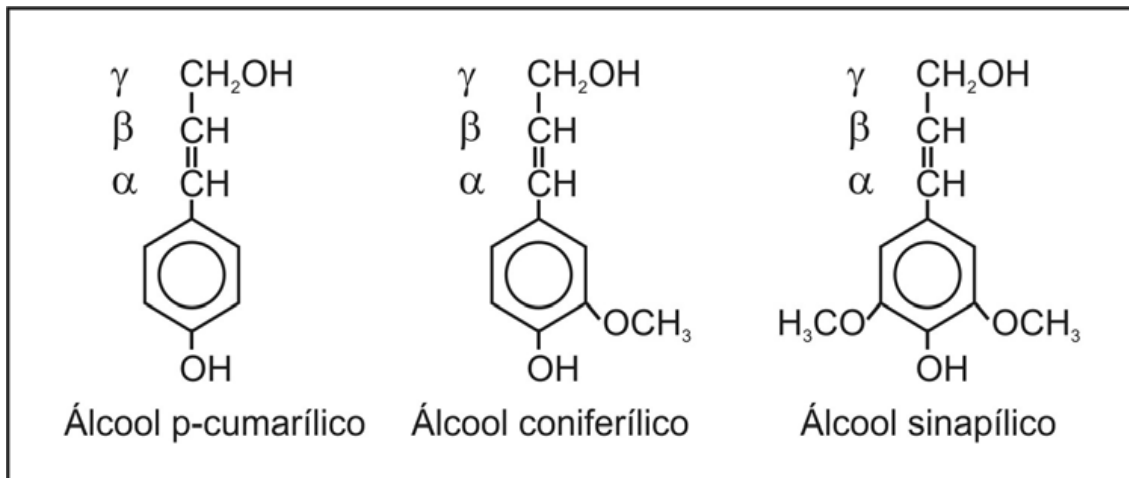
galactos; pequenas quantidades de ácidos urônicos como ácido glicurônico e de pentoses D-xilose e L-arabinose. Possuem um grau de polimerização inferior ao da celulose, com 100 a 200 monômeros (FREITAS, 2000).

A lignina é um polímero que atua como suporte nas paredes da célula, é insolúvel, apresentando massa molecular elevada de aproximadamente 4.000 Da e ligações cruzadas, características de polímeros termorrígidos. Possui natureza química bem distinta dos carboidratos, com estrutura aromática, formada pela condensação de unidades fenil-propano e com crescimento aleatório, com diferentes tipos de ligações entre os monômeros (FREITAS, 2000). A lignina é formada principalmente por três álcoois, o *p*-cumarílico, o coniferílico e o sinapílico (Figura 1) (AMEN-CHEN et al., 2001) pelas ligações do tipo (C–O–C) e carbono-carbono (C–C).

Para a degradação físico-química da lignina, a desidratação é considerada reação primária e ocorre em torno de 200 °C. Entre 150 e 300 °C ocorre quebra de ligações α e β em éter com radicais arila e alquila. Em torno de 300 °C inicia-se a cisão de cadeias alifáticas laterais aos anéis aromáticos. Finalmente, ligações C–C rompem-se na estrutura da lignina entre 370 e 400 °C, formando compostos de baixa massa molecular (AMEN-CHEN et al., 2001). As enzimas ligninolíticas podem também degradar a lignina rompendo o anel aromático e formando compostos que podem posteriormente serem degradados (COHEN et al., 2002).

Como substrato a casca de arroz já foi aplicada na produção de furfural por catalisador ácido sulfúrico (SUXIA et al., 2012), etanol por pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e sacarificação enzimática (SAHA; COTTA, 2008, CUNHA-PEREIRA et al., 2011; MEGAWATI et al., 2010), ácido levulínico e 5-hidroximetilfurfural (BEVILAQUA, 2010), xilitol via hidrólise ácida diluída; ácido láctico por auto-hidrólise na produção de xilo-oligossacarídeos e posterior fermentação (GULLÓN et al., 2008), xilitol por conversão catalítica hidrotérmica com Zn(II), Ni(II), Co(II) e Cr(III) (KONG et al., 2008), produção de enzimas via fermentação em estado sólido com casca de arroz sem suplementações (MARTINS et al., 2008; MASUTTI et al., 2012).

Figura 1 – Estruturas moleculares dos principais alcoóis constituintes da molécula de lignina



Fonte: (AMEN-CHEN et al., 2001).

3.2 PRODUÇÃO DE SOJA E COMPOSIÇÃO

A soja é originária da China, Manchúria e Coréia, e vem sendo utilizada há milênios como alimento. A cultura difundiu-se lentamente no Oriente, sendo reconhecido o seu importante valor econômico, conquistando hoje um dos primeiros lugares entre as oleaginosas cultivadas (IMCOPA, 2010).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja com 26 milhões de hectares que representam 24 % da área mundial plantada (IMCOPA, 2013).

Na última safra de 2014/2015 a produção foi 78 milhões de toneladas. Atualmente, a soja é a principal cultura agrícola do Brasil, em volume e geração de renda. Representa 11 % das exportações totais, com 250 000 produtores rurais em 17 estados e gera mais de 1,5 milhão de empregos diretos e indiretos (IMCOPA, 2014).

No estado do Paraná, o segundo maior produtor brasileiro de soja, na safra 2012/13, a produção foi de 15,9 milhões de toneladas, com área total plantada de 4,8 milhões de hectares, e produtividade média de 3.348 kg/ha (EMBRAPA, 2013).

Os grãos de soja maduros contêm aproximadamente 40% de proteína, 22 % de lipídeos, 27 % carboidratos, 4 % cinzas e 7 % umidade (ALVES et al., 2013). O conteúdo lipídico é constituído por triacilglicerol, ácidos graxos livres, fosfolipídeos e

componentes insaponificáveis (esteróides, tocoferóis e a vitamina A). O conteúdo de carboidratos contém celulose, hemicelulose, estaquiose, rafinose e sacarose. O amido é encontrado em sementes verdes, em pequenas quantidades. A casca contém a maior parte das fibras (40 a 53 % de celulose, 14 a 33 % de hemicelulose e 1 a 3 % de lignina). Contém vitaminas solúveis em água e óleo, quando madura é ótima fonte de vitaminas E (tocoferol) e K, e boa fonte de riboflavina, ácido fólico e tiamina. A soja apresenta grande quantidade de proteína, onde 90 % destas proteínas são globulinas, com solubilidade mínima em torno do pH 4,5 (VIEIRA et al., 1999).

Em sua composição, há elementos bioquímicos (proteínas, lipídios, carboidratos, minerais, vitaminas, fibras, polissacarídeos, lecitina, isoflavonoides etc.) que constituem excelente meio nutricional para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos (VIEIRA et al., 1999)

A soja é um grão que dá origem a produtos e subprodutos, como farelo de soja, okara e casca de soja, que podem ser usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Na alimentação humana, a soja compõe vários produtos embutidos, em chocolates, temperos para saladas, entre outros produtos como proteína de soja, lecitina (emulsificante) e o óleo (EMBRAPA, 2013).

Recentemente, a soja vem crescendo também como fonte alternativa de combustível. O biodiesel de soja já vem sendo testado por instituições de pesquisa, como a Embrapa, além de estar sendo testado em diferentes cidades brasileiras (EMBRAPA, 2013).

Estes substratos podem ser utilizados na produção de enzimas via fermentação em estado sólido.

3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido (FES) foi desenvolvida originalmente no Japão com a utilização de farelo de arroz e cascas de frutas como substrato. A FES pode ser definida como um processo de cultivo de microrganismos sobre partículas em matriz sólida. O teor de líquido (substrato ou meio umidificante) deve estar em um nível de atividade de água que assegure o crescimento e metabolismo das

células e não exceda a capacidade máxima de ligação da água com a matriz sólida; neste processo o microrganismo se desenvolve na superfície, a base é constituída de material sólido com umidade em torno de 70%, dependendo do material (DEL BIANCHI et al., 2001, *apud* LIMA et al., 2001).

Apresenta vantagens como condições da cultura próximas as que ocorrem em meios naturais, simplicidade no preparo do meio de cultura, diminuição de contaminações, redução dos efluentes líquidos para tratamento, resíduos sólidos mais estáveis após a fermentação, produção concentrada de metabólitos e eliminação da formação de espuma (SOCCOL, 1994; KOLICHESKI, 1995; VANDENBERGHE, 2000; SOCCOL, VANDENBERGHE, 2003, *apud* RODRIGUEZ et al., 2006).

Os fermentadores utilizados para FES podem ser de modelo contínuo ou em batelada. Uma característica comum em quase todos esses modelos tem sido sua simplicidade no funcionamento. Estudos laboratoriais geralmente são conduzidos em frascos (reatores de vidro), bequers, placas de petri, jarros e colunas de vidro. O inóculo é adicionado depois que o substrato é autoclavado (SOCCOL et al., 2005).

A FES, em comparação com a fermentação submersa, apresenta melhor transferência de oxigênio, maior disponibilidade de diferentes substratos, diminuição da necessidade de rigoroso controle sobre diversos parâmetros durante a fermentação (HASAN, 2006). Entretanto apresenta como desvantagens o uso de microrganismos que crescem em baixo teor de umidade, dificuldade para a remoção do calor gerado no processo de respiração do microrganismo, dificuldade na medida e no controle de umidade, pH, oxigênio, gás carbônico e produtos formados (PANDEY, 1991).

Vários resíduos da agroindústria, como bagaço de mandioca, polpa e casca de café, polpa de maçã, soja e resíduo de batata já foram usados em FES com diferentes microrganismos para a produção, por exemplo, de ácidos orgânicos (PANDEY et al., 2005).

Segundo Pandey et al. (2000), a partir da década de 90 houve um aumento no interesse em relação à FES para o desenvolvimento de bioprocessos, como a biorremediação e biodegradação de compostos, desintoxicação biológica de resíduos agroindustriais, biotransformação e enriquecimento nutricional de culturas e de resíduos de culturas, obtenção de produtos com grande valor agregado, tais como metabólitos secundários biologicamente ativos, como antibióticos, alcalóides,

fatores de crescimento de plantas. Podem-se citar também as enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, biocombustível e compostos aromáticos.

Outro fator relevante observado na FES é o custo do processo. Castilho et al. (2000) analisou o custo da produção da lipase por fermentação submersa e FES e observaram que o capital necessário para a produção de 100 m³/ano de concentrado de lipase foi 78 % maior para o processo submerso, em relação ao processo em estado sólido, sendo que o custo unitário de produção foi 68% maior que o preço de venda. Para o processo em estado sólido, o custo unitário foi 47 % menor que o preço de venda.

Segundo Borzani et al. (2001) pode se utilizar diferentes substratos em FES para obtenção de produtos diversos (Tabela 2).

Tabela 1 – Uso de substratos em fermentação em estado sólido para obtenção de produtos.

Substrato	Produto
Farelo e palha de trigo, farinha e farelo de soja, manipueira, palha e quirera de arroz, bagaço de cana	Enzimas: Lacases, Mn peroxidases, celulasas, proteases.
Resíduos de banana e mandioca, bagaços de laranja e maçã, grão-de-bico, polpa de café, cana-de-açúcar, arroz cozido	Enriquecimento protéico
Sorgo, bagaço de maçã, bagaço de uva, melão e cana-de-açúcar, dentre outros	Álcool
Farelo de trigo, beterraba, bagaço de cana e melão	Ácidos orgânicos
Soja, peixe e mandioca	Outros alimentos e condimentos

Fonte: Adaptado de Borzani et al. (2001).

Para utilização destes substratos é necessário um pré-tratamento para adequá-los às condições necessárias de crescimento e à produção de metabólitos pelo microrganismo. Segundo Borzani et al. (2001) os pré-tratamentos podem ser esmagamento, quebra, moagem e peneiramento, visando a adequação da granulometria; suplementação de nutrientes e correção de pH; hidrólise ácida ou

alcalina de material celulósico; umidificação para regular a umidade inicial do processo; adição de agente seqüestrante com o objetivo de retirar íons metálicos do meio; esterilização, para diminuir ou eliminar possíveis contaminações.

Segundo Bellon-Maruel et al. (2003) uma das grandes limitações de contexto industrial se refere ao controle de temperatura e umidade, fatores críticos no escalonamento do processo. A baixa condutividade térmica do material e seu baixo teor de umidade reduz consideravelmente a transferência de calor, que também é dependente do tamanho das partículas da camada sólida. Normalmente a temperatura é medida na camada sólida e no fluxo de gás de entrada e saída do biorreator.

Em FES o teor de umidade é considerado ótimo na saturação do substrato que normalmente varia entre 30 e 85% dependendo do substrato, a quantidade máxima de água, neste caso, no meio é função da capacidade de retenção do substrato. O líquido na matriz não deve ser muito abundante para não reduzir a porosidade e, conseqüentemente, limitar as trocas gasosas. No entanto, deverá estar presente suficientemente para não limitar o crescimento dos microrganismos (SOCCOL et al., 2003).

3.4 MERCADO DE ENZIMAS

Até 2001, eram conhecidas aproximadamente 4000 enzimas, e destas, cerca de 200 foram comercializadas, sendo que a maioria das enzimas industriais é de origem microbiana (SHARMA et al., 2001).

Estudos realizados por analistas de mercado da Freedonia Group Incorporated, "World Enzyme to 2009" indicaram que a indústria mundial de enzimas obteve um faturamento total de US\$ 3,7 bilhões em 2004, com previsão de crescimento da demanda mundial de 6,5% ao ano até 2009, além de uma projeção para os EUA de demanda de enzimas que deveria chegar a US\$ 2,5 bilhões até 2012 (MONTEIRO; SILVA; 2009).

O mercado de enzimas está dividido em enzimas industriais (enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para

pesquisa). As enzimas de uso industrial representam 60 % do mercado mundial. Dentre elas se destacam o grande uso de amilases, com uma projeção de 25,4%, celulases (17,1 %) e lipases (7,2 %), no ano de 2009 (MONTEIRO; SILVA; 2009).

O consumo de enzimas na América Latina foi de 3,4 % da demanda do total mundial produzida. O Brasil apresentou maior consumo, correspondendo a 60 % de enzimas em geral. Em 2005 o consumo foi de 3,7 % do mercado internacional com uma movimentação em torno de US\$ 147 milhões. O Brasil importa 86 % de enzimas e exporta 14 %, revelando um atraso tecnológico e de estratégia em termos de produção de biocatalisadores. Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior do Brasil indicaram que no ano de 2008 o Brasil importou cerca de 7,2 mil toneladas de enzimas industriais, correspondendo a US\$ 72,5 milhões, e exportou 4,5 mil toneladas (US\$ 30,5 milhões) (MONTEIRO; SILVA; 2009).

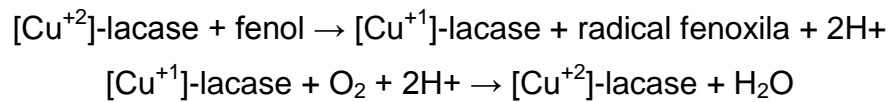
O tratamento enzimático de materiais ou substratos com enzimas apresentam vantagens quando comparadas a tratamentos convencionais, tais como: aplicação em materiais de difícil modificações físico-químicas, atuação em concentrações altas ou baixas de contaminantes num amplo espectro de pH, temperatura e salinidade e o fácil processo de controle quando imobilizadas, entre outros (DURÁN; ESPOSITO, 2000). As enzimas podem atuar em compostos específicos para removê-los por precipitação ou transformação em outros produtos inócuos (DURÁN; ESPOSITO, 2000). Podem também mudar as características de um determinado composto para torná-lo mais receptivo na bioconversão de compostos em produtos de maior valor agregado (KARAM; NICELL, 1997).

3.4.1 Lacase

3.4.1.1 Definição, estrutura, propriedades e substratos

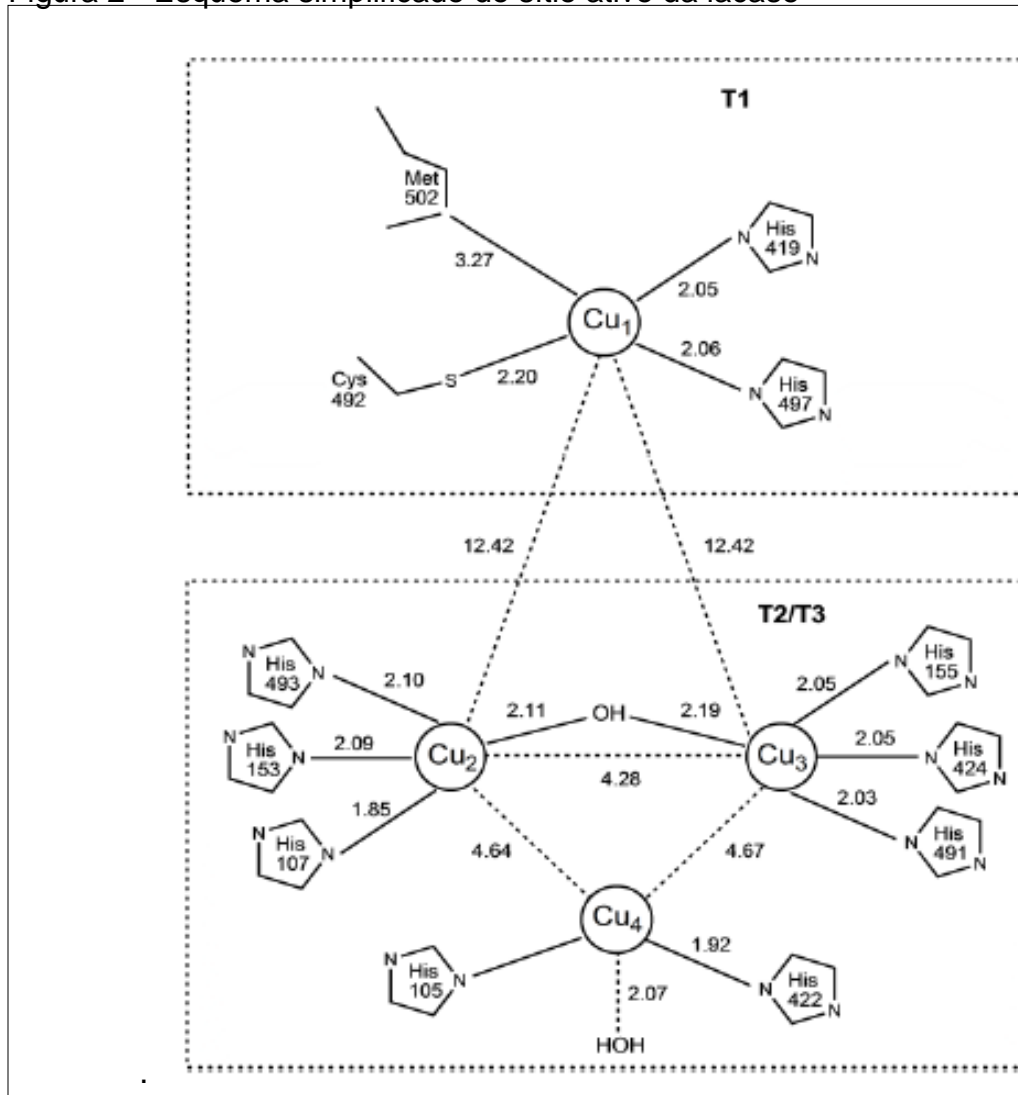
As lacases (EC 1.10.3.2) são polifenol oxidases encontradas em plantas, insetos, bactérias e fungos, em especial, nos fungos da podridão branca da madeira (GARCIA, 2006). As lacases fúngicas são glicoproteínas compostas de 520-550 aminoácidos e contêm quatro íons cobre dispostos em três sítios de ligação (Figura

2) (LEITNER et al., 2002). Cada íon desempenha um papel importante na reação catalítica que ocorre pela oxidação de um substrato fenólico, enquanto oxigênio molecular é reduzido à água (LEITNER et al., 2002). O Sítio T1 é o aceptor primário de elétrons do substrato, que é reduzido e transfere para os três átomos de cobre dos sítios T2 e T3, onde o oxigênio molecular é reduzido a água. O mecanismo de reação inicia-se com a transferência de um elétron do substrato fenólico produzindo um radical fenoxila, como pode ser observado nas reações abaixo, que exemplifica a reação da redução do oxigênio molecular até água segundo Pietro e Said (2004):



A lacase apresenta baixa especificidade por substratos, permitindo sua atuação sobre compostos orgânicos ou inorgânicos diversos, incluindo fenóis, mono-, di- e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis substituídos, poliamidas, aminas aromáticas, diaminas aromáticas, ácido ascórbico, anilinas, benzenotiois, compostos biológicos, fenoxazina, ferrocitocromo, reveratrol, E-viniferina, 4-n-nonilfenol e compostos orto-substituídos como guaiacol, ácido cafeico, ácido gálico, dihidroxifenilalanina, pirogalhol e o-fenilenodiamina, ferrocianina e uma série de outros compostos com estruturas aromáticas, mono, di e polifenóis; fenóis metoxi – substituídos e diaminas (BALDRIAN, 2006) o que a torna uma enzima versátil e com potencial para ser utilizada em várias aplicações biotecnológicas industriais.

Figura 2 - Esquema simplificado do sítio ativo da lacase



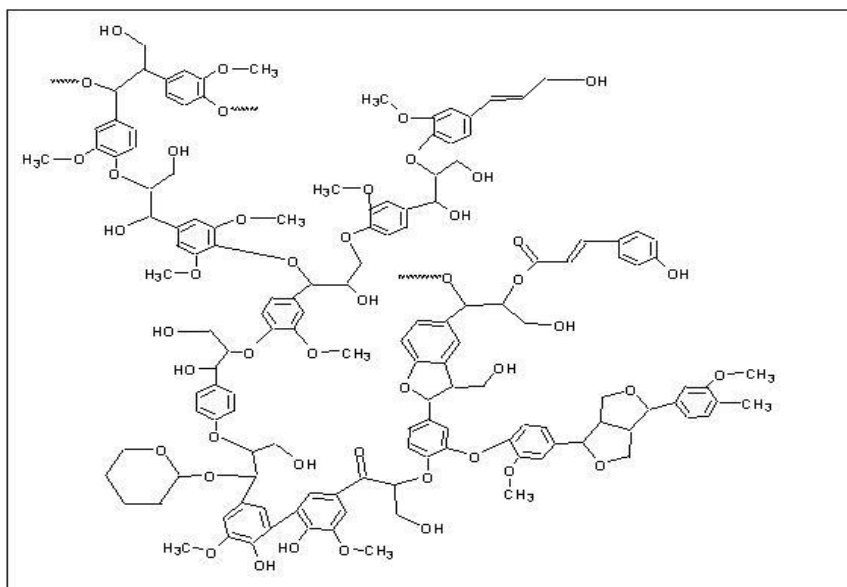
Fonte: LEITNER (2002).

As lacases também oxidam alguns compostos aromáticos não fenólicos como o ácido ascórbico, quando na presença de alguns mediadores. Os mediadores funcionam como intermediários entre os substratos com elevado potencial redox, que normalmente não seriam um substrato da lacase, permitindo que esta oxide indiretamente moléculas grandes, formando primeiro um cátion com radicais altamente ativos capazes de oxidar substratos não fenólicos que a lacase sozinha não pode oxidar (PERALTA; SOUZA; BÔER, 2004). Sabe-se que esses mediadores podem ser de origem biológica, sendo secretados por alguns microrganismos, como os fungos ligninolíticos, participando das reações de deslignificação do complexo lignocelulósico ou sintética, como é o caso do ABTS [2,1-azino-bis-ácido (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] (SILVA; GOMES, 2004).

Os produtos da reação catalisada por lacases são diversos devido aos tipos de substratos. Esses produtos tem em comum a baixa massa molecular e um radical catiônico que pode reagir com algum composto presente no meio. Podem ser oxidados até *o*-quinona e posteriormente degradados (COUTO; TOCA-HERRERA, 2006).

É utilizada principalmente para a hidrólise da lignina (Figura 3), facilitando a exposição e acesso de celulose por celulasas. A lignina é um composto recalcitrante, ligada covalentemente a celulose e forma uma barreira física à hidrólise deste carboidrato (ANDERSON; MERRILL; KLOPFENSTEIN, 1988). O uso de lacase para a hidrólise de compostos lignocelulósicos pode aumentar a biodisponibilidade de carbono para a alimentação animal entretanto a irregularidade estereoisomérica da molécula de lignina a torna muito resistente ao ataque por enzimas, por isso a lignina não pode ser absorvida pela célula para ser degradada por enzimas intracelulares. Os fungos ligninolíticos desenvolveram mecanismos não-específicos para a sua degradação, como a produção de enzimas, com sítio não específico, que oxidam compostos fenólicos (D'AGOSTINI et al., 2011).

Figura 3 - Estrutura geral da lignina



Fonte: American Chemical Society (2000).

3.4.1.2 Aplicações da lacase

As lacases podem ser empregadas em processos da indústria de papel e celulose, no branqueamento da pasta de papel, na indústria têxtil, no processo de obtenção de jeans com a característica tonalidade cinza/azulada resultante da degradação do corante índigo; na indústria cosmética, na detoxificação de esgoto, em síntese inorgânica, degradação de xenobióticos e biorremediação, produção de aglomerados de madeira sem compostos tóxicos e produção de detergentes (COUTO; TOCA-HERRERA, 2006). Pode ser aplicada em sucos e vinhos para a clarificação e estabilização da cor. Na clarificação de vinhos claros, a lacase degrada as antocianinas. As antocianinas por serem compostos fenólicos estão susceptíveis a oxidação com o passar do tempo, e conseqüente mudança de coloração (MINUSSI et al., 2007). Em sucos e vinhos claros, ela é utilizada com maior intensidade para clarificar, degradando os compostos responsáveis pela cor, antocianinas.

Uma lacase fúngica de *Pleurotus* foi usada para realçar a cor de um produto à base de chá (MINUSSI et al., 2007). A lacase também pode ser aplicada na fabricação de pão onde o uso de enzimas e outros aditivos para melhorar a sua qualidade é comum. A lacase adicionada à massa do pão catalisa oxidações que resultam em maior resistência na elasticidade do glúten o que promove um maior aumento no volume do pão além de uma melhor maciez do produto final. Verifica-se que a massa do pão assim tratada apresenta maior resistência, estabilidade e redução da viscosidade, melhorando assim a plasticidade da massa (MADHAVI; LELE, 2009).

3.4.1.3 Microrganismos produtores de lacase e condições de produção

As lacases fúngicas podem ser induzidas ou constitutivas, de acordo com suas diferentes rotas de biossíntese. As lacases induzidas são dependentes de fatores como condições nutricionais, pH, temperatura, agitação e aeração. A grande

maioria dos trabalhos publicados se refere às lacases extracelulares de fungos basidiomicetos (LEONOWICZ et al., 2001).

A lacase pode ser dividida em duas categorias principais segundo a sua origem: plantas e fungos. Esta enzima foi descoberta por Yoshida em 1883 nas plantas e caracterizada como uma oxidase de cobre por Bertrand em 1985 (MAYER; STAPLES, 2002). A lacase de fungos foi descoberta alguns anos depois (CALL; MUCKE, 1997). Os principais microrganismos produtores de lacase são os fungos da podridão branca da madeira. *Trametes versicolor* é um dos fungos da podridão branca da madeira produtor de lacases. A lacase é produzida dentro das células e excretada para o exterior dos filamentos das hifas. (GARG; MODI, 1999). Foram estudados e reportados como produtores de lacase, *Fomes annosus*, *Pholiota mutabilis*, *Rhizoctonia praticola*, *Botrytis cinérea*, *Podospora anserina*, *Trichophyton rubrum*, *Agaricus blazei*, entre outros que são produtores de lacase (GARG; MODI, 1999).

A composição do meio de cultura é um fator importante na produção da lacase. Jang et al. (2002) estudaram o efeito de glicose, glicerol, xilose e dextrana como fonte de carbono e verificaram que a glicose foi a melhor fonte para a produção de lacase por *Trametes sp.* Nyanhongo et al. (2002) avaliaram diferentes concentrações de glicose na produção da lacase por *Trametes modesta* e observaram que a concentração ideal foi de 0,87 g/L e que concentrações superiores a 1 g/L inibiram a sua produção.

O pH do meio de cultura é um fator importante na produção da enzima. Ele pode afetar a atividade e estabilidade da enzima (O'CALLAGHAN et al., 2002). A maioria dos fungos toleram o pH num intervalo de 4 - 9, enquanto que a enzima é mais sensível as variações do pH (PAPAGIANNI, 2004). A maior parte das enzimas extracelulares são produzidas em maiores quantidades a pH próximo do pH ótimo da sua atividade. Jönsson et al. (1997) mostrou que o meio de crescimento tamponado em pH 6,0 foi necessário para se obter atividade de lacase em culturas líquidas durante o cultivo de *Pichia pastoris* e que a manutenção do pH foi extremamente importante para a produção de altas concentrações de lacase. Outro estudo mostrou que o pH inicial do meio cultura de *Trametes sp.* afetou a produção da lacase. Dos diferentes valores de pH testados (de 3 a 9), o pH de 4.5 foi encontrado como o ótimo (JÖNSSON et al., 1997) enquanto que para *Trametes modesta* o pH ideal foi de 6.9 (NYANHONGO et al., 2002). A temperatura ótima de

incubação para produção de lacase deve estar entre os 25 °C e os 30 °C, para cultivos líquidos e sólidos, culturas com temperaturas superiores a 30 °C apresentaram redução na atividade enzimática (BRIJWANI et al., 2010).

O cobre está presente na estrutura da lacase e estudos têm mostrado que a sua adição ao meio de cultura, aumenta a produção da enzima. Giardina et al. (1999) observaram que a adição de sulfato de cobre ao meio de cultura de PLO aumentou a atividade da enzima e que este aumento foi proporcional à quantidade de cobre adicionado, atingindo um valor máximo com 150 µM de sulfato de cobre. Outro estudo, também com PLO, mostrou um aumento de 8 vezes na atividade da lacase com a adição de cobre (1mM) ao meio de cultura (BALDRIAN, 2006).

3.4.1.4 Caracterização bioquímica de lacases

Para aplicação de enzimas em processos industriais, é necessário o prévio conhecimento bioquímico desta molécula, a fim de que a enzima seja compatível com as condições do processo, como temperatura e pH.

As lacases são enzimas que apresentam características distintas mesmo quando produzidas por microrganismos do mesmo gênero (GARCIA, 2006). Dentre as lacases fúngicas já purificadas, observa-se uma grande variedade quanto a suas características bioquímicas, como massa molecular, pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica, parâmetros cinéticos e especificidade ao substrato. Aspectos como localização (intra ou extracelular), número de isoenzimas, átomos de cobre, quantidade e composição de carboidratos também diferem entre as lacases (THURSTON, 1994).

O pH ótimo de lacases é dependente do substrato, podendo variar de 3 a 7, para as lacases fúngicas e até 9 para as lacases de plantas. Quando usado ABTS como substrato, o pH ótimo encontrado foi de pH 3 à pH 5 (HEINZKILL et al. 1998). Em geral, a atividade de lacase tem pH ótimo que varia consideravelmente. Esta variação pode ser devido a alterações na reação causada pelo substrato e pelo oxigênio (XU, 1997).

Soden et al. (2002) observaram um pH ótimo de 3,3 para a atividade de lacases em testes realizados com *Pleurotus sajor-caju* P32-1; porém, com outra

linhagem deste mesmo fungo, Murugesan et al. (2006) observaram pH ótimo de 5,0. Dentro do mesmo gênero, para *Pleurotus sapidus* DSMZ 8266, Linke et al. (2005) detectaram 3,5 como o pH ótimo de atividade de lacases; para *Pleurotus ostreatus* 10969, Liu et al. (2009) observaram pH ótimo de 4,0 a 25 °C. Em experimentos realizados com outra espécie, lacases de *Trametes versicolor* produzidas em biorreator “airlift” apresentaram maior atividade em pH 3,0 (RANCAÑO et al., 2003).

A temperatura ótima de atividade também é variável. A temperatura ótima de lacase de *Ganoderma lucidum* foi de 20 - 25 °C e verificou-se ser estável entre 10-50 °C durante 4 horas (KO et al., 2001). Lacases isoladas a partir de *Marasmius quercophilus* (FARNET et al., 2000) foram consideradas estáveis durante 1 hora a 60 °C. Farnet et al. (2000) verificaram ainda que a pré-incubação das enzimas a 40 °C e 50 °C aumentou a atividade de lacase.

Murugesan et al. (2006) mostraram que o ótimo para a atividade de lacases de *Pleurotus sajor-caju* foi 40 °C em pH 5,0. Para a linhagem P32-1 deste mesmo fungo, Soden et al. (2002) observaram temperatura ótima de 35 °C em pH 3,5. Liu et al. (2009) detectaram que 50 °C em pH 4,0 foi a temperatura ótima de atividade para *Pleurotus ostreatus* 10969. Para *Pleurotus sapidus* DSMZ 8266, Linke et al. (2005) observaram um ótimo de atividade de lacases a 50 °C em pH 3,5. Contudo, lacases de *Trametes versicolor* mostraram maior atividade a 60 °C em pH 4,5 (RANCAÑO et al., 2003).

Em testes de estabilidade térmica, foi observado estabilidade das lacases de *Pleurotus sajor-caju* em temperaturas de 30 e 40 °C por apenas uma hora, sendo que, a 50, 60 e 70 °C em pH 5,0, a atividade enzimática caiu muito rapidamente (MURUGESAN et al., 2006). Em estudos realizados com *Pleurotus ostreatus* 10969, Liu et al. (2009) observaram estabilidade da enzima 30, 40 e 50 °C durante uma hora, com queda de atividade a 60 °C logo após 10 minutos de incubação. Entretanto, lacases de *Trametes versicolor* mostraram elevada estabilidade a 30, 40 e 50 °C por mais de 200 horas e queda de atividade somente a 60 °C em pH 4,5 (RANCAÑO et al., 2003).

Utilizando o substrato ABTS Min et al. (2001), observaram que lacases de *Phellinus ribis*, teve baixa afinidade, visto que a oxidação foi mais lenta em relação ao 2,6-dimetoxifenol (DMP) e à siringaldazina que mostrou a maior atividade. O comportamento de oxidação indica que as lacases oxidam compostos fenólicos com substituintes metoxi, como o DMP e a siringaldazina, mais facilmente que aqueles

que não possuem esses substituintes, como, por exemplo, o ABTS. A introdução de grupos OH, OCH₃ ou CH₃ no sistema aromático torna o composto mais facilmente oxidável pelas lacases (MIN et al., 2001).

Muitas isoformas de lacases envolvidas na oxidação da lignina são codificadas por mais de um gene (GIARDINA et al., 1995; GELO-PUJIC et al., 1999). Em estudos realizados com *Pleurotus sapidus* DSMZ 8266, Linke et al. (2005) observaram a presença de duas isoenzimas de lacases. Soden; Dobson (2001) detectaram quatro isoenzimas na linhagem de *Pleurotus sajor-caju* P32-1, com quatro diferentes genes codificadores envolvidos na transcrição gênica, relatando que elas são reguladas diferentemente, dependendo da adição de nutrientes ao meio de crescimento, como carbono, nitrogênio, cobre e manganês. Para essa mesma linhagem, Soden et al. (2002) mostraram que as lacases são inibidas pela presença de azida sódica e de ácido tioglicólico, mas não por ácido etileno-diamino tetra-acético (EDTA).

Após procedimentos de purificação da lacase de *Pleurotus sajor-caju*, Murugesan et al. (2006) detectaram uma proteína com massa molecular aparente de 61 kDa, que foi completamente inibida pela presença de azida sódica. Liu et al. (2009) purificaram a lacase extracelular de *Pleurotus ostreatus* 10969, que apresentou massa molecular de aproximadamente 40 kDa, K_m de 0,31 mM e V_{max} de 303,25 mM min⁻¹; ditioneitol (DTT), b-mercaptoetanol e NaN₃ inibiram quase que totalmente a atividade da lacase, bem como íons metálicos, especialmente Ag⁺.

Valores de K_m reportados na literatura para lacases de diferentes microrganismos frente a diferentes pH são apresentados na tabela 1.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos de algumas lacases.

Microrganismo	Substrato	pH	K _m
<i>Armillaria mellea</i>	p-fenilenediamina	3,5	1.7 mM
<i>Botrytis cinerea</i>	2,6- Dimetoxifenol	3,5	0.1 mM
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Guaiacol	3,5	1.6 mM
<i>Cerrena unicolor</i>	Siringaldazina	5,5	-
<i>Coprinus cinereus</i>	ABTS*	4	-
<i>Chalara paradoxa</i>	Siringaldazina	6,5	3.40 mM
<i>Coriolus hirsutus</i>	Catecol	4,5	145.6 µM
<i>Fomes annosus</i>	Siringaldazina	4,6	-
<i>Ganoderma Lucidum</i>	ABTS	3,5	0.0037 mM
<i>Lentinus edodes</i>	Siringaldazina	5,0	-
<i>Monocillium indicum</i>	0-dianisidina	3,0	0.025mM
<i>Pholiota mutabilis</i>	Siringaldazina	5,2	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Siringaldazina	6,5	-
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Guaiacol	4,0	-
<i>Rhizoctonia praticola</i>	2,6- Dimetoxifenol	6,8	0.26 mM
<i>Sporotrichum pulverulentum</i>	Siringaldazina	5,0	-
<i>Trametes hirsutus</i>	Guaiacol	4,0	10.9 µM
<i>Trametes sanguinea</i>	Dimetol-Fenilenediamina	5,0	-
<i>Trametes versicolor</i>	Catecol	4,6	0.02 mM
<i>Trametes multicolor</i>	ABTS	3,5	14.1µM

* 2,2 – azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
 Fonte: adaptado de Madhavi; Lele (2009).

3.5 PLEUROTUS OSTREATUS

O fungo *Pleurotus ostreatus* (PLO) pertence ao reino Fungi, filo Basiomiceto, à classe Agaricomycetos, à ordem *Agaricales*, à família Agaricaceae e ao gênero *Pleurotus* (BONATTI et al., 2004).

Os basidiomicetos são fungos popularmente conhecidos como cogumelos, orelhas de pau, bolores, bufa de lobo, trufas, mofos, entre outros. Produzem esporos (basidiósporos) de origem sexuada em uma estrutura especializada denominada de basídio. A fase vegetativa dos basidiomicetos é denominada micélio, que por sua vez é formado por muitos filamentos septados chamados hifas (MOREIRA NETO, 2006).

O *P. ostreatus* é encontrado nas florestas úmidas tropicais e subtropicais e podem ser cultivados artificialmente, como na técnica Jun-Cao (BONATTI et al., 2004). Ocupou a terceira posição na produção comercial de cogumelos no mundo em 2003 e considerados interessantes do ponto de vista comercial, pela fácil adaptação, manutenção e baixo custo de cultura (RAMOS et al., 2003). São utilizados tradicionalmente por povos orientais e são relatadas atividades biológicas e usos em terapias antitumorais, antivirais, tratamentos imunomodulatórios, atividades antioxidante (YANG; LIN; MAU, 2002), antimicrobiana, antimitogênica e antiproliferativa (NGAI; 2004).

O fungo *P. ostreatus* é eficiente na degradação de diferentes resíduos lignocelulósicos, na produção de corpos frutíferos (cogumelos) com elevado valor gastronômico e medicinal e apresenta menor tempo de cultivo que outros gêneros comestíveis (BONATTI et al., 2004). Por conta de suas características nutricionais e funcionais, esses fungos, originalmente cultivados em toras de madeira, têm sido produzidos de outras formas, principalmente com a utilização de serragem e palhas de diversas gramíneas em sacos plásticos, por meio de uma técnica conhecida como Jun-Cao (URBEN, 2004). Esta técnica Jun-Cao consiste principalmente da utilização de gramíneas como substrato na forma de palhas suplementadas com alguma fonte de nitrogênio (PEDRA; MARINO, 2006).

A adaptação de *Pleurotus* a novos resíduos representa, um dos principais processos de bioconversão de resíduos agroindustriais em produtos comestíveis, de alto valor agregado e alta qualidade (STURION; RANZANI, 2000). Segundo Bonatti et al. (2004), corpos frutíferos de *P. ostreatus* cultivado em palha de bananeira apresentou 16,9 % de proteína; 9,4 % de fibras e 5,97 % de lipídeos.

O píleo (parte superior) possui a forma de concha, razão de sua denominação internacional como “Oyster mushroom” (cogumelo ostra), alcançando até 30 cm, estipe excêntrico ou lateral (10 mm a 50 mm) e lamelas esbranquiçadas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004). O fungo *P. ostreatus* geralmente possui coloração branca, creme, marrom clara ou amarela, dependendo das condições de cultivo (NEVES, 2007).

Fungos *P. ostreatus* são causadores da podridão branca da madeira, por degradarem eficientemente a lignina, um polímero fenólico recalcitrante encontrado nos vegetais (ERIKSSON, et al. 1990). Tal habilidade deve-se ao fato de produzirem enzimas lignocelulolíticas, principalmente lacases e Mn peroxidase (STAJIC, 2006).

A lignina é um polímero aromático da parede celular vegetal que proporciona a célula rigidez, impermeabilidade, resistência microbiana e possuem uma biodegradabilidade restrita. Com isso o ataque inicial do fungo precisa ser extracelular, não-específico e oxidativo (KLYOSOV, 1990).

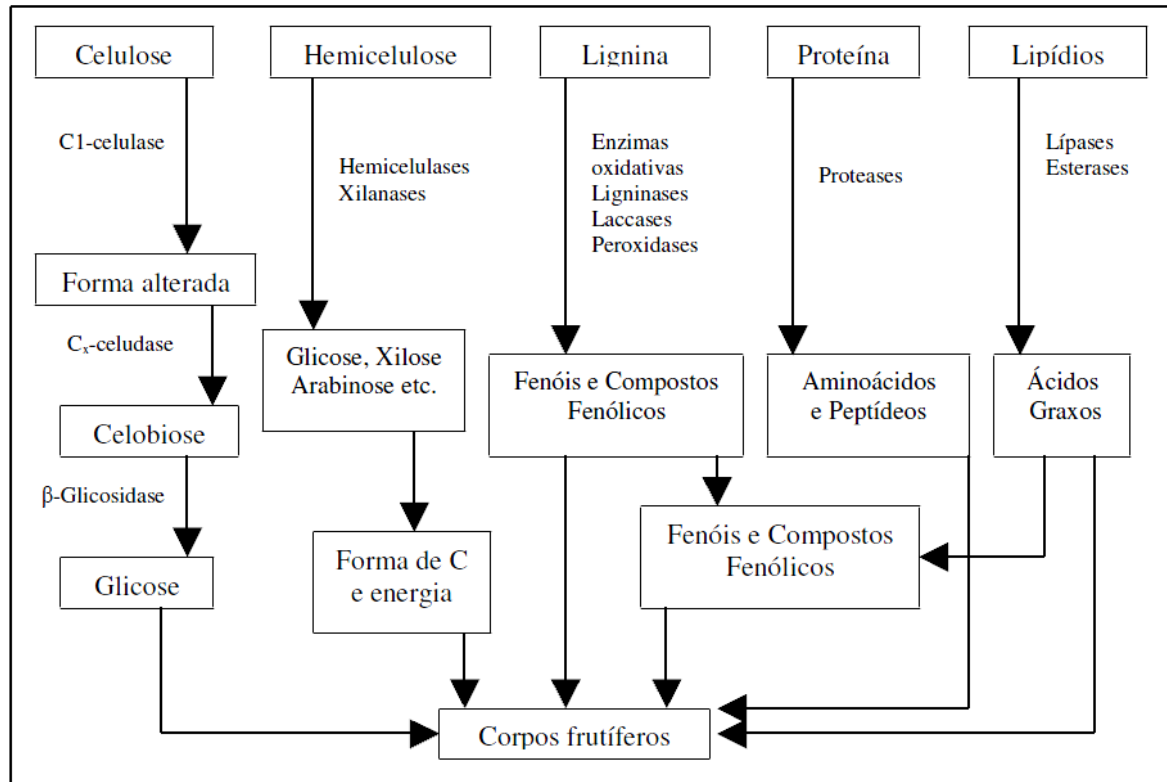
Para iniciar a degradação dos materiais lignocelulósicos os fungos promovem a penetração de suas hifas no lúmen das células vegetais. Essas hifas têm por finalidade a produção de grande diversidade de metabólitos extracelulares, os quais atuam na degradação da parede celular vegetal. Os fungos da podridão branca da madeira decompõem enzimaticamente o substrato, convertendo-os em CO₂ e água para utilizá-los em seu metabolismo (CASTRO et al., 2004).

Um estudo feito por Hatakka (1994) envolvendo *P. ostreatus*, *Trametes versicolor* e *Pycnoporus sanguineus* foi realizado e considerou-se que o basidiomiceto *P. ostreatus* está incluído em um grupo de fungos que degradam eficientemente a lignina, dando preferência a esse substrato quando em grande quantidade, mantendo grande parte da celulose intacta.

Os fungos da classe dos basidiomicetos, com o uso de seu complexo enzimático lignocelulolítico formado por celulases, ligninases, peroxidases, lacases, proteases, manganases e fenol oxidases, dentre outras enzimas, possuem a capacidade de degradar compostos para utilizá-los em seu próprio desenvolvimento (BUSWELL et al., 1987). A figura 4 esquematiza a função das enzimas degradadoras para o crescimento do fungo.

Khalil et al. (2012) relataram que a produção de enzimas lignocelulolíticas de *P. ostreatus* atingiu atividades máxima após 10 dias de cultivo. Em um estudo realizado com fungos do gênero *Pleurotus* por Rosolen et al. (2004), o mesmo mostrou que *P. ostreatus* produziu algumas enzimas em maior quantidade, 1,4 U/g de Mn Peroxidase e 2,18 U/g de lacase, do que o fungo *Pleurotus sajor-caju*, dentre as enzimas, os autores observaram que a Mn Peroxidase teve maior produção. A lignina peroxidase não foi produzida por PLO (DELLAMATRICE et al., 2005). O *P. ostreatus* é capaz de frutificar em temperaturas acima de 25 °C, bem como todos os fungos do gênero onde a faixa de temperatura entre 20 e 30 °C é a ideal para eles (WOLFF, 2007).

Figura 4 – Diagrama da função desempenhada pelas enzimas para morfogênese dos basidiomicetos



Fonte: RAJARATHNAM et al. (1992).

As condições de cultivo de *P. ostreatus* dependerá do produto desejado, o cultivo sólido, utilizando resíduos agroindustriais, é realizado para a produção de corpos frutíferos com fins alimentares para extração de metabólitos como enzimas e outros compostos terapêuticos (BONATTI et al., 2004). Em meio líquido o objetivo é a utilização do caldo de cultivo e da biomassa micelial para a extração de substâncias terapêuticas, como antibióticos, e é utilizado como inóculo líquido para o cultivo de corpos frutíferos em meio sólido (WOLFF, 2007).

Os fungos desse gênero são também são biologicamente versáteis quanto a biodegradação de materiais xenobióticos. Foi descoberto que o fungo *Pleurotus ostreatus* é capaz de degradar e mineralizar compostos xenobióticos, corantes industriais e outros poluentes de solo, como a atrazina (DELLAMATRICE et al., 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Os reagentes químicos utilizados para o preparo das principais soluções foram de grau analítico. Utilizou-se o substrato 2,6-Dimetoxifenol (DMP) nas determinações enzimáticas de lacase. O fungo *Pleurotus ostreatus* (PLO) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro Gómez do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA) da Universidade Estadual de Londrina.

4.1.1 Substratos para Fermentação

A casca de arroz bruta foi cedida pela Beneficiadora Máquina de Arroz Yara – Londrina-PR e foi armazenada em câmara fria até o momento de uso. A granulometria da casca de arroz foi superior a 6 mm.

Grãos de soja e okara foram cedidos pela COCAMAR S/A. Os grãos de soja foram triturados em moinho de facas e peneirados para obtenção da farinha de soja com granulometria superior a 3 mm. O okara foi secado em estufa a 50 °C por 6 horas e triturado em almofariz. As amostras foram armazenadas em freezer a -4 °C.

O farelo e casca de soja foram cedidos pela INCOPA - Importação, Exportação e Indústria de Óleos do Paraná e armazenados em -4 °C.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Meios de Cultivo

4.2.2.1 Meio mínimo de sais de Vogel

O meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) foi utilizado como meio basal para umedecer os substratos. Para o preparo foram dissolvidos em 750 mL de água destilada, sucessivamente e com agitação constante à temperatura ambiente, os seguintes reagentes:

- Citrato de Sódio . 5H₂O 150 g
- KH₂PO₄ Anidro 250 g
- NH₄NO₃ Anidro 100 g
- MgSO₄ . 7 H₂O 10 g
- CaCl₂ . 2H₂O 5 g
- Solução de elementos traços 5 mL
- Solução de biotina 2,5 mL

A solução de elementos traços foi constituída de:

- Ácido cítrico . 1 H₂O 5 g
- ZnSO₄ . 7H₂O 5 g
- Fe(NH₄)₂ (SO₄)₂ . 6H₂O 1 g
- Cu(SO₄)₄ . 5 H₂O 0,25 g
- MnSO₄ . 1H₂O 0,25 g
- H₃BO₄ , H₂O 0,05 g
- Na₂MoO₄ . 2H₂O 0,05 g

O volume final da solução de elementos de traços foi completado para 100 mL. A solução de biotina foi preparada dissolvendo-se 5 mg de biotina em 50 mL de água destilada. O pH foi ajustado na faixa de 5,8 a 6,0 e o volume, para 1 L. Para utilização, este meio foi diluído 50 vezes em água destilada.

4.3 CULTIVOS EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE LACASE

Etapa1: produção de lacase nos substratos farinha de soja integral (FSI), farelo de soja (FS), okara (OK), casca de soja (CS), e casca de arroz (CA) isoladamente e em diferentes combinações (Tabela 3). Os cultivos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 50 mL contendo 1,5 g acrescidos de 7 mL de solução umedecedora até 80 % de umidade, autoclavados a 121 °C por 15 minutos e incubados a 28 ± 2 °C por 7 dias em B.O.D.

Tabela 3 – Substratos e suas combinações utilizadas nos cultivos de *Pleurotus ostreatus* para produção de lacase com 7 mL de solução umedecedora.

Condição	Substrato	Solução Umedecedora
1	1,5 g Farinha de soja integral (FSI)	Para todas as condições: 7 mL de Meio Mínimo de Vogel.
2	1,5 g Farelo de soja (FS)	
3	1,5 g Okara (OK)	
4	1,5 g Casca de soja (CS)	
5	1,5 g Casca de arroz (CA)	
6	1,0 g SI + 0,5 g CA	
7	1,0 g FS + 0,5 g CA	
8	1,0 g OK + 0,5 g CA	
9	1,0 g CS + 0,5 g CA	

Fonte: Próprio Autor.

Etapa 2: produção de lacase em casca de arroz com suplementação da solução umedecedora com glicose, extrato de levedura e CuSO_4 de acordo com a Tabela 4. Os cultivos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 50 mL (1,5 g e 7 mL de solução umedecedora) e/ou 125 mL (3,75 g e 11,5 mL de solução umedecedora) até 80 % de umidade, autoclavados a 121 °C por 15 minutos e incubados a 28 ± 2 °C por 7 dias em B.O.D.

Tabela 4 – Condições de suplementação da solução umedecedora da casca de arroz e aumento da escala de cultivo para avaliar a atividade de lacase produzida por *Pleurotus ostreatus*.

Condição	Casca de Arroz (g)	Solução Umedecedora	mL
1	1,5	MMV*	7,0
2	1,5	MMV + 1% Glicose	7,0
3	1,5	MMV + 1% Glicose + 4% YE	7,0
4	1,5	MMV + 1% Glicose + 4% YE + 150 μM CuSO_4	7,0
5	3,75	MMV	11,5
6	3,75	MMV + 1% Glicose + 4% YE + 150 μM CuSO_4	11,5

*MMV: Meio Mínimo de Vogel (Vogel, 1956)
Fonte: Próprio Autor

Etapa 3: avaliação do tempo de cultivo na produção de lacase em casca de arroz umedecida com solução suplementada. Os cultivos foram realizados em

frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 3,75 g umedecidos com 11,5 mL de solução umedecedora, até 80 % de umidade, autoclavados a 121 °C por 15 minutos e incubados a 28 ± 2 °C por 2, 4, 6, 8, 10, 14, 20 e 28 dias em B.O.D.

OBS: todos os experimentos foram desenvolvidos em quadruplicatas.

4.3.1 Preparo do Inóculo

Para o preparo do inóculo, o microrganismo foi transferido do meio de manutenção para placas de Petri contendo o meio BDA (39 g.L^{-1}), mantidas em estufa $28 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ por 10 dias. As placas colonizadas pelas hifas do fungo foram utilizadas para o inóculo. Utilizou-se esferas retiradas das placas BDA de aproximadamente 6 mm contendo micélio do fungo. A proporção foi de 1 esfera para cultivos em frascos Erlenmeyer de 50 mL e 3 esferas para cultivos em frascos de 125 mL. Esse procedimento foi realizado em condições assépticas.

4.3.2 Interrupção dos Cultivos

Os cultivos foram interrompidos após o período de incubação do fungo. Foram adicionados 10 mL de água destilada em cultivos realizados em frascos de 50 mL e 20 mL em cultivos realizados em frascos de 125 mL. O conteúdo foi homogeneizado com bastão de vidro. A interrupção do cultivo foi realizada pela centrifugação do conteúdo dos Erlenmeyers a 9055 xg, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido, denominado extrato livre de células (ELC), foi armazenado a -18 °C para determinações analíticas.

4.3.3 Otimização da Produção de Lacase em Casca de Arroz

Para determinar as melhores concentrações dos componentes utilizados na suplementação (glicose, extrato de levedura e CuSO_4) da solução umedecedora, foi feito um planejamento experimental estatístico de superfície de resposta Box-Behnken (BOX; BEHNKEN, 1960) do tipo 3^3 (Tabela 5).

O delineamento com as variáveis codificadas e decodificadas são apresentadas na tabela 5. O cultivo foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 3,75 g de casca de arroz com 11,5 mL de solução umedecedora contendo os componentes utilizados na suplementação. Foi incubado por 20 dias em 28 °C.

Tabela 5 – Delianemento experimental Box-Behnken 3^3 utilizado para formulação da solução umedecedora utilizada na fermentação em estado sólido da casca de arroz por *Pleurotus ostreatus*

Tratamento	Componentes					
	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	x_1	x_2	x_3	X_1 Glicose %g (m/v)	X_2 Extrato de Levedura %g (m/v)	X_3 CuSO_4 (μM)
1	-1	-1	0	0	0	300
2	1	-1	0	1	0	300
3	-1	1	0	0	4	300
4	1	1	0	1	4	300
5	-1	0	-1	0	2	150
6	1	0	-1	1	2	150
7	-1	0	1	0	2	450
8	1	0	1	1	2	450
9	0	-1	-1	0,5	0	150
10	0	1	-1	0,5	4	150
11	0	-1	1	0,5	0	450
12	0	1	1	0,5	4	450
13	0	0	0	0,5	2	300
14	0	0	0	0,5	2	300
15	0	0	0	0,5	2	300
16	0	0	0	0,5	2	300
17	0	0	0	0,5	2	300

Fonte: Próprio autor

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA LACASE OBTIDA EM CASCA DE ARROZ

Um experimento foi realizado nas mesmas condições referentes ao tratamento 12 (Tabela 5), com frascos Erlenmeyer com 3,75 g de casca de arroz com 11,5 mL de solução umedecedora. Incubados por 20 dias em 28 °C. Os extratos livre de células obtidos foram reunidos, e armazenados em tubos onde permaneceram congelados até o momento de uso

4.4.1 Determinação de pH e Temperatura Ótimos

Para a determinação de temperatura e pH ótimos da enzima foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2², com 4 pontos axiais e triplicata no ponto central, totalizando 11 experimentos (Tabela 6). A variação de temperatura foi de 25 a 75°C e a variação de pH de 3,0 a 8,0. As dosagens enzimáticas foram realizadas conforme Yaropolov et al. (1944), em tampão McIlvaine, ajustado para diferentes valores de pH. Os resultados foram expressos em percentagem de atividade de enzima (atividade relativa) em função da temperatura e pH

Tabela 6 - Matriz dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 com as variáveis independentes pH e Temperatura, codificadas e decodificadas.

Experimento	Componentes			
	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas	
	x_1	x_2	X_1	X_2
	pH	Temperatura	pH	Temperatura (°C)
1	-1	-1	4,0	35
2	-1	+1	4,0	65
3	+1	-1	7,0	35
4	+1	+1	7,0	65
5	-1,41	0	7,0	50
6	+1,41	0	3,0	50
7	0	-1,41	8,0	25
8	0	+1,14	5,0	75
9	0	0	5,0	50
10	0	0	5,0	50
11	0	0	5,0	50

Fonte: Próprio autor.

4.4.2 Determinação da Estabilidade Térmica

O extrato contendo enzima foi pré-incubado a 30, 50 e 70°C em tampão no pH ótimo durante 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos. A reação foi interrompida nos intervalos de tempo determinados e analisados quanto à atividade de enzima residual, utilizando o tampão no pH ótimo. A estabilidade térmica foi determinada plotando-se os valores da atividade relativa da enzima versus o tempo de incubação.

Avaliou-se também, a estabilidade da enzima após ciclos de congelamento e descongelamentos sucessivos.

4.4.3 Determinação da Constante de Michaelis-Menten (K_m) e Velocidade Máxima (V_{max})

Os valores de K_m e V_{max} foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk conforme descrito por Nelson e Cox (1995), em condições ótimas de temperatura e pH. Preparou-se tubos contendo o substrato DMP em concentrações variando de 0,1 a 30 mM com volume de extrato livre de células constante (500 μ L).

Foi construído o gráfico de Michaelis-Menten. Os resultados foram transformados conforme Lineweaver-Burk, com os inversos dos valores das concentrações de substrato e V_0 (anexo I).

4.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.5.1 Determinação da Atividade de Lacase

A atividade de lacase foi determinada pela mudança de cor da reação, de incolor para marrom, devido a oxidação do substrato 2,6-Dimetoxifenol (DMP) conforme Yaropolov et al. (1994). O sistema de incubação (Tabela 7) foi constituído de 150 μ L de DMP 10mM, 150 μ L de tampão McIlvaine (pH 5,0), 200 μ L de água deionizada e 500 μ L de ELC (fonte de enzima). O tempo de incubação foi de 5 min a 50 °C. Foi realizada leitura em espectrofotômetro a 468 nm e as absorvâncias referentes aos tubos controle da enzima (C1), controle do substrato (C2) foram subtraídas da absorvância da reação (R). A unidade de atividade ($U mL^{-1}$) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de produto formado por minuto de reação.

4.5.2 Determinação de Açúcares Totais Solúveis

A determinação dos açúcares totais solúveis foi realizada pelo método de Dubois et al. (1956). Em um tubo de ensaio foram adicionados 500 µL de ELC, 500 µL de solução de fenol 5% (m/v) e 2,5 mL de H₂SO₄ e após resfriamento dos tubos foi realizada leitura em espectrofotômetro a 490 nm. Foi utilizado uma curva de calibração de glicose (10 a 60 µg/mL) como padrão.

4.5.3 Determinação de Açúcares Redutores

Os açúcares redutores foram determinados segundo o método de SOMOGYI (1945) e NELSON (1944). Em um tubo de ensaio foram adicionados 500 µL de ELC, 500 µL do reagente de Somogyi e incubados a banho-Maria a 100 C°, após resfriamento foi adicionado 500 µL do reagente de Nelson e 3,5 mL de água destilada e procedeu-se leitura em espectrofotômetro em 540 nm. Foi utilizado uma curva de calibração de glicose (10 a 100 µg/mL) como padrão.

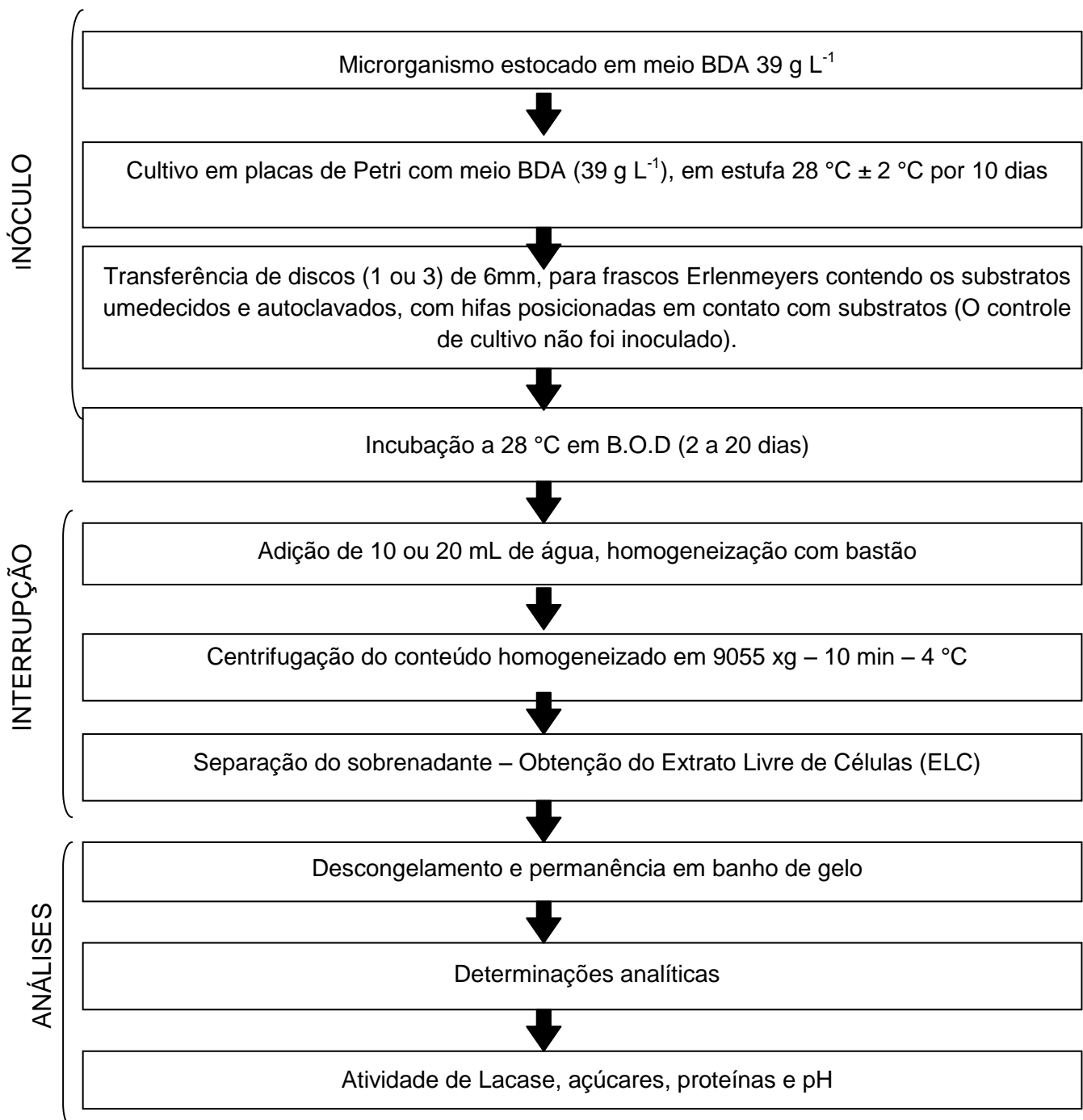
4.5.4 Determinação de Proteínas Totais Solúveis

As proteínas totais solúveis foram determinadas segundo o método de Bradford (1976). Em um tubo de ensaio foram adicionados 100 µL do ELC, e 1 mL do reagente de Bradford, diluído 5 vezes. Após 5 minutos procedeu-se leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm. Para quantificação de proteínas foi utilizado padrão de albumina de soro bovino (BSA) na sensibilidade de 10 à 100 µg/mL.

4.6 FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

O fluxograma geral do cultivo e processo de obtenção do extrato livre de células é apresentado na figura 5.

Figura 5 – Fluxograma geral do cultivo e processo de obtenção do ELC.



Fonte: Próprio autor.

REFERÊNCIAS

- AMEN-CHEN, C.; PAKDEL, H.; ROY, C. Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: a review. **Bioresource Technology**. V.79, P. 277–299, 2001.
- ANDERSON, S.; MERRILL, J.; KLOPFENSTEIN, T. Soybean hulls as an energy supplement for the grazing ruminant. **Journal of Animal Science**. V. 66, n. 11, p. 2959-2964, 1988.
- ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M.; LEE, M. G. Elucidation of the effect of ionic liquid pretreatment on rice husk via structural analyses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012.
- BALDRIAN P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Letters**, v. 30, p. 215-242, 2006.
- BELLON-MARUEL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**.v.38, p.881-896, 2003.
- BEVILAQUA, D. **Produção de ácido levulínico por meio de hidrólise ácida da casca de arroz**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, 2010.
- BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**. V.76, p. 965-977, 2008.
- BOLLAG, J. M.; LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Applied and Environmental Microbiology**. N.48, p. 849-854, 1984.
- BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H. M.; FURLAN, S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**. v.88, p. 425–428, 2004.
- BORZANI, W., AQUARONE, E., LIMA, U.A., SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. Volume II, São Paulo: Edgard Blücher Ltda. 2001.
- BOX, G.E.P.; BEHNKEN, D.W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**. V.2, p.455-475, 1960.
- BOX, G.E.P.; WILSON, K.B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal Royal Statistics Society**, New York, B13,38p. 1951.
- BRADFORD, M.M. A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem.* V.72, P. 248-254, 1976.

BREEN, A.; SINGLETON, F.L. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Currentky Opinion of Biotechnology**. 10: 252-258, 1999.

BRIJWANI K., RIGDON A., VADLANI P. Fungal lacases: Production function, and applications in food processing. **Enzyme Research**, p. 1-10, 2010.

BUSWELL, J.A.; ODIER, E.; KIRK, T.K. Lignin biodegradation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1-60, 1987

CASTRO, A.; PAIVA, P.; DIAS, E.; SANTOS, J. Avaliação das alterações bromatológicas e de degradabilidade do resíduo de lixadeira do algodão após tratamento biológico com *Pleurotus sajor caju*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 3, p. 608-613, 2004.

COCHRAN, W.G.; COX, G.M. **Experimental designs**. New York: John Wiley and Sons, 661p, 1957.

COLLINS, P. J. AND DOBSON, A. D. W Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Applied Environmental Microbiology**. N. 63, p.3444-345, 1997.

CALL H., 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.

CARLOS, R. M. & KHANG, D. B. Characterization of biomass energy projects in Southeast Asia. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 525-532, 2008.

CASTILHO, L.; ALVES, T.; MEDRONHO, R. Production and extration of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues. **Brazilian archieve of biology technology**. V.47, n..5 Curitiba, Set, 2004

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wooddegrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology Biotechnology** V. 58: p. 582-594, 2002.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 16/09/2014

COUTO S.R., TOCA-HERRERA, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 500-513, 2006.

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

CUNHA-PEREIRA, F.; HICKERT, L. R.; SEHNEM, N. T.; SOUZA-CRUZ, P.; ROSA, C.; AYUB, M. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4218-4225, 2011.

D'AGOSTINI, E.; MANTOVANI, T.; VALE, J.; MEIRELLES, L.; COLAUTO, N.; LINDE, G. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 3, p. 295-300, 2011.

DATTA, R.; TSAI, S. P.; BONSIGNORE, P.; MOON, S. H.; FRANK, J. R. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 221-231, 1995.

DELLAMATRICE, P. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana**, SP. 2005. 137 f. Tese. Piracicaba, 2005.

DHAWAN, S.; LAL, R.; HANSPAL, M.; KUHAD, R.C. (2005). Effect of antibiotics on growth and laccase production from *Cyathus bulleri* and *Pycnoporus cinnabarinus*. **Bioresource Technology**. 96: 1415-1418.

DUBOIS, M.; et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** v.28, p.350–356, 1956.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação da lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Org.). In: **Microbiologia ambiental**, Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, p. 303-319, 1997.

ECONOMOU, C. N.; AGGELIS, G.; PAVLOU, S.; VAYENAS, D. V. Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9737-9742, 2011.

ERIKSSON, K. E; BLANCHETTE, R.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Springer Series in wood Science, ed. T. E. Timell. Springer. Verlag, Berlin, 1990.

ESPOSITO, E. AZEVEDO, J. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Rio Grande do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 507 p., 2004.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em 16/09/2014.

FARNET, A.M.; CRIQUET, S.; TAGGER, S.; GIL, G.; LE PETIT, J. Purification, partial characterization and reactivity with aromatic compound of two laccase from *Marasmius quercophilus* strain 17. **Canadian Journal of Microbiology**. N.46, p.189-194, 2000.

FREITAS, J. Estudo de materiais carbonosos obtidos por decomposição térmica de precursores orgânicos através de ressonância magnética nuclear de alta resolução em conjunção com outras técnicas experimentais, Rio de Janeiro, Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Tese doutorado, 173, 2000.

GARCIA, T. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. 2006. 126 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília - DF, Brasília, 2006.

GARCIA, T.A.; SANTIAGO, M.F.; ULHOA, C.J. Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylydine. **Biotechnology Letters**. N.28, p.633-636, 2006.

GARG, S.; MODI, D.; Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.19, e.2, p.85-112, 1999.

GELO-PUJIC, M.; KIM, H.-H.; BUTLIN, N.G.; PALMORE, T.R. Eletrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*. **Applied Environmental Microbiology**. N.65, p.5515-5521, 1999.

GERBER, L.F.P.; Penz JÚNIOR, A.M.P.; RIBEIRO, A.M.L. Efeito da composição do farelo de soja sobre o desempenho e o metabolismo de frangos de corte. **Revista Brasileira de zootecnia**, v.35, n.4, p.1359-1365, 2006.

GIARDINA, P.; CANNIO, R.; MARTIRANI, L.; MARZULLO, L.; PALMIERI, G.; SANNIA, G. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Applied Environmental Microbiology**. N.61, p. 2408-2413, 1995.

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.

GIOVANI, E. M. Response surface methodology and product optimization. **Food Technology**, London, v.37, n.11, p.41-83, 1983.

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

GREGORI, A. The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production . **New Biotechnology**, V. 00, N. 00, 2008.

GULLÓN, P.; MOURA, P.; ESTEVES, M. P.; GIRIO, F. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7482-7487, 2008.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology, in press**, 2006.

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

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

HENIKA, R.G. Simple and effective system for use with response surface methodology. **Cereal Science Today**, St. Paul, v.17, n.10, p.309 - 334, 1972.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Wood Science Technology**, New York, v. 24, n. 1 p. 23-63, 1990.

HUMAR., M. PETRIČ, M., POHLEVEN, F. Changes of the pH value of impregnated wood during exposure to wood-rotting fungi. **Holz als Roh- und Werkstoff**. v. 59, p. 288 – 293, 2001.

JANG, M., RYU, W., CHO, M. Laccase production from repeated batch cultures using free mycelia of *Trametes* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 741–746, 2002.

JÖNSSON, L.; SALOHEIMO M.; PENTTILÄ M. Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of *lcc1* and expression in *Pichia pastoris*. **Current Genetics**, v.32, p. 425–430 1997.

KARAM J.; NICELL J.A., Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 69, p.141, 1997.

KHALIL, Md. I.; HOQUE, M. M., BASUNIA, M. A.; ALAM, N.; KHAN, Md. A. Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass. Turkish **Journal of Agriculture and Forestry**, 2012.

KIRK, K. T.; FARRELL, R. L. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 41, n. 3, p. 465-505, 1987.

KLYOSOV, A.A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. **Biochemistry Washington**, v. 29, p. 10577–10585, 1990

KO, E. M., LEEM, Y. E., AND CHOI, H. T. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. n.57, p. 98-102, 2001.

KOLICHESKI, M. B., **Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido Utilizando como Substrato Bagaço de Mandioca.**, tese, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 1995.

KONG, L.; LI, G.; WANG, H.; HE, W.; LING, F. Hydrothermal catalytic conversion of biomass for lactic acid production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 383-388, 2008.

LEITNER, C., HESS J, GALHAUP C, LUDWIG R, NIDETZKY B, KULBE KD, HALTRICH D. Purification and characterization of a laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolor*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98, p.497-507, 2002.

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

LIM, J. S.; MANAN, Z. A.; ALWI, S. R. W.; HASHIM, H. A review on utilisation of biomass from rice industry as a source of renewable Energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3084-3094, 2012.

LIMA, U. A. ; AQUARONE, E. ; BORZANI, W. ; SCHIMIDELL, W. **Coleção Biotecnologia Industrial**. v. 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos, Edgard Blücher: São Paulo, 593 p. 2001 .

LINKE, D.; BOUWS, H.; PETERS, T.; NIMTZ, M.; BERGER, R.G.; ZORN, H. Laccases of *Pleurotus sapidus*: Characterization and cloning. **Journal Agricultural Food Chemistry. Applied Environmental Microbiology** V. 53: p. 9498-9505, 2005.

LIU, L.; LIN, Z.; ZHENG, T.; LIN, L.; ZHENG, C.; LIN, Z.; WANG, S.; WANG, Z. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. **Enzyme Microbiology and Technology**. n44, p. 426-433, 2009.

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

MANSUR, M.; ARIAS, M. E.; FLÄRDH, M. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. **Mycologia Stanford**, v. 95, n. 6, p. 1013-1020, 2003.

MARTINS, V.; KALIL, S.; COSTA, J. Co-produção de lipase e biosurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, p. 1942-1947, 2008.

MASUTTI, D; BORGOGNONE, A; SETTI, L. Production of Enzymes from Rice Husks and Wheat Straw in Solid State Fermentation. **Chemical engineering transactions**. V. 27, p. 133- 138, 2012.

MAYER, A.; STAPLES, R.; Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**. V. 60, p.551-565, 2002.

MEGAWATI; SEDIAWAN, W. B.; SULISTYO, H.; HIDAYAT, M. Kinetics of sequential reaction of hydrolysis and sugar degradation of rice husk in ethanol production: Effect of catalyst concentration. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2062-2067, 2010.

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.

MIN, K. L., Y. H. KIM, Y. W. KIM, AND H. S. JUNG, AND Y. C. HAH. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. **Archieve Biochemestr Biophysical**, N.392,p. 279-286, 2001.

MINUSSI R.C., ROSSI M., BOLOGNA L., ROTILIO D., PASTORE G.M., DURÁN N. Phenols removal in musts: Strategy of wine stabilization by laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 102-107, 2007.

MONTEIRO, V; SILVA, R. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, p. 9 – 23, Anápolis, Jun. 2009

MOREIRA NETO, S.L.M. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB 444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. 2006. 124 p. Dissertação, Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

MUNARI, F.M.; GAIO, T.A.; CALLONI, R.; DILLON, A.J.P. Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. **World journal of Microbiology and Biotechnology**. 24: 1383-1392, 2008.

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. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**n. 72, p. 939-946, 2006.

NELSON, D.; COX, M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NELSON, D. H. A photometric adaptation of the Somogyi's method for the determination of the glucose. **Biology Chemistry**. N. 153, p. 373-380, 1944.

NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

NEVES, J. Caracterização **Estrutural Dos Polissacarídeos Obtidos Do Basidioma De *Pleurotus ostreatus* variedade florida**. 77 f. Dissertação, Universidade Federal do Paraná, 2007.

NGAI, P.H.K.; NG, T.B. A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Peptides**, New York, v. 5, p. 11–17, 2004.

- NYANHONGO, G., GOMES, J., GUBITZ G., ZVAUYA R., READ, J., STEINER, W. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Bioresource Technology**, v.84, p259–263, 2002.
- O'CALLAGHAN, J., O'BRIEN M., MCCLEAN K., DOBSON, A. Optimisation of the expression of a *Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 29, p. 55–59, 2002.
- OKAMOTO, K.; YANAGI, S. O.; SAKAI, T. Purification and characterization of extracellular laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Mycoscience**, New York, v. 41, n. 1, p. 7-13, 2000.
- OYENUGA, V. A. Nigeria feed and feedstuffs. **Ibadan University Press** . v. 3, 1968.
- PANDEY, A. ; SOCCOL, C. ; SOCCOL, V. ; SINGH, D. ; MOHAN, R. **Advances in Microbial Amylases. Biotechnol. Appl. Biochem.** V. 31, p. 135-152. , 2000.
- PANDEY, A. ; SOCCOL, C.R ; SOCCOL, V. ; SINGH, D. ; MOHAN, R. **Advances in Microbial Amylases.** Biotechnol. Appl. Biochem., v. 31, p. 135-152, 2000.
- PANDEY, A. ; SOCCOL, C.R. ; RODRIGUES-LEON, J.A. ; NIGAM, POONAM. **Solid-State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications.** New Delhi: Asiatech Publishers, Inc. . 221p. 2001.
- PANDEY, A. Aspects of Fermenter Design for Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**. v. 26, p. 335-361, 1991.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology.** 1^a ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 760 p. 2005.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v.22, p. 189–259 , 2004.
- PEDRA, W.N.; MARINO, R.H. Cultivo axênico de *Pleurotus spp.* em serragem da casca de coco (*cocos nucifera linn.*) suplementada com farelo de arroz e/ou de trigo. **Instituto de Biologia.**, v. 73, n. 2, p. 219-225, 2006.
- PERALTA, R.; SOUZA, C.; BôER, C. **As principais oxidorredutases de uso industrial.** Ed. Legis Summa: Ribeirão Preto – SP. 2004.
- PIETRO, R.; SAID, S.; **Enzimas Como Agentes Biotecnológicos.** Ed. Legis Summa: Ribeirão Preto – SP. 2004.
- BHANGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving characterization of laccase from *Botrytis cinera* 61-34. **Applied and environmental Microbiology** n. 61, p. 907-912, 1995.
- RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M.N.U.; BANO, Z. Biopotentialities of Basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**, vol. 37, p. 233-361. 1992.

RAMOS, A. W. **Delineamento de experimentos**. Pro 2712 – controle da qualidade. *Escola Politécnica da Universidade de São Paulo*, 2005.

RAMOS, A.. **Cultura de Cogumelos do Gênero Pleurotus**. Portugal: INIAP, 2003.

RANCAÑO, G.; LORENZO, M.; MORALES, N.; COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. **Process Biochemistry**. n39, p.467-473, 2003.

REGINA, M.; BROETTO, F.; GIOVANNOZZI-SERMANNI, G.; MARABOTINI, R.; PERANNI, C.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em substratos agroindustriais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 4, p. 881-888, 2009.

REHMAN, A. U. THURSTON, C. F. Purification of laccase I from *Armillaria mellea*. **Journal General of Microbiology**. n.138, p. 1251-1257, 1992.

RISDIANTO, H; SOFIANTI, E., HARJATI, S.; SETIADI, T. Optimisation of Laccase Production using White Rot Fungi and Agriculture Wastes in Solid State Fermentation. **ITB Journal Engineer Science**, V. 44, N. 2, p. 93-105, 2012.

RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Casa do Pão Editora. Campinas, SP. 2005.

ROSOLEN, L. A.; MONTEIRO, R. .; DELLAMATRICE, P.; KAMIDA, H. Biodegradação de efluente têxtil e nove corantes técnicos utilizando fungos basidiomicetos. **XVII CONGRESSO LATINO AMERICANO DE QUIMICA TEXTIL**, Piracicaba – SP, 2004.

RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS, J.C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, J.; BHANGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v.41, p. 2264–2269, 2006.

ROY, B. ARCHIBALD, F. Effects of kraft Pulp and Lignin on *Trametes versicolor* Carbon Metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 59(6), p. 1855-1863, 1993.

SAHA, B. ;COTTA, M. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 971-977, 2008.

SARNTHIMA, R.; KHAMMUANG, S. Laccase isozymes of *Pleurotus sajor-caju* culture on husk and bran of black sticky rice and their potential on indigo carmine decolourisation. **African Journal of Biotechnology**, V. 7,p. 3731-3736, 2008.

SCHNIEWIND, A.P. Thermal Properties, In: **Encyclopedia of Wood & Wood-Based materials**, Nova Iorque; Pergamon Press, p.271–273, 1989.

SHARMA, R., CHISTI, Y.; BANERJEE, U. Research review paper production, purification, characterization, and applications of lipases, **Biotechnology Advances**, v.19, pp.627–662, 2001.

SHUMAKOVICH, G.P.; SHLEEV, S.V.; MOROZOVA, O.V.; KHOHLOV, P.S.; GAZARYAN, I.G.; YAROPOLOV, A.I. Electrochemistry and kinetics of fungal laccase mediators. **Bioelectrochemistry**. V.69, P. 16-24., 2006.

SILVA, R.; GOMES, G. Ligninases. In: PIETRO, R. ; SAID, S.; **Enzimas Como Agentes Biotecnológicos**. Ed. Legis Summa. Ribeirão Preto – SP. 2004.

SLOMCZYNSKI, D., NAKAS, J. P., AND TANENBAUM, S. W. Production and SOCCOL, C. R. **Contribuição ao Estudo da Fermentação no Estado Sólido em relação com a produção de Ácido Fumárico. Biotransformação de resíduo Sólido de mandioca por Rhizopus e Basidiomycetes do Gênero Pleurotus**. Tese, Universidade Federal do Paraná Curitiba, 228f. 1994.

SOCCOL, C.R. ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. **Glucoamylase**. In: Enzyme Technology. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., p. 221-230. 2005.

SODEN, D.M.; DOBSON, A.D.W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiology**, N. 147, p. 1755-1763, 2001.

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

SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biology Chemistry**, v.160, p.61-68, 1945.

SOYA HANDBOOK, **Centre Expertise Soya**, Tetra Pak, 2003

STAJIC, M. et al. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme Microbial Technology**, v. 38, n. 1, p. 65-73, 2006.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (data analysis software system), version 7.0. Statsoft: Tulsa, Oklahoma, 2005.

STEVENS, J.; MCGINNIS, J. .The effect of autoclaving lysine in the presence of carbohydrate on its utilization by the chick. **Scientific Paper**, N. 732, Washington, 1947.

STURION, G.; RANZANI, M.. Composição em minerais de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil – *Pleurotus* spp. e outras espécies desidratadas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 50, n. 1, p. 102-108, 2000.

SUXIA, R.; HAIYAN, X.; JINLING, Z.; SHUNQING, L.; XIAOFENG, H.; TINGZHOU, L. Furfural production from rice husk using sulfuric acid and a solid acid catalyst through a two-stage process. **Carbohydrate Research**, v. 359, p. 1-6, 2012.

TAVARES, A. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira**. 2006. 190 p. Tese – Universidade de Aveiro, Aveiro. 2006.

TARLEY, C. R. T.; SILVEIRA, G.; SANTOS, W. N. L.; MATOS, G. D.; SILVA, E.G. P.; BEZERRA, M. A.; MIRÓ, M.; FERREIRA, S. L. C. Review article -Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**. 92, 58- 67, 2009.

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

TINOCO, R.; PICKARD, M.A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. **Letter Applied of Microbiology** 32: 331-335, 2001.

URBEN, A. F. **Cogumelos cultivados no Brasil pela técnica "Juncao"**. In: Ii Simpósio Internacional De Cogumelos No Brasil E Ii Simpósio Nacional Sobre Cogumelos Comestíveis, 2006, São Paulo, Brasília :EMBRAPA, p. 16-24, 2006.

VANDENBERGHE W, VAN DEN BOSCH L, ROBBERECHT W. Glial cells potentiate kainate-induced neuronal death in a motoneuron-enriched coculture system. **Brain Resouce** V.807, P. 1–10, 1998.

VIEIRA, C.R.; CABRAL, L.C.; PAULA, A.C.O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 34:1277- 1283, 1999.

VOGEL, H.. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p.42-3, 1956

WOLFF, E.. **Estudo in vivo da atividade antitumoral de substancias bioativas sintetizadas por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833**. 87 p. Dissertação, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2007.

YANG, J. H.; LIN, H. C.; MAU, J. L. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**. v. 72 (4), p. 465-471, 2002.

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão apresentados na forma de um artigo científico intitulado: Casca de arroz para produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* em fermentação em estado sólido.

ARTIGO A**Casca de arroz para produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* em fermentação em estado sólido**

Leonardo Guerreiro Borges dos Santos¹; Maria Inês Rezende¹; Mara Lúcia Luiz Ribeiro^{1*}.

¹Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - Centro de Ciências Exatas - Universidade Estadual de Londrina. Londrina , PR, Brasil.

Running title: Production, optimization and characterization of laccase enzyme by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation

*Corresponding author. Mailing address: UEL – Centro de Ciências Exatas – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia. Caixa Postal 10.011 – CEP 86057-970, Londrina – Paraná. E-mail: maraluciaribeiro@uel.br

RESUMO

O Brasil é o nono produtor mundial de arroz, gerando subprodutos como a casca de arroz (CA) de composição lignocelulósica e potencial de aproveitamento em bioprocessos. O *Pleurotus ostreatus* é um basidiomiceto, ligninolítico e comestível. Avaliou-se a produção de lacase de *P.ostreatus* em CA, sob fermentação em estado sólido (FES). A FES foi desenvolvida utilizando os substratos: Farinha integral de soja integral; farelo de soja; okara; casca de soja; CA e misturas entre substratos de soja e CA. A solução umedecedora foi o Meio Vogel Mínimo (MMV). A casca de arroz foi selecionada para melhor avaliação da produção da lacase. Avaliou-se a suplementação adicionando-se ao MMV: glicose, extrato de levedura (EL) e CuSO_4 em um delineamento Box-Behnken 3^3 . O efeito do tempo de cultivo foi avaliado no intervalo de 2 – 28 dias. A enzima foi caracterizada em pH e temperatura de atividade ótimos, utilizando planejamento estatístico composto central rotacional 2^2 . Testou-se a estabilidade térmica em 30°, 50° e 70° C, assim como a concentração do substrato 2,6-Dimetoxifenol na atividade. Os níveis glicose (0,5%), EL (4%) e CuSO_4 (450 μM) proporcionaram 10,7 U mL^{-1} de lacase. O melhor tempo de produção foi 20 dias. A temperatura demonstrou-se significativa na atividade ($p < 0,05$) sendo ótima em 55° C. O valor de K_m ao substrato 2,6-Dimetoxifenol foi 2,71 mM e V_{max} 12,64 U mL^{-1} por minuto em pH 5,5 em 55° C. A suplementação evidenciou a influência na produção de lacase, sendo a casca de arroz suplementada um potencial substrato na produção desta enzima.

PALAVRAS-CHAVE: *Pleurotus ostreatus*; casca de arroz; fermentação em estado sólido; lacase.

ABSTRACT

Brazil is the ninth largest producer of rice, generating by-products such as rice husk (RH) lignocellulosic composition and use of potential bioprocesses. The *Pleurotus ostreatus* is a basidiomycete, ligninolytic and edible. Was evaluated the production of laccase of *P.ostreatus* in RH under solid state fermentation (SSF). The SSF was developed using substrates: Soybean flour ; soybean meal; okara; soy hull; RH and mixtures of soybean substrates and RH. The moisturizing solution was Vogel Medium (VM). Rice husk has been selected to better assess the production of laccase. Was evaluated the supplementation adding to the VM glucose, yeast extract (YE) and CuSO₄ in a Box-Behnken design 3³. The effect of culture time was evaluated in the range 2-28 days. The enzyme was characterized on optimum pH and temperature activity using a central composite statistical design 2² was tested for thermal stability 30°, 50° and 70° C, and the concentration of 2,6-dimethoxyphenol substrate in the activity. Glucose levels (0.5%), EL (4%) and CuSO₄ (450 mM) gave 10.7 U mL⁻¹ of laccase. The best production time was 20 days. The temperature was demonstrated significant in activity (p <0.05) optimum at 55 C. The optimum value of K_m to 2,6-dimethoxyphenol substrate was 2.71 mM and V_{max} 12.64 U mL⁻¹ per minute at pH 5.5 at 55° C. The supplementation showed the influence of laccase production. Rice husk supplemented are a potential substrate for production of laccase enzyme.

KEY-WORDS: *Pleurotus ostreatus*; rice husk; solid state fermentation; laccase.

INTRODUÇÃO

Lacases são polifenol oxidases (EC 1.10.3.2) produzidas por fungos, bactérias, plantas e insetos (Collins e Dobson, 1997; Soden e Dobson, 2011; Majeau et al., 2010). Apresenta baixa especificidade por substratos, permitindo atuação sobre compostos orgânicos ou inorgânicos diversos, incluindo fenóis, mono-, di- e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e outros compostos com estruturas aromáticas. Existem 4 íons cobres em 3 sítios catalíticos na lacase que desempenham papéis fundamentais na reação (Baldrian, 2006).

No meio ambiente a lacase é utilizada pelos fungos principalmente para hidrólise da lignina, que é um composto recalcitrante de diferentes pesos moleculares ligados covalentemente a celulose. Facilitando a exposição e acesso de celulose por celulases. (Anderson; Merrill; Klopfenstein, 1988).

O uso de lacases é uma alternativa para processos biotecnológicos de interesse para diversos setores industriais, químicos, farmacêuticos, de alimento e de rações. Podem atuar no branqueamento e delignificação de polpa de celulose (Breen e Singleton, 1999); na elaboração de diagnósticos clínicos (Dhawan et al., 2005) e na clarificação e estabilização de sucos de frutas, melhoria da qualidade de rações animais (Couto; Herrera, 2006).

Fungos da espécie *Pleurotus ostreatus* são conhecidos como causadores da podridão branca da madeira, por degradarem a lignina de tecidos vegetais e por produzirem enzimas lignocelulolíticas, principalmente lacases e Mn peroxidase (Stajic, 2006).

Os setores agroindustriais produzem resíduos lignocelulósicos que representam perdas de nutrientes. O aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são necessários para garantir a viabilidade econômica, biocompatibilidade das cadeias agroindustriais e reduzir o impacto ambiental que o acúmulo destes resíduos podem provocar. O arroz após seu beneficiamento gera a casca, que corresponde a 20% do total do grão de arroz que é rica em celulose e hemicelulose com potencial para produção de bioprodutos (Saha e Cotta, 2008). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes subprodutos da agroindústria como substrato para produção de lacase por *P. ostreatus* em fermentação em estado sólido, selecionar o melhor substrato, otimizar as condições de cultivo e caracterizar parcialmente a enzima.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e preparo do inóculo

O *P. ostreatus* mantido em meio Batata-dextrose ágar (BDA) 39 g L⁻¹ (Acumedia®, Laming, Michigan, EUA) foi cultivado em placas no mesmo meio por 10 dias em estufa em 28 °C. Após o crescimento das hifas foram obtidas esferas de 6 mm de diâmetro para o inóculo.

Preparo dos substratos

Os substratos utilizados foram grãos de soja para obtenção de farinha integral de soja (FIS) e okara (OK) (cedido pela COCAMAR SA, PR, Brasil); farelo (FS) e casca de soja (CS) (cedido pela INCOPA, Cambé, PR, Brasil) e casca de arroz (cedida pela Beneficiadora Máquina de arroz Yara, Londrina, PR, Brasil).

A FIS foi obtida por moagem dos grãos de soja em moinho de facas, peneirada para obtenção de grânulos superior a 3 mm. O OK foi secado em estufa a 50° C por 6 horas, triturado em almofariz até obtenção de grânulos superiores a 4 mm. A granulometria do FS foi superior a 3 mm e a da CS foi superior a 6 mm. Os substratos foram armazenados em -18° C.

Fermentação em estado sólido (FES)

Os substratos FIS, FS, OK, CS e CA e as misturas FIS + CA, FS + CA, OK + CA e CS + CA foram utilizados para FES. Os substratos FIS, FS, OK, CS e CA contendo 1,5 g e as misturas FIS + CA, FS + CA, OK + CA e CS + CA contendo 1,0 g de substrato de soja e 0,5 g de casca de arroz foram colocados em frascos Erlenmeyers (50 mL) umedecidos com meio mínimo de Vogel (1956) (MMV) diluído 50 vezes em água, na proporção de 1,5 g de substrato para 7 mL de solução umedecedora para manter 80% de umidade aproximadamente. Os frascos foram autoclavados a 121° C por 16 minutos e inoculados com uma esfera de BDA de 6 mm de diâmetro contendo as hifas de *P. ostreatus*, que ficou em contato com os substratos. Os frascos foram incubados a 28° C por 7 dias em estufa BOD (Nova ética® - 411 D, São Paulo, SP, Brasil). O extrato livre de células foi obtido com a

adição de 10 mL de água em cada frasco, centrifugado a 9055 xg por 10 minutos (Hettich – Universal 320 R, Tuttlingen, Alemanha) e armazenados a -18° C por análises de atividade de lacase, consumo de açúcares e teor de proteína conforme metodologia descrita. Também foram realizados cultivos com casca de arroz contendo 3,75 g do substrato e 11,5 mL de solução umedecedora, em frascos de 125 mL. Na interrupção deste foi utilizado 20 mL de água destilada. A maior escala foi calculada por proporção utilizando o volume do frasco Erlenmeyer como padrão.

Suplementação da solução umedecedora (MMV) da casca de arroz.

O MMV foi suplementado com glicose, extrato de levedura (EL) e sulfato de cobre (CuSO₄); para avaliar o efeito de nutrientes na produção de lacase por *P.ostreatus* em casca de arroz.

As condições utilizadas foram: MMV sem suplementações, MMV + Glicose 1%; MMV + glicose 1% + EL 4%; e MMV + glicose 1% + EL 4% + CuSO₄ 150 µM; na proporção de 1,5 g de casca de arroz para 7 mL de solução umedecedora. As condições contendo MMV e MMV + glicose 1% + EL 4% + CuSO₄ 150 µM foram avaliadas com 3,75 g de casca de arroz para 11,5 mL de solução umedecedora. O cultivo foi conduzido em B.O.D por 7 dias em 28 °C.

Tempo de cultivo e produção da lacase

A produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* a casca de arroz suplementada com MMV + glicose 1% + EL 4% + CuSO₄ 150 µM (3,75 g de casca de arroz e 11,5 mL de solução umedecedora) foi avaliada em 2, 4, 6, 8, 10, 14, 20 e 28 dias de cultivo a 28° C.

Otimização da suplementação da solução umedecedora (MMV) para produção de lacase.

Para otimizar a melhor condição de suplementação da solução umedecedora foi utilizado um planejamento do tipo Box-Behnken 3³ (Box; Behnken, 1960) com as variáveis independentes % glicose (0; 0,5, 1,0), % extrato de levedura (0; 2; 4) e µM CuSO₄ (150; 300; 450) (tabela 5). A função resposta Y₁ (atividade de lacase U mL⁻¹)

foi avaliada pelo modelo matemático $Y = \beta_0 + \sum \beta_{ii} + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$ (equação 1) onde Y (função resposta), $x_i x_j$ (variáveis decodificadas), β (coeficientes estimados para cada termo do modelo de superfície de resposta e ε (erro experimental).

Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL com 3,75 g de casca de arroz e 11,5 mL de MMV suplementado incubado a 28° C por 20 dias.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas pelo software Statistica 7.0 (Statsoft, Oklahoma, 2005). Após a análise da função resposta (Y_1), a análise de variância (ANOVA), regressão, coeficiente de determinação (R^2) e superfície de resposta foram gerados. O teste de Tukey, nível de significância de 5% foi utilizando para comparação de médias.

Determinações analíticas

A atividade de lacase foi determinada pelo método proposto por Yaropolov et al. (1994), onde o substrato 2,6-Dimetoxifenol (DMP) é oxidado pela enzima passando a ter coloração marrom e realizado leitura em 468 nm. Uma unidade de atividade ($U mL^{-1}$) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de produto formado por minuto de reação.

Os açúcares totais solúveis foram quantificados pelo método de Dubois et al. (1956) utilizando uma curva de calibração de glicose (10 – 60 μ g mL^{-1}) ($y = 0,009x - 0,0092$; $R^2 = 0,9989$); os açúcares redutores pelo método Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945; Nelson, 1944) com base em uma curva de calibração de glicose (10 – 100 μ g mL^{-1}) ($y = 0,006x - 0,1141$; $R^2 = 0,9872$); a quantidade de proteínas totais solúveis foi dosada pelo método de Bradford (1976) (sensibilidade 10 – 100 μ g mL^{-1}) ($y = 0,0034x + 0,0181$; $R^2 = 0,9976$). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Genesys6® (Thermo Scientific).

O pH dos ELC de cada experimento foi determinado com auxílio de um potenciômetro marca DigiMed®, modelo DM 20.

Caracterização parcial da lacase

O extrato obtido na melhor formulação da solução umedecedora da casca de arroz (glicose 0,5%; EL 4%; CuSO_4 450 μM), incubado por 20 dias, foi utilizado para caracterização parcial da lacase.

pH e temperatura ótimos de atividade

Para a determinação de temperatura (25 – 75° C) e pH (3,0 – 8,0) ótimos foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2² com função resposta Y_1 (atividade de lacase) avaliada conforme modelo matemático (Equação 1 – Anexo I). Os resultados foram expressos em percentagem de atividade relativa em função da temperatura e pH.

Estabilidade térmica e ao descongelamento

A estabilidade térmica da lacase foi avaliada pela incubação da enzima a 30, 50 e 70° C em tampão McIlvanes no pH ótimo (5,5) em intervalo de tempo (0 – 240 minutos). Os resultados foram expressos em percentagem de atividade residual.

A estabilidade da enzima foi avaliada após ciclos de congelamento e descongelamentos sucessivos.

Cinética de DMP na atividade da lacase

O efeito da concentração de DMP (0,1 – 30 mM) foi determinado em pH 5,5 a 50° C por 5 minutos de reação. Os resultados foram expressos em U mL^{-1} e os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ estimados pelo método gráfico de Lineweaver- Burk (Nelson e Cox; 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do Substrato na Produção de Lacase por Pleurotus ostreatus

A produção de lacase por *P. ostreatus* foi avaliada em FES nos substratos: FIS, FS, OK, CS e CA e misturas: FIS+CA; FS + CA; OK + CA e CS + CA (Anexo I – Tabela 1).

As maiores atividades de lacase foram observadas no cultivo contendo CA + CS ($2,37 \text{ U mL}^{-1}$) e somente CA ($2,22 \text{ U mL}^{-1}$). Segundo Stajic (2006) basidiomicetos como *P. ostreatus* são fungos com habilidade genética para produção de enzimas lignocelulolíticas, pois seu habitat natural, troncos e galhos de árvores, são ricos em lignina. A casca de arroz é um subproduto da indústria de beneficiamento de arroz de alto teor lignocelulósico, 18% contra somente 2% da casca de soja (Suxia et al., 2012) que, possivelmente atuou como indutora na produção de lacase. Quando há presença de casca de arroz no substrato (misturas) observa-se que as atividades de lacase são mais elevadas. Assim, a CA foi selecionada como substrato para produção de lacase por *P. ostreatus*.

Os teor de açúcares solúveis totais nos ELC foi de 0,37 e 4,82 mg mL^{-1} (Anexo I – Tabela 1), quando os substratos foram CA e FS; e açúcares redutores de 0,72 e 2,58 mg mL^{-1} quando os substratos foram CA e OK+CA. Houve maior concentração de açúcares totais nos ELC na maioria dos cultivos, quando comparado ao controle. O teor de açúcares redutores foi superior aos controles, indicando que o fungo hidrolisou carboidratos complexos para suprir necessidades energéticas, e, com essa atividade, liberou açúcares redutores.

O teor de proteínas foi de 0,34 e 2,18 mg mL^{-1} quando os substratos foram CA e FS. Estes resultados foram superiores aos cultivo controle, possivelmente devido as enzimas extracelulares produzidas pelo microrganismo. As proteínas presentes nos substratos podem ser solubilizadas na fase aquosa de uma FES. O pH observado nos cultivos e controles de cultivo ficou próximo da neutralidade de 6,0 - 7,0 (Anexo I – Tabela 1).

Suplementação da solução umedecedora na produção de lacase por P. ostreatus em casca de arroz

A casca de arroz umedecida com MMV suplementado com glicose, EL, e CuSO_4 foi testada como substrato para produção de lacase (Anexo I – Tabela 2). Os cultivos foram realizados em duas escalas, com 1,5 g e 3,75 g de CA.

A produção de lacase por *P. ostreatus* foi superior nos cultivos com CA umedecida com MMV suplementado com glicose 1%, EL 4% e CuSO_4 150 μM . Os resultados foram de 3,06 e 4,00 U mL^{-1} para as escalas de 1,5 e 3,75 g de CA. Observa-se o e CuSO_4 150 μM foi o constituinte químico que apresentou maior contribuição para o aumento de atividade de lacase de aproximadamente 15% e 2 vezes em relação aos cultivos com CA umedecida com MMV (anexo I - tabela 2). O aumento da escala favoreceu a produção de lacase por *P. ostreatus* em aproximadamente 1,5 vezes. O cobre está presente na estrutura da lacase e estudos têm mostrado que a sua adição ao meio de cultura, aumenta a produção da enzima (Dhawan et al., 2005).

Os resultados obtidos neste trabalho foram superiores ao observado na literatura. Sarnthima (2008) obteve 2,25 U mL^{-1} cultivando *Pleurotus sajor-caju* em casca de arroz por 30 dias para obtenção de lacase, Risdiando et al. (2012) cultivou *Marasmius sp.* em casca de arroz suplementada com alguns sais que estão presente no MMV adicionado de glicose 4,3 g L^{-1} ; extrato de levedura 0,3 g L^{-1} ; H_2MoO_4 0,007 g L^{-1} , e obteve 1,11 U mL^{-1} ; Gregori et al. (2008) cultivando *Pleurotus ostreatus* em fermentação em estado sólido utilizando como substrato palha de trigo e resíduos de indústria cervejeira alcançaram atividade máxima de lacase de 0,3 U mL^{-1} . Tavares (2006) cultivou *Trametes versicolor* utilizando meio líquido quimicamente definido contendo e obteve atividade máxima de lacase de 0,7 U mL^{-1} .

Tempo de Cultivo na Produção de Lacase

O *P. ostreatus* iniciou a produção da lacase em 2 dias de cultivo em CA suplementada, sendo o pico máximo de produção em 20 dias, 10 U mL^{-1} (Anexo I – Figura 1). Do 14º ao 20º dia de cultivo houve um aumento de 3,5 vezes na atividade de lacase. Após 20 dias de cultivo ocorreu uma redução de 35% de atividade.

Okamoto, Yanagi e Sakai (2000) relataram atividade de lacase de $0,13 \text{ U mL}^{-1}$ por *Pleurotus ostreatus* após oito dias de cultivo, utilizando meio líquido com malte, extrato de levedura e glicose. Mansur, Arias e Flärdh (2003) avaliaram a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*, em meio líquido de sais adicionado de glicose 10 g L^{-1} , extrato de levedura 1 g L^{-1} e obtiveram máxima atividade de $0,31 \text{ U mL}^{-1}$ no 5º dia de cultivo.

Os açúcares foram consumidos por *P. ostreatus* (Anexo I – figura 1). Esse consumo foi menos intenso após 14 dias de crescimento. O pH aumentou de 6,8 em 14 dias de cultivo para 7,3 em 20 dias. Leitner et al. (2002) reportou que houve aumento de quase 2 vezes na atividade da lacase quando a concentração inicial de glicose passou de 9 g L^{-1} para nenhuma glicose no meio e concluiu que quando a glicose está presente, a síntese da lacase é menor em *Trametes pubescens*. O teor de proteínas totais aumentou com o tempo de cultivo. Após 20 dias houve um aumento de 10 vezes no teor de proteínas e após 28 dias de cultivo o teor de proteínas e a atividade de lacase diminuíram 26% e 35%.

Otimização da produção de lacase por Pleurotus ostreatus

A partir da constatação de que o MMV suplementado aumentou a atividade de lacase produzida por *P. ostreatus* em casca de arroz, as condições de suplementação foram exploradas por um delineamento Box-Behnken 3^3 (Tabela 1).

O tempo de cultivo foi 20 dias. A análise de regressão e ANOVA para função resposta ($Y_1 = \text{U mL}^{-1}$) e o efeito das variáveis x_1 (%glicose: 0; 0,5; 1,0); x_2 (%EL: 0; 2; 4) e x_3 ($\mu\text{M CuSO}_4$: 150; 300; 450) foram analisados. Praticamente todas as variáveis, assim como as interações entre elas foram significativas na produção de lacase, apenas a interação entre x_1x_3 (glicose e CuSO_4) não foi significativa (Anexo I – tabela 3). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,872 (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividade de lacase de *Pleurotus ostreatus* referente a cada tratamento utilizado na formulação da solução umedecedora da casca de arroz pelo delineamento estatístico.

Tratamento	Variável Codificada			Variável Decodificada			Variável Resposta	
	x1	x2	x3	X ₁	X ₂	X ₃	Y	
				%Glicose (m/v)	% EL* (m/v)	CuSO ₄ (µM)	Atividade (U mL ⁻¹)	Atividade Predita* (U mL ⁻¹)
1	-1	-1	0	0	0	300	0,81	0,27
2	1	-1	0	1	0	300	2,87	2,27
3	-1	1	0	0	4	300	4,44	6,17
4	1	1	0	1	4	300	5,11	8,17
5	-1	0	-1	0	2	150	0,91	0,23
6	1	0	-1	1	2	150	0,74	2,93
7	-1	0	1	0	2	450	1,27	1,49
8	1	0	1	1	2	450	0,9	2,79
9	0	-1	-1	0,5	0	150	0,98	2,60
10	0	1	-1	0,5	4	150	8,7	7,37
11	0	-1	1	0,5	0	450	0,71	2,03
12	0	1	1	0,5	4	450	10,7	9,06
13	0	0	0	0,5	2	300	0,82	0,81
14	0	0	0	0,5	2	300	0,72	0,81
15	0	0	0	0,5	2	300	0,86	0,81
16	0	0	0	0,5	2	300	0,81	0,81
17	0	0	0	0,5	2	300	0,84	0,81

* Atividade predita pela equação de segundo grau ajustada ao modelo ($R^2 = 0,872$).

A melhor interação observada (10,7 U mL⁻¹) foi no tratamento 12 (Glicose 0,5%; EL 4%; CuSO₄ 450 µM), a segunda melhor interação observada (8,7 U mL⁻¹) foi no tratamento 10 (glicose 0,5%; EL 4%; CuSO₄ 150 µM). Nota-se que a composição destes tratamentos somente variou na concentração de CuSO₄, quando houve o aumento deste componente, a atividade de lacase foi maior.

A análise de variância dos resultados obtidos no estudo de produção de lacase sob as diferentes concentrações dos componentes da solução umedecedora da casca de arroz (Anexo I – Tabela 3) apresentou ajuste para o modelo fatorial (R^2) de 0,872 sendo que todos os componentes, interações e falta de ajuste foram significativos na produção de lacase ($p \leq 0,05$), somente a interação entre glicose e CuSO₄ revelou não ser significativa ($p > 0,05$).

A partir da análise da regressão (Anexo I – Tabela 4) para atividade de lacase foi possível definir o modelo polinomial de segunda ordem. O coeficiente de correlação de 0,87 demonstrou que 87% total da resposta foi explicada pelo modelo.

Os valores preditos de atividade de lacase foram calculados pela equação de segundo grau (Tabela 1).

O gráfico de superfície de resposta (Figura 1) relacionando extrato de levedura e CuSO_4 permitiu observar que as melhores condições para a atividade enzimática estão na região entre concentrações de extrato de levedura acima de 4% e concentrações de CuSO_4 acima de 400 μM . Nota-se que a região ótima não foi alcançada.

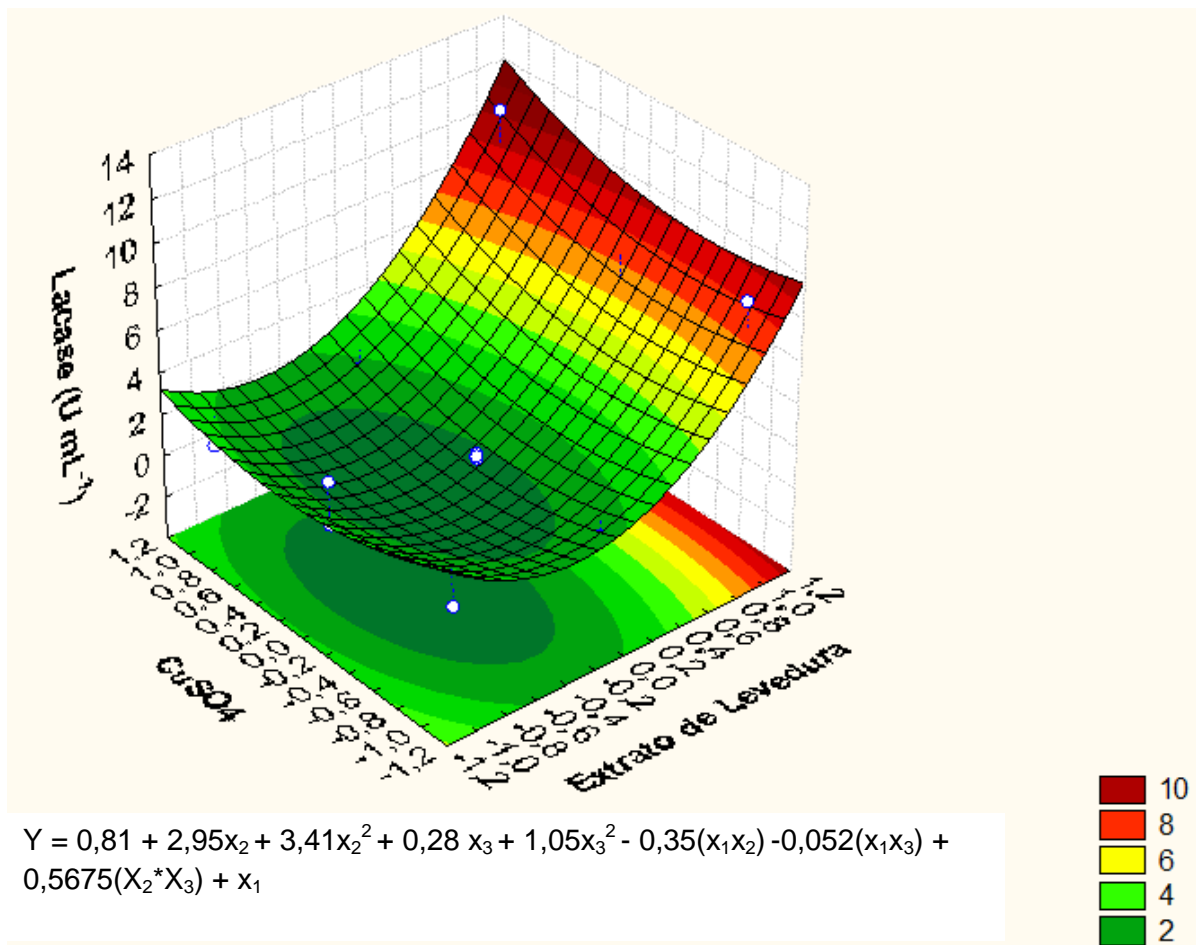


Figura 1 - Gráfico de superfície de resposta para a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* em resposta à interação entre extrato de levedura e CuSO_4 .

Determinação de pH e temperatura ótima de atividade

Para determinação de pH e temperatura ótimos de atividade da lacase foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2². Os resultados são expressos em atividade relativa, em relação à temperatura e pH. A atividade inicial (100%) foi de 9,77 U mL⁻¹ utilizando pH (5,0) e temperatura (50 °C) propostos pelo método de Yaropolov et al. (1944).

Os resultados obtidos (Tabela 2) demonstraram uma maior atividade nos experimentos 2 com pH 4,0 e 65 °C, e nos experimentos referentes ao ponto central, 9, 10 e 11 com pH 5,5 e 55 °C. Sendo ótimos os valores de pH 5,5 e temperatura de 55 °C definido pelo metologia de superfície de resposta (Figura 2)

Tabela 2 - Condições experimentais e resultados obtidos no planejamento fatorial por DCCR para de lacase produzido por *Pleurotus ostreatus*.

Experimento	Componentes				Y		
	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas				
	x1	x2	X1	X2	Atividade relativa* (%)	Atividade (U mL ⁻¹)	Atividade Predita* (U mL ⁻¹)
	pH	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)			
1	-1	-1	4,0	35	49,24	4,81	4,67
2	-1	+1	4,0	65	92,75	9,06	8,63
3	+1	-1	7,0	35	29,42	2,87	5,06
4	+1	+1	7,0	65	44,16	4,31	3,98
5	-1,41	0	7,0	55	59,01	5,77	6,5
6	+1,41	0	3,0	55	65,73	6,42	7,54
7	0	-1,41	8,0	25	15,61	1,53	0,67
8	0	+1,14	5,5	75	38,65	3,78	4,22
9	0	0	5,5	55	90,17	8,81	8,65
10	0	0	5,5	55	91,91	8,98	8,65
11	0	0	5,5	55	92,20	9,01	8,65

*Atividade predita utilizando a equação de segundo grau ajustada ao modelo ($R^2=0,88$).

A análise de variância dos resultados obtidos no estudo de atividade de lacase sob diferentes pH e temperaturas (Anexo I – Tabela 5) apresentou ajuste para o modelo fatorial (R^2) de 0,898 sendo que somente termos quadráticos de pH não influenciou significativamente na atividade da lacase ($p > 0,05$).

A partir da análise da regressão (Anexo I – Tabela 6) para atividade de lacase em relação a temperatura e pH, foi possível definir o modelo polinomial de segunda ordem. O coeficiente de correlação de 0,89 demonstrou que 89% total da resposta foi explicada pelo modelo. Os valores preditos de atividade de lacase (Tabela 2) foram calculados pelo equação 2 (Anexo I). Os coeficientes de regressão (Anexo I – Tabela 6) temperatura quadráticos e lineares foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os termos de pH não foram estatisticamente significativos.

O gráfico de superfície de resposta relacionando pH e temperatura (Figura 2) com resposta em atividade relativa (%) de lacase permitiu observar que somente a temperatura influencia na atividade de lacase, não havendo influencia do pH sobre a

atividade. Temperaturas abaixo de 20° C e acima de 80° C diminuem a atividade da enzima.

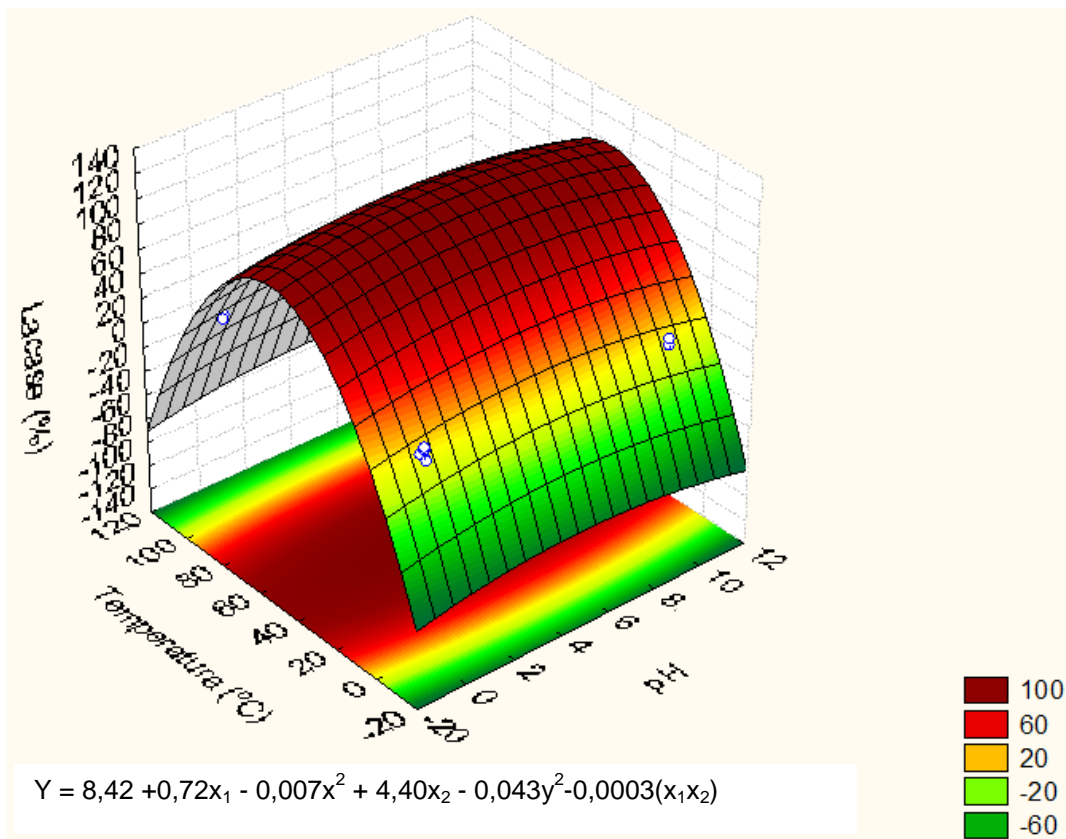


Figura 2- . Superfície de resposta representando os efeitos de interação de pH e temperatura sobre a atividade de lacase produzida por *Pleurotus ostreatus*.

Caracterizações de lacases produzidas por diferentes espécies de microrganismos já foram realizadas e o pH ótimo de lacases é dependente do substrato. O pH ótimo pode variar de 3 a 7, para as lacases de fungos e até 9 para as lacases de plantas. O ABTS foi utilizado como substrato e o pH de atividade variou de 3,0 à 5,0 (Heinzkill et al. 1998). A variação de pH pode ser atribuída a alterações na reação causada pelo substrato e pelo oxigênio (XU, 1997).

O pH ótimo das lacases produzidas por *P. sajor-caju* P32-1, *P. sapidus* e *P. ostreatus* 10969 foi de 3,3 a 5,0; 3,5; 4,0 (Soden et al.,2011; Murugesan et al.,2006; Linke et al., 2005; Liu et al.,2009). Em experimentos realizados com outra espécie de basidiomicetos, lacases de *Trametes versicolor* apresentaram maior atividade em pH 3,0 (Rancaño et al., 2003).

Outros estudos demonstram que as lacases de outros fungos mesófilos apresentam valores de pH e temperatura ótimos de 3,0 a 6,0 e 50 a 70°C (More et al., 2011; Lomascolo et al., 2011; Atalla et al., 2013). Lacases com atividade em

condições muito ácidas, como a de *Polyporus sanguineus* MUCL 41582, apresentou uma atividade máxima em pH 2,5 (Lomascolo et al., 2011). A temperatura ideal de atividade pode ser muito diferente de uma cepa para outra. A lacase isolada a partir de *Ganoderma lucidum* mostrou temperatura ótima de 20 - 25 °C e verificou-se ser estável entre 10 - 50 °C por 4 horas (Ko et al., 2001).

Estabilidade térmica da lacase da lacase

A estabilidade térmica da lacase foi testada em 30 °C, 50 °C e 70 °C, por até 240 minutos (Anexo I - Figura 2). Com incubação em 30 °C obteve-se total atividade durante 20 minutos, após esse tempo a enzima perdeu aproximadamente 20% de sua atividade e foi perdendo atividade gradativamente até 240 minutos, tempo no qual ocorreu sua inativação.

Em 50 °C a enzima perdeu 60% de sua atividade em 5 minutos de incubação e após 20 minutos não apresentou atividades expressivas. Em 70 °C a enzima perdeu 90% de atividade em 5 minutos, e após 15 minutos não apresentou atividades expressivas, sendo esta temperatura mais agressiva, levando a inativação total em poucos minutos. Lacases isoladas a partir de *Marasmius quercophilus* (Farnet et al., 2000) foram consideradas estáveis por 1 hora a 60 °C. Farnet et al. (2000) verificaram ainda que a pré-incubação das enzimas a 40 °C e 50 °C aumentou a atividade de lacase em 3 vezes.

Em testes de estabilidade térmica foi observada estabilidade das lacases de *Pleurotus sajor-caju* em temperaturas de 30 e 40 °C por apenas 1 hora, sendo que, a 50, 60 e 70 °C em pH 5,0, a atividade enzimática diminuiu pela metade muito rapidamente (Murugesan et al., 2006). Em estudos realizados com *P. ostreatus* 10969, Liu et al. (2009) observaram estabilidade da enzima 30, 40 e 50 °C durante uma hora, com diminuição de 60% de atividade a 60 °C logo após 10 minutos de incubação. Entretanto, lacases de *Trametes versicolor* mostraram elevada estabilidade a 30, 40 e 50 °C por mais de 200 horas e diminuição de 60% atividade somente a 60 °C em pH 4,5 (RANCAÑO et al., 2003).

A lacase produzida por *P. ostreatus* apresentou estabilidade a congelamento e descongelamento sucessivos (Anexo I – Figura 4), com atividade residual de 100% por 3 ciclos. A partir do 4º ciclo foi perdendo 10% de atividade até o 6º ciclo. No

sétimo descongelamento (ciclo) perdeu 75% de atividade. No 9º descongelamento perdeu-se atividade de aproximadamente 100%, sendo a atividade de 0,1 U mL⁻¹.

Determinação da constante de Michaelis Menten (K_m)

A constante de Michaelis Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) em condições ótimas de temperatura (55° C) e pH (5,5) para lacase de *P. ostreatus* utilizando o substrato 2,6-Dimetoxifenol (DMP) foi de 2,71 mM e Vmax de 12,64 U mL⁻¹ (Anexo I - figura 3).

O K_m para DMP obtido foi superior comparado com a literatura. Utilizando DMP em pH 3,5, Slomczynski et al. (1995) obtiveram K_m de 0.1 mM para lacase de *Botrytis cinerea*. Bollag; Leonowicz (1984) também utilizando o substrato DMP obtiveram o K_m 0,26 para lacase de *Rhizoctonia praticola* em pH 6,8.

Liu et al. (2009) analisaram lacase *P. ostreatus* 10969 e observaram K_m de 0,31 mM e velocidade máxima de 303,25 mM min⁻¹. Robles et al. (2002) ao caracterizarem lacases de *Chalara paradoxa* obtveram K_m de 3,40 em pH 6,5 para o substrato siringaldazina. Rehman; Thurston (1992) obtiveram K_m de 1,7 mM ao substrato p-fenilenediamina em pH 3,5 ao caracterizar lacase de *Armillaria mellea*.

Min et al. (2001), utilizando lacases de *Phellinus ribis*, mostraram baixa afinidade das enzimas por ABTS, visto que a oxidação foi mais lenta em relação ao 2,6-dimetoxifenol (DMP).

CONCLUSÃO

O *Pleurotus ostreatus* se desenvolveu em casca de arroz e substratos de soja; produzindo a enzima lacase nestes substratos. A casca de arroz como substrato propiciou maior produção de lacase. O melhor tempo de cultivo foi de 20 dias.

A suplementação da casca de arroz foi um fator de influência na produção de lacase por *P. ostreatus*. Dentre as suplementações avaliadas, a combinação de glicose, extrato de levedura e CuSO₄ propiciou maior produção, e a metodologia estatística de superfície de resposta revelou que quanto maior a concentração de extrato de levedura e CuSO₄ no meio, maior foi a produção de lacase. Não foi

possível otimizar a produção da lacase, pois as concentrações utilizadas no delineamento não atingiram a região ótima de produção.

A enzima manteve atividade em uma ampla faixa de pH. A atividade em ampla faixa de pH permite que esta lacase seja utilizada em processos industriais onde o pH do meio tenha grande variação. A temperatura foi um fator significativo ($p < 0,05$), sendo este fator o que influencia na atividade desta lacase.

A lacase produzida não foi estável a altas temperaturas, sendo inviável a aplicação desta em processos industriais submetidos a altas temperaturas.

O valor de K_m ao substrato DMP foi maior que valores estudados por outros autores.

Agradecimentos: À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela auxílio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS

- Anderson, S.; Merrill, J.; Klopfenstein, T. (1988) Soybean hulls as an energy supplement for the grazing ruminant. **Journal of Animal Science, Champaign**. 66:2959-2964.
- Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties. (2006). **FEMS Microbiol Letters**. 30:215-242.
- Bollag, J. M., and Leonowicz, A. (1984). Comparative studies of extracellular fungal Laccases. **Applied and Environmental Microbiology** 48(4): 849-854.
- Box, G.E.P.; Behnken, D.W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**. 2:455-475.
- Bradford, M.M. (1976). A dye binding assay for protein. **Anal. Biochem**. 72: 248-254.
- Breen, A.; Singleton, F.L. (1999). Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Curr. Opin. Biotechnol**. 10: 252-258.
- Collins, P. J. And Dobson, A. D. W. (1997), Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3444-345
- Couto, S.R.; Toca-Herrera, J.L. (2007). Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnol. Adv**. 25: 558-569.
- D'agostini, E.; Mantovani, T.; Vale, J.; Meirelles, L.; Colauto, N.; Linde, G. (2011). Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**. 68:295-300.
- Dhawan, S.; Lal, R.; Hanspal, M.; Kuhad, R.C. (2005). Effect of antibiotics on growth and laccase production from *Cyathus bulleri* and *Pycnoporus cinnabarinus*. **Bioresour. Technol**. 96: 1415-1418.
- Dubois, M.; et al. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. 28:350–356.
- Economou, C. N.; Aggelis, G.; Pavlou, S.; Vayenas, d. V. (2011). Single cell oil production from rice hulls hydrolysate. **Bioresource Technology**. 102: 9737-9742.
- Farnet, A.M.; Criquet, S.; Tagger, S.; Gil, G.; Le Petit, J. (2000). Purification, partial characterization and reactivity with aromatic compound of two laccase from *Marasmius quercophilus* strain 17. **Can. J. Microbiol**. 46: 189-194
- Gregori, A. The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production . **New Biotechnology**, V. 00, N. 00, 2008.
- Ko, E. M., Leem, Y. E., and Choi, H. T. (2001). Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 57:98-102.

- Linke, D.; Bouws, H.; Peters, T.; Nimtz, M.; Berger, R.G.; Zorn, H. (2005). Laccases of *Pleurotus sapidus*: Characterization and cloning. **J. Agric. Food Chem.** 53: 9498-9505.
- Liu, L.; Lin, Z.; Zheng, T.; Lin, L.; Zheng, C.; Lin, Z.; Wang, S.; Wang, Z. (2009). Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. **Enzyme Microb. Technol.** 44: 426-433.
- Lomascolo, A.; Uzan-Boukhris, E.; Herpoël-Gimbert, I.; Sigoillot, J.; Lesage-Meessen, C. (2011). Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. **Appl. Microbiol Biotechnol.** 92:1129–1149.
- Majeau, J.A.; Brar, S.K.; Tyagi, R.D. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresour. Technol.** 101: 2331-2350.
- Mansur, M.; Arias, M. E.; Flärdh, M. (2003) The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. **Mycologia, Stanford.** 95(6):1013-1020.
- Min, K.L.; Kim, Y.H.; Kim, Y.W.; Jung, H.S.; Hah, Y.C. (2001). Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. **Arch. Biochem. Biophys.** 392:279-286.
- Munari, F.M.; Gaio, T.A.; Dillon, A.J.P. (2007). Phenol degradation and colour removal in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju* with paper mill effluents. **Biocatal. Biotransform.** 25: 24-28.
- Murugesan, K.; Arulmani, M.; Nam, I.-H.; Kim, Y.-M.; Chang, Y.-S.; Kalaichelvan, P.T. (2006). 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. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72: 939-946.
- Nelson, D. H. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi's method for the determination of the glucose.. **Biol. Chem.** 153 :373-380.
- Okamoto, K.; Yanagi, S. O.; Sakai, T. (2000) Purification and characterization of extracellular laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Mycoscience.** 41(1):7-13.
- Rancaño, G.; Lorenzo, M.; Morales, N.; Couto, S.R.; Sanromán, M.A. (2003). Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. **Process Biochem.** 39: 467-473.
- Robles, A., Lucas, R., Magdalena, M. C., Omar, N. B., Perez, R., and Galvez, A. (2002). Characterization of laccase activity produced by hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. **Enzyme and Microbial Technology.** 31:516-522.
- Saha, B. ;Cotta, M. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy.** (2008). 32: 971-977.

Sarnthima, R.; Khammuang, S. (2008) Laccase isozymes of *Pleurotus sajor-caju* culture on husk and bran of black sticky rice and their potential on indigo carmine decolourisation. **African Journal of Biotechnology**. 7:3731-3736.

Slomczynski, D., Nakas, J. P., and Tanenbaum, S. W. (1995). Production and characterization of laccase from *Botrytis cinera* 61-34. **Applied and Environmental Microbiology** 61(3), 907-912.

Soden, D.M.; Dobson, A.D.W. (2011). Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiol.**147:1755-1763.

Somogyi, M. (1945) A new reagent for determination of sugars. **J. Biol. Chem.**160:61-68.

Stajic, M.; Persky, L.; Friesem, D.; Hadar, Y.; Wasser, S.P.; Nevo, E.; Vukojevic, J. (2006). Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleutorus* species. **Enzyme Microb. Technol.** 38: 65-73.

Stevens, J.; Mcginnis, J.(1947) .The effect of autoclaving lysine in the presence of carbohydrate on its utilization by the chick. **Scientific Paper**, 732: 70 – 75.

Suxia, R.; Haiyan, X.; Jinling, Z.; Shunqing, L.; Xiaofeng, H.; Tingzhou, L. (2012) Furfural production from rice husk using sulfuric acid and a solid acid catalyst through a two-stage process. **Carbohydrate Research**. 359:1-6.]

Tavares, A. (2006) **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira**. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia química) – Universidade de Aveiro, Aveiro. 2006

Vogel, H. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**. 13:42-53.

Xu, F. (1997). Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. **J. Biol. Chem.** 272: 924-928.

Yaropolov, A. I., Skorobogat'ko, O. V., Vartanov, S. S. & Varfolomeyev, S. D. (1994) Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. **ApplBiochem Biotechnol**. 49:257-280.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O *Pleurotus ostreatus* demonstrou ser um bom produtor de lacase quando cultivado em fermentação em estado sólido em casca de arroz. As suplementações do meio mínimo de Vogel evidenciaram aumentar a produção desta enzima. Outros cultivos de diferentes concentrações dos suplementos utilizados neste trabalho, em um delineamento estatístico, são necessários serem realizados, para que a região ótima de produção seja alcançada. Assim como a avaliação de outras suplementações.

O efeito de outros substratos durante a reação enzimática é necessário ser investigado para se obter um K_m menor e revelar maior afinidade ao substrato. Assim como outras caracterizações bioquímicas como efeito de diferentes compostos na inibição da atividade enzimática, estimativa do peso molecular e estabilidade a diferentes pH, são necessárias serem estudadas.

Processos de purificação e aplicação desta lacase em algum processo industrial, como por exemplo, o de biorremediação, em que não se utilize altas temperaturas, são necessários para que a enzima produzida seja avaliada propriamente no local de interesse.

ANEXO I

Tabelas e figuras contendo resultados

Tabela 1 - Produção de lacase por *P. ostreatus* em fermentação em estado sólido com substratos umedecidos com meio mínimo de Vogel a 28 °C ± 2 °C por 7 dias.

Condição	Lacase (U mL ⁻¹)	Açúcares Totais Solúveis (mg mL ⁻¹)	Açúcares Redutores (mg mL ⁻¹)	Proteínas Totais Solúveis (mg mL ⁻¹)	pH
Farinha Integral de Soja (FIS)	0,71±0,13 ^A C*=0, C.V**= 0,18	3,85±0,28 C=2,51 C.V=0,07	1,33±0,06 C=0,70 C.V=0,05	1,86±0,33 C=1,33 C.V=0,18	6,8 C=6,1
Farelo de Soja (FS)	0,13±0,01 ^A C=0 C.V=0,11	4,82±0,20 C=2,94 C.V=0,04	1,86±0,18 C=0,73 C.V=0,10	2,19±0,09 C=1,72 C.V=0,05	6,3 C=6,6
Okara (OK)	0,14±0,02 ^A C=0 C.V=0,12	4,71±0,16 C=1,70 C.V=0,3	2,51±0,80 C=1,10 C.V=0,32	1,52±0,09 C=0,48 C.V=0,06	6,2 C=6,1
Casca de Soja (CS)	0,51±0 ^A C=0 C.V=0,21	1,73±0,12 C=1,10 C.V=0,07	1,62±0,04 C=0,57 C.V=0,02	0,94±0,06 C=0,44 C.V=0,06	5,9 C=5,6
Casca de Arroz (CA)	2,22±0,12 ^B C=0 C.V=0,05	0,72±0,17 C=0,05 C.V=0,45	0,37±0,11 C=0,62 C.V=0,16	0,34±0,05 C=0,37 C.V=0,15	6,0 C=6,1
SI + C.A	1,37±0,21 ^C C=0 C.V=0,16	2,18±0,27 C=2,70 C.V=0,12	1,75±0,13 C=0,79 C.V=0,07	1,23±0,04 C=1,15 C.V=0,03	6,3 C=6,0
FS + C.A	1,18±0,06 ^C C=0 C.V=0,05	2,78±0,08 C=4,15 C.V=0,03	2,08±0,26 C=0,59 C.V=0,13	1,84±0,09 C=1,59 C.V=0,06	6,2 C=6,1
OK + C.A	1,26±0,09 ^C C=0 C.V=0,07	4,81±0,42 C=4,11 C.V=0,09	2,58±0,33 C=0,85 C.V=0,13	0,95±0,14 C=0,42 DC.V=0,14	5,9 C=5,9
CS + CA	2,37±0,01 ^B C=0,1 C.V=0,01	1,18±0,27 C=1,95 C.V=0,23	1,04±0,04 C=0,84 C.V=0,03	0,75±0,05 C=0,50 C.V=0,06	6,8 C=5,8

*C: controle de cultivo **C.V: Coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 2 – Produção de Lacase por *P. ostreatus*, em fermentação em estado sólido, utilizando casca de arroz suplementada como substrato a 28 °C ± 2 °C por 7 dias.

Condição	Lacase (U mL ⁻¹)	Açúcares Totais Solúveis (mg mL ⁻¹)	Açúcares Redutores (mg mL ⁻¹)	Proteínas Totais Solúveis (mg mL ⁻¹)	pH
A* + MMV	2,67±0,42 ^A C***=0 C.V****=0,16	1,84±0,68 C=1,95 C.V=0,37	1,33±0,04 C=1,02 C.V=0,03	0,09±0,02 C=0 C.V=0,22	5,64 C=5,83
A + MMV + glicose 1%	2,14±0,38 ^A C=0 C.V=0,18	1,73±0,15 C=1,76 C.V=0,08	1,39±0,20 C=1,26 C.V=0,15	0,09±0,04 C=0 C.V=0,42	5,60 C=5,78
A + MMV + glicose 1% + EL 4%	2,25±0,18 ^A C=0 C.V=0,08 ^A	6,99±0,39 C=9,76 C.V=0,06	3,39±0,23 C=5,03 C.V=0,07	0,73±0,09 C=0,08 C.V=0,13	6,63 C=5,9
A + MMV + glicose 1% + EL 4 + CuSO ₄ 150 µM	3,06±0,27 ^B C=0 C.V=0,09	9,31±0,61 C=9,87 C.V=0,07	2,58±0,08 C=5,01 C.V=0,03	0,65±0,04 C=0,12 C.V=0,06	6,60 C=5,8
B** + MMV	2,00±0,24 ^A C=0 C.V=0,12	2,61±0,73 C=3,45 C.V=0,28	1,57±0,18 C=1,09 C.V=0,11	0,19±0,02 C=0,04 C.V=0,1	5,6 C=5,8
B + MMV + glicose 1% + EL 4 + CuSO ₄ 150 µM	4,00±0,45 ^C C=0 C.V=0,11	7,80±0,90 C=8,6 C.V=0,11	3,78±0,34 C=4,88 C.V=0,09	0,74±0,06 C=0,12 C.V=0,08	6,6 C=5,9

*A (1,5 g de casca de arroz + 7 mL de Meio mínimo de Vogel); **B (3,75 g de casca de arroz + 11,5 mL de meio mínimo de Vogel). ***C: controle de cultivo; ****C.V: coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Figura 1 – Efeito do tempo na produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* em FES com casca de arroz suplementada como substrato

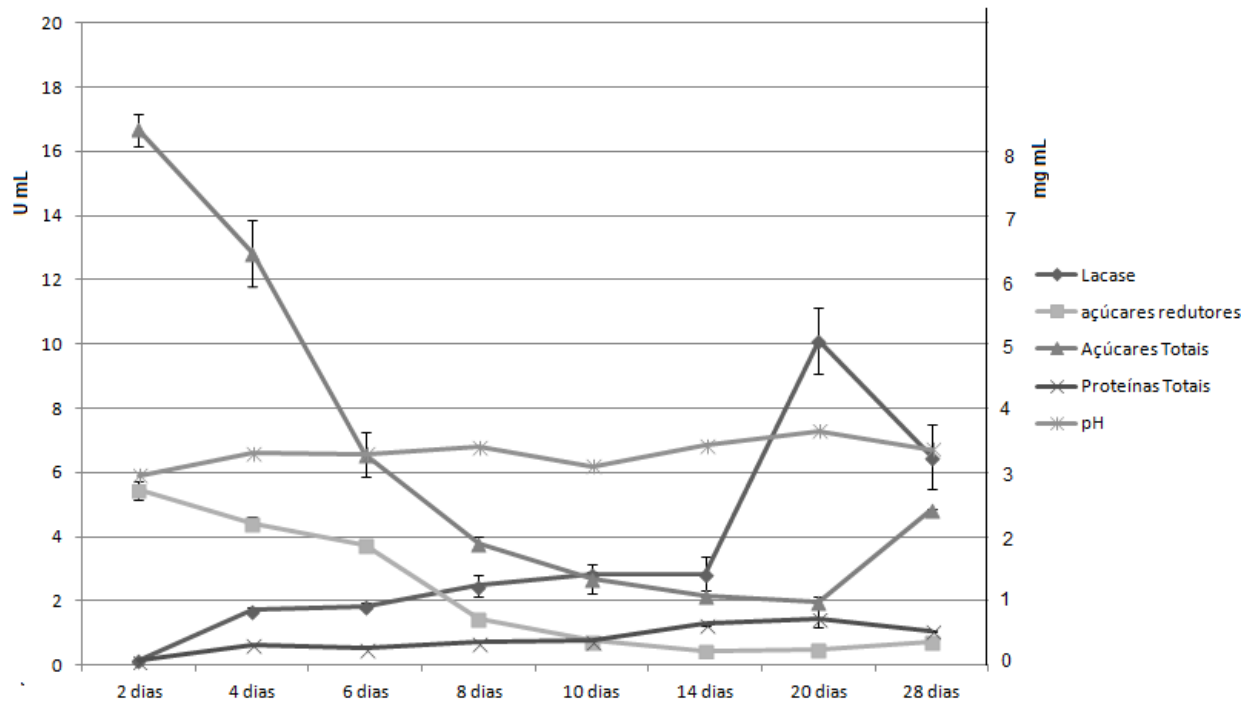


Tabela 3 - Análise de variância para a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* em resposta à variação na concentração de componentes da solução umedecedora da casca de arroz após 20 dias de cultivo em 28° C.

Fator	SQ ¹	GL ²	MQ ³	p-valor	Fcalc ⁴	Ftab ⁵
(x₁)Glicose* (L+Q)	4,0561	2	2,02803	0,000008	699,32	6,59
(x₂)Extrato de Levedura * (L+Q)	118,38	2	59,19332	0,000000	20411,49	6,59
(x₃)CuSO₄* (L+Q)	5,30	2	2,65381	0,000005	915,11	6,59
x₁ . x₂*	0,48	1	0,48025	0,000210	165,60	
x ₁ . x ₃	0,010	1	0,01071	0,126987	3,69	
x₂ . x₃*	1,288	1	1,28823	0,000030	444,22	
Falta de Ajuste*	18,99	3	6,33085	0,000001	2183,05	
Erro	0,0116	4	0,00290			
Total	148,653	16				
	6					

¹SQ = soma quadrática; ²GL = graus de liberdade; ³MQ = média quadrática; ⁴Fcalc. = distribuição F de Snedecor calculado; ⁵Ftab= = distribuição F de Snedecor tabulado; R² = 0,872; *Significativo com nível de significância de 95% (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 4 - Coeficiente de regressão para a atividade lacásica concentração de glicose, extrato de levedura e CuSO₄

Fatores	Coefficiente	p
Intercepto*	0,810000	0,000005
(A)Glicose *(L)	0,271875	0,000140
Glicose* (Q)	-0,907125	0,000004
(B)Extrato de Levedura* (L)	2,948250	0,000000
(B)Extrato de Levedura* (Q)	3,406125	0,000000
(C)CuSO ₄ *(L)	0,281875	0,000121
CuSO ₄ *(Q)	1,053375	0,000002
A*B*	-0,346500	0,000210
A*C	-0,051750	0,126987
B*C*	0,567500	0,000030

*Valores estatisticamente significativo (p<0,05)

Equação 1:

$$Y = 0,81 + 2,95x_2 + 3,41x_2^2 + 0,28 x_3 + 1,05x_3^2 - 0,35(x_1x_2) - 0,052(x_1x_3) + 0,5675(x_2 \cdot x_3) + x_1$$

(Y é a atividade enzimática (U mL⁻¹), x₁, x₂ e x₃ são as variáveis concentração de glicose, extrato de levedura e concentração de CuSO₄)

Tabela 5 - ANOVA para a atividade de lacase em resposta a temperatura e pH

Fator	SQ ¹	GL ²	MQ ³	F _{calc} ⁴	F _{tab} ⁵	p
(1)pH (L)*	6,46108	1	6,46108	48,4217	0,3362	*0,020033
pH (Q)	1,51486	1	1,51486	11,3529		0,077926
(2)Temperatura (L)*	14,16735	1	14,16735	106,1755		*0,009287
Temperatura (Q)*	53,76595	1	53,76595	402,9425		*0,002473
1 * 2*	5,00130	1	5,00130	37,4816		*0,025657
Falta de Ajuste	6,75504	3	2,25168			0,056462
Erro	0,26687	2				
Total	69,47860	10				

¹SQ = soma quadrática; ²GL = graus de liberdade; ³MQ = média quadrática; ⁴F_{calc}. = distribuição F de Snedecor calculado; ⁵F_{tab}= = distribuição F de Snedecor tabulado; R² = 0,898 *Significativo com nível de significância de 95% (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 6 - Coeficiente de regressão para a atividade de lacase frente pH e temperatura.

Fatores	Coeficiente	p
Intercepto	8,423795	0,000609
pH (L)	0,726363	0,080345
pH (Q)	-0,007308	0,077926
T°(L)	4,403121	*0,002472
T°(Q)	-0,043540	*0,002473
pH . T°	-0,000342	0,025657

*Valores estatisticamente significativo (p<0,05)

Equação 2:

$$Y = 8,42 + 0,72x_1 - 0,007x_2^2 + 4,40x_2 - 0,043y^2 - 0,0003(x_1x_2)$$

(Y é a atividade enzimática (U mL⁻¹), x₁ e x₂ são as variáveis pH e temperatura).

Figura 2 – Estabilidade térmica de lacase de *Pleurotus ostreatus* em diferentes temperaturas

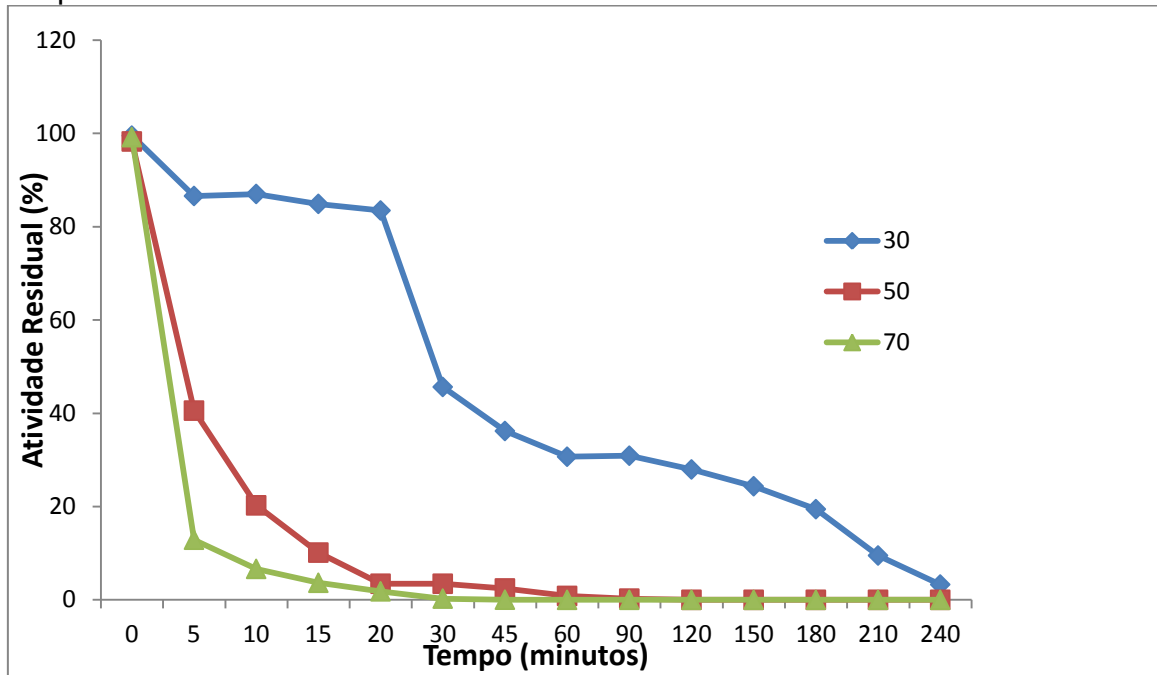


Figura 3 – Efeito da concentração de DMP na atividade de lacase de *P. ostreatus* cultivado em casca de arroz sob fermentação em estado sólido

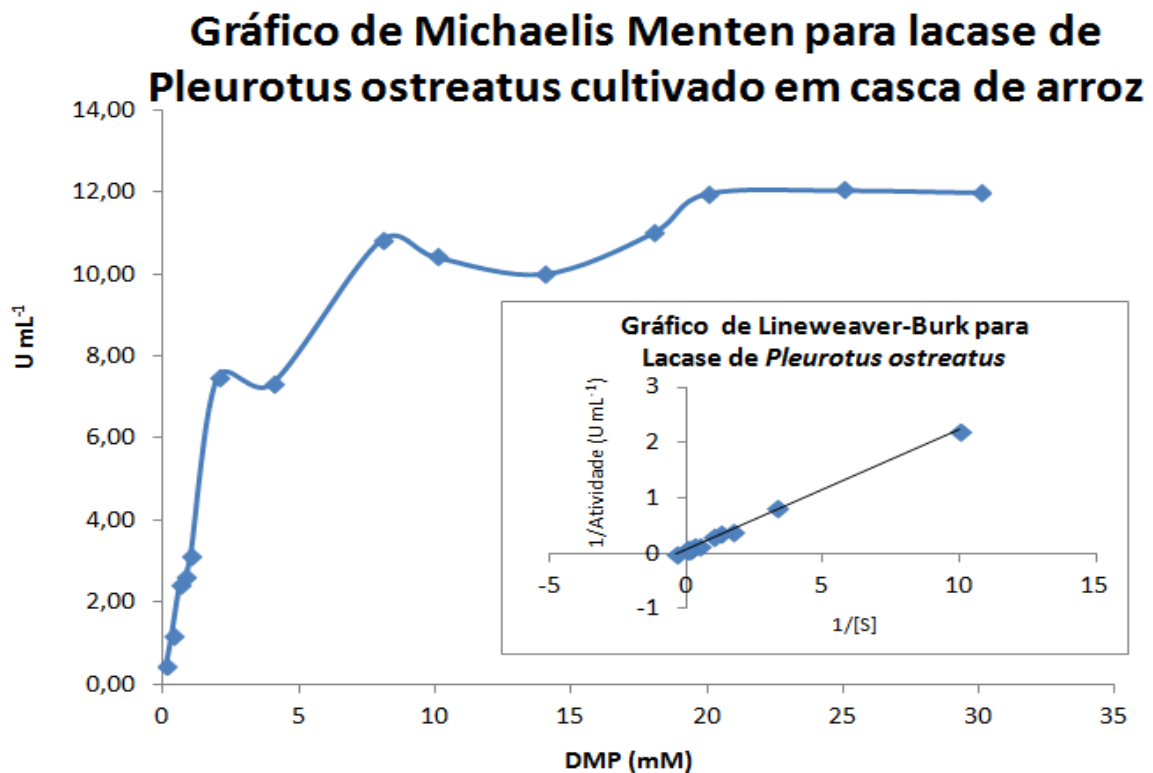
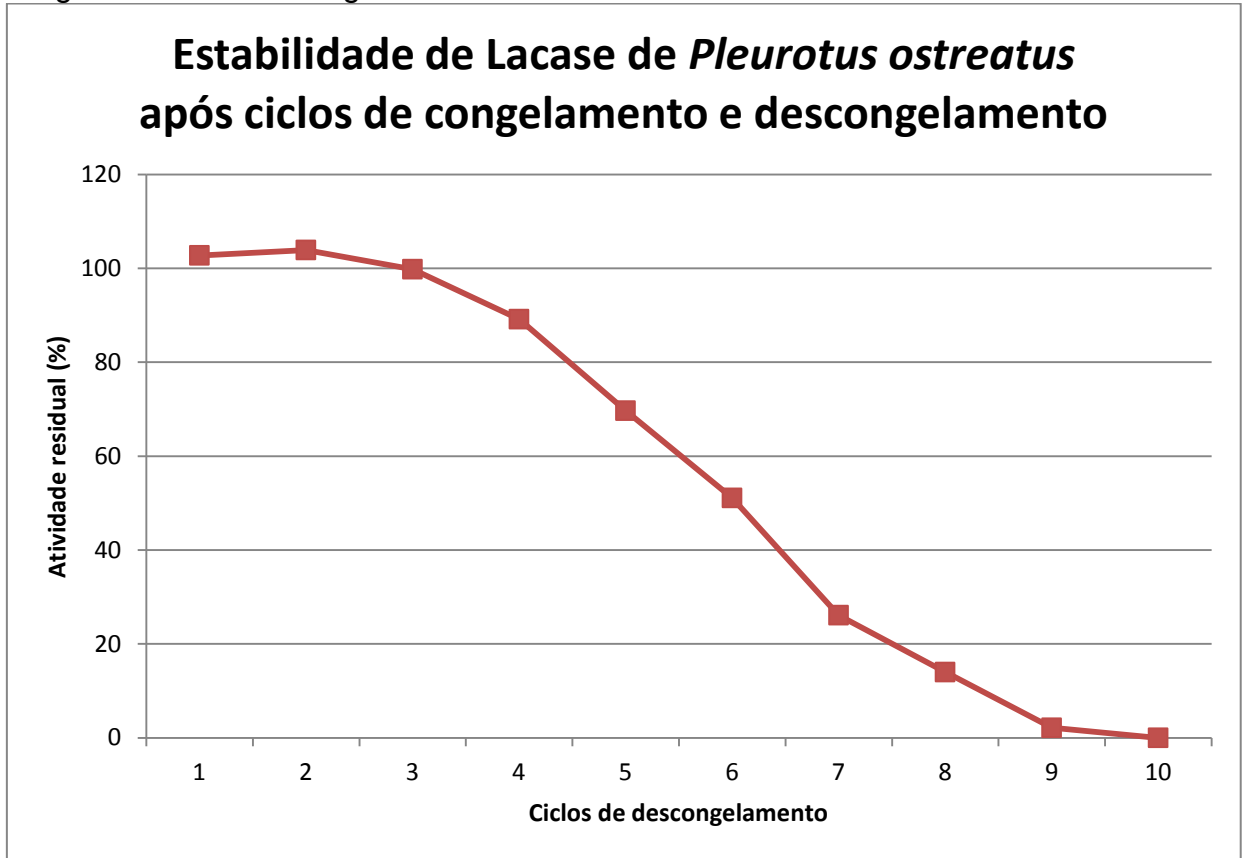


Figura 4 – Estabilidade de lacase de *Pleurotus ostreatus* após ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos.



ANEXO II

Normas para submissão do artigo A na revista *Brazilian Journal of Microbiology*

Escopo da revista

A partir do dia 01/01/2015 o *Brazilian Journal of Microbiology* (BJM) aceitará manuscritos que versem sobre genoma de microrganismo sequenciado recentemente. Eles serão publicados na seção "Genome Announcement". O objetivo desta seção é permitir que autores do sequenciamento informem aos leitores do BJM sobre um genoma que está disponível e qual seria o interesse para a comunidade científica. O publicação não impedirá a futura publicação de um artigo científico completo no BJM ou em outra revista.

Escopo da seção "Genome Announcement" no BJM:

- Os autores da publicação deverão ser os mesmos ou na sua maioria dos contidos no depósito da sequência do genoma;
- A sequência do genoma deve estar disponível para o público no DDBJ / EMBL / NCBI dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), no momento do envio do manuscrito para o BJM. O número de acesso válido no GenBank para o genoma, deve ser claramente indicado no manuscrito;
- As sequências completas de plasmídeos circulares serão aceitas sem lacunas;
- As sequências de nucleotídeos que se refere o "announcement", deve cobrir pelo menos 95% do tamanho do genoma esperado para o organismo;
- Serão considerados para publicação depósitos completos feitos no GenBank e gapped cromossomos (scaffolded) do genoma. Para tais depósitos é preferível ter uma anotação funcional.
- O manuscrito enviado para a seção "Genome Announcement" deve conter no máximo 500 palavras no corpo do texto e um resumo de 150 palavras;
- Os autores devem indicar claramente a origem da cepa microbiana, a importância de ter sequenciado o genoma e os benefícios que o campo da microbiologia.
- O texto deve conter a metodologia utilizada no sequenciamento, incluindo o número e tamanho das leituras geradas, métodos de montagem utilizado, as medidas tomadas para gerar os scaffolds e para fechar o genoma, quando aplicável. Além disso, informar quais métodos serão utilizados para anotação e curadoria se for o caso.

A revista *Brazilian Journal of Microbiology*, editada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, publica artigos originais, e trabalhos de revisão que cobrem todos os

aspectos da Microbiologia. Não são cobradas taxas para publicação de artigos.

As seguintes categorias de artigos são aceitas para publicação no *Brazilian Journal of Microbiology*:

- **Artigos Originais:** reportam resultados científicos originais que ainda não tenham sido publicados em outro periódico;
- **Artigos de Revisão:** abordam temas ligados à microbiologia em geral e de amplo interesse da área.

Seu manuscrito deve ser escrito em inglês **claro e compreensível**.

Se você tiver dúvidas sobre o nível de inglês do seu texto, você pode optar por ter o seu manuscrito editado profissionalmente por um nativo da língua inglesa ou por um serviço de editoração científica **antes da submissão** do seu manuscrito. Todos os serviços devem ser organizados e pagos pelo autor, e o uso de um desses serviços não garante a aceitação ou preferência para publicação do manuscrito. No caso de o autor ser um nativo da língua inglesa, por favor, substituir o certificado de Inglês por uma carta de justificativa.

É um prazer aceitar o seu trabalho para ser publicado na Revista Brasileira de Microbiologia. No entanto, só será publicada uma vez revisada a versão final do texto em Inglês. Por favor, envie o texto revisado e o certificado emitido pelo "American Journal Experts".

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>

SEÇÕES

Microbiologia Industrial: Fermentação Bacteriana

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por bactérias.
- Aspectos moleculares de biotecnologia bacteriana.

Fermentação Fúngica

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por fungos.
- Aspectos moleculares de biotecnologia fúngica.

**Microbiologia de Alimentos:
Tecnologia de Alimentos**

- Aplicações de microrganismos (bactérias e fungos) na produção de alimentos.

Segurança e Qualidade dos alimentos

- Doenças de origem alimentar.
- Deterioração de alimentos.
- Ecologia microbiana em alimentos.

**Microbiologia Médica:
Patogênese Bacteriana**

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese bacteriana.

Patogenicidade de Fungos

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese fúngica.

**Microbiologia Clínica:
Bacteriologia**

- Estudos sobre bactérias de importância médica.

Micologia

- Estudos sobre fungos de importância médica.

Virulogia

- Estudos sobre vírus de importância médica.

**Microbiologia Ambiental:
Ecologia Microbiana**

- Ecologia de grupos microbianos naturais; diversidade microbiana de ambientes naturais, como água, solo, sedimentos e organismos superiores.
- Interações microbianas.

Biotechnologia

- Aspectos ambientais de saúde pública.
- Biodegradação.
- Biorremediação.
- Considerações ambientais para microrganismos geneticamente modificados.

Fisiologia de Fungos

- Bioquímica de fungos, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

Fisiologia de Bactérias

- Bioquímica de bactérias, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

Genética e Biologia Molecular de Fungos

- Genética de fungos, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Genética e Biologia Molecular de Bactérias

- Genética de bactérias, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Genética e Biologia Molecular de Vírus

- Genética de vírus, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

Microbiologia Veterinária

- Doenças de animais
- Controle e/ou tratamento de animais
- Diagnóstico de patógenos de animais
- Patógenos veterinários ou zoonóticos

Ensino de Microbiologia

- Estratégias de ensino em microbiologia
- Novas ferramentas de ensino em microbiologia

Submissão de um artigo

Um artigo para ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* não deve ter sido previamente publicado (exceto na forma de resumo) nem ter sido submetido em qualquer outro periódico.

As instruções para submissão *online* estão disponíveis neste site.

Todos os autores serão informados por mensagem eletrônica a respeito da submissão eletrônica. A mensagem também questionará se todos os autores concordam com a submissão. Ausência de resposta será considerada como concordância à submissão.

A responsabilidade pela exatidão do conteúdo do manuscrito é de inteira responsabilidade dos autores.

Publicação do artigo

Os artigos são aceitos para publicação após terem sido revisados de forma crítica por pelo menos dois revisores, indicados pelos editores.

As sugestões e recomendações dos revisores e editores serão encaminhadas eletronicamente ao autor para correspondência, o qual deverá retornar o artigo revisado aos editores na data estipulada, pelo sistema *online*. O autor para correspondência deverá explicar ou comentar as alterações introduzidas no texto.

O autor para correspondência receberá uma mensagem eletrônica sempre que houver alteração do *status* do artigo.

Não é necessário ser associado da Sociedade Brasileira de Microbiologia para submeter artigo para publicação.

Todos os cientistas, brasileiros ou estrangeiros, são convidados a submeterem artigos para publicação.

ÉTICA

O(s) autor(es) devem informar, no texto do artigo, se o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de sua Instituição, em consoante à Declaração de Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>). Nos trabalhos experimentais que envolvem animais, as normas estabelecidas no "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (*Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996*), e os "*Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio*

Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20eticos>) devem ser respeitados.

Preparo do artigo

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Título resumido
- Resumo (200 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

Artigos Originais e Artigos de revisão deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências tabelas e figuras.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Comission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections*). As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

SUGESTÕES DE REVISORES

Os autores poderão enviar sugestões de revisores para avaliação dos artigos. Deverão

constar as seguintes informações: nome; e.mail e Instituição de Origem.

USO DE EXTRATOS DE PLANTAS EM EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

Artigos que apresentarem estudos com extratos de plantas, ou extratos de outras substâncias complexas, serão aceitos apenas após identificação dos compostos.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: joroberts@uol.com.br
- ATO Traduções: www.atotraining.com.br
- Prof. Julian D. Gross, University of Oxford, Oxford Biomedical Editors: julian.gross@pharm.ox.ac.uk
- BioMed Proofreading LLC: <http://www.biomedproofreading.com>

ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos

experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser redigidas em ordem alfabética e começar pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As citações no texto devem ser escritas pelo último nome do primeiro autor, seguido pelo ano de publicação. Como exemplo, tem-se: "... while Silva and Pereira (1987) observed that resistance depended on soil density" ou "It was observed that resistance depended on soil density (Silva and Pereira, 1987)." Para a citação de dois ou mais artigos do mesmo autor, liste em ordem cronológica sendo que os anos devem ser separados por vírgula (exemplo: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000; Hene 2010; Padonou et al., 2012). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o *BIOSIS*. Todas as referências incluídas na lista final devem ter sido citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem aparecer na lista final.

Exemplos:

a. **Artigos de Periódicos**

Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz J Microbiol*37:101-107.

b. **Artigos ou Capítulos de Livro**

Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. *In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.*

c. **Livros**

Montville TJ, Matthews KR (2005) *Food Microbiology - an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

d. **Patentes**

Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. **Teses e Dissertações**

Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. **Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)**

Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. **Publicações na Web**

Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. **Webpage**

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available

at:<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

As citações do tipo "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheçam que, eventualmente, elas possam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista final de referências. As referências que consistem de artigos que foram "aceitos para publicação" ou "no prelo" são aceitáveis. No entanto, as referências dos artigos que são "submetidos" ou "em preparação" não são aceitas.

AGRADECIMENTOS: Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

TABELAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FOTOGRAFIAS: Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

Conflitos de Interesses

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

DIREITOS AUTORAIS

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; bjm@sbmicrobiologia.org.br), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

Transferência de "Direitos Autorais"

"O(s) autor(es) abaixo assinado(s) afirmam que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado anteriormente. O(s) autor(es) confirma(m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s). Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian Journal of Microbiology* e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seus Editores."

Artigo n°. _____

Título do Artigo:

"

"

Nome(s) do(s) Autor(es)

Assinatura(s)

_____	_____
_____	_____
_____	_____

Data: ____/_____/_____