



**Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Micologia  
XIII Curso de Especialização em Micologia**

**Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por  
Fungos Filamentosos**

**RECIFE  
2011**

**NELÂNIA MARIA DE QUEIROZ BAPTISTA**

**Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por  
Fungos Filamentosos**

Monografia apresentada ao XIII curso de Especialização em Micologia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos finais para obtenção do título de Especialista em Micologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>: Angela Coimbra dos Santos**

**Co-Orientadoras: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup>: Norma Buarque de Gusmão**

**Msc. Flávia Virginia Ferreira de Arruda**

**RECIFE-PE**

**2011**

# **Produção das Enzimas Lignina Peroxidase e Lacase por Fungos Filamentosos**

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Monografia defendida pela aluna **Nelânia Maria de Queiroz Baptista** e aprovada pela banca examinadora:

### **1º examinadora e Orientadora**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Coimbra dos Santos  
Departamento de Micologia – CCB – UFPE

---

**Co-Orientadoras: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup>: Norma Buarque de Gusmão e Msc. Flávia Virginia Ferreira de Arruda.**

### **Examinadores:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Laura Mesquita Paiva  
Departamento de Micologia – CCB – UFPE

---

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Neiva Tinti de Oliveira  
Departamento de Micologia – CCB – UFPE

---

E como suplente: Professor Dr: Bruno Severo Gomes

Departamento de Micologia – CCB – UFPE

## AGRADECIMENTOS

Ao meu querido Deus tesouro de minha vida, herança, supremo bem, sem a presença “**Dele**” em minha vida eu não seria capaz de nada.

Aos meus pais que tanto amo e por vocês me solidifico, é minha base em tudo. Obrigada Wilson e Neide (meu pai e minha mãe), que sempre estão ao meu lado e por acreditarem em mim, contribuindo amorosamente, com incentivos e também materialmente, pois, como gasta estudar!!!

Ao meu irmão Túlio por sempre estar do meu lado, pela amizade linda, por Deus ter me presenteado com a sua pessoa em minha vida.

A minha professora Norma Gusmão por ser esse ser humano incrível, por ter me aceito e me orientado, não só como mestre, mas como amiga.

A professora Angela Coimbra dos Santos, exemplo de humildade, também pela orientação, palavras e alegria que transmite a todos que a conhecem.

A minha co-orientadora e amiga do “cora” Flávia Arruda essa pessoa de um caráter grandioso a quem sempre peço conselhos em todos os sentidos, e por ter mais intimidade a de que mais abusava da boa vontade com minhas perguntas.

Ao Curso de Especialização em Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas/Departamento de Micologia, pelos ensinamentos, em especial a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Maria Souza Motta por ter dado estrutura física e profissional para o acontecimento do curso.

Aos meus queridos familiares que sempre se fazem presente em minha vida: Tia Rosilene, Tia Coca, Tia Risoleta, Tia Veia, Tia Dida, pelo apoio essencial em minha vida, amo muito vocês.

Aos meus primos lindos: Tâninha, Toninho, Thais, Luan, Thainá, Gui, Louise, meus pequeninos lindos Matheus, Vitorinha, Biel, Tainá e Tayane e minha mais nova priminha Clarinha, amo muito vocês, irmãos separados, mas que Deus me deu fazendo parte da mesma família.

Aos meus amigos que são de extrema importância em minha vida, a todos desde os mais presentes e também os ausentes por algum motivo da vida de cada um, dia-a-dia, os compromissos enfim.

Amigos da graduação no geral, e em especial à Renata, Isabelle e Elielton, onde estávamos sempre juntinhos a nos ajudar, compartilhando de momentos da vida de cada um, dando forças uns aos outros, vocês foram e são extremamente especiais para mim, meus queridos amigos.

Amigos da pós, onde conheci pessoas muito boas e que me mostraram que não existe isso de competição, pois todos terão nossas conquistas e méritos, isso mostrou dignidade e humanização entre nós, em especial Marília e Priscila que fiquei mais próxima, apesar de termos estudado juntas na faculdade, meninas vocês também foram essenciais para mim.

Aos amigos que fazem parte do meu cotidiano que são tantos que passaria minha monografia inteira falando sobre, pois sou uma pessoa muito privilegiada de ter gente tão querida e especial ao meu lado, Kedma, Vivi, Cris, Fabíola, Milena, Gio, Manu, que sempre me incentivaram e ajudaram de alguma maneira traçar metas para realização de muitos projetos de minha vida, amo muito vocês meninas do meu coração.

Aos amigos da igreja, amigos pela fé, amigos Ágape, só tenho a agradecer por ter verdadeiras amizades em Deus tão firmes, e quem compreende que eu sinto tudo isso, vai sentir meu carinho ao ler essas linhas.

Companheiros do laboratório Orlando, Luís, muito obrigada pelos ensinamentos.

Aos meus queridos amigos, companheiros, parceria, brodagem do laboratório de Antibióticos, uns presentes no dia-a-dia outros ausentes por motivos de crescimento profissional, Amanda, Carlinha, Cecília, Diana, Erik, Eveline, Jeane, Ju, Luis Cláudio, Mamá, Mari, Maria Cláudia, Maria Juliana Márcio, Persitcho, Rosilma, Tatá, com vocês o trabalho, a pesquisa, o almoço, tudo, tudinho fica bem melhor, agradeço a Deus por estar em um ambiente de trabalho tão harmonioso.

A Rita em especial por ter me convidado e acolhido no laboratório, por essa amizade de tantos anos, desde a época da igreja e que se fortaleceu ainda mais por ser essa pessoa tão humilde, tão gente da gente sabe, obrigada pelos conselhos, ajuda, carinho, brincadeiras, por chamar minha atenção quando necessário, muitas vezes isso na carona matinal, lembra? “Quando crescer quero ser parecida com você”.

A prof. Kêsia e todos do Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos.

A todos no geral que fazem parte da minha vida, que sempre estarão a me dar forças, por acreditarem que sou capaz, pelo carinho, por absolutamente tudo, todos são muito importantes para mim, e me desculpem a falta de citação de algum outro não menos querido, mas é pela emoção do momento.

E para finalizar mais uma vez muito obrigada Deus maravilhoso.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Micro-organismos utilizados nos testes. (A) <i>Aspergillus terreus</i> ; (B) <i>Cunninghamella echinulata</i> e (C) <i>Penicillium commune</i> .....	19
<b>Figura 2:</b> Separação do material biológico do extrato enzimático por filtração (A) <i>Cunninghamella echinulata</i> ; (B) <i>Aspergillus terreus</i> .....	21
<b>Figura 3:</b> Determinação do pH dos fungos isoladamente nos meios de culturas: (A) caldo Sabouraud, (B) caldo Sabouraud adicionado de óleo diesel, e, (C) Bushnell Hass mais óleo diesel.....	27
<b>Figura 4:</b> valores de pH para os consórcios fúngicos.....	27
<b>Figura 5:</b> Valores de biomassa para os isolados nos três meios de culturas, (A) caldo Sabouraud, (B) caldo Sabouraud adicionado de óleo diesel, e, (C) Bushnell Hass mais óleo diesel.....	28

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Matriz obtida para a formação de consórcio utilizando planejamento experimental com as três espécies.....	21
<b>Tabela 2 -</b> Atividade enzimática em meio caldo Sabouraud.....	23
<b>Tabela 3-</b> Atividade enzimática em meio caldo Sabouraud acrescido de óleo diesel.....	23
<b>Tabela 4-</b> Atividade enzimática dos isolados em meio Bushnell Haas.....	24
<b>Tabela 5-</b> Produção das enzimas lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e lacase no ensaio em consórcio.....	25

## RESUMO

As enzimas são biocatalisadores utilizados em diferentes indústrias além de poder ser empregadas em estudos da biologia molecular, aplicações biomédicas, no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de resíduos. Estes catalisadores biológicos em geral são bastante atraentes para a aplicação industrial, principalmente pela sua ação eficiente e seletiva e há um reconhecimento crescente de que as enzimas podem ser usadas em muitos processos de remediação, como o tratamento de poluentes, Podendo ser considerado a produção dessas enzimas como, um dos maiores setores da indústria biotecnológica. Neste sentido os fungos vêm sendo amplamente utilizados na produção de substâncias de interesse econômico, como: enzimas, antibióticos, vitaminas e esteroides. Dessa forma, são considerados grandes produtores de enzimas lignolíticas: grupo do fenol-oxidase como as lignina-peroxidase e lacases. Este trabalho tem como objetivo produzir enzimas ligninolíticas, por *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune* isoladamente e em consórcio, utilizando o óleo diesel como substrato nos meios de cultura Sabouraud e Bushnell Haas. A produção de lignina peroxidase e lacase no meio caldo Sabouraud pelo fungo *Penicillium commune*, atingindo 2.500 U/L para lignina e 1.947 U/L para a lacase. No meio caldo Sabouraud adicionado com óleo diesel foi encontrado para lacase, atividades variando de 4,35 U/L a 4,62 U/L, destacando a mais alta produção para os fungos *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune* (4,62 U/L). Nos fungos crescido em meio Bushnell Haas acrescido de óleo diesel observou-se que a produção de lacase pelo *A. terreus* e *C. echinulata* foi de 18.970 U/L e 18,705 U/L respectivamente, destacando-se na produção da mesma enzima em relação aos demais fungos. Para os ensaios em consórcios a lignina peroxidase apresentou melhores produções nos ensaios 2 e 1 quando produziu respectivamente, 2.683 U/L e 2.666 U/L; seguido do ensaio 11 e 10, com 2.655 U/L e 2.649 U/L respectivamente. Os fungos utilizados no trabalho demonstraram que a produção das enzimas são viáveis utilizando óleo diesel como substrato como os meios de cultivo Sabouraud e Bushnell Haas, como forma de obtenção das enzimas, além de servir como base para a nutrição microbiana nos processos de descontaminação do ambiente.

Palavras-chave: Enzimas, fungos filamentosos, óleo diesel, consórcios.

## ABSTRACT

Enzymes are biocatalysts used in different industries and it can be used in studies of molecular biology, biomedical applications, the development of analytical methodologies in the manufacturing of technological products and waste treatment. These biological catalysts in general are very attractive for industrial application, mainly because of its efficient and selective action and there is a growing recognition that enzymes can be used in many remediation processes such as the treatment of pollutants, which can be considered the production of enzymes as one of the largest sectors of the biotechnology industry. In this sense the fungi have been widely used in the production of substances of economic interest, such as enzymes, antibiotics, vitamins and steroids. Thus, they are considered major producers of ligninolytic enzymes group of phenol-oxidase like lignin peroxidase and laccase. This work aims to produce ligninolytic enzymes by *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* and *Penicillium commune* alone and in consortium, using diesel as a substrate in the culture medium Sabouraud and Bushnell Haas. The production of lignin peroxidase and laccase in Sabouraud broth by the fungus *Penicillium commune*, reaching 2.500 U/L for lignin and 1.947 U/L for laccase. In Sabouraud broth added with diesel was found to laccase, activities ranging from 4.35 U/L to 4.62 U/L, highlighting the most productive for the fungi *Cunninghamella echinulata* and *Penicillium commune* (4.62 U/L). In fungi grown in Bushnell Haas medium plus diesel was observed that the production of laccase by *A. terreus* and *C. echinulata* was 18.970 U/L and 18.705 U/L respectively, especially in the production of the same enzyme in relation to other fungi. For the tests in consortia lignin peroxidase showed the best productions in the trials when he produced two one respectively, 2.683 U/L and 2.666 U/L, followed by the test 11 and 10, with 2.655 U/L and 2.649 U/L respectively. The fungi used in the study showed that the production of enzymes are viable using diesel as a substrate as the culture media Sabouraud and Bushnell Haas, in order to obtain enzymes, besides serving as a basis for nutrition microbial processes for environmental.

Keywords: enzymes, filamentous fungi, diesel, consortia

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos Específicos.....	14
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
4.1. Origem e manutenção dos fungos.....	19
4.2. Determinação da biomassa microbiana.....	19
4.3. Meios de culturas.....	19
4.4. Condições de cultivo para ensaios enzimáticos em culturas puras.....	20
4.5. Condições de cultivo para ensaios enzimáticos em consórcio.....	20
4.6. Ensaio enzimáticos.....	21
<b>5. RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	23
5.1. Análise enzimática em caldo Ágar Sabouraud.....	23
5.2. Amostras enzimáticas em caldo Ágar Sabouraud acrescido de óleo diesel.....	23
5.3. Fungo crescido Bushnell Haas-BH acrescido de óleo diesel.....	24
5.4. Consórcio fungico.....	25
5.5. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH).....	26
5.6. Biomassa.....	28
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	29
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	30

## 1. INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores utilizados nas indústrias podendo ser empregadas na biologia molecular e aplicações biomédicas (SANCHEZ & DEMAN, 2002), no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de resíduos (CHIRUMAMILLA *et al.*, 2001).

A biocatálise é a aplicação de enzima livres ou de células íntegras como agentes catalisadores (BEILEN & LI, 2002). Alguns autores preferem utilizar definições mais específicas e considerar a tecnologia enzimática como a aplicação competitiva de enzimas em bioprocessos de grande escala. (PANKE & WUBBOLTS, 2002).

A biocatálise apresenta muitas aplicações em diferentes setores industriais e muitas são também as áreas do conhecimento com interface no desenvolvimento, aplicação e avanço da tecnologia enzimática (ROZZELL, 1999). Na indústria é amplamente vista como a “terceira onda” da biotecnologia, em seguida às farmacêuticas e agrícolas. No centro desta tecnologia estão os catalisadores biológicos, ou melhor, as enzimas industriais. (MARRS, 1999). Os catalisadores biológicos em geral são bastante atraentes para a aplicação industrial, principalmente pela sua ação eficiente e seletiva. As reações mediadas por biocatalisadores resultam em elevados rendimentos com excelentes níveis de pureza, e minimizam a formação de subprodutos. Todas essas vantagens asseguradas pelos biocatalisadores ocorrem em condições reacionais brandas.

A produção e o uso de biocatalisadores industriais é uma área em expansão pela grande diversidade natural de biocatalisadores e também devido à disponibilidade de técnicas modernas para o melhoramento e otimização na seleção, produção, estabilização e modificação das enzimas industriais. Estas técnicas possibilitam a inserção de novos biocatalisadores nos processos industriais por contribuírem também na viabilidade econômica. A utilização de enzimas como catalisador traz vantagens imediatas aos processos que as utilizam: sua especificidade minimiza a formação de subprodutos e as condições mais brandas de reação resultam num menor

consumo energético, como: temperaturas entre 25° a 40°C, pressão atmosférica, e pH em torno da neutralidade (ROZZELL,1999).

Devido à importância das enzimas fenoloxidasas nos processos de biorremediação o estudo da produção destas enzimas por fungos filamentosos utilizando o óleo diesel como substrato tem sido intensificado nos últimos anos e foi objeto do nosso estudo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Este trabalho visa verificar a produção das enzimas ligninolíticas, lignina peroxidase e lacase, por *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Produzir as enzimas lignina peroxidase e lacase em dois meios de cultura utilizando óleo diesel como substrato;
- Verificar a produção das enzimas ligninolíticas, utilizando os fungos isoladamente;
- Verificar a produção das enzimas ligninolíticas em consórcio;
- Comparar a produção nos meios de cultivo, com e sem óleo diesel.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Há um reconhecimento crescente de que as enzimas podem ser usadas em muitos processos de biorremediação, como o tratamento de poluentes. O potencial de aplicação de enzimas ligninolíticas tem sido alvo de grande interesse acadêmico e industrial, devido à sua capacidade de biodegradar uma série de poluentes tóxicos e recalcitrantes. As potenciais vantagens do tratamento enzimático, em comparação com os tratamentos convencionais incluem: aplicação dos materiais recalcitrantes; a operação em altas e baixas concentrações de contaminantes ao longo de uma ampla faixa de pH, de temperatura e salinidade; as necessidades de aclimação da biomassa e do processo de controle mais fácil (DURAN & ESPOSITO, 2000).

As enzimas podem ser provenientes de organismos diferenciados, como animal (glândulas), vegetal (sementes, frutas, exsudações) e culturas de micro-organismos. Com os micro-organismos faz-se uso de cultivo total, quer extraído as enzimas do meio de cultura onde esses são cultivados. (COELHO, *et al* 2011).

Industrialmente uma das principais fontes produtoras de enzimas são os micro-organismos. Estes são considerados fontes atrativas e de baixo custo na produção destes metabólitos, podendo ser cultivados em grandes quantidades e em tempo relativamente curto. Acrescenta-se ainda a vantagem da produção não estar condicionada às questões sazonais e geográficas e pela possibilidade de uso de matérias prima pouco dispendiosa. (ZIMMER, *et al.*, 2009).

O uso de enzimas é considerado na atualidade, um dos maiores setores da indústria biotecnológica, tendo os fungos como o principal organismo, sendo amplamente utilizados como produtores de substâncias de interesse econômico (BRAGA *et al.*, 1999).

Considerando o uso desses organismos em larga escala na produção de metabólitos, os maiores nichos correspondem às indústrias do amido encontrados nas ( $\alpha$ -amilase, glicoamilase e glicose isomerase), detergentes (proteases alcalinas), têxtil (amilases e celulasas) e de laticínios (renina). Outras aplicações relevantes ocorrem em panificação, cervejaria, produção de sucos de frutas, ração animal, indústrias de papel e celulose, aromatizantes,

processamento de óleos e gorduras, hidrólise de proteínas, processamento de couro, química fina e tratamento de efluentes. Proteases e amilases são as enzimas de maior uso, correspondendo 20% e 25% do mercado total, respectivamente (BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY, 2004). O crescimento do mercado de enzimas para ração animal é significativo, impulsionado em grande parte pelo crescente uso da enzima fitase. Este mercado é, entretanto, majoritariamente suplantado pelas enzimas com aplicação em medicina e pelas chamadas enzimas especializadas (utilizadas em analítica, biotecnologia e pesquisa).

Outro setor em que as enzimas vêm ganhando espaço é na indústria de cosméticos. Já há enzimas incorporadas à formulação de vários produtos presentes no mercado, como tinturas, depilatórios, alisantes de cabelo, sais de banho, dentifrícios, desodorantes, produtos anti-caspa, curativos e outros, ou aplicadas em limpezas de pele (descamação) e produtos aromáticos. Enzimas que quebram proteínas têm recebido atenção especial da cosmetologia, com destaque para a papaína, capaz de promover a penetração de compostos na pele e atuar como agente de raspagem e depilação em produtos de uso local. É importante, no desenvolvimento do cosmético, conhecer as características da enzima usada, dos demais componentes da fórmula e do recipiente onde é acondicionado, além das condições de armazenamento, para evitar reações entre essas substâncias, que prejudicariam a eficácia e a segurança do produto (MAIOLINI, 2009).

Segundo Mussato (2007), é vantajoso usar enzimas na indústria, porque elas são naturais, não tóxicas e específicas para determinadas ações. Além disso, são capazes de alterar as características de variados tipos de resíduos, contribuindo para reduzir a poluição ambiental, substituindo processos químicos rigorosos.

O uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção (por biotecnologia) e às vantagens em relação aos catalisadores (aceleradores de reações) químicos, como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação. Além disso, a catálise enzimática tem outros benefícios, como o aumento da qualidade dos produtos, em relação à catálise química; a redução dos custos

de laboratório e de maquinário, graças à melhoria do processo; ou a fabricação controlada de pequenas quantidades (OU *et al.*, 2007).

A procura por enzimas vem sendo realizada utilizando vários tipos de produtos, a partir de origem animal e vegetal, ou pelo aproveitamento da expressão enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos (COLEN, 2006). Dessa forma, os fungos são considerados maiores produtores das enzimas, as fenol-oxidase como as lacases, manganês-peroxidases, lignolíticas, destacando-se *Phanerochaete chrysosporium*, *Penicillium spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Cunninghamella elegans*, *Candida spp.*, *Torulopsis sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Aspergillus sclerotium* e *Mucor racemosus* (BOONCHAN *et al.*, 2000; BONUGLI SANTOS *et al.*, 2010).

A literatura destaca as maiores famílias de enzimas produzidas por fungos lignolíticos: manganês peroxidase (MnP) (E.C:1.11.1), lacases (Lac) (E.C:1.10.3.2) e lignina peroxidase (LiP) (E.C:1.11.1.14), sendo essas duas as mais importantes nos processos de degradação de lignina com uma larga aplicação nas indústrias (D'Souza *et al.*, 2006). A lacase é uma enzima que contém cobre em seu sítio ativo, no entanto lignina peroxidase (LiP) contém ferro como grupo prostético. A lignina peroxidase é uma proteína *heme* com um elevado potencial de oxidação e pode oxidar substratos fenólicos e não fenólicos. A lacase é uma oxidase que catalisa a redução do O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O e oxida aminas aromáticas (D'SOUZA *et al.*, 2006).

Nessas enzimas falta à especificidade pelo substrato e, com isso, elas são empregadas na degradação de diversos xenobióticos, com aplicação na indústria química, alimentícia, agrícola, de papel, têxtil, além de setores da indústria de cosméticos (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010; GOMES, *et al.*, 2009; De SOUZA; PERALTA, 2003). Além disso, estas enzimas têm um alto potencial em um largo número de campos, incluindo os químicos, combustíveis, alimentos, papel, agrícolas, têxteis, cosméticos e setores industriais (SETTE *et al.*, 2008). Como tratamentos biológicos-biorremediação (PEARCE 1997).

A biorremediação é uma tecnologia baseada na utilização de micro-organismos ou processos biológicos para transformar os poluentes em substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade, quando comparada com processos químicos e físicos, é uma alternativa ecologicamente mais segura e eficiente para reduzir a poluição por contaminantes orgânicos (PROVIDENTI *et*

*al.*, 1993; GOGOI *et al.*, 2003; WARD *et al.*, 2003). Nas últimas décadas tem sido relatado que os fungos filamentosos possuem atributos que os distinguem das outras formas microbianas nos processos de degradação, como o crescimento micelial, o qual confere uma vantagem sobre as células unicelulares, bactérias e leveduras, especialmente no que concerne à colonização de substratos insolúveis.

Pela importância das enzimas fenol-oxidases nos processos de biorremediação o estudo da produção destas enzimas por fungos filamentosos utilizando o óleo diesel como substrato tem sido intensificado nos últimos anos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Origem e manutenção dos fungos

As espécies utilizadas foram: *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune* (Figura 1), previamente isolados do sedimento de manguezal no Recôncavo Baiano e mantidos no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. Todos os fungos foram mantidos no meio Ágar Sabouraud a temperatura 4°C.



**Figura 1:** Micro-organismos utilizados nos testes. (A) *Aspergillus terreus*; (B) *Cunninghamella echinulata* e (C) *Penicillium commune*.

### 4.2. Determinação da biomassa microbiana

O pH do meio de cultivo de cada ensaio realizado foi medido em potenciômetro da marca PHTEK modelo PHS-3B e a determinação da biomassa microbiana foi realizada por gravimetria.

### 4.3. Meios de cultura

#### Meio mineral Bushnell Haas – BH (Atlas, 1995)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 1g  
K<sub>2</sub>HP ..... 1g  
NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ..... 1g  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ..... 0,2g  
FeCl<sub>3</sub> ..... 0,05g  
CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ..... 0,02g  
Água destilada ... ..... 1000mL  
pH = 7,0

### Meio Agar Sabouraud – SAB (Atlas, 1995)

Peptona .....40,0g/L  
Glicose.....10,0g/L  
Agar.....15,0g/L  
Água destilada ..... 1000mL  
pH = 7,0

#### **4.4. Condições de cultivo para ensaios enzimáticos em culturas puras**

Inicialmente os fungos foram cultivados, separadamente, no meio Agar Sabouraud durante 5 dias, após três blocos (bl) de gelose ( $\emptyset$  6mm), foram transferidos para frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 100 mL dos meios caldo Sabouraud; caldo Sabouraud acrescido de 7% óleo diesel e caldo Bushnell Haas também acrescido de 7% de óleo diesel. Para o meio Bushnell Haas o óleo diesel foi usado como única fonte de carbono. Todos os ensaios foram mantidos sob condições estáticas durante sete dias a temperatura 28°C ( $\pm$  2°C). As amostras de Óleo diesel foram cedidas pela Transpetro S/A.

#### **4.5. Condições de cultivo para ensaios enzimáticos em consórcio**

O consórcio fúngico foi formado utilizando um planejamento experimental fatorial tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^3$  onde incluiu 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios. Esse planejamento foi realizado com o auxílio do software StatSoft 6.0, onde a variável dependente foi a concentração de inóculos conforme matriz apresentada na Tabela 1. O meio utilizado para esse experimento foi o Bushnell Haas acrescido de 7% de óleo diesel e mantidos durante sete dias a temperatura 28°C ( $\pm$  2°C) sob condições estáticas.

**Tabela 1:** Matriz obtida para a formação de consórcio utilizando planejamento experimental com as três espécies.

Ensaio	Matriz codificada			Número de blocos de gelose (Ø6mm)		
	<i>C. echinulata</i>	<i>P. commune</i>	<i>A. terreus</i>	<i>C. echinulata</i>	<i>P. commune</i>	<i>A. terreus</i>
1	-1	-1	-1	2	2	2
2	1	-1	-1	4	2	2
3	-1	1	-1	2	4	2
4	1	1	-1	4	4	2
5	-1	-1	1	2	2	4
6	1	-1	1	4	2	4
7	-1	1	1	2	4	4
8	1	1	1	4	4	4
9	1,68	0	0	1	3	3
10	-1,68	0	0	5	3	3
11	0	-1,68	0	3	1	3
12	0	1,68	0	3	5	3
13	0	0	-1,68	3	3	1
14	0	0	1,68	3	3	5
15	0	0	0	3	3	3
16	0	0	0	3	3	3
17	0	0	0	3	3	3

#### 4.6 Ensaio enzimáticos

Após o período de cultivo, o micélio foi separado do líquido metabólito por filtração utilizando papel de filtro modelo faixa branca da marca Qualy (Figura 2).



**Figura 2:** Separação do material biológico do extrato enzimático por filtração (A) *Cunninghamella echinulata*; (B) *Aspergillus terreus*.

A atividade da lacase foi determinada usando 2,2-azino-bis-etilbentiazolína (ABTS) como descrito por Buswell *et al.* (1995). A mistura foi utilizada usando 0,1 mL de tampão acetato de sódio a 0,1M (pH 5,0), 0,8 mL de uma solução de ABTS a 0,03% (m/v) e 0,1 mL do extrato enzimático e a leitura da absorbância a 420 nm. A atividade da lignina peroxidase-LiP foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico de acordo com a metodologia determinada por Buswell *et al.*, (1995). A mistura foi composta por 1 mL de tampão tartarato de sódio 125 mM (pH3,0), 500 µL de álcool veratrílico 10 mM, 500 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 500 µL de extrato enzimático. Com a adição do peróxido de hidrogênio a reação foi iniciada e a leitura feita a 310 nm. Uma unidade de cada enzima foi definida como 1,0 µmol de produto formado por minuto sob as condições do ensaio.

As atividades enzimáticas, lignina peroxidase-LiP e lacase - Lac foram medidas em espectrofotômetro com comprimento de onda 310 e 420nm da marca Shimadzu-1240 UV/MINI.

## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1. Análise enzimática em caldo Sabouraud

A produção de lignina peroxidase e lacase para o meio caldo Sabouraud pode ser observada na tabela 2, onde o fungo *P. commune* apresentou maior produção para as duas enzimas, atingindo 2.500 U/L para lignina e 1.947 U/L para a lacase respectivamente.

Recentemente, os fungos do solo têm sido estudados em relação a sua capacidade de degradar os hidrocarbonetos e produzir enzimas ligninolíticas (SILVA *et al.*, 2009).

**Tabela 2:** Atividade enzimática em meio caldo Sabouraud

Fungos	LiP U/L	Lac U/L
<i>Aspergillus terreus</i>	1.595	1.839
<i>Cunninghamella echinulata</i>	2.249	1.850
<i>Penicillium commune</i>	2.500	1.947

### 5.2. Amostras enzimáticas em caldo Sabouraud acrescido de óleo diesel

Na tabela 3 a glicose foi utilizada como controle e óleo diesel como indutor da atividade enzimática, foi encontrado para lacase, atividades variando de 4,35 a 4,62, destacando a mais alta produção para os fungos *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*, com 4,62 U/L para ambos.

**Tabela 3:** Atividade enzimática em meio caldo Sabouraud acrescido de óleo diesel

Fungos	LiP U/L	Lac U/L
<i>Aspergillus terreus</i>	1.408	4,35
<i>Cunninghamella echinulata</i>	1.447	4,62
<i>Penicillium commune</i>	2.357	4,62

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

As funções biológicas da lacase nos micro-organismos ainda não estão muito claras. Em fungos há relatos sobre sua participação no rápido crescimento celular (LEONOWICZ *et al.*, 2001), esporulação (GIANFREDA *et al.*, 1999) e degradação de lignina (EGGERT *et al.*, 1996).

De acordo com Rothschild *et al.* (2002) a atividade da Lipase e da Lacase tem sido relatada em alguns fungos da podridão branca .

### 5.3. Fungo crescido em caldo Bushnell Haas - BH acrescido de óleo diesel

Observou-se que a produção de lacase pelos fungos *A. terreus* 18.970 U/L e *C. echinulata* produziu 18.705 U/L destacando-se em comparação à produção da mesma enzima pelo *P. commune*. Segundo Kim *et al.* (1998), quando foram utilizados fenantreno e antraceno como substratos ocorreu à produção de lignina peroxidase por *Phanerochaete chrysosporium* e *P. ostreatus*, respectivamente. Resultados similares foram observados neste trabalho utilizando óleo diesel como substrato quando conseguiu obter o valor mais alto para *Cunninghamella echinulata* 2.594 U/L. Para Quarantino *et al.* (2008), a produção de lacase por *Panus trigrinus* (linhagem 577.79) variou de 0,024 U/mL e 2,04 U/mL. Téllez -Téllez *et al.* (2008), em ensaios de produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*, obteve 162U/mg de proteína. Maciel *et al* (2010) relataram que a melhor produção de lacase, 290 U/L, foi observada pelo fungo *Penicillium* sp.(F33), contudo os resultados aqui descritos foram superiores, 18.970 U/L.

Levando em consideração que o meio utilizado Bushnell Haas- BH, não possui a riqueza de nutrientes dos demais citados acima. O diesel é rapidamente biodegradado pelos micro-organismos de solo em processos de biorremediação combinados com bioventilação, bioestimulação e bioaumento. (ALISE *et al.*, 2000). Os resultados são apresentados na tabela 4.

**Tabela 4:** Atividade enzimática dos isolados em caldo Bushnell Haas acrescido de óleo diesel

Fungos	LiP U/L	Lac U/L
<i>Aspergillus terreus</i>	2.469	18.970
<i>Cunninghamella echinulata</i>	2.594	18.705
<i>Penicillium commune</i>	2.441	18.335

#### 5.4. Consórcio fúngico

Consórcio significa a comunhão de interesse, a associação entre diferentes organismos. A interação entre diferentes micro-organismos, em condições de consórcio, como o cometabolismo ou antagonismo pode ser importante, e a biodegradação de compostos orgânicos tóxicos como os hidrocarbonetos pelo consórcio poderiam ser diferentes das de uma única cultura (FERNANDEZ-SANCHEZ, 2001).

Para os ensaios em consórcios a lignina peroxidase apresentou melhores produções nos ensaios 1 e 2 quando produziram respectivamente, 2.666 U/L e 2.683 U/L; seguido dos ensaios 10 e 11, com 2.649 U/L e 2.655 U/L respectivamente.

Com relação aos ensaios em consórcio para lacase observa-se uma variação de 19.440U/L ensaio 3 a 12.620 U/L ensaio 7.

**Tabela 5:** Produção das enzimas lignina peroxidase e lacase no ensaio em consórcio

ENSAIO	LIGNINA PEROXIDASE	LACASE
1	2. 666	18. 355
2	2. 683	18. 460
3	2. 429	19. 440
4	2. 518	18. 920
5	2. 632	13. 975
6	2. 577	13. 845
7	2. 593	12. 620
8	2. 609	15. 375
9	2. 623	14. 810
10	2. 649	14. 079
11	2. 655	13. 475
12	2. 652	14. 475
13	2. 574	14. 495
14	2. 602	15. 140
15	2. 610	13. 780
16	2. 598	13. 070
17	2. 554	13. 685

Poucos são os trabalhos com consórcios somente de fungos, são mais frequentes os consórcios mistos de espécies de bactérias, ou de diferentes espécies de bactéria com dois ou três fungos (ARRUDA, 2011). Kataoka,

(2001) afirma que devido a uma grande dificuldade de análises de misturas complexas, a maioria dos trabalhos realizados sobre micro-organismos que degradam hidrocarbonetos têm sido realizados envolvendo o crescimento de um único micro-organismo sobre um único hidrocarboneto ou uma classe de hidrocarbonetos relacionados.

Lignina- peroxidase tem sido utilizada para mineralizar uma variedade de compostos aromáticos recalcitrantes como: hidrocarbonetos e corantes (WESENBERG *et al.*, 2003). Clemente *et al.* (2001) investigaram a degradação de hidrocarbonetos por treze fungos deuteromicetos ligninolíticos e constataram que o grau de degradação varia de acordo as enzimas ligninolíticas.

A degradação microbiana por fungos ligninolíticos tem sido intensamente estudada nos últimos anos. Alguns fungos produzem enzimas extracelulares, tornando-os adequados para a degradação de compostos recalcitrantes (CAJTHAML *et al.*, 2001; HARITASH & KAUSHIK, 2009).

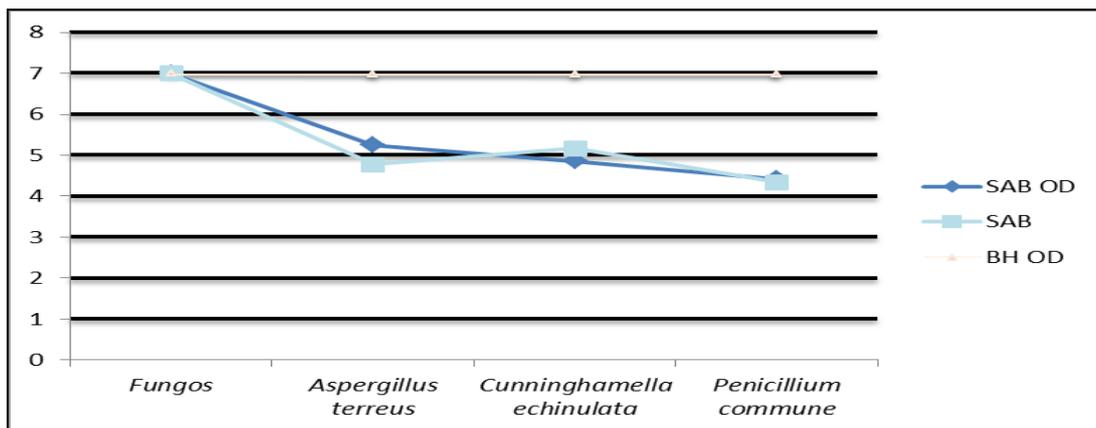
### **5.5. Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)**

As enzimas são específicas e requerem certas condições para aproveitar ao máximo seu desempenho. Essas condições são: pH, temperatura, dose e compatibilidade com os componentes da formulação. (MARTÍNEZ, 2011).

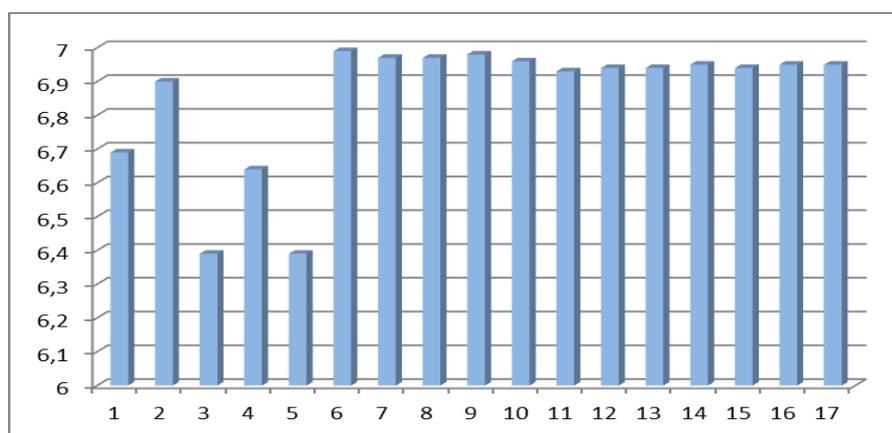
Os fungos podem crescer sob uma larga faixa de pH, sendo que a maioria tolera uma escala de pH de 4 a 9 (PAPAGIANNI,2004).

O pH, conceito proposto pelo dinamarquês Sørensen, em 1909, que significa literalmente potência (p) de hidrogênio (H), permite-nos descrever o carácter ácido ou base que predomina nos meios, tendo em conta o seu valor determinado numa escala de 0 a 14. Para a temperatura de 25°C, será ácido se tiver pH de 0 a 7, será básico se o pH for de 7 a 14 e será neutro para pH igual a 7.

O pH ótimo para os fungos segundo Magenta (2011) é o ácido. Para os fungos crescidos isoladamente obteve-se o pH entre 7,0 a 4,5, atingindo o pH ácido sendo assim considerado bom.



**Figura 3:** Determinação do pH dos fungos isoladamente nos meios de culturas: (A) caldo Sabouraud, (B) caldo Sabouraud adicionado de óleo diesel, e, (C) caldo Bushnell Hass mais óleo diesel.



**Figura 4:** Valores de pH para os consórcios fúngicos

Entretanto em relação aos consórcios o pH dos ensaios apresentaram um discreto aumento variando de 6,39 a 6,97, o que caracteriza um potencial hidrogeniônico próximo da neutralidade, diferente dos valores encontrados dos mesmos isoladamente. Os fungos filamentosos são mais tolerantes as condições ácidas, os valores de pH podem variar de  $6,0 \pm 0,08$  e  $8,0 \pm 0,05$ , sendo os mais favoráveis à ação degradadora de hidrocarbonetos. Nesse pH, observa-se um maior crescimento dos micro-organismos, aumento da velocidade de degradação e, de acordo com autores, a acidez do meio em processo de degradação é indicativa da produção de ácidos intermediários, como o ácido oxálico (CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2001; ALEXANDER, 1999; LEAHY; COLWELL, 1990). O pH do meio é um fator muito relevante porém é frequentemente negligenciado o que pode afetar a morfologia dos fungos.

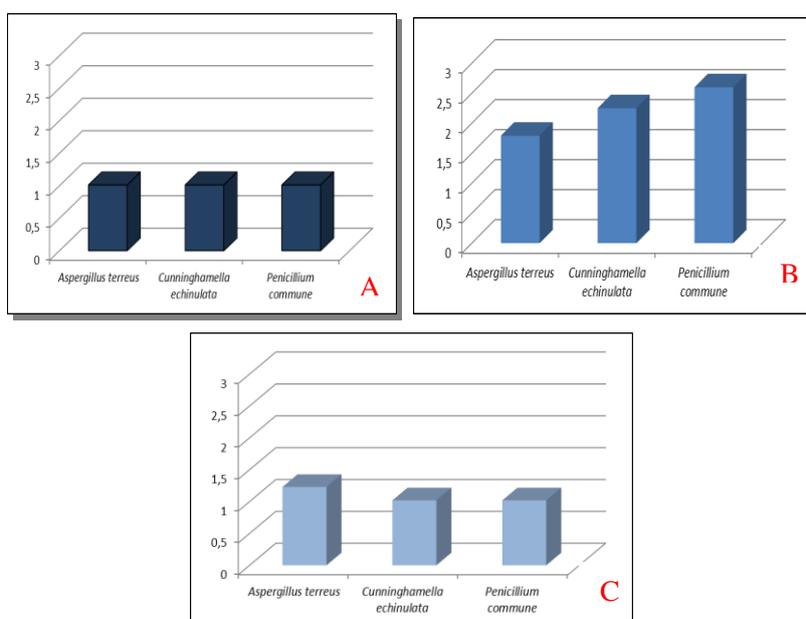
Diferentes valores de pH podem ser observados durante a incubação e podem estar relacionados aos transportes e solubilização dos nutrientes, a reações enzimáticas, produtos de excreção ou fenômenos de superfícies.

Os fungos consideram-se mais eficientes sob condições adversas: solos com valores extremos de pH, limitação de nutrientes e com baixo teor de umidade (MACEDO *et al*, 2002).

## 5.6. Biomassa

A produção de biomassa (Figura 5) pelos fungos foi observado em maior quantidade no meio caldo Sabouraud e óleo diesel, atingindo 2,7 g/L (Figura 5-B), os resultados obtidos em consórcio variaram entre 0,0002 (ensaio 4) a 0,0098 (ensaio 11). Quarantino *et al.* (2008), demonstraram uma produção de biomassa de 1,8 g/L em ensaios de produção de lacase por *Panus tigrinus*. Téllez-Téllez (2008), observou 55 g/L de biomassa, utilizando glicose como fonte de carbono para a produção de lacase por *Pleurotus ostreus*.

Porém preconiza-se que para processos de biorremediação o ideal é que se tenham pouca geração de biomassa, isso só vem a confirmar a possibilidade de utilização destes fungos nos processos de remediação.



**Figura 5:** Valores de biomassa para os isolados nos três meios de culturas, (A) caldo Sabouraud, (B) caldo Sabouraud adicionado de óleo diesel e (C) Bushnell Hass mais óleo diesel

## 6. CONCLUSÃO

- Os fungos *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune* apresentaram produção enzimática de lignina peroxidase e lacase para os meios na presença ou ausência do substrato (óleo diesel), obtendo melhores resultados quando utilizados isoladamente que em consórcio;
- A produção das enzimas lignolíticas para consórcio obteve um excelente resultado para lacase 19.440 U/L;
- A produção das enzimas lignolíticas isoladamente foi mais bem vista no meio Bushnell Haas atingindo o melhor resultado, para lignina peroxidase 2.594 e para lacase 18.970 U/L cultura;
- Para os ensaios em consórcios a lignina peroxidase apresentou melhores produções nos ensaios 1 e 2 quando produziram respectivamente, 2.666 U/L e 2.683 U/L. Com relação aos ensaios em consórcio para lacase observa-se uma variação de 19.440U/L ensaio 3 a 12.620 U/L ensaio 7;
- Nos meio caldo Sabourand com e sem óleo diesel, todos os ensaios produziram as enzimas, porém a melhor produção, tanto lignina peroxidase quanto lacase, foram observadas para o *Penicillium commune*;
- Os fungos ao produzirem enzimas, mostram seu grande potencial de obtenção para utilização em diversos segmentos industriais e nos processos de biodegradação, servindo como auxiliar nos processos de descontaminação do meio ambiente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. *Acclimatation, biodegradation and bioremediation*. California: Academic Press, v. 3, p. 17-38, 1999.

ALISI, C.; MUSELLA, R.; TASSO, F.; UBALDI, C.; MANZO, S.; CREMISINI, C.; SPROCATI, A. R. Bioremediation of diesel oil in a co contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Sci Total Environ*, v.407, p.3024–3032, 2009.

ARRUDA, F. V. F. DEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR *Aspergillus terreus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune*.56p. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco UFPE, Recife, 2011.

ARUN, A.; PRAVEEN, R. A.; ARTHI, A.; ANANTHI, M.; SATHISH, K. K.; EYINI M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation by basidiomycetes fungi, pseudomonas isolate, and their cocultures: comparative in vivo and in silico approach. *Appl Biochem Biotechnol*, v.151, p.132–42, 2008.

ATLAS, R. M. Fate of Petroleum Pollutants in Arctic Ecosystems. *Water Science Technology*, v. 18, n.2, p. 59-67, 1995.

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

BARR, D. P.; AUST, S. D. Pollutant degradation by white rot fungi. Reviews of *Environmental Contamination and Toxicology*, v. 138, p. 49-72, 1994b.

BRAGA, G. U. L.; DESTÉFANO, R. H. R.; MESSIAS, C. L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. *Revista de Microbiologia*, v. 30, n. 2, p. 107-113, 1999.

BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, p.338-344, 2002.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SILVA, M.; SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 46, n. 1, p. 32-37, 2010.

BOONCHAN, S.; BRITZ, M. L.; STANLEY, G.A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterium cocultures. *Applied Environmental Microbiology*, v. 66, p. 1007-1019, 2000.

BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY, INC., RC-147U *Enzymes for Industrial Applications*, v. 25. Van Zant Street, Norwalk, EUA, 2004.

BUSWELL, J. K.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiol Lett*, v.128, p.81–87, 1995.

CAJTHAML, T.; PACAKOVA, V.; SASEK, V. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chem. Listy*. v.95, p.404-410, 2001.

CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by lignolytic and non-lignolytic fungi. In: Gadd, G. M. *Fungi in bioremediation*. United Kingdom: Cambridge University Press, p.136-187, 2001.

COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F.F. *Produção de enzimas*. Disponível em: [http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Enzimol%20Aplic/eqb706\\_aula\\_07.pdf](http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Enzimol%20Aplic/eqb706_aula_07.pdf). Acessado em: 02 de abril de 2011.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. 206 p. Dissertação (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia da UFMG, Minas Gerais, 2006.

CHIRUMAMILLA, R. R.; MURALIDHAR, R.; MARCHANT, R.; NIGAM.; P. Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. *Mol Cell Biochem* v. 224, p.159-168, 2001.

D'SOUZA, T. M.; MERRIT, C. S.; REDDY, C. A. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycetes *Ganoderma lucidum*. *Applied and environmental Microbiology*, v. 65, n. 12, p. 5307-5313, 1999.

D'SOUZA, D. T.; TIWARI, R.; SAH, A. K.;RAGHUKUMARA, C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme Microb Technol* v.38,p.504–511, 2006.

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

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

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

FERNANDEZ-SANCHEZ, J. M., R. RODRIGUEZ-VAZQUEZ, G. RUIZ-AGUILAR, AND P. J. J. ALVAREZ .PCB biodegradation in aged contaminated soil: Interactions between exogenous *Phanerochaete chrysosporium* and indigenous microorganisms. *J. Environ. Sci. Health A* 36: 1145-1162, 2001.

FUJIAN, X.; HONGZHANG, C.; ZUOHU, L. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. *Bioresource Technology*, v. 80, p. 149-151, 2001.

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

GOGOI, B. K., DUTTA, N. N., GOSWAMI, P. E KRISHNA MOHAN, T.R. A Case Study of Bioremediation of Petroleum-Hydrocarbon Contaminated Soil at a Crude Oil Spill Site. *Advances in Environmental Research*, v.7,p.767-782,2003.

GOMES, E.; AGUIAR, A. P.; CARVALHO, C. C.; BONFÁ, M. R. B.; SILVA, R.; BOSCOLO, M. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of microbiology*, v. 40, p. 31-39, 2009.

GHAZALI, F. M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Internacional Biodeterioration & Biodegradation* v.54, p.61-67, 2004.

HARITASH, A.K.; KAUSHIK, C.P. A review: biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*, v. 169, p.1–15, 2009.

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

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

JORGENSEN, K. S., PUUSTINEM, J.; SUORTTI, A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environment International, Elmsford*, v. 107, p.245-254, 2000.

KATAOKA, A. P. A. G. Biodegradação de resíduos oleosos de refinaria de petróleo por micro-organismos isolados de landfarming. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, p.202, 2001.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.

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

LOPEZ, M. J., VARGAS-GARCIA, M.; SUAREZ-ESTRELLA, F.; NICHOLS, N. N.; DIEN, B.S.; MORENO, J. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme and Microbial Technology*. v.40, p.794-800, 2007.

MACEDO, R. C.; BERBERT, V. H. C.; LEMOS, J. L. S.; TRINDADE, P. V. O.; RIZZO, A. C. L. *Biorremediação de solos impactados por óleo cru utilizando fungos filamentosos*. In: X jornada de Iniciação científica - Centro de Tecnologia Mineral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Orientadores: Judith Liliana. S. Lemos, Pedro V. Trindade e Andrea C. de L. Rizzo 2002.

MACIEL, C. C. S., SOUZA, M. A. GUSMÃO, N. B., CAMPOS-TAKAKI, G. M. 2010. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactado por petroderivados. *Exacta*, São Paulo. 8(2): 133-144.

MAIOLINI,R.S.S. *Aplicações das enzimas em diagnóstico molecular: desenvolvimento de um reagente enzimático para determinação de lactato em fluidos biológicos*.36p.Monografia (Especialização no Departamento de Bioquímica) Universidade Federal de Lavras,UFLA, Minas Gerais, 2009.

MARGENTA, M. *Fungos – Reino Fungi*. Disponível em: <http://www.mundovestibular.com.br/>. Acessado: 02 de abril de 2011.

MARRS, B.;DELAGRAVE, S.; MURPHY, D.Novel, approaches for discovering industrial enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, v.2 p.241-245, 1999.

MARTÍNEZ, H. *O Fascinante Mundo das Enzimas*. Disponível em: [http://www.freedom.inf.br/artigos\\_tecnicos/03072006-1/mundo\\_enzimas.asp](http://www.freedom.inf.br/artigos_tecnicos/03072006-1/mundo_enzimas.asp). Acessado em: 03 de abril de 2011.

MISHRA, S. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67:4, 1675-1681, 2001.

MORAIS,J O valor do Ph.Departamento de Química e Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas (ICAM) Universidade de Évora. Disponível em: [http://www.videos.uevora.pt/quimica\\_para\\_todos/valor\\_ph.pdf](http://www.videos.uevora.pt/quimica_para_todos/valor_ph.pdf). Acessado em: 03 de abril de 2011.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas Ferramenta na Indústria. *Biocologia. Ciência Hoje*, p. 28 - 33, São Paulo, 2007.

OU, S.,LUO,Y., FENG, X., HUANG, C., ZHANG, N.,LIU, Z. Separation and purification of ferulic acid in alkaline-hydrolysate from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption macroporus resin exchange chromatograph. *Journal of food Engineering*. V. 78, P. 1298-1304, 2007.

PANKE,S.;HELD,M.; WUBBOLTS,M.Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemical . *Current Opinion in Biotechnology*, v. 15, p.272-279, 2004.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial process. *Biotechnology Advances, London*, v. 22, p. 189-259, 2004.

PARK, Y.K. 1986. Produção de enzimas biotecnologia:tecnologia das fermentações São Paulo: Edgard Blüncher, 3 ed.,v. 1, p. 182-209, 1996.

PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. *Adv. Appl. Microbiol.*44, 1-68,1997.

POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 20-33, 2001.

PROVIDENTI, M. A., LEE, H. E TREVORS, J. T. Selected Factors Limiting the Degradation Degradation of Recalcitrant Compounds. *Journal of Industrial Microbiology*, 12 (6): 379-395, 1993.

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

ROZZELL,J.D. Commercial scale biocatalysis:Myths and realities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.7, p.2253-2261, 1999.

SANCHEZ, S.; DEMAIN A. L. Metabolic regulation of fermentation processes, *Enzyme Microbial Technology*, v. 31,p.895-906, 2002.

SETTE, L. D.; OLIVEIRA, V. M.; RODRIGUES, M. F. A. Microbial lignocellulolytic enzymes: industrial applications and future perspectives. *Microb Aust* v.29,p.18–20, 2008.

SILVA I.S.; GROSSMAN, M. DURRANT, L.R. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi, *Int. Biodet. Biodeg.* v. 63:2, p. 224–229, 2009.

SILVA, M.; PASSARINI, M. R. Z.; BONUGLI, R. C.; SETTE, L. D. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. *Environ Technol* v.29, p.1331–1339, 2008.

SOUZA, F. A. S. D. Biodegradação de óleo diesel por *Candida lipolytica* em água do mar. 175p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento em Processos Ambientais). Universidade Católica de Pernambuco, Recife. 2009.

TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; FERNÁNDEZ, F. J.; MONTIEL-GONZÁLES, A. M.; SÁNCHEZ, C.; DIAZ-GODINEZ, G. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, p. 675-679, 2008.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology*, v. 41, p. 1-17, 1995.

UYTTEBROEK, M. VERMEIR, S. WATTIAU, P. RYNGAERT, A. SPRINGAEL, D. Characterization of cultures enriched from acidic polycyclic aromatic hydrocarboncontaminated soil for growth on pyrene at low pH, *Appl. Environ. Microbiol.* v. 73 p. 3159–3164, 2007.

VELÁZQUEZ-CEDEÑO, M. A.; MATA, G.; SAVOIE, J. M. Waste reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulpe changes in the production of some lignocellulolytic enzyme. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.18:3, p.201-207, 2002.

WARD, O., SINGH, A., VAN HAMME, J. Accelerated Biodegradation of Petroleum Hydrocarbon Waste. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, 30:260 – 270, 2003.

ZIMMER, K,ET AL. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 123-137, jul./dez. 2009.