

Estudo da produção enzimática fúngica por basidiomicetos cultivados em resíduos lignocelulósicos

Study of the fungal enzyme production by cultured in basidiomycetes lignocellulosic residues

Luiza Rodrigues Zancan, Andressa Ribas Barreto, Cristiano Ragagnin de Menezes

Universidade Federal de Santa Maria, DTCA-UFSM

Resumo

Resíduos lignocelulósicos são amplamente gerados pelas atividades agrícolas, sendo que grande parte desses materiais não é aproveitada, sendo transformada em poluentes para o meio ambiente. Para que ocorra o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos, foi estudada a capacidade de biodegradação destes substratos por fungos basidiomicetos, mediante a atividade enzimática. As linhagens *Pleurotus* sp 001 (P001) e *Pleurotus* sp 068 (P068), foram cultivadas sobre bagaço de cana, através de fermentação semi-sólida, incubados em estufas à 30° C por períodos de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias. A produção de enzimas celulolíticas ocorreu com valores discretos nas condições estudadas. Porém, para a atividade de enzimas ligninolíticas, a atividade máxima da enzima manganês peroxidase foi observada em valores elevados (18,67 U/L, no 60° dia de incubação). As linhagens P001 e P068 mostraram-se promissoras no uso de substratos lignocelulosicos para produção enzimática. Todavia, estudos mais detalhados se fazem necessários para que sejam obtidas as condições ótimas de produção destas enzimas pelas linhagens estudadas.

Palavras-chave: Resíduos lignocelulósico. Enzimas. Fungos basidiomicetos. Biodegradação.

Abstract

Lignocellulosic residues are largely generated by agricultural activities, and much of this material is not used, being transformed into polluting the environment. For occurs the use of lignocellulosic residues, was studied biodegradability of these substrates by fungi Basidiomycetes, by enzymatic activity. The strains *Pleurotus* sp 001 (P001) and *Pleurotus* sp 068 (P068), were grown on sugarcane bagasse, through solid state fermentation, incubated in greenhouses to 30 degrees C for periods of 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days . The production of cellulolytic enzymes occurred with discrete values in the studied conditions. However, for the ligninolytic enzyme activity, the maximum activity of the manganese peroxidase enzyme was observed in high (18.67 U/L at day 60 of incubation). The strains P001 and P068 shown promise in the use of lignocellulosic substrates for enzyme production. However, more detailed studies are needed so that the optimal conditions of production of these enzymes by strains studied are obtained.

Keywords: Lignocellulosic residues, enzymes, fungi basidiomycetes, biodegradation.

1. Introdução

Ampla variedade e quantidade de resíduos orgânicos são gerados anualmente pela atividade agroindustrial. Os materiais residuais constituem um fator negativo na avaliação econômica das operações agrícolas e florestais provocando efeitos adversos sobre o ambiente no decorrer da sua disposição final (CHANG, 1997). Desde 1986, existe uma série de pesquisas sendo desenvolvidas no país a fim de agregar valor aos produtos e subprodutos da agricultura, principalmente pelo aumento da geração de resíduos agroindustriais. A utilização de resíduos da agroindústria brasileira, além de fornecer diferentes alternativas de substratos para a fermentação, também ajuda nos problemas de poluição (PANDEY et al., 1999).

Uma das possibilidades na degradação de materiais lignocelulósicos é o uso de microrganismos que produzem enzimas específicas que hidrolisam a celulose, como a avicelase, carboximetilcelulase e β -glicosidase (Celulases) enzimas que atuam sobre a porção celulósica, as xilanases, mananases, glucanases e galactanases (Hemicelulases) que atuam sobre a porção hemicelulósica e as enzimas oxidativas como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, definidas como fenoloxidasas, que atuam sobre a lignina (TUOR et al., 1995; CAI et al., 1994; WOOD & GARCIA-CAMPAYO, 1990).

A existência de microrganismos capazes de degradar compostos xenobióticos é de grande interesse para a biorremediação, sendo os fungos de decomposição branca um dos grupos que tem obtido maior notoriedade em estudos relacionados a esta área (CHANDRA & RUSTGI, 1998). Os fungos de decomposição branca, ou seja, os degradadores de lignina, têm obtido crescente êxito em pesquisas relacionadas a biodegradação de poluentes, pois estes são capazes de transformar e mineralizar contaminantes ambientais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes azo, herbicidas, resíduos e outros compostos tóxicos através da ação de suas enzimas extracelulares (CLEMENTE, 2002; NEVES, 2002; LANG et al., 1998).

Os meios de cultivo utilizados em fermentação semi-sólida, na sua maioria, são produtos agrícolas ou sub-produtos de agroindústrias tais como o farelo de arroz, farelo de trigo, bagaço de mandioca, torta de babaçu, bagaço de cana-de-açúcar e farinha de trigo. Estes substratos contêm, geralmente, substâncias macromoleculares como fonte de nutrientes e as enzimas hidrolíticas, secretadas pelo microrganismo, hidrolisam estas macromoléculas e liberam, assim, pequenas moléculas solúveis que podem ser utilizadas para o crescimento (PALMA, 2003; NANDAKUMAR et al., 1999; DALSENTER, 2000; PALMA et al., 2000; SOCCOL et al., 1994; NAGEL et al., 2001).

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Foram utilizadas as linhagens 001 e 068 do fungo *Pleurotus sp.*, mantidas em meio de cultivo PDA (Difco) armazenadas em câmara fria a 16° C, pertencentes à coleção de culturas fúngicas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana – FEA – UNICAMP/SP. O substrato utilizado foi o bagaço de cana-de-açúcar, adquirido na região de Campinas-SP.

2.2 Cultivo sob condição aeróbica

Foram utilizados Erlenmeyers de 300 mL, onde adicionou-se 10 g de substrato a cada frasco e levados à autoclave (121° C por 30 minutos). Depois de esterilizados, os Erlenmeyers receberam os inóculos na proporção de 1 cm² de ágar-micélio para cada 2 g de substrato (5

quadrados por frasco) e 10 mL de água destilada estéril, e após incubados em estufas à 30° C. Os frascos foram incubados durante 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias (REYES, 2003). Este ensaio foi realizado em triplicata. No controle abiótico utilizou-se apenas os substratos submetidos à fermentação semi-sólida (10 mL de água destilada autoclavada), ou seja, não foram inoculados com os microrganismos. Desta forma, eliminou-se a interferência das características do substrato no resultado final de produção enzimática por cada fungo.

2.3 Determinação das atividades enzimáticas lignocelulolíticas

Após o término de cada período de incubação foi adicionado aos Erlenmeyers 100 mL de água destilada esterilizada e em seguida os frascos foram agitados a 150 rpm durante 20 minutos. Posteriormente, o material contido em cada Erlenmeyer foi filtrado em lã de vidro sendo que 40 mL do caldo enzimático obtido foi transferido para frascos âmbar devidamente demarcados, e por fim armazenados em freezer (-20° C).

2.3.1 Determinação das atividades enzimáticas celulolíticas

Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de DNS (ácido-3,5-dinitrosalicílico) conforme MILLER et al. (1960) utilizando-se uma curva padrão de glicose. A unidade de atividade enzimática foi expressa como a liberação de 1 μmol de açúcar redutor por minuto por mL de enzima - $U/L = \mu\text{moles produto/min.} \times \text{Litro}$.

Todas as determinações das atividades enzimáticas foram realizadas em triplicata, acompanhadas do branco do substrato, onde o filtrado foi substituído por água destilada. As leituras da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro, Espectronic 20 - Bausch & Lomb, a 550 nm. Os valores do controle abiótico foram descontados dos resultados obtidos com as amostras.

2.3.1.1 Avicelase

Foi adicionado 1 mL de suspensão 1% de celulose microcristalina em tampão acetato (0,05 M - pH 5,0) e 1 mL de caldo enzimático em pequenos tubos de ensaio, e em seguida foram incubados a 50° C durante 30 minutos. Após o período de incubação, os tubos foram colocados em água gelada e receberam 2,0 mL de DNS. Interrompida a reação, os tubos foram colocados em banho-maria em ebulição por 5 minutos (REYES, 2003). Por fim, as leituras da absorbância foram realizadas.

2.3.1.2 Carboximetilcelulase – CMCase

CMCase foi realizado da mesma forma que para avicelase, porém a suspensão 1% de celulose microcristalina em tampão acetato (0,05 M - pH 5,0) foi substituída pela solução de 1% de carboximetilcelulose em tampão acetato (0,05 M - pH 5,0). Após o período de incubação, os tubos foram colocados em água gelada e receberam 2,0 mL de DNS. Interrompida a reação, os tubos foram colocados em banho-maria em ebulição por 5 minutos (REYES, 2003). Por fim, as leituras da absorbância foram realizadas.

2.5.2 Determinação das atividades enzimáticas ligninolíticas

Todas as determinações das atividades enzimáticas foram realizadas em triplicata. As leituras da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV – 1201/Shimadzu e as atividades foram expressas em U/Litro ($\mu\text{moles produto/min.} \times \text{Litro}$). Os valores do controle abiótico foram descontados dos resultados obtidos com as amostras.

2.3.2.1 Lacase – Lac

A atividade de lacase foi determinada na ausência de H_2O_2 exógeno no meio da reação – tipo lacase (SZKLARZ et al., 1989 – modificado), utilizando-se siringaldazina 0,1% em etanol como substrato. A mistura de reação foi constituída por 0,6 mL de caldo enzimático, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato (0,05 M - pH 5,0), 0,1 mL de água deionizada e 0,1 mL de siringaldazina (1,0 mM) preparada em etanol (0,1%). A reação foi iniciada pela adição de siringaldazina, em temperatura ambiente, e após 10 minutos a oxidação da siringaldazina até sua forma de quinona foi determinada através da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 525 nm ($\epsilon_{525} = 65.000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

2.4.2.2 Lignina Peroxidase – LiP

Foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico (TIEN & KIRK, 1984), a mistura de reação foi constituída por 0,6 mL de caldo enzimático, 0,2 mL de H_2O_2 (2,0 mM) e 0,2 mL de álcool veratrílico (2,0 mM) em tampão tartarato de sódio (0,4 M - pH 4,5). A reação foi iniciada pela adição do H_2O_2 , em temperatura ambiente, e após 10 minutos o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado através da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9.300 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

2.3.2.3 Manganês Peroxidase – MnP

A atividade de MnP foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol na presença de manganês e peróxido de hidrogênio (KUWAHARA et al., 1984). A mistura de reação foi constituída por 0,5 mL de caldo enzimático, 0,1 mL de lactato de sódio (0,25 M), 0,2 mL de albumina bovina (0,5%), 0,05 mL de MnSO_4 (2,0 mM), 0,05 de uma solução de H_2O_2 (2,0 mM) preparada em tampão succinato de sódio (0,2 M - pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol (0,1%). A reação foi iniciada pela adição do vermelho de fenol, em temperatura ambiente. Após 5 minutos, a reação foi interrompida adicionando-se 0,04 mL de NaOH (2,0 N) e a oxidação do vermelho de fenol foi determinada através da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 610 nm ($\epsilon_{610} = 4.460 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

3. Resultados e discussão

3.1 Análise do desenvolvimento micelial

Até a primeira semana de incubação (0-7 dias), não foi observado nenhum crescimento micelial significativo no substrato utilizado. De acordo com CHANG (1997) alguns basidiomicetos apresentam a capacidade de produzir simultaneamente as enzimas hidrolíticas e oxidativas necessárias para degradar substratos lignocelulósicos e que a maioria dos fungos de podridão branca produz estas enzimas de forma a prover sua adaptação ao meio extremamente rico em lignoceluloses.

Estudos conduzidos por WEILAND (1988) demonstraram que a maioria dos fungos basidiomicetos cresce melhor à faixa de temperaturas entre 20-30° C e que o controle da

temperatura do desenvolvimento fúngico é um fator primordial na regulação da fermentação semi-sólida para a otimização dos processos de deslignificação. Porém, mesmo com o controle da temperatura não foi observado nenhum crescimento microbiano do fungo *Pleurotus sp.* 068 após 12 dias de incubação em bagaço de cana-de-açúcar. Outro estudo, conduzido por RAJARATHNAM & BANO (1987) observou que espécies de *Pleurotus* não se desenvolveram bem sobre o bagaço de cana-de-açúcar, e justificaram este fato à incapacidade metabólica do fungo para utilizar os açúcares disponíveis no bagaço. O estudo apontou para a alternativa de se utilizar juntamente com o bagaço de cana-de-açúcar outros resíduos agrícolas, que também estão abundantemente disponíveis, como o farelo de arroz e farelo de trigo, ricos em proteínas, lipídios, vitaminas e sais minerais, além da fração lignocelulósica, de forma a favorecer o desenvolvimento micelial fúngico (LUH et al., 1991; POMERANZ, 1988).

3.2 Avaliação das atividades enzimáticas celulolíticas produzidas pelas linhagens fúngicas

3.2.1 Atividade de Avicelase

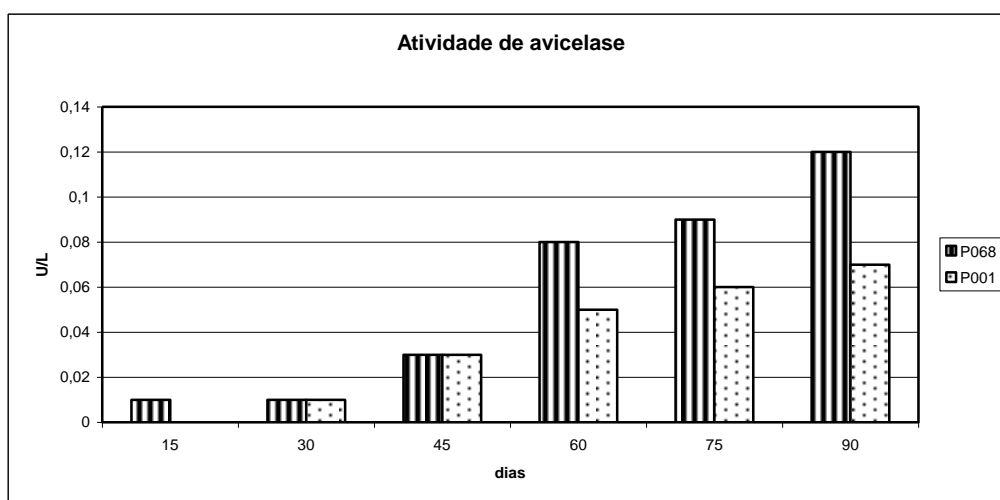


Figura 1. - Atividade da enzima avicelase sobre o substrato bagaço de cana produzida pelas linhagens fúngicas (*Pleurotus sp* 068 (P068) e *Pleurotus sp* 001 (P001) no período de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, sob fermentação semi-sólida.

De acordo com os dados figura 1, demonstrou-se que foram obtidas atividades da enzima avicelase durante todos os períodos analisados de incubação, para os dois fungos estudados. Para a linhagem P068 foi verificado o aumento dos valores de atividade da enzima avicelase no decorrer do período de incubação, sendo que a maior atividade foi observada no 90º dia com 0,12 U/L. Já para o fungo P001, a obtenção de atividade da enzima ocorreu à partir do 30º dia de incubação, alcançando a maior atividade no 90º dia com 0,07 U/L. Porém, estes resultados apontaram para baixas atividades de avicelase. FERNANDEZ (1996) relatou que o bagaço de cana é um material bastante heterogêneo constituído por uma mistura de fibras, como celulose, hemicelulose e lignina, além de tecidos parenquimatosos. Além disso, apresenta em sua composição um elevado teor de açúcares totais (glicose, frutose, sacarose, rafinose, etc.), o que segundo RAJARATHNAM & BANO (1987), poderia delimitar o desenvolvimento de *Pleurotus sp.* e principalmente, dificultar a produção de enzimas celulolíticas, como a avicelase.

3.2.2 Carboximetilcelulase

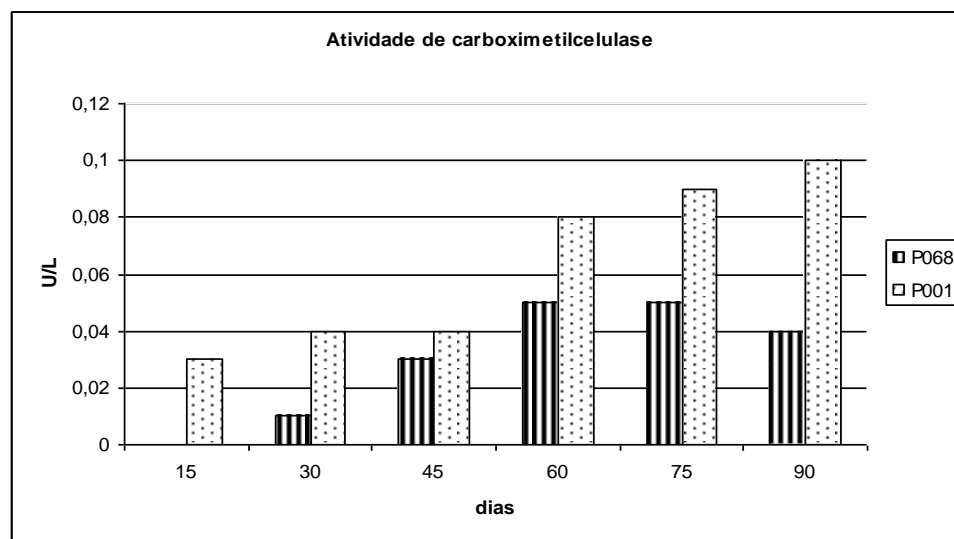


Figura 2. - Atividade da enzima carboximetilcelulase sobre o substrato bagaço de cana produzida pelas linhagens fúngicas (*Pleurotus* sp 068 (P068) e *Pleurotus* sp 001 (P001) no período de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, sob fermentação semi-sólida.

A figura 2 demonstra que a atividade máxima de carboximetilcelulase foi verificada em bagaço de cana inoculado com *Pleurotus* sp 001 no 90º dia, com atividade de 0,10 U/L. Já para *Pleurotus* sp 068 a atividade foi muito mais baixa, alcançando a atividade máxima no 60º 75º dia, com atividade de 0,05 U/L.

De acordo com TAN & WAHAB (1997), os fungos de podridão branca exibem baixa atividade celulolítica relativa no estágio anamórfico, pois se desenvolvem, principalmente, em substratos altamente lignificados como a madeira e a serragem, além de produzirem enzimas ligadas à polimerização da lignina. Isso deve-se, principalmente, a maior proporção da fração lignina nestes resíduos, em comparação as frações de celulose e hemicelulose existentes. Estes autores cultivaram *P. sajor-caju* sobre resíduos de algodão e serragem de madeira e verificaram que foram produzidas maiores atividades de celulasas sobre o primeiro substrato.

3.3 Avaliação das atividades enzimáticas ligninolíticas produzidas pelas linhagens 068 e 001

3.4.1 Lacase – Lac

De acordo com os resultados apresentados na figura 3, foi demonstrado que durante todo o período de incubação, foram obtidos valores de atividade da enzima lacase. Para a linhagem P068 o maior valor de atividade obtida foi no dia 75, com 1,80 U/L e para a linhagem P001 a maior atividade detectada foi no 90º dia, com o valor de 1,90 U/L. Porém, estes resultados foram muito baixos, se comparados com os estudos de KUMARAN et. al. (1997), que utilizando a biodegradação por fermentação semi-sólida obtiveram para o fungo *Pleurotus sajor-caju* o valor de 10,6 U/L de atividade de lacase, em substrato lignocelulósico semelhante.

A enzima lacase é uma glicoproteína polifenoloxidase que contém cobre no seu sítio ativo e catalisa a redução de O₂ para água, com simultânea oxidação de substratos fenólicos. A catálise de substratos fenólicos e compostos modelos de lignina por lacase ocorrem via transferência de um elétron, conduzindo à geração de radicais fenoxila, que podem ser convertidos a quinonas

(LEONOWICZ, 2001). E em relação ao processo de degradação, estudos de STURION (1994) registraram que a degradação da lignina por *Pleurotus sp.* através da lacase é maior durante a fase de colonização do substrato pelo micélio. A quebra da lignina permite a liberação de celulose e hemicelulose nesta primeira fase do ciclo de vida fúngico, facilitando o acesso enzimático biodegradativo das celulases e hemicelulases.

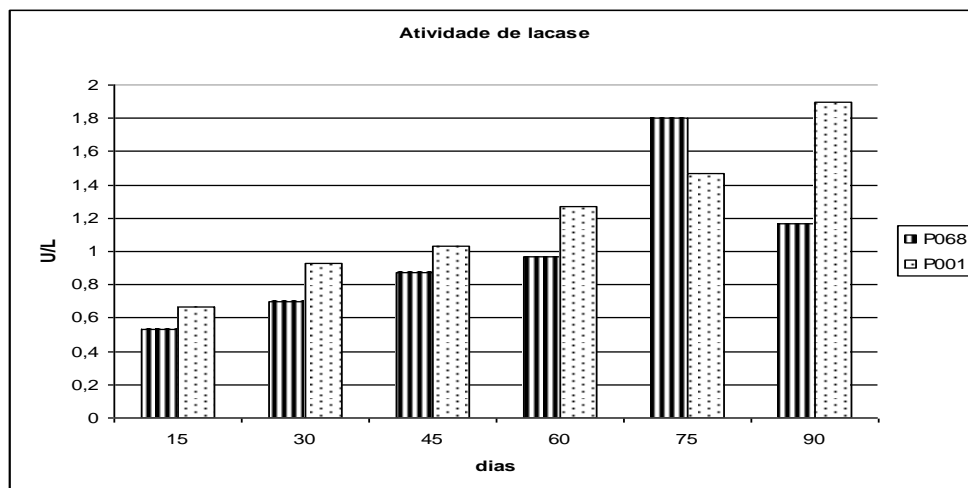


Figura 3. - Atividade da enzima lacase sobre o substrato bagaço de cana produzida pelas linhagens fúngicas (*Pleurotus sp* 068 (P068) e *Pleurotus sp* 001 (P001) no período de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, sob fermentação semi-sólida.

3.3.2 Lignina Peroxidase – LiP

A figura 4 demonstra que foram obtidos resultados de atividade da enzima lignina peroxidase durante todo o período de incubação para ambas as linhagens fúngicas. Para o fungo P068, a maior atividade obtida foi no 60º dia de incubação com 1,87 U/L. Para a linhagem P001, os resultados foram superiores, com atividade máxima da enzima lignina peroxidase nos dias 75 e 90 de incubação, com o mesmo valores de 5,67 U/L. Estudo conduzido por REGINATO (1992) demonstrou que podem ocorrer flutuações ou oscilações nas atividades enzimáticas de lignina peroxidase durante o crescimento de um microrganismo, devido á diversos fatores, tais como: a variação do pH, que pode causar inativação de algumas enzimas e estimular a secreção de outras; a possibilidade de algumas formas de enzimas poderem sofrer ataque proteolítico preferencial e o ultimo fator que pode ocorrer durante o crescimento do microrganismo, onde a enzima lignina peroxidase pode ser adsorvida pelos substratos insolúveis e serem liberadas após a exaustão da celulose.

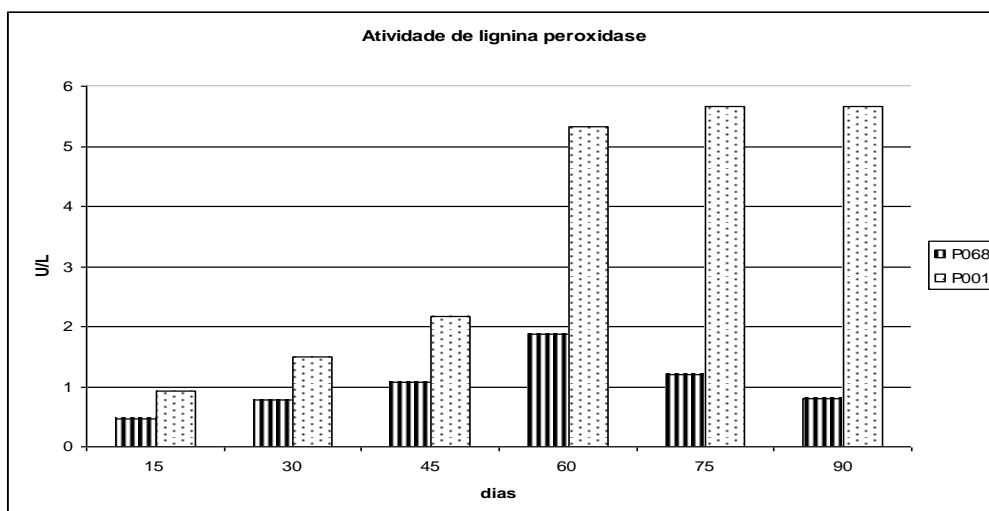


Figura 4. - Atividade da enzima lignina peroxidase sobre o substrato bagaço de cana produzida pelas linhagens fúngicas (*Pleurotus* sp 068 (P068) e *Pleurotus* sp 001 (P001) no período de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, sob fermentação semi-sólida.

3.3.3 Manganês Peroxidase – MnP

Os resultados apresentados na figura 5, demonstram que em todos os períodos de incubação foram detectadas atividades enzimáticas de manganês peroxidase. Para a linhagem P001, as atividades da enzima oscilaram entre 1,67 U/L (15° dia) e 5,67 U/L (60° dia). Porém, para a linhagem P068, os valores foram bem mais elevados, chegando a uma atividade de 18,67 U/L no 60° dia de incubação. A enzima manganês peroxidase é produzida durante o metabolismo secundário e é regulada pelas concentrações de carbono e nitrogênio no meio de cultura. É cataliticamente dependente de H_2O_2 e íons Mn (II), e α -cetoácidos que estabilizam a sua atividade oxidativa (VALASKOLÁ, 2005). Os resultados obtidos pela linhagem P068 foram muito similares aos encontrados por (VIKINESWARY et. al. 2005), em todos os resíduos agroindustriais testados para a produção da enzima, utilizando o fungo *P. sanguineos*, que revelou-se grande produtor desta enzima em 11 dias de fermentação sólida. Geralmente, este tipo de enzima possui alto nível de atividade com estes tipos de cultivo, o que pode estar correlacionado com a boa estabilidade das isoenzimas produzidas (COUTO et al., 2000).

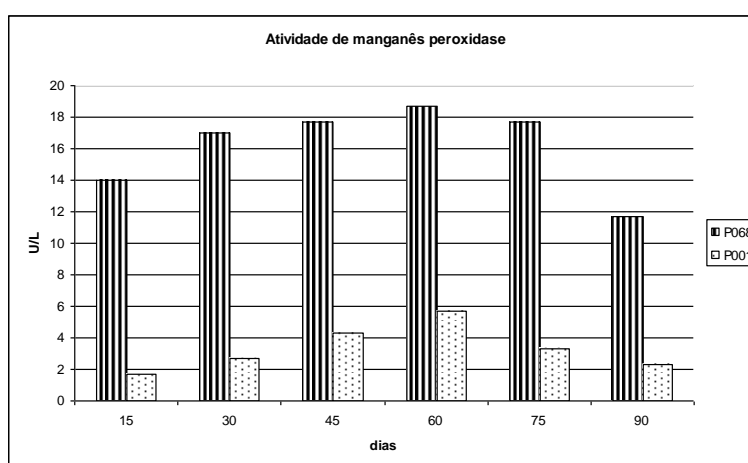


Figura 5. - Atividade da enzima Manganês peroxidase sobre o substrato bagaço de cana produzida pelas linhagens fúngicas (*Pleurotus* sp 068 (P068) e *Pleurotus* sp 001 (P001) no período de 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, sob fermentação semi-sólida.

4. Conclusões

As linhagens 001 e 068 mostraram-se promissoras no uso de substratos lignocelulolíticos para produção enzimática. O bagaço de cana é um resíduo que permite esta avaliação, pois possui quantidades significativas de lignina e celulose. No entanto, são necessários estudos mais detalhados para que sejam obtidas condições ótimas de produção destas enzimas pelas linhagens estudadas, aumentando assim a eficiência enzimática e a eficiente biodegradação destes resíduos.

5. Bibliografia

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Standart practice for determinig resistence of plastics to fungi, G21-90, 1990.

CAI, Y.J.; BUSWELL, J.A.; CHANG, S.T. Production of cellulases and hemicellulases by the straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **Mycological Research**, New York, v. 98, part. 9, p. 1019-1024, Sep, 1994.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. **Degradable polymers Prog**, Polym. Sci., v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHANG, S.T. Bioconversion technology: **Composting and production of microbial and metabolites**, In: **Workshop sul-americano sobre usos alternativos de resíduos de origem florestal e urbana**. Anais. Colombo: EMBRAPA-Floretas, Curitiba, p. 71-82, 1997.

CLEMENTE, A.R.; DURRANT, L.R. Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos pro fungos. Dissertação de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

COUTO, S.R.; RIVELA, I.; MUNOZ, M.R. & SANROMAN, A. Stimulation the ligninolytic enzyme production and the ability to decolourise Poly R-478 in semi-solid-state cultures of *Phanerochate chrysosporium*. **Biores. Technol.**, v. 74, p. 159-164, 2000.

DALSENTER, F.D.H. Contribuição ao Estudo da proposta ZERI para um Resíduo Agroindustrial Utilizando Processo Biotecnológico. Dissertação de Mestrado, FURB, Blumenau, SC, 2000.

FERNANDEZ, N. Pulp and paper development from sugar cane bagasse. In: **THIRD INTERNATIONAL NON-WOOD FIBER PULPING AND PAPERMAKING CONFERENCE PROCEEDINGS**. Oct., p. 231-240, 1996.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A & GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Left.**, n. 169, p. 247-250, 1984.

KUMARAN, S.; SASTRY, C.A.; VIKINESWARY, S.; Laccase, cellulose and xylanase activities during growth of *Pleurotussajor-caju* on sago "hampas". **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 43-49, 1997.

LANG, E.; NERUD, F.; ZADRAZIL, F. Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus* sp and *Dichomitus squalens* in soil and lignocellulose substrate as influence by soil microorganisms. **FEMS Microbiol, Lett**, v. 167, p.239-244, 1998.

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

LUH, B.S. et al. Rice – Utilization. Van Nostrand Reinold, New York, v.2, p. 313-362, 1991.

MILLER, G.L.R.; BLUM, R.; GLENNON, W.E. & BURTON, A.L. Measurement of Carboxylcellulose Activity. **Anal. Biochem.**, n. 2, p. 127-132, 1960.

NAGEL, F.J.; VAN AS, H.; TRAMPER, R.; RINZEMA, A. Water and Glucose Gradients in the Substrate Measured with NMR Imaging During Solid-State Fermentation with *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering**: v. 79, p. 653-663, 2002.

NANDAKUMAR, M.P.; THAKUR, M.S.; RAGHAVARAO, K.S.M.S.; GHILDYAL, N.P. Studies on Catabolite Repression in Solid State Fermentation for Biosynthesis of Fungal Amylases. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p. 380- 384, 1999.

NEVES, E.B.; DURRANT, L.R. Degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias. Dissertação de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

PALMA, M.; PINTO, A.L.; GOMBERT, A.K.; SEITZ, K.H.; KIVATINITZ, S.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid state waste of industrial babassu oil production as substrate. **Applied Biochemistry an Biotechnology**, v. 84-86, p.1137-1145, 2000.

PALMA, M.B. Produção de Xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em Cultivo em Estado Sólido. Tese de Doutorado, UFSC, Florianópolis, SC, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. & SOCCOL, V. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Biores. Technol.**, n. 74, p. 69-80, 1999.

PAVARINA, E.C. Estudo dos sistemas celulolítico e fermentativo de fungos microaeróbios facultativos. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, p. 82, Campinas, 1997

POMERANZ, Y. Chemical composition of kernel structures. Wheat – chemistry and technology. **American Assosiation of Cereal Chemists**, St. Paul, p. 97-158, 1988.

RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. *Pleurotus*, Mushrooms. Part I A - Morphology, life cycle taxonomy, breeding and cultivation. **CRCC – Food Sc. Nutr.**, n. 26, p. 157-311, 1987.

REGINATTO, V. Estudo das enzimas produzidas por *Trichoderma longibrachiatum* responsáveis pela degradação de materiais celulósicos. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, p. 147, Campinas, 1992.

REYES, L.F. Estudo da Degradação de PET por Fungos Basidiomicetos Ligninolíticos. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003.

SOCOL, C.R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J.M. Potencial of Solid State fermentation for Production of L(+) Lactic Acid by *Rhizopus oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 286-290, 1994.

STURION, G.L. Utilização da folha de bananeira como substrato para cultivo de cogumelos comestíveis (*Pleurotus spp.*). Dissertação de Mestrado – ESALQ – USP – Piracicaba – p. 56, 1994.

SZLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L. & LINKINS, A.E. Production of phenol – oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycol.**, n. 81, p. 234-240, 1989.

TAN, Y.; WAHAB, M.N. Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. London, Nov., v. 13, n. 6, p. 613-617, 1997.

TIEN, M. & KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, n. 84, p. 2280-2284, 1984.

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

VALASKOLÁ, V.; BALDRIAN, P. Estimulation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. **Research in Microbiology**, 2005.

VIKINESWARY, S.; NOORLIDAH, A.; RENUVATHANI, M.; SEKARAN, M.; PANDEY, A.; JONES, E.B.G.. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**, v.97, p. 171-177, 2005.

WEILAND, P. Principle of solid state fermentation. In: ZADRAZIL, F.; REINIGER, P. (Ed.). Treatment of lignocellulosics with white-rot-fungi, Amsterdam, **Elsevier Applied Science**, p. 64-76, 1988.

WOOD, T.M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. **Biodegradation**, Netherlands, v.1, n. 2/3, p. 147-167, 1990.