



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



“Purificação e caracterização bioquímica de manganês peroxidase de *Bacillus pumilus* e *Paenibacillus* sp. e sua atuação na remoção da cor do efluente da indústria papaleira”.

Patrícia Lopes de Oliveira

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos, área: **Microbiologia**

Campinas
Março / 2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



“Purificação e caracterização bioquímica de manganês peroxidase de *Bacillus pumilus* e *Paenibacillus* sp. e sua atuação na remoção da cor do efluente da indústria papaleira”.

Patrícia Lopes de Oliveira

ORIENTADORA: Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant – FEA/UNICAMP

CO-ORIENTADORA: Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte – CPQBA/UNICAMP

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos, área: **Microbiologia**

Campinas
Março / 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

OL4p

Oliveira, Patrícia Lopes de
Purificação e caracterização bioquímica de manganês peroxidase de *Bacillus pumilus* e *Paenibacillus* sp. e sua atuação na remoção da cor do efluente da indústria papaleira / Patrícia Lopes de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Lúcia Regina Durrant
Co-orientador: Marta Cristina Teixeira Duarte
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Bacillus pumilus*. 2. *Paenibacillus* sp. 3. Manganês peroxidase. 4. Remoção da cor. 5. Efluente papaleiro. I. Durrant, Lúcia Regina. II. Duarte, Marta Cristina Teixeira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(ckn/fea)

Titulo em inglês: Purification and biochemical characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. and its performance in the color removal of the paper industry effluent

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus* sp., Manganese peroxidase, Color removal, Paper effluent

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Lúcia Regina Durrant

Marta Cristina Teixeira Duarte

Eleonora Cano Carmona

Alexandre Nunes Ponezi

Ranulfo Monte Alegre

Programa de Pós-Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte
(Co-orientadora)

Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona
(Membro)

Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi
(Membro)

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(Membro)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Romão e Marli, que sempre me incentivaram e apoiaram, que eu amo tanto, e devo a eles tudo o que sou...obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Em especial a Deus por sempre me guiar e iluminar.

À Profa. Dra. Lúcia R. Durrant pela orientação e atenção concedida nos momentos em que precisei.

À Profa. Dra. Marta C. T. Duarte, por todos os ensinamentos e durante essa jornada foi mais do que co-orientadora, foi uma amiga para todas as horas.

Ao Prof. Dr. Alexandre N. Ponezi, sempre compreensivo, pronto para ensinar e fazer rir.

À Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona e ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre, por aceitarem compor a banca examinadora e pelas sugestões pertinentes.

Às amigadas conquistadas durante esse trajeto no Laboratório de Microbiologia-CPQBA-Unicamp: Éricka, Márcia, Camila, Giuliana, Sandrinha, Ana Flávia, Ana Paula, Bruna, Vivian, Aline Maria, Renata, Maira, Fabiano, Armando, Edilberto e tantos outros que contribuíram com esse laboratório e irei me estender muito se citar todos!

Ao pessoal do laboratório de Fisiologia e Sistemática Microbiana, Fea-Unicamp, principalmente ao Emerson, Elisângela e Maricy.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação e da secretaria de Ciência de Alimentos, Fea-Unicamp, pelo esclarecimento da parte burocrática durante essa jornada.

À Regianne pela amizade e pelo empréstimo do mini-sistema de eletroforese.

Ao Prof. Nelson, responsável pelo Laboratório de Análises Químicas da Sanasa-Campinas, pela permissão para realizar os testes de cor real e pelos bate-papos com ele e sua equipe, que também foram muito acolhedores.

Aos meus amigos que sempre estão ao meu lado, me incentivando e transmitindo energia positiva.

À minha grande família: avós, tios, primos e ao meu querido irmão Patrick, que sempre mostraram interesse pelos meus estudos!

À minha pequena.

Ao Carlos pelo amor, compreensão, amizade e mesmo com a distância está sempre presente em meus pensamentos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. PRODUÇÃO DE LIGNINASES POR FUNGOS.....	4
2.2. PRODUÇÃO DE LIGNINASES POR BACTÉRIAS.....	14
2.3. APLICAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	17
2.3.1. APLICAÇÕES DE LIGNINASES NA INDÚSTRIA DE CELULOSE E PAPEL.....	20
2.4. INDÚSTRIA PAPELEIRA E PROBLEMÁTICA DO EFLUENTE GERADO.....	24
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. MATERIAL.....	28
4.1.1. Microrganismos.....	28
4.1.2. Meios de cultura.....	28
4.1.2.1. Meio para manutenção de <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp.....	28
4.1.2.2. Meio para crescimento e produção de enzimas.....	29
4.1.3. Efluente industrial.....	29
4.1.4. Reagentes.....	29
4.2. MÉTODOS.....	29
4.2.1. Manutenção de <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp.....	29
4.2.2. Preparo de inóculo.....	30
4.2.3. Produção de MnP por <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp.....	30
4.2.4. Cinética da produção de MnP por <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp.....	30
4.2.5. Efeito de indutores sobre a produção de MnP por <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp.....	31
4.2.6. Purificação e caracterização da MnP de <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp....	31

4.2.6.1. Purificação	31
4.2.6.2. Caracterização.....	32
4.2.6.2.1. Eletroforese em gel de SDS-PAGE.....	32
4.2.6.2.2. Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade da MnP purificada.....	33
4.2.7. Determinação da atividade de MnP.....	33
4.2.8. Descoloração do efluente da indústria papelreira.....	34
4.2.8.1. Determinação da cor real.....	34
4.2.8.2. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	35
4.2.8.3. Cromatografia de permeação em gel	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1. Cinética da produção de MnP por <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp. e efeito de indutores.....	36
5.2. Purificação e caracterização da MnP de <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp.....	40
5.2.1. Purificação.....	40
5.2.2. Eletroforese em gel de SDS-PAGE.....	44
5.3. Determinação do pH ótimo e temperatura ótima de atividade da MnP purificada.....	46
5.4. Estudos da descoloração do efluente da indústria papelreira.....	50
5.4.1. Determinação da cor real.....	51
5.4.2. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	54
5.4.3. Cromatografia de permeação em gel do efluente da indústria papelreira...	56
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Produção de MnP por <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp. na ausência de indutores.....	37
Figura 2 – Produção de MnP por <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp. na presença de indulina AT.....	37
Figura 3 – Produção de MnP por <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp. na presença de álcool veratrílico.....	37
Figura 4 – Produção de MnP por <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp. na presença de ácido lignocelulósico dissulfonado.....	38
Figura 5 – Produção de MnP por <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp. na presença de ácido lignocelulósico.....	38
Figura 6 – Produção de MnP por <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp. na presença de guaiacol.....	38
Figura 7 – Perfil de eluição do caldo bruto do cultivo de <i>B. pumilus</i> em cromatografia de interação hidrofóbica, utilizando resina Fenil Sepharose. Tampão sulfato de amônio de 1,7 a 0 M e tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, fluxo de 3,0 mL/min.....	41
Figura 8 – Perfil de eluição do caldo bruto do cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp. em cromatografia de interação hidrofóbica, utilizando resina Fenil Sepharose. Tampão sulfato de amônio de 1,7 a 0 M e tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, fluxo de 3,0 mL/min.....	41
Figura 9 – Eletroforese em SDS-PAGE: A – Padrões; B – MnP purificada de <i>B. pumilus</i> . Coloração com Coomassie blue.....	45
Figura 10 – Eletroforese em SDS-PAGE: A – Padrões; B – MnP purificada de <i>Paenibacillus</i> sp. Coloração com Coomassie blue.....	45
Figura 11 – Atividade de MnP de <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp. em pH 5,0 e pH 6,0 – tampão citrato-fosfato 0,2 M; pH 7,0 e pH 8,0 – tampão fosfato de sódio 0,2 M; pH 9,0 e pH 10,0 – tampão glicina-NaOH 0,2 M.....	47
Figura 12 – Atividade de MnP de <i>B. pumilus</i> , em pH 8,0 – tampão fosfato de sódio 0,2 M e de <i>Paenibacillus</i> sp., em pH 9,0 – tampão glicina-NaOH 0,2 M, em diferentes valores de temperatura.....	47
Figura 13 – Remoção da cor real do efluente da indústria papaleira tratado com <i>B. pumilus</i>	52
Figura 14 – Remoção da cor real do efluente da indústria papaleira tratado com <i>Paenibacillus</i> sp.....	52
Figura 15 – Remoção da DQO do efluente da indústria papaleira tratado com <i>B. pumilus</i>	55
Figura 16 – Remoção da DQO do efluente da indústria papaleira tratado com <i>Paenibacillus</i> sp.....	55

Figura 17 – Perfil da massa molar do efluente da indústria papaleira a pH 9,0 em cromatografia de permeação em gel, utilizando resina Sephadex G-75. Tampão NaOH e LiCl em sistema isocrático, fluxo de 2,0 mL/min.....	57
Figura 18 – Perfil da massa molar do efluente da indústria papaleira a pH 9,0 após 48 h de tratamento com <i>B. pumilus</i> em cromatografia de permeação em gel, utilizando resina Sephadex G-75. Tampão NaOH e LiCl em sistema isocrático, fluxo de 2,0 mL/min.....	57
Figura 19 – Perfil da massa molar do efluente da indústria papaleira a pH 9,0 após 48 h de tratamento com <i>Paenibacillus</i> sp. em cromatografia de permeação em gel, utilizando resina Sephadex G-75. Tampão NaOH e LiCl em sistema isocrático, fluxo de 2,0 mL/min.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização bioquímica e purificação de ligninases fúngicas nos últimos anos.....	10
Tabela 2 – Síntese das etapas de purificação da MnP a partir do caldo bruto do cultivo de <i>B. pumilus</i>	42
Tabela 3 – Síntese das etapas de purificação da MnP a partir do caldo bruto do cultivo de <i>Paenibacillus</i> sp.....	43
Tabela 4 – Atividade de MnP encontrada na literatura para diferentes microrganismos...	50
Tabela 5 – Remoção da cor real do efluente com diferentes valores de pH após tratamento com <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp.....	51
Tabela 6 – Remoção da DQO do efluente com diferentes valores de pH após tratamento com <i>B. pumilus</i> e <i>Paenibacillus</i> sp.....	54

RESUMO

No presente trabalho a produção de manganês peroxidase (MnP) pelas bactérias *Bacillus pumilus* e *Paenibacillus* sp. foi estudada na ausência e presença de indutores. As cinéticas de produção enzimática mostraram que a utilização de indulina AT no meio de cultivo de *B. pumilus* aumentou a atividade da MnP, propiciando 31,66 U/L após 8 h, enquanto a utilização de indutores no meio de cultivo de *Paenibacillus* sp. não causou aumento da MnP, e a cultura sem a presença de indutores apresentou atividade da MnP de 12,33 U/L, após 20 h. As MnPs produzidas por estes microrganismos foram purificadas em resina Fenil Sepharose e as proteínas de ambos os caldos brutos foram eluídas em duas frações, porém apenas as primeiras frações apresentaram atividade para a enzima. Ensaio a diferentes valores de pH e temperatura, de pH 5,0 a pH 10,0 e 25 °C a 60 °C foram realizados com as MnPs purificadas para verificar as condições ótimas de atuação das enzimas. Para a MnP de *B. pumilus* a máxima atividade foi de 4,3 U/L a pH 8,0 e 25 °C, enquanto para a MnP de *Paenibacillus* sp. a máxima atividade foi de 11,74 U/L a pH 9,0 e 45 °C. Através de eletroforese SDS-PAGE, verificou-se que a massa molar da MnP purificada de *B. pumilus* foi de 25 kDa e de *Paenibacillus* sp. foi de 40 kDa. As bactérias foram aplicadas separadamente em efluente da indústria papeleira com pH corrigido para pH 7,0, 9,0 e 11,0, para verificação da remoção da cor e da DQO. As remoções da cor real e DQO em pH 9,0 foram respectivamente de 41,87% e 22,08% após o tratamento com *B. pumilus* e 42,30% e 22,89% após tratamento com *Paenibacillus* sp., ambos de 48 h de tratamento. Para verificar as massas molares dos compostos presentes no efluente não tratado e tratado, foi utilizada cromatografia de permeação em gel. Pode-se verificar que houve diminuição dos compostos responsáveis pela cor do efluente da indústria papeleira.

ABSTRACT

The production of manganese peroxidase (MnP) from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. was studied under absence and presence of inducers. The enzymatic production showed that indulin AT increased the MnP activity in the *B. pumilus* culture medium up to 31.66 U/L after 8 h, while the inducers did not provide changes in the MnP activity in the *Paenibacillus* sp. culture medium, which reached maximum activity of 12.22 U/L after 20 h. The MnPs produced by these microorganisms were purified in Fenil Sepharose resin and proteins from both crude enzymes eluted two fractions, however only the first ones exhibited MnP activity. Tests in different pH and temperature values, from pH 5.0 to pH 10.0 and 30 °C to 60 °C, respectively, were accomplished with purified MnP to verify the optimum conditions for maximum activity. For MnP activity from *B. pumilus* the maximum activity was 4.3 U/L in pH 8.0 at 25 °C and for MnP activity from *Paenibacillus* sp. the maximum activity was 11.74 U/L in pH 9.0 at 45 °C. The molar masses determined by SDS-PAGE gel eletrophoresis were 25 kDa for the purified enzyme from *B. pumilus* and 40 kDa for purified enzyme from *Paenibacillus* sp. The bacteria were applied to the paper industry effluent to investigate the colour remotion. Inoculum were individually applied in effluent with corrected pH to 7.0, 9.0 and 11.0. After the effluent treatment with microorganisms, tests were carried out to verify the real colour and COD remotion. The real colour and COD remotion in pH 9.0 effluent were respectively 41.87% and 22.08% after *B. pumilus* treatment and 42.30% and 22.89% after *Paenibacillus* sp. treatment, both of 48 h. Gel permeation chromatography was used to verify the molar masses of compounds present in the non-treated and treated effluent, showing a decrease in the compounds responsible for the paper industry effluent colour.

1. INTRODUÇÃO

A indústria de polpa e papel está em face de novas mudanças e adequações a regulamentações ambientais, competição global e novas demandas de marketing, que estão modificando sua tecnologia de produção e processos. As enzimas estão entre as ferramentas que poderão ajudar as indústrias a alcançar novas metas (SIIKA-AHO et al., 2001).

O número de aplicações industriais de enzimas na polpa e manufatura do papel tem crescido constantemente, e várias têm alcançado ou estão em vias de uso comercial. Essas incluem o uso de xilanases no branqueamento da polpa, a deslignificação com enzimas oxidativas, recuperação de energia de refino com celulases, a redução do piche com lipases, melhora da drenagem com celulases e hemicelulases, bem como controle enzimático de gomas da máquina de papel (SIIKA-AHO et al., 2001).

Embora enzimas que atuem sobre os componentes principais da madeira, tais como celulose e hemicelulose sejam bem conhecidas, estas atuam indiretamente sobre o branqueamento, e a enzimologia de ligninas e extrativos é ainda pouco conhecida e explorada. Oxidases, peroxidases, desidrogenases e enzimas geradoras de peróxido de hidrogênio são as principais enzimas responsáveis pela deslignificação, apresentando efeito direto sobre o branqueamento. Devido aos resultados promissores no branqueamento da polpa kraft, lacases e peroxidases dependentes de manganês têm sido estudadas.

A indústria de polpa e papel produz efluentes com altas DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio). Um dos problemas específicos que ainda não foram resolvidos é a forte cor marrom do efluente, que é devida primeiramente à lignina e seus derivados liberados a partir do substrato e descarregados nos efluentes,

principalmente a partir da polpação, branqueamento e estágios de recuperação química (RAGUNATHAN e SWAMINATHAN, 2004). Sistemas de tratamentos biológicos são particularmente atrativos, uma vez que em adição à cor eles podem reduzir a DBO e DQO do efluente (BAJPAI e BAJPAI, 1994). Entre vários microrganismos usados, fungos da podridão branca da raiz têm mostrado potencial no tratamento de efluentes lignina/fenólicos. No entanto, apesar das ligninases terem sido consideradas até pouco tempo como enzimas exclusivamente fúngicas, a atividade de lacase foi detectada na bactéria *Azospirillum lipoferum* (GIVAUDAN et al., 1993), o que demonstra que ligninases não são restritas a eucariotos.

Inúmeros trabalhos sobre a produção de ligninases por fungos mostram que existem múltiplas aplicações biotecnológicas para estas enzimas, sendo que muitos estudos estão apenas se iniciando. No caso da produção por bactérias, poucas menções são encontradas na literatura.

As bactérias *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 e *Paenibacillus* sp. CBMAI 868 são aptas a produzir enzimas xilanolíticas tolerantes a álcali e termotolerantes. Foi verificado que estas produzem também manganês peroxidase. A determinação das condições ótimas para atuação da MnP de *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. torna-se necessária para se alcançar atividades máximas. Ainda, estudos da atuação dos microrganismos no efluente da indústria do papel, conduzirão a um melhor entendimento sobre os mecanismos de ação para a remoção da cor do efluente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Alguns exemplos da utilização de enzimas e/ou microrganismos dentro do processo de manufatura da polpa de celulose são a utilização de pectinases no descascamento das madeiras, biodeslignificação dos cavacos por fungos ligninolíticos, biobranqueamento das polpas com xilanases, ligninases e lacases, tratamento dos efluentes por enzimas ligninolíticas ou pelos fungos degradadores da madeira, dentre outros (ANGELO, 1999). A promessa é que a utilização de enzimas possa resultar na redução do consumo de energia, melhor uso dos materiais brutos ou de produtos químicos, bem como a redução do impacto ambiental de seus efluentes (VIKARI et al., 1991).

De fato, os efluentes gerados pelas indústrias de polpa e papel constituem um tema de significativa preocupação ambiental (SAHOO e GUPTA, 2005). A cor marrom desses efluentes é devida principalmente ao alto conteúdo de compostos oxidados e lignina parcialmente degradada. A cor não é somente esteticamente inaceitável como também inibe o processo natural de fotossíntese devido à absorção da luz do sol. Isso desencadeia efeitos adversos sobre o ecossistema aquático. Se os efluentes das indústrias de polpa e papel não forem tratados ou forem parcialmente tratados, isso resultará na persistência da cor no corpo d'água receptor por longa distância. Os sistemas de tratamentos biológicos aeróbios e anaeróbios podem reduzir a DBO, mas não podem remover a cor escura dos efluentes.

Embora alguns métodos físicos e químicos sejam efetivos na descoloração dos efluentes da indústria de polpa e papel, todos têm desvantagens tais como alto custo por unidade de volume de efluente tratado ou não confiabilidade na operação (VENKATARAMAN, 1990; JOYCE et al., 1984). Sistemas de tratamento biológicos são

particularmente atrativos, uma vez que em adição à cor eles podem reduzir a DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio) do efluente (BAJPAI e BAJPAI, 1994). Entre vários microrganismos usados, fungos da podridão branca da raiz têm mostrado potencial no tratamento de efluentes lignina/fenólicos. Vários pesquisadores têm também mostrado que efluentes de plantas kraft podem ser parcialmente descoloridos por esses fungos (RAGUNATHAN e SWAMINATHAN, 2004).

Uma área de aplicação de enzimas lignocelulolíticas é então, no tratamento de efluentes industriais. Processos de biotratamento desses efluentes estão agora sendo considerados, a maioria dos quais utiliza fungos degradadores de lignina. Dependendo do processo de tratamento, o inóculo do fungo para descoloração pode ser usado na forma de micélio, pellets ou no estado imobilizado. Enzimas ligninolíticas imobilizadas podem também ser empregadas para descoloração do efluente.

2.1. PRODUÇÃO DE LIGNINASES POR FUNGOS

Lignina é o nome dado a um grupo heterogêneo de polímeros fenólicos, que juntamente com a hemicelulose e a pectina preenchem os espaços entre as fibrilas de celulose de madeira. A lignina é um polímero aromático tridimensional composto basicamente de três diferentes tipos de *p*-hidroxicinamil álcool. O tipo de lignina e a rigidez do tecido vegetal são determinados pela quantidade relativa desses álcoois. Na natureza, esse polímero é uma macromolécula com diversos pesos moleculares, e a polimerização dos radicais fenóxi dá-se especialmente por ligação estável carbono-carbono e ligações éter entre os núcleos aromáticos (LEISOLA e FIECHTER, 1985).

Na natureza, a lignina é recalcitrante e limita o acesso à celulose e hemicelulose. Sua degradação completa é resultado da ação cooperativa de vários fungos e bactérias,

sendo que as bactérias têm um papel secundário nessa degradação, relacionado ao metabolismo de monômeros de compostos aromáticos (LEISOLA e FIECHTER, 1985). Em nível de laboratório esse material pode ser degradado pelo uso de ácidos ou álcalis fortes, solventes, e/ou ainda por tratamentos físicos tal como moagem a altas temperaturas. No entanto, estes são processos dispendiosos e poluentes (RAJARATHANAM e BANO, 1989).

Os basidiomicetos conhecidos como fungos da podridão branca, são assim chamados por possuírem um sistema enzimático capaz de degradar eficientemente a lignina, bem como a celulose e hemicelulose. Esses foram divididos por TUOR et al., (1995) em cinco grupos distintos, de acordo com a atividade enzimática que apresentam, sendo que o grupo mais estudado é aquele capaz de produzir a lignina peroxidase (LiP), a manganês peroxidase (MnP) e a lacase. Representantes deste grupo são o *Coriolus versicolor*, a *Phledia radiata* e *P. brevispora*, *Pleurotus sajor-caju* e *P. ostreatus*, e o *Phanerochaete chrysosporium*.

Aparentemente, a lignina é degradada pelos fungos da degradação branca através de diferentes combinações entre peroxidases e oxidases, chamadas genericamente de ligninases (LEISOLA e FIECHTER, 1985). Compreende-se por ligninases várias isoenzimas: lignina peroxidase (LiP), peroxidases dependentes de manganês (MnP), bem como fenoloxidases e oxidases capazes de produzir H_2O_2 (TUOR et al., 1995).

A LiP, descoberta em filtrados de cultura de *P. chrysosporium*, foi inicialmente chamada por diferentes nomes, tais como oxigenase dependente de H_2O_2 , ligninase e diarilpropano oxigenase, até que se descobriu serem estas peroxidases (LEISOLA e WALDNER, 1988). Esta enzima é capaz de oxidar substratos de lignina não fenólicos, contrário à lacase. O *P. chrysosporium* também produz a peroxidase dependente da

presença de Mn (II), chamada manganês peroxidase (MnP), que oxida Mn(II) a Mn(III) e é capaz de oxidar vários substratos.

As LiPs e MnPs são glicoproteínas, definidas como fenol oxidases. Cerca de quinze peroxidases diferentes e MnP foram isoladas e purificadas. Todas contêm um grupo heme porfirina-ferro por molécula. O ferro é oxidado por H_2O_2 a um estado de oxidação maior, o que torna a enzima capaz de oxidar a lignina e outros compostos relacionados (LEISOLA e WALDNER, 1988).

As LiPs, na presença de peróxido de hidrogênio, catalisam a oxidação de um elétron de uma grande variedade de compostos aromáticos, dando como produtos iniciais, radicais aril catiônicos que subsequenteiramente interagem em reações dependentes-substituintes tanto de radicais livres e de natureza iônica. Os radicais catiônicos reagem não enzimaticamente levando à quebra nas cadeias laterais alifáticas e núcleos aromáticos (RAJARATHANAM et al., 1992).

Lignina peroxidase e manganês peroxidase foram investigadas em *P. chrysosporium* por RUIZ-DUENAS et al. (2001). Uma terceira peroxidase ligninolítica foi descrita em *Pleurotus* e *Bjerkandera*. Duas dessas versáteis peroxidases (VPs) foram clonadas, seqüenciadas e caracterizadas. As enzimas apresentaram alta afinidade por Mn^{2+} , hidroquinonas e corantes, e também oxidaram álcool veratrílico, dimetoxibenzeno e lignina. As seqüências deduzidas mostraram identidade maior com LiP de *P. chrysosporium* do que com MnP, mas os modelos moleculares obtidos incluem sítios ligados a Mn^{2+} .

A MnP constitui outra família de proteínas heme, extracelular, de quatro a seis ou mais peroxidases dependentes de manganês, com pI variando entre 4,2 e 4,9, e massa molecular de aproximadamente 46 KDa, ativadas por lactato, o qual provavelmente atua como quelante de Mn(III), formando complexos estáveis com alto potencial redox, que por

sua vez oxida fenóis a radicais fenoxi. A enzima oxida uma grande variedade de corantes, incluindo o vermelho fenol, o-dianisidina e “poly R” (KUWAHARA et al., 1984).

O álcool veratrílico é um indutor das LiPs, e pode funcionar também como um mediador na transferência de um elétron. Assim, compostos que não são diretamente acessíveis à enzima podem ser oxidados pela via do álcool veratrílico. Outra função é estabilizar a LiP pela remoção de excesso de H_2O_2 (LEISOLA e WALDNER, 1988). Ainda, segundo estes autores, o álcool veratrílico é oxidado pelas LiPs sob condições aeróbias a veratrildeído, que é o único produto da oxidação. Sob condições anaeróbias, entretanto, outros produtos são formados, incluindo duas quinonas e um produto da clivagem do anel aromático. Portanto, na presença de oxigênio as LiPs podem mediar a abertura do anel aromático.

SUGUIMOTO et al. (2001) observaram que o álcool veratrílico estimula a formação do corpo de frutificação de *Pleurotus ostreatus* nos estágios iniciais do cultivo em meio sólido, o que não ocorre na ausência deste álcool. Além disso, foi capaz de estimular a produção de lacase. Os autores apresentaram evidências de que lacases estão envolvidas também no desenvolvimento fisiológico do corpo de frutificação.

As melhores condições de cultura para a produção e atividade da MnP pelos fungos *Dichomitus squalens*, *Irpex flavus* e *Polyporus sanguineus*, comparado com as condições de *Phanerochaete chrysosporium* e *Coriolus versicolor* foram estudadas por GILL e ARORA (2003). Estudos sobre a produção da enzima dentro de diferentes condições nutricionais revelaram que o álcool veratrílico, o guaiacol, Reax 80 e Polyfon H foram excelentes indutores da enzima.

Outra enzima que tem recebido atenção nos últimos anos é a lacase, uma polifenoloxidase. As lacases constituem um pequeno grupo de enzimas também denominadas cupro-proteínas azuis ou cupro-oxidases azuis, isto porque o cobre participa

de sua constituição química, assim como no processo oxidativo. Estas oxidases dividem com as oxidases terminais da respiração aeróbica a habilidade de reduzir as moléculas de oxigênio a água. Devido ao seu potencial oxidativo, estas enzimas catalisam a oxidação de um grande número de substâncias, entre elas os compostos aromáticos, o que tem despertado o interesse para o emprego em diferentes processos industriais (THURSTON, 1994; GIANFREDA et al., 1999; XU et al., 2000).

Uma vez que a lacase é capaz de atuar na degradação da lignina esta tem aplicação potencial na destoxificação de poluentes fenólicos (KUMARAN et al., 1997). A lacase é produzida pelos fungos da degradação branca, com exceção do *P. chrysosporium*, que produz pouca ou nenhuma atividade (TUOR et al., 1995).

A produção de lacase por fungos tem sido estudada extensivamente nos últimos anos. Um estudo sobre os efeitos de vários meios e suplementos sobre a produção de lacase por alguns fungos da degradação branca mostrou que caldo de sais minerais contendo extrato de malte foi o melhor meio para a produção de lacases. Bagaço de cana-de-açúcar foi o melhor indutor desta enzima dentre vários suplementos adicionados ao meio (ARORA e GILL, 2001).

O fungo *Botryosphaeria* sp produz duas lacases (PPO-I e PPO-II) constitutivamente. Um estudo de otimização da produção da enzima por este microrganismo, na presença de álcool veratrílico, utilizando método de superfície de resposta foi conduzido por VASCONCELOS et al. (2000). Os principais fatores que permitiram aumentar a produção de lacase foram a concentração do álcool e o tempo de cultivo.

Os efeitos de vários solventes miscíveis em água (RODAKIEWICZ-NOWAK et al., 2000) e de monômeros fenólicos sobre a atividade e produção de lacase (LO et al., 2001)

também têm sido estudados. No caso dos solventes, uma boa correlação entre os efeitos inibitórios e a capacidade de desnaturação foi observada.

Complexos multienzimáticos que atuem em conjunto são também encontrados em fungos, como em *Lentinula edodes*, que produz peroxidase, lacase e β -glucosidase (MAKKAR et al., 2001). Este complexo enzimático foi efetivo na transformação de xenobióticos ambientais persistentes, como o pentaclorofenol e o 2,5-diclorofenol.

Trametes trogii BAFC 463 produziu lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase e celobiose desidrogenase (LEVIN e FORCHIASSIM, 2001). Em culturas com alto teor de N (40 mM N), o microrganismo produziu 6,55 U/mL e 45 U/mL de lacase e manganês peroxidase, respectivamente, resultados superiores aos encontrados em meio com quantidade limitada de N. Isto é consistente com o fato de que o sistema ligninolítico em *T. trogii* é expressado constitutivamente. A atividade enzimática diminuiu com a diminuição do pH do meio, de 6,5 para 1,5. A atividade de lacase foi estimulada pelo triptofano e pelo Tween 80.

A necessidade de N para produção de enzimas ligninolíticas parece variar de espécie para espécie de microrganismo. No caso de *Trametes cingulata*, *T. elegans* e *T. pocas*, estes produziram as mais altas atividades de MnP em meio contendo alta concentração de C e baixa concentração de N (TEKERE et al., 2001).

Nos últimos anos, a caracterização bioquímica e a purificação de ligninases, principalmente lacases, foram estudadas extensivamente. A **Tabela 1** resume alguns dos principais trabalhos realizados, as enzimas estudadas e os microrganismos produtores, bem como os pesquisadores envolvidos.

Tabela 1 – Caracterização bioquímica e purificação de ligninases fúngicas nos últimos anos.

MICROORGANISMO	ENZIMA	CARACTERES PRINCIPAIS, ELUCIDAÇÕES	REFERÊNCIAS
<i>Trametes villosa</i>	lacase	pH ótimo de atividade varia de acordo com o substrato	YAYER et al., 1996
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	lacase	Induzida pela 2,5-xilidina	EGGERT et al., 1996
<i>Pleurotus</i>	lacase	Na presença de hidroquinonas pode participar na produção de espécies reduzidas de O ₂ e íons mangânicos	MUNOZ et al., 1997
<i>Chaetomium thermophilum</i>	lacase	Atividade à pH 5-10 e estável à 70 °C	CHEFETZ et al., 1998
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	fenol oxidases	A partir de fibra de trigo produziu entre 1 e 2 U/mL	MACHUCA et al., 1998
<i>Coprinus cinereus</i>	lacase	Hábil para oxidar o corante Direct Blue 1	SCHNEIDER et al., 1999
<i>Coriolus irsutus</i>	lacase	Inibida completamente pela L-cisteína e azida de sódio	LEE e SHIN, 1999
<i>Lentinula edodes</i>	lacase	Lacase pode ter função na morfogênese do fungo	ZHAO e KWAN, 1999
<i>Marasmius quercophilus</i> 17	lacase	Atividade à 80 °C	FARNET et al., 2000
<i>Phellinus ribis</i>	lacase	Baixa homologia com outras lacases microbianas	MIN et al., 2001
<i>Coriolus hirsutus</i> , <i>C. zonatus</i> , <i>Cerrena maxina</i> e <i>Coriolisimus ful-vocinerea</i>	lacases	Todas apresentaram os mesmos mecanismos de interação entre substratos orgânicos doadores de elétrons e o sítio ativo contendo cobre da enzima	SMIRNOV et al., 2001
<i>Aspergillus nidulans</i>	lacase	Identificaram um segundo gene para lacase, que codifica uma proteína de 66,3 kDa, idêntica à lacase I de <i>A. nidulans</i>	SCHERER e FISCHER, 2001
6 diferentes linhagens de <i>P. ostreatus</i>	lacases	Diferenças significantes nas constantes cinéticas foram encontradas	TINOCO et al., 2001
<i>Phanerochaete flavido-alba</i>	MnP	Produção de duas famílias de MnP (MnP1 e MnP2), ácidas	RUBIA et al., 2002
<i>Bjerkandera adusta</i> UAMH 8258	MnP	1 MnP dependente de Mn (pH ótimo 5) e 1 independente (pH ótimo 3)	WANG et al. 2002
<i>Aspergillus terreus</i> LD-1	MnP	Alcalina, com estabilidade de pH 11 a 12,5 e acima de 40 °C	KANAYAMA et al. 2002

Trametes (coliolus) versicolor é o fungo produtor de lacase que tem sido mais estudado (BOURBONNAIS et al., 1995). *Phlebia radiata*, outro basidiomiceto produtor de lacase, apresenta similaridades com o *Phanerochaete chrysosporium* na degradação da lignina e na produção de enzimas que a modificam. Também produz álcool veratrílico sob condições de degradação da lignina (KANTALINEN et al., 1989). A adição de álcool veratrílico em concentrações de até 1,5 mM aumentou a produção de lacase nas culturas de *Phlebia radiata*.

BARBOSA et al. (1996) verificaram também que o ascomiceto *Botryosphaeria* sp. produz 115 vezes mais lacase quando cultivado na presença de 40 mM de álcool veratrílico. BARBOSA e DEKKER (1996) ainda caracterizaram uma segunda polifenol oxidase deste ascomiceto, cuja produção também foi aumentada na presença do álcool com o aumento da aeração do meio de cultivo.

Quanto às aplicações, os microrganismos produtores de lacase podem atuar em diferentes processos: na biorremediação de xenobióticos (BOLLAGE et al., 1988; FIELD et al., 1993); na remoção da cor de águas residuárias, em biopolpação (REID, 1991; PATEL et al., 1994); em biobranqueamento (KATAGIRI et al., 1995); na degradação da lignina (UMA et al., 1994; BOURBONNAIS et al., 1995), na descoloração de corantes da indústria têxtil (RODRIGUEZ et al., 1999); como também na síntese de produtos químicos e de medicamentos e na remediação de águas e solos contaminados (XU et al., 2000).

A aplicação ambiental das lacases baseia-se no seu envolvimento na formação do material húmico. A atividade catalítica da lacase afeta a oxidação de substâncias fenólicas e seus derivados, resultando na produção de agregados poliméricos que usualmente são pouco solúveis e muito mais estáveis (BOLLAGE et al., 1988). A incorporação de xenobióticos ao humus diminui sua toxicidade, e quando liberados poderiam ser mineralizados pela atividade microbiana do solo. Outros poluentes são relativamente

inertes à ação enzimática, mas podem por outros meios, ser transformados em moléculas mais reativas e nesta forma serem rapidamente oxidados pela lacase (GIANGREDA et al., 1999).

Ganoderma ludidum, um basidiomiceto amplamente distribuído no mundo, foi estudado para a produção de lacases, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP) (TREVOR et al., 1999). Os níveis de lacase observados em cultura agitada com altos níveis de nitrogênio (24 mM N) foram muito mais altos do que com baixos níveis de nitrogênio (2,4 mM N), extrato de malte, ou culturas crescendo em substratos lignocelulósicos. Uma vez que unidades siringil são componentes estruturais importantes em lignina oriunda de madeira dura, e menos encontradas em madeira macia, culturas de pinus foram suplementadas com ácido sirínquico, e isso resultou em níveis de lacase comparáveis aqueles observados em culturas de pinus com adição de madeira dura.

FANG et al. (1999) concluíram que a celobiose desidrogenase (CDH) produzida por *Schizophyllum commune* AS 5.391 pode facilitar a degradação da lignina da polpa kraft por ligninases. Em condições ótimas de cultivo o nível mais alto de CDH obtido foi 150 U/L.

A otimização da produção de MnP e lacase pelo fungo Sul Americano *Fomes sclerodermeus* foi estudada aplicando-se um modelo experimental de Doehlert (PAPINUTTI e FORCHIASSIN, 2003). Os fatores estudados foram Cu^{2+} , Mn^{2+} e asparagina. Tanto o modelo utilizado, quanto a análise dos dados permitiu não somente definir o meio ótimo para produção de ambas as enzimas, mas também mostrou os efeitos combinados entre os fatores. A produção de MnP foi fortemente influenciada pelo Mn^{2+} , que agiu como indutor. Dentro dessas condições, Cu^{2+} afetou negativamente a atividade da MnP. Aos 13 dias de crescimento, 0,75 U/mL foram produzidas no meio otimizado suplementado com 1mM de MnSO_4 e 4g/L de asparagina. A produção de

lacase, dentro das condições otimizadas, alcançou valor máximo aos 16 dias de crescimento: 13,5 U/mL na presença de 0,2 mM de CuSO₄, 0,4 mM de MnSO₄ e 6 g/L de asparagina. Mn²⁺ promoveu a produção de ambas as enzimas. Ocorreram importantes interações entre os nutrientes avaliados, as mais significantes entre Cu²⁺ e asparagina.

Fungos foram isolados de amostras de solo e do tratamento primário do efluente de uma indústria de destilados por PANT e ADHOLEYA (2007). Utilizando palha de trigo e derivados de milho como fonte de carbono durante o cultivo, alguns desses microrganismos foram capazes de produzir ligninases. O *Aspergillus niger* TERI DB20 produziu 0,81 U/mL de MnP, *Pleurotus ostreatus* foi capaz de produzir 0,81 U/mL de lacase e *Fusarium verticillioides* ITCC 6140 produziu 2,03 U/mL de LiP.

A MnP foi a principal enzima ligninolítica produzida pelo fungo *Irpex lacteus*. Esta foi purificada utilizando cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular por BABORAVÁ et al. (2006). A proteína apresentou massa molecular de 37 kDa com pH ótimo de pH 5,5, apresentando atividade em temperaturas que variaram de 5 e 70 °C, e máximas entre 50 e 60 °C.

Duas isoenzimas de MnP denominadas MnP₁ e MnP₂, foram produzidas pelo fungo *Lentinula edodes* quando cultivado em meio sólido suplementado com 0,5% de glicose e 5 mM de MnSO₄, durante 12 dias a 30 °C. A isoenzima principal, MnP₂ foi purificada utilizando-se ultrafiltração, precipitação com acetona e filtração em gel. A massa molecular da proteína purificada foi de 44 kDa e o pH e temperatura ótimos para esta enzima foram de 4,5 e 40 °C, respectivamente (BOER et al., 2006).

CHENG et al. (2007) isolaram e purificaram a MnP produzida pelo fungo *Schizophyllum* sp. F17 utilizando cromatografia de exclusão molecular. A massa molecular da proteína foi de 48,7 kDa, apresentando um pH ótimo de pH 6,8 e temperatura ótima de 35 °C. A estabilidade da MnP ocorreu entre os pHs 4,0 e 7,0, a 25 °C durante 1 h de incubação.

2.2. PRODUÇÃO DE LIGNINASES POR BACTÉRIAS

Os inúmeros trabalhos existentes sobre a produção de ligninases por fungos mostram que ainda há muito a ser estudado. No caso da produção por bactérias, poucas menções foram encontradas na literatura.

Lacases eram conhecidas como enzimas produzidas exclusivamente por fungos. Porém, atividade de lacase foi detectada na bactéria *Azospirillum lipoferum* por GIVAUDAN et al. (1993). No entanto, os genes envolvidos na produção dessas enzimas por bactérias nunca haviam sido descritos.

A atividade da lacase produzida pela bactéria *Azospirillum lipoferum* sobre derivados fenólicos foi estudada por métodos de espectrofotometria, HPLC e GC/MS por FAURE et al. (1996). Compostos fenólicos do tipo siríngico (aldeído, ácido ou acetofenona) foram transformados em 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (2,6-DMBQ). Os autores fizeram também uma comparação entre a lacase bacteriana e a do fungo *Pyricularia oryzae*. A transformação de outros derivados ácidos fenólicos, relacionados ao metabolismo da lignina foram também estudados para ambas as enzimas, usando análises espectrofotométricas.

A lacase de *Azospirillum lipoferum* foi purificada e caracterizada por DIAMANTIDIS et al. (2000). A purificação à homogeneidade foi conseguida após ruptura das células por sonicação, solubilização da proteína com Triton X-100, precipitação com acetona e protamina, cromatografia em coluna de hidroxiapatita na presença de uréia (5 M) e NaCl (2M), e finalmente por cromatografia em coluna de hidroxiapatita convencional. Após este passo final, a lacase estava na forma inativa, mas pode ser reativada pela adição de dodecil sulfato de sódio (SDS). Com base nos resultados de eletroforese, os autores sugeriram que a lacase de *A. lipoferum* é composta de uma cadeia polipeptídica

catalítica com baixa massa molar (16,3 kDa) e uma ou duas cadeias regulatórias estruturais, com alta massa molar (81,5 kDa). A enzima purificada foi estável acima de 70 °C durante 10 min, com pH ótimo de 6,0, e foi inibida pelo tropolon, um conhecido inibidor de enzimas contendo metais. Embora o substrato natural desta enzima não seja conhecido, sua caracterização bioquímica poderá facilitar investigações adicionais sobre o papel ecológico desta lacase no processo de colonização de raiz pelo microrganismo.

ALEXANDRE e ZHULIN (2000) identificaram lacase putativa em representantes do gênero *Aquificales*, bactéria gram-positiva com alto conteúdo G+C, e α -, γ -e ε -proteobactéria. Os autores afirmaram que a descoberta sugere fortemente que lacases são amplamente difundidas em bactérias, o que abre oportunidades para seu uso em biotecnologia, considerando-se a disponibilidade de ferramentas para manipulação genética e produção industrial.

HULLO et al. (2001) estudaram a proteína CotA de *Bacillus subtilis* e verificaram tratar-se de uma lacase cobre-dependente. A CotA mostrou similaridade com oxidases multicobre, incluindo manganês oxidases e lacases. *B. subtilis* é hábil para oxidar manganês, mas nem a CotA nem outra proteína ligada à esporulação estão envolvidas. A siringaldazina, substrato específico para lacase, reagiu com os esporos tipo selvagem, mas não com esporos DeltacotA. A CotA pode participar na biossíntese de esporos de pigmento marrom, e parece ser um produto similar à melanina devendo atuar como protetor contra a luz UV.

Marinomonas mediterranea é uma bactéria marinha melanogênica isolada por SANCHEZ-AMAT et al. (2001), que apresenta atividades de lacase e de tirosinase. Essas atividades são devido à expressão de duas polifenol oxidases (PPOs), uma lacase multicobre azul e uma tirosinase SDS-ativada. O gene ligado à lacase, foi isolado, clonado e expressado em *Escherichia coli*. Sua sequência de aminoácidos mostra a existência de

um peptídeo sinal e quatro sítios ligados ao cobre, característica das proteínas multi-cobre azuis, incluindo todas as lacases fúngicas.

Uma nova peroxidase de *Favobacterium meningosepticum* foi purificada e caracterizada por KOGA et al. (1999). A massa molecular relativa da enzima nativa foi de 220000 Da, e da subunidade catalítica foi de 54000 Da. Em contraste a outras peroxidases intracelulares de origem bacteriana, a enzima não mostrou nenhuma atividade de catalase. A sequência dos 92 aminoácidos NH₂-terminais e 3 peptídeos internos não mostraram homologia significativa com peroxidases conhecidas. A enzima também não foi sensível a inibidores típicos de peroxidase como NaCN, NaF e NaN₃, enquanto íon mercúrio inibiu fortemente a atividade enzimática, e alguns reagentes carbonil também tiveram efeitos inibitórios. A enzima mostrou pequeno valor de *K_m* para H₂O₂ (9.5 µM) comparado a outras peroxidases.

A produção de multi-enzimas por *Cellulomonas sp* crescendo sobre palha de trigo foi reportada por EMTIAZI e NAHVI (2000). Foram detectadas atividades de carboximetilcelulase (CMCase), celobiase, filtro paperase (Fpase), xilanase, amilase e manganês peroxidase. Algumas enzimas permaneceram ligadas à membrana celular, mas puderam ser liberadas por vários tratamentos, principalmente por sonicação. CMCase, celobiase e Fpase tiveram pH ótimo de 6,0, 5,5 e 6,0, respectivamente. Em relação à temperatura ótima, esta foi detectada entre 45°C e 50 °C. As atividades de α-amilase e manganês peroxidase termoestáveis foram reportadas pela primeira vez para esta bactéria.

2.3. APLICAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Indústrias de polpa e papel, de corantes, têxteis e de óleo de oliva apresentam compostos fenólicos em seus efluentes (GARG e MODI, 1999). A aplicação mais provável de ligninases diz respeito ao tratamento de resíduos que contém ligninas ou outros compostos aromáticos recalcitrantes. Outras aplicações dessas enzimas incluem a melhora da digestibilidade e valor nutricionais de materiais lignocelulósicos, e tratamento de materiais celulósicos para aplicação no processo de polpação da indústria de papel (LEISOLA e FIECHTER, 1985). Aplicações mais raras incluem o emprego das enzimas em biotransformações da lignina e substâncias relacionadas a compostos químicos de valor.

P. chrysosporium tem sido o fungo mais estudado na elucidação da degradação de compostos lignocelulósicos e da lignina (LEISOLA e FIECHTER, 1985). Dentre os compostos xenobióticos que este microrganismo é apto a degradar está o DDT, o 2,4,5-T-benzopireno, os bifenis policlorados e o lindane. É também capaz de descolorir uma grande variedade de compostos altamente coloridos e suas misturas, tais como os resíduos do processo kraft da indústria papelreira, corantes poliméricos, vários corantes trifenilmetano, incluindo o cristal violeta, bem como os corantes azo (BUMPUS, 1995).

Um grande número de processos biológicos está sendo estudado para o tratamento de corantes e resíduos da indústria têxtil, visando a descoloração dos mesmos. Entre os microrganismos implicados com a descoloração de corantes têxteis estão as bactérias, fungos, algas e mais recentemente consórcios de culturas de bactérias (BANAT et al., 1996). Os actinomicetos são também capazes de solubilizar a lignina, mas a mineralização a CO₂ ocorre em menor extensão do que a apresentada por fungos da degradação branca (GOSH e SINGH, 1993).

A atividade ligninolítica de 116 linhagens de basidiomicetos da floresta tropical brasileira foram estudadas por OKINO et al. (2000), em termos da habilidade para oxidar o corante remazol azul brilhante R (RBBR) e guaiacol. A maioria das linhagens apresentou atividade de lacase (96,6%) e peroxidase (92,2%). Um método rápido de screening utilizado pelos pesquisadores pode ser útil para identificar linhagens de fungos ligninolíticos, que poderão ser utilizadas para várias aplicações biotecnológicas.

Trametes hirsuta e uma lacase purificada deste microrganismo foram hábeis para degradar os corantes triarilmetano, índigo, azo e antraquinínico (ABADULLA et al., 2000). A velocidade de descoloração inicial dependeu dos substituintes nos anéis fenólicos dos corantes. A imobilização da lacase em alumina aumentou a estabilidade térmica da enzima e sua tolerância contra inibidores, tais como halidas, quelantes de cobre, e aditivos dos corantes. O tratamento enzimático dos corantes diminuiu suas toxicidades acima de 80%.

A lacase de *Pycnoporus cinnabarinus* mostrou também ser hábil para iniciar a destruição do cromóforo do corante diazo Chicago Sky Blue, resultando na formação de dois produtos intermediários com intensidades de absorção ao redor de uma ordem de magnitude abaixo da molécula original (SCHLIEPHAKE et al., 2000). A taxa de transformação do corante aumentou com o aumento da concentração da enzima.

Degradação in vitro de um corante polimérico, o Poly R-478, pela enzima manganês peroxidase foi investigada (MOREIRA et al., 2001a). O tratamento enzimático provocou não somente a destruição dos grupos cromofóricos, mas também uma notável quebra da estrutura química do corante. Em experimentos com a enzima pura, MnP provou ser o principal fator responsável pela descoloração.

A descoloração de 12 corantes azo, diazo e antraquinínico foram estudadas por Kariminiaae-Hamedani et al. (2005) utilizando o fungo denominado L-25. A eficiência na

descoloração permaneceu entre 84,9 e 99,6% quando o microrganismo foi cultivado por 14 dias, sendo que a principal enzima ligninolítica produzida foi a MnP, apresentando atividade acima de 1,0 U/mL.

Os corantes azo Congo Red, Orange G e Orange IV foram degradados utilizando MnP purificada produzida pelo fungo *Schizophyllum* sp. F17. A degradação desses corantes foi mais rápida quando H₂O₂ foi adicionado ao meio. A maior descoloração foi de 30% para o corante Orange IV após 30 minutos de tratamento (CHENG et al., 2007).

Fenóis oxidases têm sido também utilizadas para a detoxificação de efluentes contendo fenóis e aminas aromáticas (HUSAIN e JAN, 2000). Uma vantagem deste procedimento é que essas enzimas agem sobre uma ampla faixa de substratos, e dentro de baixas concentrações destes. Lignina sintética fenólica e não fenólica (permetilada) foram depolimerizadas por lacase de *Trametes villosa* na presença de um radical mediador, 1-hidroxibenzotriazol (HOBT). Cromatografia de permeação em gel das ligninas tratadas mostrou que 10% de suas subestruturas foram clivadas (SREBOTNIK e HAMMEL, 2000).

CHUNG et al. (2001) estudaram os efeitos do nitrogênio sobre a degradação de pentaclorofenol (PCP) pelo fungo da degradação branca, *Phanerochaete chrysosporium*. O PCP desapareceu quase à mesma taxa em ambos os tratamentos, com nitrogênio suficiente (NS) e limitado (NL), na cultura em fase estacionária. Entretanto, mais pentacloroanizol (PCA) acumulou-se na cultura NS do que na NL. Ainda, PCA desapareceu mais rápido na cultura NL, indicando que a menor acumulação de PCA durante a degradação de PCP na cultura NL foi devido à degradação mais rápida de PCA nessas condições. Os autores verificaram também que o PCP parece ser metabolizado à tetraclorociclohexadienodiona (TCHD) via PCA, ou diretamente oxidado à TCHD pela lignina peroxidase. Uma vez que todos os resultados indicaram que nenhum metabólito

inócuo se formou durante a degradação do PCP pelo fungo, os autores concluíram que o uso do fungo no biotratamento do composto é praticável.

O *Phanerochaete chrysosporium* foi também testado quanto à degradação de pesticidas (CASTILLO et al., 2001). *P. chrysosporium* e outro fungo foram hábeis para produzir atividade necessária para degradar dois herbicidas, bentazona e o MCPA (ácido clorometilfenoxiacético), em 20 dias (65 e 75%, respectivamente). O decréscimo de ambos os herbicidas coincidiu com a presença da atividade de LiP e MnP/lacase.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) também podem ser degradados por enzimas ligninolíticas. BABORAVÁ et al. (2006) realizou um estudo utilizando MnP produzida pelo fungo *Irpex lacteus* para verificar a degradação de desses compostos. Pireno, fluoranteno, fenantreno e principalmente antraceno foram os compostos que tiveram anéis aromáticos clivados.

2.3.1. APLICAÇÕES DE LIGNINASES NA INDÚSTRIA DE CELULOSE E PAPEL

PEKAROVICOVA (1996) escreveu uma revisão da literatura onde discute as oportunidades que se abriu com o crescente esforço em se eliminar o cloro das plantas de branqueamento de polpas e papel, inclusive as oportunidades biotecnológicas. O autor fez um levantamento sobre os mecanismos de ação das xilanases durante o pré-branqueamento, particularmente na degradação do complexo lignina-carboidrato, além dos mecanismos de ação da lignina peroxidase, Mn-peroxidase e lacase durante a degradação da lignina.

Enzimas podem melhorar o processo de branqueamento do papel indiretamente ou diretamente. No método indireto, a branqueabilidade das polpas é melhorada pela ação de xilanases ou mananases, afetando a extractabilidade da lignina. O método mais

promissor ou método direto é o sistema mediador-lacase, que degrada lignina (SIIKA-AHO et al., 2001). Xilanases têm sido usadas em escala industrial por cerca de 10 anos, enquanto o sistema mediador-lacase é um conceito que está ainda em desenvolvimento. Em estudos iniciais, o 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina sulfonato) (ABTS), substrato comum de lacases, foi usado com o primeiro mediador. A procura por um mediador mais adequado resultou no uso do 1-hidroxibenzotriazol (HBT), no laboratório e em escala piloto (CALL, 1995). O processo de delignificação é comumente referido como LMS (sistema-lacase-mediador) ou processo Lignozima. Novos mediadores foram descobertos, os mais promissores são o ácido violúrico (VIO) e o N-hidroxi-N-fenilacetamida (NHA). Especialmente este último propicia rápida delignificação com nenhum impacto significativo sobre a estrutura da celulose. O grau de delignificação após uma extração alcalina é reportado como sendo superior a 40%. O sistema LMS tem se mostrado hábil para substituir a deslignificação que utiliza oxigênio ou o estágio de tratamento com ozônio (SIIKA-AHO et al., 2001), resultando em mesmos valores de alvura, mas rendimento e viscosidades superiores. De acordo com os autores, os efeitos da xilanase e do sistema LMS mostraram-se aditivos, quando os tratamentos foram usados sucessivamente. A aplicação do LMS, empregando HBT como mediador, com o tratamento com xilanase em um único estágio, entretanto, parece inefetivo, aparentemente devido à inativação da xilanase pelo HBT. Este efeito inativador do HBT foi também observado para lacases. Estudos sobre novos mediadores revelaram que NHA causou menos danos às enzimas.

Estudos sobre a aplicação de ligninases obtidas a partir de actinomicetos ou fungos no tratamento da polpa kraft começaram a ser realizados recentemente. O uso de enzimas extracelulares de *Streptomyces albus* ATCC 3005 para o branqueamento de polpa kraft de *Eucalyptus* foi estudado por ANTONOPOULOS et al. (2001). A produção

máxima de xilanase e peroxidase extracelulares foi detectada após 120 h (11,97 U/mL) e 72 h (0,58 U/mL), respectivamente. O pH máximo para atividade das enzimas, foi respectivamente, 6,5 e 9,9. A concentração ótima de peróxido de hidrogênio para atividade de peroxidase ocorreu à 20 mM, sendo que a enzima permaneceu ativa a 100 mM de H₂O₂, após 1 h de incubação a 53 °C. O branqueamento da polpa kraft com o sobrenadante da cultura de *S. albus* na presença de H₂O₂ resultou em significativa redução do número Kappa (2,85 unidades) com nenhuma mudança na viscosidade. Esses resultados sugerem uma aplicação potencial dos sobrenadantes da cultura de *S. albus* no biobranqueamento.

MOREIRA et al. (2001b) estudaram a oxidação da lignina na polpa kraft por MnP obtida a partir do fungo *Bjerkandera* sp BOS55. Estudos prévios haviam mostrado que esta linhagem causa altos níveis de branqueamento e delignificação da polpa, dentro de condições de cultura em que a MnP ocorre como enzima oxidativa predominante. Os autores isolaram a enzima e testaram a aplicação in vitro na polpa delignificada com oxigênio, medindo a redução no número kappa como indicador da oxidação da lignina. A preparação da MnP aplicada a 60 U/g de polpa por 6 h causou um significativo decréscimo de 11-13% no número kappa dentro de condições ótimas, comparado a controles sem enzima. Foram avaliados ainda os efeitos da dosagem de enzima, concentração de Mn²⁺, ácidos orgânicos, pH e adição de H₂O₂.

Em um trabalho subsequente, MOREIRA et al. (2003) testaram preparações de MnP de *Bjerkandera* sp. BOS55 no branqueamento e deslignificação de polpa kraft de *Eucalyptus* delignificada com oxigênio, em sequência combinando um estágio quelante com um estágio peróxido. A inclusão do tratamento enzimático na sequência de branqueamento ajudou consideravelmente na melhora da alvura final. Outros interessantes resultados foram redução moderada do número Kappa, baixa perda de

rendimento e folhas de papel com uma aceitável resistência ao alongamento e índice de estouro.

Quanto ao potencial das ligninases no tratamento de efluentes, MANZANARES et al. (1995) estudaram a habilidade do *Trametes versicolor* na descoloração de efluentes alcalinos de uma indústria de papel e celulose. A remoção da cor alcançou 70% quando adicionado uma fonte de carbono. O estudo enzimático revelou a presença de lacase, e a MnP foi detectada quando adicionado MnSO_4 no efluente.

O fungo *Trametes versicolor*, linhagem B7, juntamente com agroresíduos, foi aplicado em efluentes de diversas indústrias papeleiras. O microrganismo foi capaz de remover a coloração dos efluentes na presença dos co-substratos utilizados como sacarose, glicose, etanol, carboximetil-celulose, bagasso de cana-de-açúcar. O pH e temperatura ótima foram de 4,5-5,0 e 25-35 °C, respectivamente. A máxima remoção da cor foi de 92% com redução de DQO de 69% (MEHNA et al., 1995).

NAGARATHNAMMA et al. (1999) realizaram um estudo aplicando o fungo *Ceriporiopsis subvermispora* no efluente do primeiro estágio do branqueamento da polpa Kraft. Testes enzimáticos revelaram que o fungo produz lacase e MnP. Utilizando glicose na concentração de 1 g/L, o fungo removeu 90% da cor, 45% de DQO e 65% de lignina após 48 horas de tratamento em temperaturas de 30-35 °C e pH entre 4,0 e 4,5. Na ausência de glicose, o fungo foi capaz de remover 62% da coloração.

O uso de microrganismos ligninolíticos isolados do próprio efluente foram avaliados por SAHOO e GUPTA (2005) para descoloração do efluente de uma pequena fábrica de polpa e papel, e compararam sua eficiência com a dos organismos *P. chrysosporium* e *T. versicolor*. Dois isolados identificados como *A. fumigatus* e *A. flavus* produziram altos graus de redução da cor. *A. fumigatus*, microrganismo mais eficiente, foi capaz de produzir enzimas extracelulares como lacase, MnP e xilanase, descolorindo o efluente com pH na

faixa de pH 6,0-9,0, com ótimo em pH 8,0. Os autores determinaram ainda que celulose, sacarose, glicose e xilose podem ser usados como co-substratos não sendo necessária a adição de fontes de nitrogênio adicionais para descoloração do efluente.

RAGUNATHAN e SWAMINATHAN (2004) investigaram a habilidade de *Pleorotus* spp (*P. sajor-caju*; *P. platypus* e *P. citrinopileatus*) no tratamento de um efluente da indústria de papel e celulose, tanto em escala de laboratório como em escala piloto. Em escala de laboratório, *P. sajor-caju* descoloriu 66,7% do efluente no sexto dia de incubação e removeu 61,3% da DQO no décimo dia de tratamento. Em escala piloto, a descoloração máxima também foi obtida com *P. sajor-caju* (60,1%) no sexto dia de incubação e a DQO foi reduzida em 57,2% no sétimo dia de incubação.

2.4. INDÚSTRIA PAPELEIRA E PROBLEMÁTICA DO EFLUENTE GERADO

Uma grande quantidade de indústrias papelarias existe em vários países. A população mundial utiliza mais de 214 milhões de toneladas de papel por ano (BAJPAI e BAJPAI, 1994).

Historicamente, a indústria de polpa e papel é considerada uma das indústrias que mais consomem recursos naturais (madeira, água) e energia (combustíveis fósseis, eletricidade) e contribui significativamente no descarte de poluentes ao ambiente. Essa indústria utiliza imensos volumes de água, permanecendo atrás das indústrias metalúrgicas e químicas. O volume de água varia de acordo com o tipo de papel que será produzido, alcançando 60 m³ por tonelada de papel produzido, mesmo utilizando as técnicas mais modernas e eficientes de produção (THOMPSON et al., 2001).

O efluente é altamente impactante no ambiente. Evidências mostram uma variedade de respostas em populações de peixes, incluindo atraso na maturidade sexual,

mudanças na reprodução e uma diminuição nas características sexuais secundárias (MUNKITTRICK et al., 1997).

Devido às pressões de ambientalistas e legislativas, e juntamente com as novas técnicas e comprometimento das empresas líderes, a indústria de polpa e papel tem reduzido os impactos ambientais por volta de 80 a 90% (THOMPSON et al., 2001).

Uma das formas de minimizar os impactos gerados é através da reutilização da água do processo, que vem sendo feita por algumas indústrias, porém esse procedimento pode aumentar a concentração de espécies orgânicas e inorgânicas, afetando a produção do papel, além de aumentar o odor gerado durante a produção (ROBERTSON e SCHWINGEL, 1997). Outro problema ocorre quando o processo de tratamento da polpa e papel não é eficiente, podendo resultar em liberação de sólidos suspensos, perdendo os nutrientes, como nitrogênio e fósforo, os quais podem promover a eutrofização dos corpos receptores (THOMPSON et al., 2001).

A madeira, uma das principais matérias-primas para a fabricação da polpa e papel, é composta por fibras de celulose, carboidratos e lignina. A lignina atua como uma substância adesiva para as fibras de celulose. A indústria de polpa e papel separa a celulose dos outros compostos presentes na madeira através do digestor, onde a madeira é quimicamente cozida por horas para formar a polpa. Há o digestor sulfito, que utiliza sulfito de cálcio, denominado processo ácido e o digestor sulfato, também conhecido como processo Kraft, que utiliza sistema alcalino. O processo Kraft é o mais utilizado por ser menos corrosivo e mais eficiente. A polpa posteriormente é seca na máquina de papel para produzir a folha de papel (THOMPSON et al., 2001).

Atualmente, os tratamentos utilizados podem diminuir os poluentes a níveis aceitáveis, porém a lignina e seus derivados, que são removidos durante a polpação, branqueamento, e outras operações químicas, são ofensivos devido à coloração que

causam nos efluentes, inibindo o processo natural de fotossíntese além de ser esteticamente inaceitável. O problema da remoção da cor do efluente da indústria de polpa e papel tem sido alvo de preocupação e objeto de pesquisas nos últimos anos (BAJPAI e BAJPAI, 1994; GARG e MODI, 1999).

A lignina não é um composto químico definido de composição uniforme, sendo esse termo utilizado para uma série de macromoléculas similares. Lignina e seus derivados oferecem resistência à degradação devido à presença de ligações carbono/carbono do tipo bifenil e outras ligações presentes na molécula, além de possuírem anéis aromáticos e grupos quinonas (BAJPAI e BAJPAI, 1994).

Vários métodos físicos, químicos e biológicos têm sido empregados para a remoção da cor do efluente da indústria de polpa e papel. Os processos físicos e químicos apresentam valores econômicos elevados e por esta razão podem não ser atrativos industrialmente. Métodos de descoloração biológica utilizando microrganismos têm se mostrado eficiente na degradação da lignina presente nos efluentes (BAJPAI e BAJPAI, 1994).

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- verificar a ação de indutores na produção de MnP por *B. pumilus* CBMAI 0008 e por *Paenibacillus* sp. CBMAI 868;
- purificar e caracterizar bioquimicamente a MnP de *B. pumilus* e de *Paenibacillus* sp.;
- verificar a atuação de *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. na remoção da cor do efluente da indústria papeleira.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Microrganismos

Bacillus pumilus CBMAI 0008, isolado de material vegetal em decomposição por DUARTE et al. (1997).

***Paenibacillus* sp.** CBMAI 868 foi isolado de efluente da indústria do papel, em meio de cultura contendo (%): xilana, 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1; efluente do tratamento biológico da indústria do papel, 50; ágar, 2. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 min, e antes de verter em placas de Petri, nistatina (0,044 mg/mL) foi adicionada como controle antifúngico. Em seguida, 0,3 mL de efluente do tratamento biológico foram inoculados por espalhamento na superfície do meio, e as placas incubadas a 37 °C, durante 48 h. Após esse período, verificou-se o crescimento de colônias de bactérias e a formação de halos claros ao redor das mesmas. A colônia que exibiu o halo de maior diâmetro foi purificada e identificada na Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/Unicamp.

4.1.2. Meios de cultura

4.1.2.1. Meio para manutenção de *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp.

Meio de xilana de bétula sólido, de acordo com MANDELS e STENBERG (1976), contendo (g/L): xilana de bétula (birchwood - Sigma), 10; peptona, 1,0; Tween 80, 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,4; KH_2PO_4 , 2,0; uréia, 0,3; CaCl_2 , 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3; solução dos seguintes elementos (mg/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,0; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,6; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4; CoCl_2 , 2,0; ágar-ágar, 20. O pH foi acertado para 9,0 com NaOH 2N, e o meio esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 min.

4.1.2.2. Meio para crescimento e produção de enzimas

Meio de xilana líquido, de acordo com MANDELS e STENBERG (1976), citado acima, com concentração otimizada de xilana e peptona, de acordo com DUARTE et al. (1998).

4.1.3. Efluente industrial

Efluente da indústria Ripasa S/A Celulose e Papel, localizada em Americana -SP, coletado na saída do tratamento de branqueamento da polpa de papel. Para o estudo, foram coletadas amostras do tratamento ácido (pH = 3) e do tratamento alcalino (pH = 12). As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e o efluente filtrado em papel de filtro para remoção de partículas em suspensão. O efluente filtrado foi armazenado a - 25 °C até o uso.

4.1.4. Reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentam grau analítico, com exceção da xilana de bétula (birchwood - Sigma X-0502).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Manutenção de *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp.

As bactérias foram preservadas em meio sólido inclinado contendo xilana de bétula. A manutenção das culturas foi feita por repicagem periódica no meio, seguido de incubação a 45 °C até crescimento, e de estocagem sob refrigeração a 5 °C. Réplicas das culturas foram preservadas em óleo mineral e em criotubos com glicerol.

4.2.2. Preparo de inóculo

Para preparo de inóculo, células do meio de preservação foram transferidas para frasco de Erlenmeyer de 125 mL contendo 12,5 mL do meio de xilana de bétula líquido. Após 20 h de incubação a 45 °C e agitação de 250 rpm, as culturas foram centrifugadas em condições de assepsia e a biomassa ressuspensa em 40 mL do referido meio. Para os ensaios de produção de enzimas, tal inóculo foi utilizado na proporção de 8 % (v/v). Este procedimento foi conduzido com objetivo de padronizar o inóculo referente a diferentes fermentações para produção das enzimas.

4.2.3. Produção de MnP por *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp.

Para produção de MnP foi utilizado o meio de MANDELS e STENBERG (1976), citado acima. A fermentação foi conduzida em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 250 mL contendo 25 mL de meio. Após inoculação dos microrganismos, os frascos permaneceram sob temperatura de 45 °C e agitação de 250 rpm, durante o tempo definido no item abaixo (4.2.4.). Ao final do cultivo, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm sob refrigeração, e o sobrenadante armazenado a -25 °C para determinação da atividade enzimática.

4.2.4. Cinética da produção de MnP por *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp.

Para estudo da cinética e determinação do tempo ótimo para produção da MnP por *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp., inóculo preparado conforme descrito acima foi utilizado na proporção de 8 % (v/v). A fermentação foi conduzida em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, contendo 50 mL de meio, sob agitação de 250 rpm e temperatura de 45 °C. A intervalos regulares, amostras foram coletadas para determinação da atividade de MnP.

4.2.5. Efeito de indutores sobre a produção de MnP por *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp.

O efeito de indutores sobre a produção de MnP foi estudada a partir da suplementação no meio de cultura com álcool veratrílico, indulina AT, guaiacol, ácido lignocelulósico e ácido lignocelulósico dissulfonado em concentrações de 0,1% (p/v).

4.2.6. Purificação e caracterização da MnP de *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp.

A atividade de MnP foi determinada primeiramente no caldo bruto, tanto oriundo da fermentação com xilana (item 4.2.4.), como proveniente do meio suplementado com indutores (item 4.2.5.). A MnP presente no caldo proveniente da condição de melhor produção da enzima foi purificada e caracterizada conforme descrito abaixo.

4.2.6.1. Purificação

Todas as etapas de purificação da enzima foram realizadas à temperatura ambiente. Os métodos utilizados para a purificação da MnP foram efetuados apenas na fase de captura, purificação intermediária e polimento, não sendo necessários outros processos de purificação devido às características das enzimas. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

O caldo bruto obtido a partir da fermentação foi filtrado em membrana 0,45 µm e concentrado em sistema de ultrafiltração Pellicon™, utilizando membrana de exclusão de 10 kDa Biomax 10™. O material obtido foi separado por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) em resina Fenil Sepharose (KX-26 40/26), previamente equilibrada com sulfato de amônio de 1,7 M, de acordo com HAKALA et al. (2005). As proteínas foram eluídas com um fluxo de 3 mL/min. e gradiente linear, utilizando sulfato de amônio de 1,7

a 0 M (tampão A) e tampão fosfato de sódio pH 7,0, 50 mM (tampão B) como fase móvel. As frações contendo atividade de MnP foram combinadas, concentradas e dialisadas contra o mesmo tampão.

Em seguida, a MnP obtida por HIC foi aplicada no sistema de cromatografia de troca iônica para verificar a pureza da fração protéica obtida na etapa cromatográfica anterior. Foi utilizada resina Q-Sepharose (KX-16 16/2), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM. A fase móvel utilizando tampão fosfato de sódio 50 mM com um gradiente NaCl de 0 a 1 M em pH 7,0 foi aplicada em fluxo de 2 mL/min.

Todos os passos cromatográficos foram conduzidos em sistema FPLC (Pharmacia Amersham) e a eluição seguida de leitura a 280 nm.

4.2.6.2. Caracterização

4.2.6.2.1. Eletroforese em gel de SDS-PAGE

A eletroforese foi conduzida de acordo com o método de LAEMMLI (1970). Esta técnica foi realizada para confirmar a pureza e determinação da massa molecular das frações coletadas.

As frações foram submetidas a um processo de desnaturação onde 50 µL de cada amostra foram adicionados a 50 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0; mercaptoetanol 2%; glicerol 15%; azul de bromofenol 0,05%; 0,2% de SDS), sendo a mistura incubada em banho-maria de água fervente por 4 min. As quantidades de amostra adicionadas em cada poço foram de 20 e 45 µL. A eletroforese foi realizada no sistema Mini-PROTEAN® II, na presença de tampão de corrida Tris-glicina (0,025M Tris pH 8,3; 0,192M Glicina) em corrente constante de 30 mA e 120 W durante 3 h, a temperatura ambiente.

Para determinação da massa molar da MnP foi utilizado gel de resolução 10,0 %, usando-se uma mistura de proteínas padrões (Promega). A massa molar foi estimada a partir da massa dos padrões contra suas respectivas mobilidades relativas. Após a corrida, foi realizada a coloração com Comassie Blue R-250.

4.2.6.2.2. Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade da MnP purificada

A atividade de MnP purificada de *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp., foi determinada em diferentes valores de pH, a saber: pH 5,0 e pH 6,0 – tampão citrato-fosfato 0,2 M; pH 7,0 e pH 8,0 – tampão fosfato de sódio 0,2 M; pH 9,0 e pH 10,0 – tampão glicina-NaOH 0,2 M. A faixa de temperatura estudada foi de 25 a 60 °C, com intervalos de 5 °C. Quanto ao tempo de incubação, optou-se por utilizar o indicado no método de KUWAHARA et al. (1984), ou seja, 5 min.

4.2.7. Determinação da atividade de MnP

A reação foi iniciada através da mistura de 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M, 0,05 mL de MnSO_4 2 mM, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,1 mL de vermelho fenol 0,1%, 0,5 mL da enzima purificada e 0,05 mL de H_2O_2 2 mM em tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 8,0). A mistura permaneceu em temperatura ambiente por 5 min., e a reação foi interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH 2 N. A absorbância foi lida a 610 nm e a atividade expressa em U/L. Como controle, 1 mL da amostra foi colocada em tubo de ensaio por 30 min. em banho maria de água fervente. Após resfriamento, a amostra foi lida como as demais.

Para cálculo direto da atividade enzimática foi considerado o fator de multiplicação para MnP, de 89,68, obtido a partir da fórmula $\epsilon_{610} = 4460 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, onde ϵ é o coeficiente de absorção molar. O fator de multiplicação foi utilizado no seguinte cálculo:

$$\Delta \text{ Abs } (\text{abs}_{\text{amostra}} - \text{abs}_{\text{controle}}) \times 89,68 = \text{U/L}$$

4.2.8. Descoloração do efluente da indústria papaleira

B. pumilus e *Paenibacillus* sp. foram inoculados separadamente no efluente da indústria papaleira para verificação da descoloração. O pH do efluente foi corrigido para pH 7,0, 9,0 ou 11,0, misturando-se amostras do efluente ácido e do efluente alcalino.

O inóculo de *B. pumilus* para estes ensaios foi produzido conforme descrito no item 4.2.2., porém foi utilizada a indulina AT (0,1% p/v) como indutor, uma vez que esta estimulou a produção de MnP por este microrganismo durante os testes realizados no item 4.2.5.

Os ensaios de descoloração foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, contendo 100 mL do efluente. Após inoculação das bactérias (8 % v/v), os frascos foram incubados sob agitação de 200 rpm e 45 °C. Após 24 h e 48 h, os efluentes tratados foram centrifugados a 10.000 rpm sob refrigeração. Esta etapa foi realizada em triplicata.

As diferentes amostras obtidas foram separadas em três alíquotas e armazenadas a -25 °C para os testes seguintes.

4.2.8.1. Determinação da cor real

A cor real foi determinada de acordo com o Standard Methods (2005). Os testes foram realizados no laboratório de análises químicas da Sanasa-Campinas, utilizando um espectrofotômetro HACH - modelo DR2010. A quantificação da cor foi feita através da

leitura direta de amostras do efluente não tratado e tratado a 455 nm. Os resultados obtidos foram expressos em mg Pt-Co/L.

4.2.8.2. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A medida de DQO das amostras de efluente antes e após o tratamento com as bactérias foi realizada pelo método colorimétrico de refluxo fechado (método 5220 C) (Standard Methods, 2005), utilizando-se o bloco digestor HACH – modelo DRB 200.

Para os testes, foram adicionados 1,5 mL de solução digestora, 3,5 mL de solução catalizadora e 2,5 mL da amostra em tubo de borossilicato com dimensões de 16 x 100 mm, sendo disposta no bloco digestor a 150 °C por 2 h. Após a etapa de digestão, a DQO foi quantificada a absorbância de 600 nm, sendo os resultados expressos em mg/mL.

4.2.8.3. Cromatografia de permeação em gel

A distribuição da massa molar no efluente não tratado e tratado que apresentou melhor resultado na medida da cor real e DQO foram determinados por aplicação de 2 mL de cada amostra (sobrenadante das amostras de efluente centrifugado) em resina Sephadex G-75 (KX-16 100/16), previamente equilibrada com NaOH (0,002 g/L) e LiCl (0,848 g/L) em sistema isocrático, fluxo de 2,0 mL/min., conectada a um sistema de cromatografia GradiFrac (Pharmacia Biotech), de acordo com SAHOO e GUPTA (2005). A eluição das amostras foi monitorada pela medida da OD_{280nm} com um detector UV-1 Pharmacia LKB, coletando 4 mL de amostra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cinética da produção de MnP por *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. e efeito de indutores

O tempo ótimo de produção de MnP foi determinado no caldo bruto de crescimento de *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp., tanto na ausência como na presença de indutores. Após verificar o tempo ótimo para a produção de MnP por cada um dos microrganismos, a curva enzimática que apresentou a maior atividade de MnP foi realizada novamente, em duplicata, para a confirmação dos resultados.

A máxima atividade de MnP observada no caldo de fermentação de *B. pumilus* na ausência de indutores foi de 6,41 U/L após um período de 16 h de incubação (**Figura 1**). Quando a bactéria foi cultivada na presença dos indutores, maiores atividades de MnP foram observadas na presença da indulina AT, que propiciou atividade de 31,66 U/L, após um período de 8 h (**Figura 2**), seguido do ácido lignocelulósico dissulfonado e ácido lignocelulósico, que após 6 h de cultivo propiciaram atividades de MnP de 15,6 e 8,6 U/L, respectivamente (**Figuras 4 e 5**).

De acordo com os resultados, a maior produção de MnP por *Paenibacillus* sp. ocorreu na presença do álcool veratrílico, com atividade máxima de 13,76 U/L após 28 h (**Figura 3**), seguido do ácido lignocelulósico dissulfonado, que propiciou atividade de 12,78 U/L no mesmo período (**Figura 4**) e do guaiacol, cuja atividade foi de 12,20 U/L após 20 h (**Figura 6**). Porém, para os estudos posteriores com esta bactéria, não foi utilizado nenhum indutor, uma vez que na ausência destes a atividade enzimática máxima, de 12,33 U/L, foi alcançada após um período de 20 h, ou seja, um período de incubação menor, para uma atividade enzimática próxima à alcançada na presença do melhor indutor (**Figura 1**).

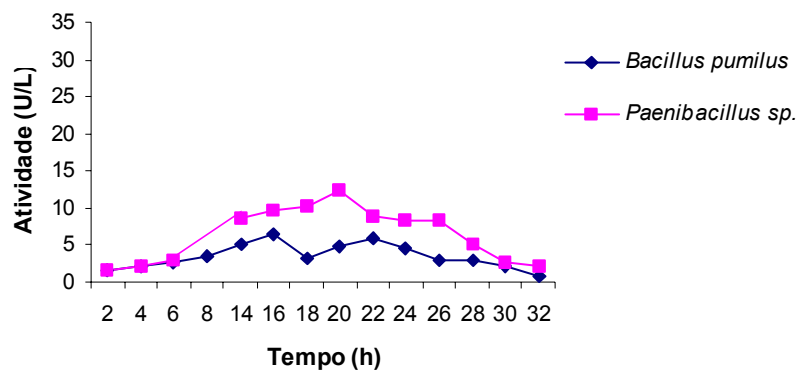


Figura 1 – Produção de MnP por *B. pumilus* e *Paenibacillus sp.* na ausência de indutores.

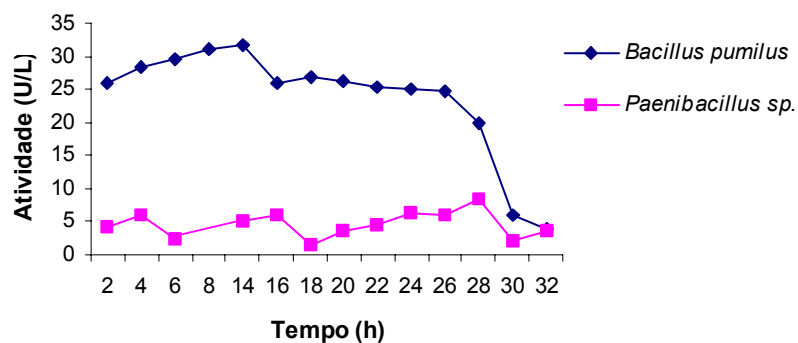


Figura 2 – Produção de MnP por *B. pumilus* e *Paenibacillus sp.* na presença de indulina AT.

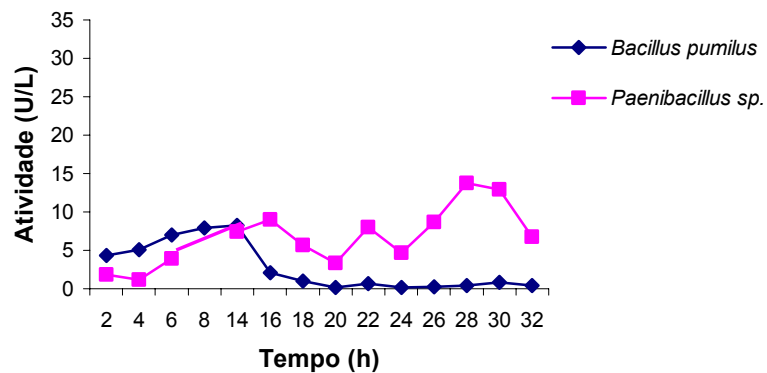


Figura 3 – Produção de MnP por *B. pumilus* e *Paenibacillus sp.* na presença de álcool veratrílico.

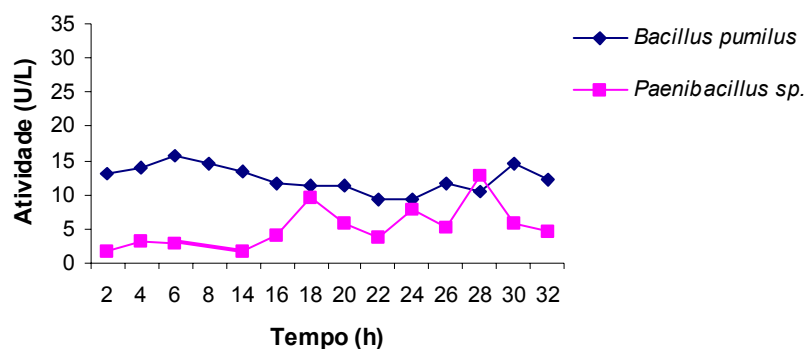


Figura 4 – Produção de MnP por *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. na presença de ácido lignocelulósico dissulfonado.

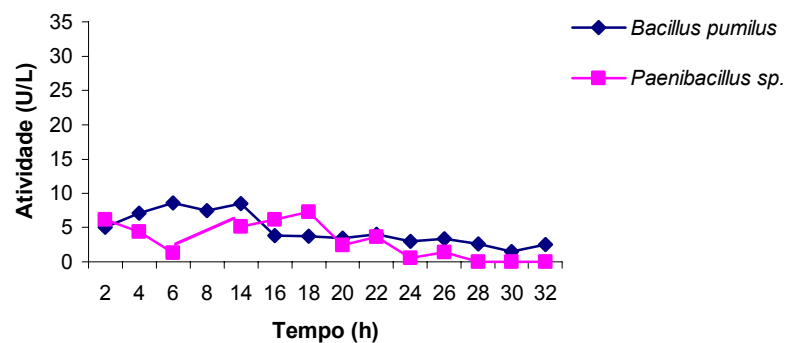


Figura 5 – Produção de MnP por *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. na presença de ácido lignocelulósico.

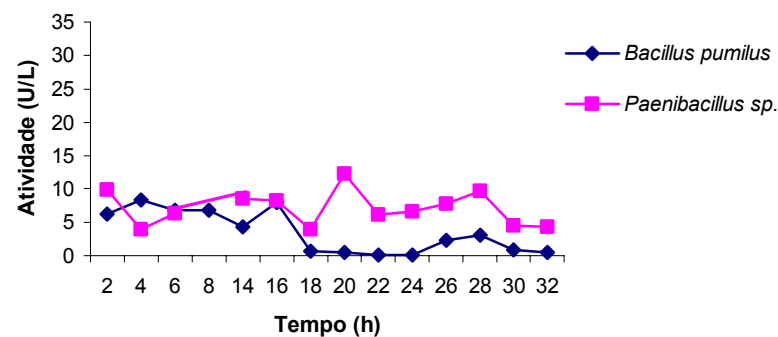


Figura 6 – Produção de MnP por *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. na presença de guaiacol.

No presente estudo, indulina AT e ácido lignocelulósico dissulfonado, pela ordem, foram eficientes no aumento da atividade de MnP por *B. pumilus*, enquanto a utilização de indutores no cultivo de *Paenibacillus* sp. não propiciaram aumento significativo da atividade desta enzima.

Nenhuma menção foi encontrada na literatura sobre a utilização de indutores visando aumento da atividade de MnP por bactérias. No caso dos fungos, não há um consenso sobre a eficiência dos indutores no aumento da atividade de MnP.

A MnP original de *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 e modificada com metoxipolietileno glicol, revelou maiores atividades quando cultivada em presença de 2,6-dimetoxifenol, álcool veratrílico, guaiacol e ABTS (WANG et al., 2002).

GILL e ARORA (2003) observaram o efeito de álcool veratrílico, guaiacol, Reax 80 e Polyfon H sobre a produção de MnP por fungos. Polyfon H propiciou aumento da atividade enzimática apenas para *Irpex flavus*, propiciando atividade de 0,08 U/mL. A ausência de indutores no meio de cultura foi a melhor condição de produção da MnP por *Dichomitus squalens* e *Polyporus sanguineus*, obtendo atividades de 0,29 e 0,43 U/mL, respectivamente.

Em um trabalho posterior, ARORA e GILL (2005) estudaram a produção de enzimas ligninolíticas por *Phlebia floridensis* na presença dos indutores indulina AT, polyfon H, Reax 80 e Orzan S, álcool veratrílico e guaiacol. Porém, não houve aumento na atividade de MnP.

5.2. Purificação e caracterização da MnP de *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp.

5.2.1. Purificação

Para a fase de captura da MnP produzida por *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. foram aplicados 5 mL do caldo bruto concentrado em coluna Fenil Sepharose. Os caldos brutos obtidos dos cultivos com os microrganismos apresentaram duas frações de proteínas após essa etapa cromatográfica. Para *B. pumilus*, a fração I foi eluída a 10% e a fração II a 100% do tampão B, enquanto a fração I presente no caldo bruto de *Paenibacillus* sp. eluiu a 0% e a fração II a 100% do tampão B.

As **Figuras 7 e 8** ilustram as frações eluídas do caldo bruto obtido do cultivo de *B. pumilus* e de *Paenibacillus* sp., respectivamente.

Testes de determinação da atividade de MnP foram realizados com as 2 frações de proteínas eluídas do caldo bruto de *B. pumilus*. A fração I apresentou atividade de 0,43 U/L, tendo rendimento de 1,44% e fator de purificação de 0,03 vezes, enquanto a fração II não apresentou atividade para esta enzima. Após a concentração e diálise das frações I e II, os testes enzimáticos mostraram que a fração I apresentou atividade de 4,2 U/L e rendimento de 14,05%, com fator de purificação de 0,18. A fração II, mesmo concentrada não apresentou atividade de MnP detectável (**Tabela 2**).

Após essa etapa, as fases de purificação intermediária e polimento foram conduzidas aplicando-se 2 mL da fração I na coluna Q-Sepharose, e dessa forma confirmou-se a presença de uma fração protéica na amostra, pois apenas uma fração foi eluída nessa etapa cromatográfica. A atividade de MnP foi de 0,38 U/L, com rendimento de 1,27% e fator de purificação de 0,17, sendo que após a concentração e diálise da amostra a atividade foi de 3,45 U/L (**Tabela 2**).

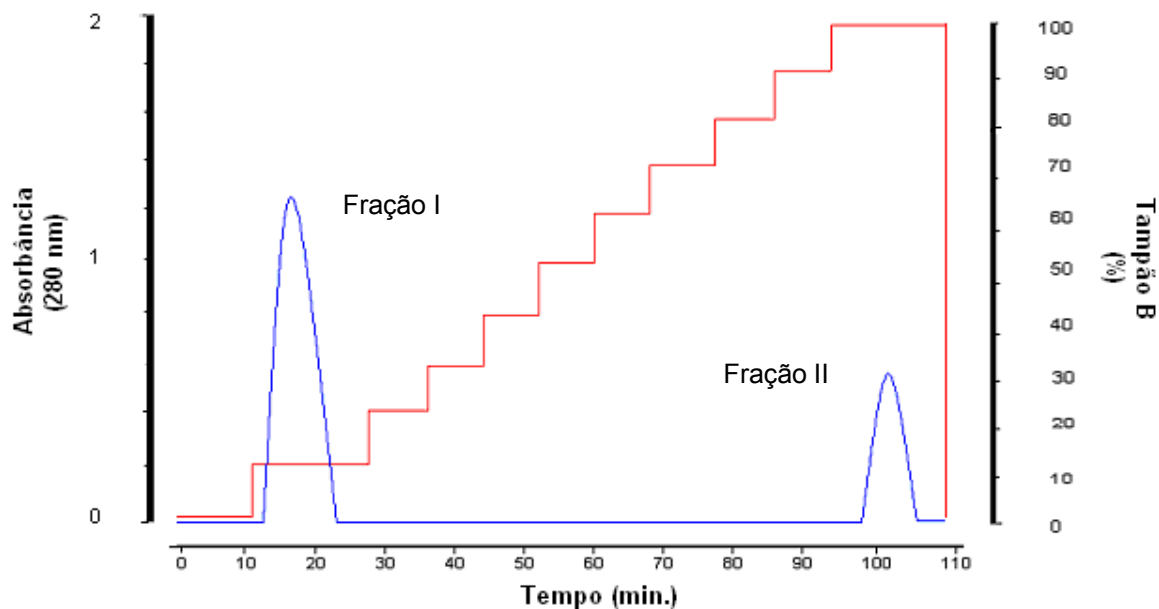


Figura 7 – Perfil de eluição do caldo bruto do cultivo de *B. pumilus* em cromatografia de interação hidrofóbica, utilizando resina Fenil Sepharose. Tampão sulfato de amônio de 1,7 a 0 M e tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, fluxo de 3,0 mL/min.

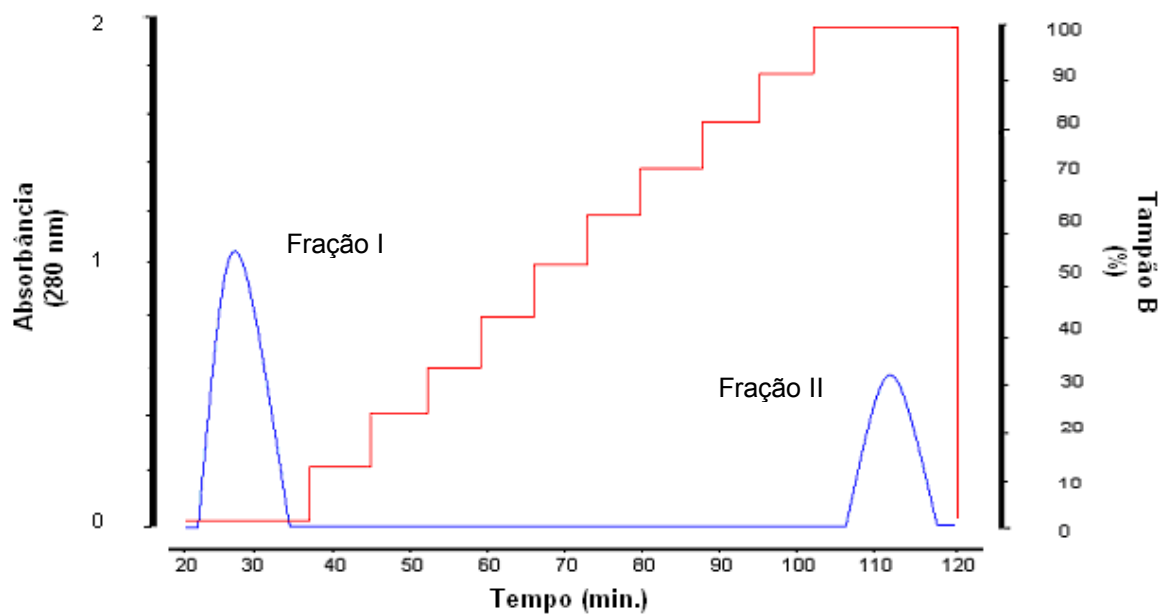


Figura 8 – Perfil de eluição do caldo bruto do cultivo de *Paenibacillus* sp. em cromatografia de interação hidrofóbica, utilizando resina Fenil Sepharose. Tampão sulfato de amônio de 1,7 a 0 M e tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, fluxo de 3,0 mL/min.

Tabela 2 – Síntese das etapas de purificação da MnP a partir do caldo bruto do cultivo de *B. pumilus*.

Etapa		Volume (mL)	Atividade (U/L)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Rend. (%)	Fator de Purific.
Caldo Bruto		1000	29,9	0,178	167,98	100,00	1,00
Ultrafiltração		100	287	0,387	741,6	959,87	4,41
Fenil	Fração I	140	0,43	0,08	5,37	1,44	0,03
Sepharose	Fração II	80	-	0,004	-	-	-
Ultraf./Diál.	Fração I	14	4,2	0,1382	30,39	14,05	0,18
	Fração II	8	-	0,0623	-	-	-
Q-Sepharose	Fração I	80	0,38	0,013	29,23	1,27	0,17
Ultraf./Diál.	Fração I	8	3,45	0,11	31,36	11,54	0,19

O mesmo procedimento foi realizado com as 2 frações eluídas obtidas do caldo bruto cultivado com *Paenibacillus* sp. A fração I apresentou atividade de MnP de 0,35 U/L, tendo rendimento de 2,9% e fator de purificação de 0,21 vezes, enquanto a fração II não apresentou atividade para esta enzima. Após a concentração e diálise das frações I e II, a primeira fração apresentou atividade de 3,2 U/L, rendimento de 26,49% e fator de purificação de 0,32. Na fração II não foi detectada atividade de MnP (**Tabela 3**).

Apenas uma fração protéica foi eluída após a aplicação de 2 mL da fração I na coluna Q-Sepharose. A atividade de MnP foi de 0,28 U/L, com rendimento de 2,32% e fator de purificação de 0,20, sendo que essa fração apresentou atividade de MnP de 2,4 U/L após sua concentração e diálise (**Tabela 3**).

A comparação desses valores com aqueles encontrados na literatura para MnP não é muito significativo pois há uma alta variabilidade de métodos cromatográficos utilizados. Duas MnP (MnP-GY e MnP-PGY) provenientes de diferentes meios de cultivos de *Pleurotus ostreatus* foram purificadas por KAMITSUJI et al. (2004). O caldo contendo a

enzima foi concentrado através de ultrafiltração (Amicon PM-10) e aplicado em coluna DEAE-Sepharose. A eluição da enzima ocorreu com tampão contendo 0,1 M NaCl. Maior atividade de MnP foi encontrada em MnP-PGY. Após a concentração das frações ativas de MnP-PGY, estas foram aplicadas em coluna Superdex 75 e um pico apresentou atividade de MnP de 653 U, sendo concentrado novamente e aplicado em cromatografia de troca aniônica usando coluna Mono-Q. A MnP eluída nessa etapa apresentou atividade de 265 U.

Tabela 3 – Síntese das etapas de purificação da MnP a partir do caldo bruto do cultivo de *Paenibacillus* sp.

Etapa		Volume (mL)	Atividade (U/L)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Rend. (%)	Fator de Purific.
Caldo Bruto		1000	12,08	0,38	31,79	100,00	1,00
Ultrafiltração		100	111,7	0,628	177,87	924,67	5,59
Fenil	Fração I	110	0,35	0,053	6,6	2,9	0,21
Sepharose	Fração II	65	-	0,048	-	-	-
Ultraf./Diál.	Fração I	11	3,2	0,317	10,09	26,49	0,32
	Fração II	6	-	0,3094	-	-	-
Q-Sepharose	Fração I	70	0,28	0,044	6,36	2,32	0,20
Ultraf./Diál.	Fração I	7	2,4	0,284	8,45	19,87	0,27

HAKALA et al. (2005) purificaram MnP do fungo *Physisporinus rivulosus*. Depois de concentrada, a amostra foi aplicada numa coluna Q-Sepharose (Pharmacia Amersham) para pré-purificação e após a concentração e diálise da amostra, esta foi aplicada em coluna Fenil Sepharose (Pharmacia Amersham). Posteriormente, as frações foram aplicadas em coluna Mono-Q HR. Na primeira etapa cromatográfica, algumas impurezas eluíram juntamente com a MnP. Na segunda e terceira etapa cromatográfica, as duas frações eluídas não apresentaram homogeneidade no pico cromatográfico.

Através da focalização isoeletrica (IEF) e análise de antígenos foi possível verificar que as proteínas eluídas eram isoenzimas.

5.2.2. Eletroforese em gel de SDS-PAGE

A purificação da MnP foi confirmada através de eletroforese em gel de SDS-PAGE. A determinação da massa molar da MnP foi realizada com uma mistura de proteínas padrões de baixa massa molar (Pharmacia), através de comparação com as respectivas mobilidades relativas. As **Figuras 9 e 10** mostram as bandas das proteínas padrões e enzimas purificadas.

As MnPs purificadas de *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. apresentaram massas molares de 25 kDa e 40 kDa, respectivamente. A MnP produzida pelo fungo *Irpex lacteus* foi purificada e a proteína apresentou massa molar de 37 kDa (BORAVÁ et al., 2006). HOSHINO et al. (2002) purificaram a MnP produzida por *Lenzites betulinus* e a através de eletroforese em SDS-PAGE verificou-se massa molar de 40 kDa.

Duas MnP (MnP-PGY e MnP-GY) produzidas pelo fungo *Pleurotus ostreatus* (KAMITSUJI et al., 2004), e uma MnP purificada de *Trametes versicolor* (CHAMPAGNE e RAMSAY, 2005) apresentaram massas molares de 42 kDa.

De acordo com os resultados do presente estudo e menções reportadas na literatura, verificou-se que a massa molar da MnP purificada de *B. pumilus* apresentou massa molar inferior às de outras MnPs produzidas por fungos.

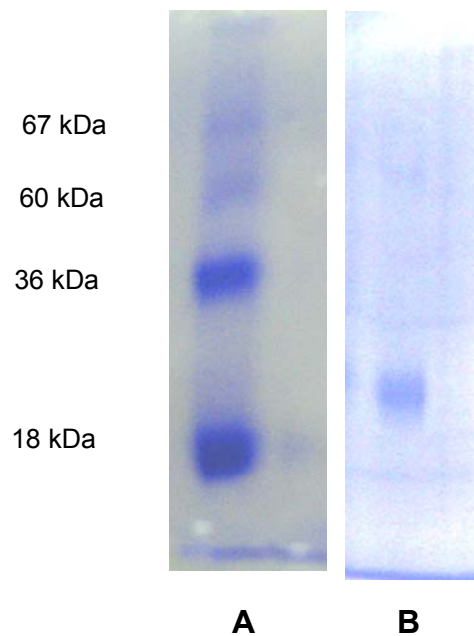


Figura 9 – Eletroforese em SDS-PAGE: A – Padrões; B – MnP purificada de *B. pumilus*. Coloração com Coomassie Brilliant Blue.

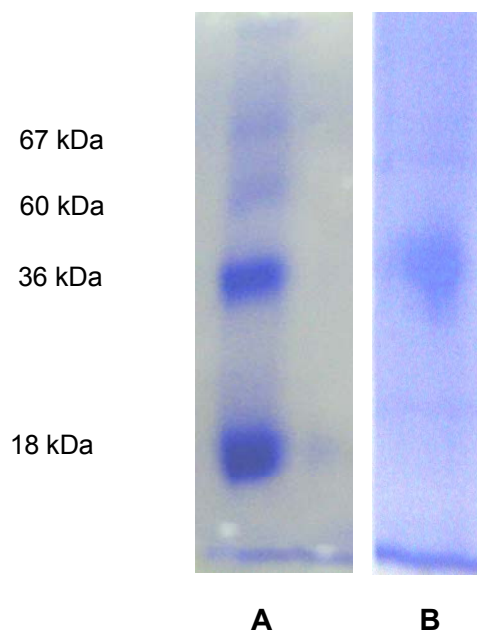


Figura 10 – Eletroforese em SDS-PAGE: A – Padrões; B – MnP purificada de *Paenibacillus* sp. Coloração com Coomassie Brilliant Blue.

5.3. Determinação do pH ótimo e temperatura ótima de atividade da MnP purificada

Os resultados de atividade enzimática a diferentes valores de pH e temperatura, para a MnP de *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. estão apresentados nas **Figuras 11 e 12**.

De acordo com os resultados, houve um aumento gradual na atividade da MnP de *B. pumilus* conforme aumento do pH de 5,0 para 8,0, onde foi verificada máxima atividade (4,3 U/L). Com aumento do pH, a atividade decresceu, sendo de 1,9 U/L a pH 9,0 e 0,45 U/L a pH 10,0 (**Figura 11**).

Para *Paenibacillus* sp., o pH ótimo foi 9,0, apresentando atividade enzimática de 5,65 U/L. A MnP produzida por esta bactéria mostrou ser mais estável à variação de pH do que a enzima produzida por *B. pumilus*, sendo a menor atividade enzimática observada em pH 6,0 (3,56 U/L) (**Figura 11**).

Verificou-se que o pH ótimo para a atividade de MnP de *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. está na faixa alcalina. As condições de isolamento desses microrganismos foram direcionadas para a obtenção de bactérias com máximas atividades enzimáticas em meios alcalinos. No presente estudo, confirma-se que as atividades máximas das enzimas purificadas ocorrem nessas condições de pH.

Estudos com enzimas produzidas por fungos mostraram que a atividade ótima ocorre em valores ácidos de pH. A MnP produzida por *Phebia floridensis* (ARORA e GILL, 2005) e duas isoenzimas de MnP denominadas MnP₁ e MnP₂ (BOER et al., 2006) produzidas pelo fungo *Lentinula edodes* apresentaram pH ótimo de 4,5.

Quando *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 foi cultivada em presença de 2,6-dimetoxifenol, álcool veratrílico, guaiacol e ABTS máxima atividade de MnP ocorreu a pH 5 (WANG et al., 2002).

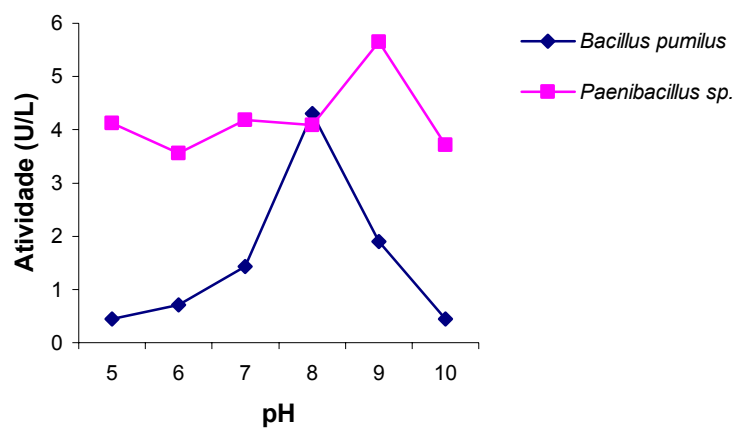


Figura 11 – Atividade de MnP de *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. em pH 5,0 e pH 6,0 – tampão citrato-fosfato 0,2 M; pH 7,0 e pH 8,0 – tampão fosfato de sódio 0,2 M; pH 9,0 e pH 10,0 – tampão glicina-NaOH 0,2 M.

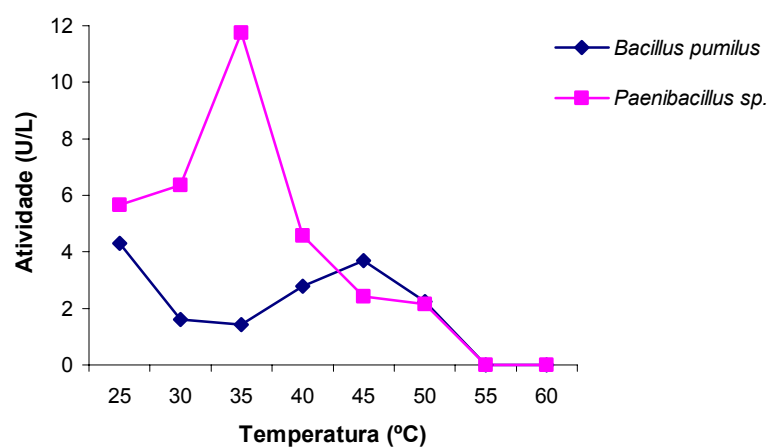


Figura 12 – Atividade de MnP de *B. pumilus*, em pH 8,0 – tampão fosfato de sódio 0,2 M e de *Paenibacillus* sp., em pH 9,0 – tampão glicina-NaOH 0,2 M, em diferentes valores de temperatura.

CHENG et al. (2007) isolaram e purificaram uma MnP produzida pelo fungo *Schizophyllum* sp. F17 e esta apresentou pH ótimo de 6,8.

Em seguida foram estudadas as atividades de MnP em diferentes valores de temperatura, sendo que os ensaios ocorreram no valor de pH ótimo determinado anteriormente para cada microrganismo, ou seja, pH 8,0 para *B. pumilus* e pH 9,0 para *Paenibacillus* sp.

A temperatura ótima de atividade da MnP de *B. pumilus* foi 25 °C, com atividade de 4,3 U/L. Nenhuma atividade enzimática foi detectada a 55 °C e a 60 °C (**Figura 12**).

Para a MnP de *Paenibacillus* sp. a temperatura ótima de atividade foi 35 °C, com atividade de 11,74 U/L (**Figura 12**). Assim como ocorreu com a atividade da MnP de *B. pumilus*, a enzima produzida pelo *Paenibacillus* sp. também sofreu desnaturação quando submetida a 55 °C e 60 °C.

Verifica-se uma variação quanto à temperatura ótima da atividade de MnP produzida por diversos microrganismos. A MnP purificada de *Aspergillus terreus* LD-1 revelou máxima atividade a 37 °C (KANAYAMA et al., 2002), enquanto GILL e ARORA (2003), estudando a MnP produzida por *Dichomitus squalens*, *Irpex flavus* e *Polyporus sanguineus* concluíram que a melhor temperatura para a atividade desta enzima foi 30 °C para os três microrganismos. Nenhuma atividade foi verificada a 35 °C, exceto para a MnP de *Polyporus sanguineus*. Em estudo posterior ARORA e GILL (2005) mostraram que a temperatura ótima de atividade da MnP produzida por *Phebia floridensis* foi de 25 °C.

Nesse estudo, a temperatura ótima de atividade da MnP purificada de *B. pumilus* se compara ao menor valor de temperatura ótima reportada na literatura. Já para a MnP purificada de *Paenibacillus* sp., a máxima atividade ocorreu a 35 °C, temperatura

idêntica a encontrada para a MnP purificada produzida pelo fungo *Schizophyllum* sp. F17 (CHENG et al., 2007).

A **Tabela 4** resume alguns trabalhos realizados com MnP, mostrando os microrganismos estudados, principais condições de cultivo e produção e atividade enzimática.

Através dos resultados obtidos no presente trabalho verificamos que a atividade de MnP observada no caldo bruto de cultivo de *B. pumilus* (31,66 U/L) foi quase três vezes superior à encontrada para a MnP de *Paenibacillus* sp (12,33 U/L). No entanto, a atividade da enzima de *B. pumilus* purificada foi inferior, devido a perdas ocorridas durante as etapas de purificação.

Tabela 4 – Atividade de MnP encontrada na literatura para diferentes microrganismos.

MICRORGANISMOS	CONDIÇÕES DE CULTIVO E PRODUÇÃO DA ENZIMA	ATIVIDADE (U/L)	REFERÊNCIAS
<i>Dichomitus squalens</i>	Caldo extrato malte, pH 5,5 a 25 °C, após 8 dias	290	
<i>Irpex flavus</i>	Caldo sais minerais com palha de arroz, pH 5,5 a 25 °C, após 8 dias	340	GILL e ARORA, 2003.
<i>Polyporus sanguineus</i>	Caldo extrato malte, pH 5,5 a 25 °C, após 8 dias	430	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Meio extrato de levedura, peptona/glicose, pH 7,5 a 28 °C, após 8 dias	740	KAMITSUJI et al., 2004.
<i>Phlebia floridensis</i>	Caldo de sais minerais, pH 4,5 a 25 °C, após 4 dias	60	ARORA e GILL, 2005.
<i>Ganoderma</i> sp.	Caldo extrato de malte, a 30 °C, após 7 dias	7,8	SILVA et al., 2005.
<i>Trametes versicolor</i>	Glicose como fonte de C, pH 6,0 a 25 °C, após 8 dias	44	MIKIASHVILI et al., 2005.
<i>B. pumilus</i>	Meio xilana, suplementado com indulina AT, pH 9,0 a 45 °C, após 8 h.	31,66	
<i>B. pumilus</i>	MnP purificada, pH 8 a 25 °C	4,3	PRESENTE ESTUDO
<i>Paenibacillus</i> sp.	Meio xilana, pH 9,0 a 45 °C, após 20 h	12,33	
<i>Paenibacillus</i> sp.	MnP purificada, pH 9,0 a 35 °C	11,74	

5.4. Estudos da descoloração do efluente da indústria papelreira

Para os estudos da descoloração do efluente da indústria papelreira optou-se pelo emprego do microrganismo, com base em estudos anteriores desenvolvidos com fungos. Assim, as bactérias foram inoculadas separadamente no efluente da indústria papelreira após a correção do pH para 7,0, 9,0 ou 11,0. O estudo foi conduzido conforme descrito no item 4.2.8. Foi utilizada a temperatura de produção de MnP, ou seja, 45 °C.

5.4.1. Determinação da cor real

A cor real do efluente não tratado foi de 887, 781 e 597 mgPt-Co/L para os pHs 7,0, 9,0 e 11,0, respectivamente.

Após o tratamento do efluente com *B. pumilus*, os valores da cor real foram reduzidos. Na **Tabela 5** estão apresentadas as porcentagens de redução da cor real após 24 h e 48 h de tratamento com *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp.

Tabela 5 – Remoção da cor real do efluente com diferentes valores de pH após tratamento com *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp.

EFLUENTE (pH)	TEMPO DE TRATAMENTO (h)	REMOÇÃO DA COR REAL APÓS TRATAMENTO (%)	
		<i>B. pumilus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.
7,0	24	20,63	23,04
	48	24,01	41,08
9,0	24	29,24	36,32
	48	41,87	42,30
11,0	24	28,42	35,85
	48	29,98	31,55

As **Figuras 13** e **14** apresentam os valores médios de remoção da cor real do efluente da indústria papelreira após o tratamento com *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp., respectivamente. O tratamento do efluente com *Paenibacillus* sp. de forma geral, foi mais eficiente do que o tratamento com *B. pumilus*, sugerindo que outras enzimas ligninolíticas, que não foram alvos deste estudo, possam estar sendo produzidas pelo microrganismo.

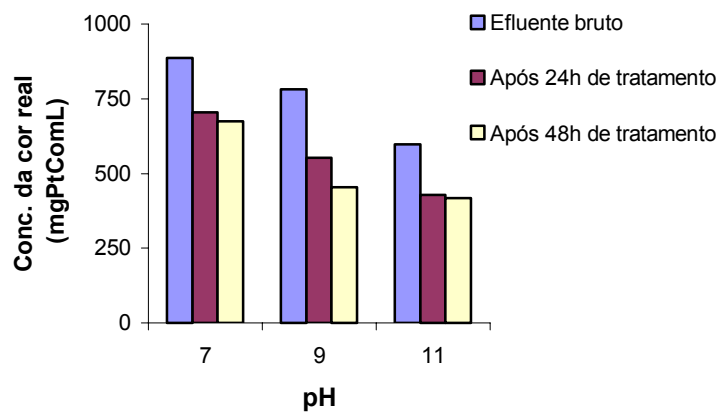


Figura 13 – Remoção da cor real do efluente da indústria papelreira tratado com *B. pumilus*.

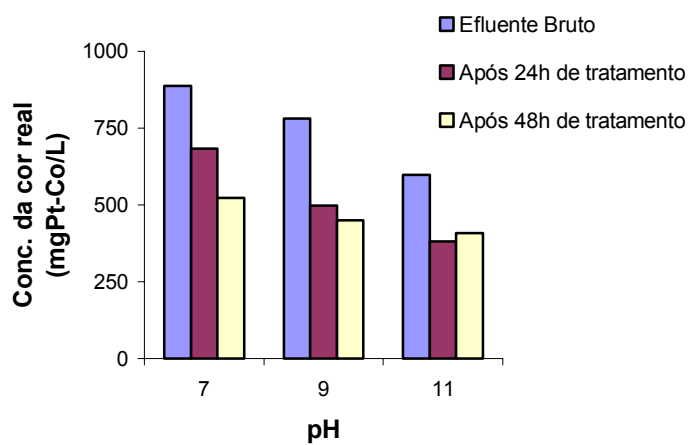


Figura 14 – Remoção da cor real do efluente da indústria papelreira tratado com *Paenibacillus* sp.

Um estudo realizado por SAHOO e GUPTA (2005) utilizando enzimas ligninolíticas dos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*, comprovou que essas enzimas estão aptas a remover a coloração de efluentes da indústria papaleira. *A. fumigatus* produziu descoloração de 55,5% quando o ensaio ocorreu em estado estático e 89,3% quando o ensaio foi realizado com agitação, e *A. flavus* foi responsável por 53,5 e 84,0% de remoção nessas mesmas condições. A diferença de remoção da cor do efluente nessas condições pode estar relacionada às diferenças de aeração empregadas.

Pleurotus sajor-caju, *P. platypus* e *P. citrinopileatus* também foram alvos de estudos para a remoção da cor do efluente da indústria papaleira (RAGUNATHAN e SWAMINATHAN, 2004). Dentre as três espécies, *P. sajor-caju* foi o microrganismo que apresentou o melhor resultado, removendo 66,7% da cor do efluente em 6 dias de tratamento.

A utilização de enzimas bacterianas para a remoção da cor do efluente da indústria do papel foi reportada na literatura apenas na década de 1980. Em estudos com fungos, verifica-se que há alta remoção da cor do efluente, observando-se eficiência entre 55% e 90%. Porém, para se obter essa faixa de eficiência, são necessários no mínimo três dias de tratamento com o microrganismo, sendo que há estudos nos quais verificam-se maiores taxas de remoção da cor em 144 horas (6 dias), o que pode não ser viável industrialmente.

No presente estudo, obteve-se eficiência de cerca de 40% de remoção da cor após 48 h, o que mostra que um aumento no tempo de tratamento do efluente com bactérias, além deste período, pode levar à mesma eficiência obtida com fungos.

5.4.2. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

O efluente não tratado e o efluente tratado por *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. foram avaliados quanto à DQO. Os resultados estão apresentados nas **Figuras 15 e 16**.

Os valores médios de DQO do efluente não tratado foram de 2157,92, 2221,68 e 2297,59 mg/mL, respectivamente, quando o pH foi acertado para 7,0, 9,0 e 11,0. Na **Tabela 6** estão apresentadas as porcentagens de redução da DQO após 24 h e 48 h de tratamento com *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp.

Tabela 6 – Remoção da DQO do efluente com diferentes valores de pH após tratamento com *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp.

EFLUENTE (pH)	TEMPO DE TRATAMENTO (h)	REMOÇÃO DA DQO APÓS TRATAMENTO (%)	
		<i>B. pumilus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.
7,0	24	20,46	19,11
	48	21,19	19,41
9,0	24	21,95	22,34
	48	22,08	22,89
11,0	24	23,13	23,70
	48	23,58	23,91

O estudo da remoção da DQO do efluente da indústria papaleira por *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. não revelou mudanças significativas quando 24 h ou 48 h de tratamento foram utilizadas.

NAGARATHNAMMA et al. (1999) estudando a remoção da DQO do efluente da indústria papaleira pelo fungo *Ceriporiopsis subvermispora*, obtiveram 45% de eficiência após 48 h, cerca do dobro obtido no presente trabalho.

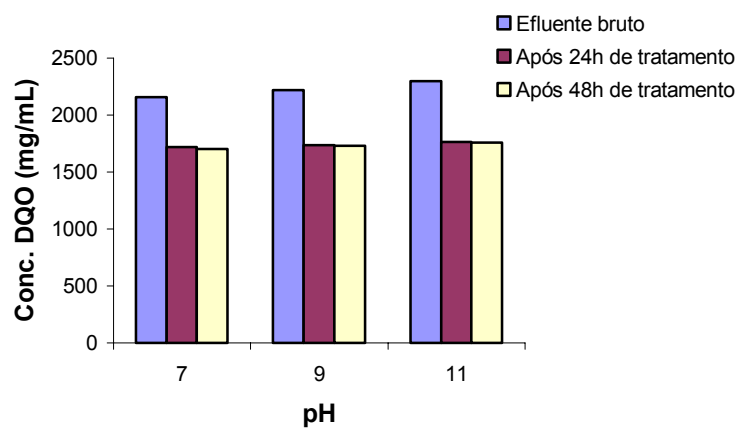


Figura 15 – Remoção da DQO do efluente da indústria papeleira tratado com *B. pumilus*.

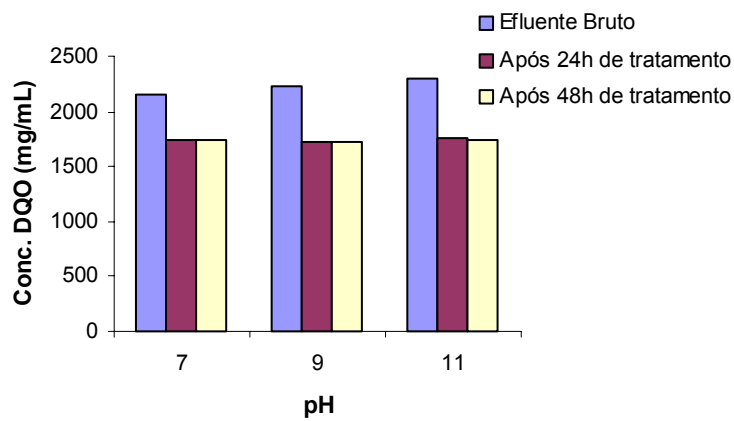


Figura 16 – Remoção da DQO do efluente da indústria papeleira tratado com *Paenibacillus* sp.

RAGUNATHAN e SWAMINATHAN (2004) verificaram a redução de DQO em seus estudos de remoção da cor do efluente da indústria papaleira. *Pleurotus sajor-caju* mostrou ser a espécie mais eficiente, reduzindo 61,3% da DQO em 10 dias de tratamento.

Novos isolados de *Fomes lividus* e *Trametes versicolor* foram capazes de reduzir 66,7 e 59,7% da DQO presente nesses efluentes (SELVAM et al., 2002). A máxima remoção da DQO observada neste estudo não ultrapassou 24% para os dois microrganismos estudados.

A literatura reporta estudos utilizando fungos que alcançaram alta remoção da DQO, quando comparadas aos valores de remoção alcançados por *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp.

5.4.3. Cromatografia de permeação em gel do efluente da indústria papaleira

A distribuição das massas molares do efluente da indústria papaleira, não tratado e tratado com *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. foram determinadas por cromatografia de permeação em gel. As amostras do efluente tratado que apresentaram melhores resultados no conjunto de ensaios cor real e DQO foram selecionadas para esse ensaio, ou seja, pH 9,0 e 48 h para ambos os microrganismos. Embora os valores de DQO não tenham apresentado diferenças quando se considera os diferentes pHs e tempos estudados, tais condições foram escolhidas em função da remoção da cor.

A distribuição das massas molares do efluente não tratado e das amostras tratadas após 48 h com *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. estão representadas nas **Figuras 17, 18 e 19**, respectivamente.

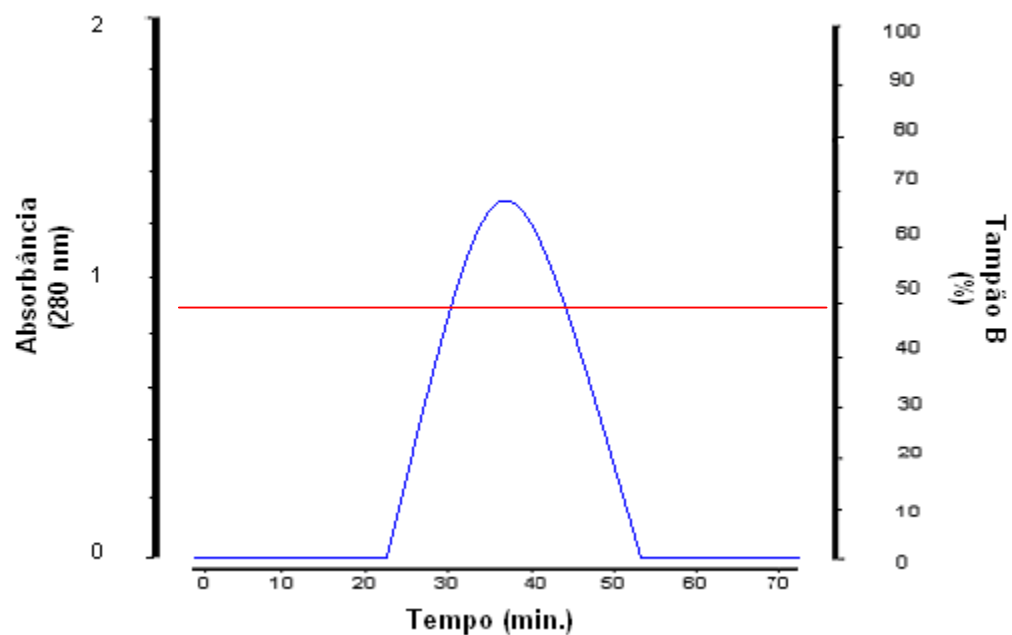


Figura 17 – Perfil da massa molar do efluente da indústria papaleira a pH 9,0 em cromatografia de permeação em gel, utilizando resina Sephadex G-75. Tampão NaOH e LiCl em sistema isocrático, fluxo de 2,0 mL/min.

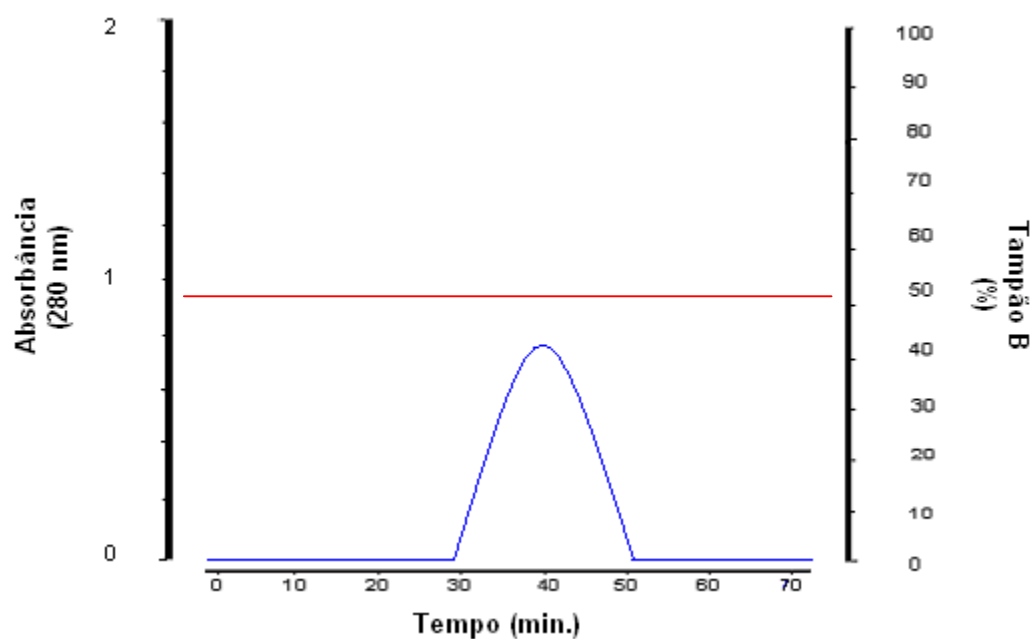


Figura 18 – Perfil da massa molar do efluente da indústria papaleira a pH 9,0 após 48 h de tratamento com *B. pumilus* em cromatografia de permeação em gel, utilizando resina Sephadex G-75. Tampão NaOH e LiCl em sistema isocrático, fluxo de 2,0 mL/min.

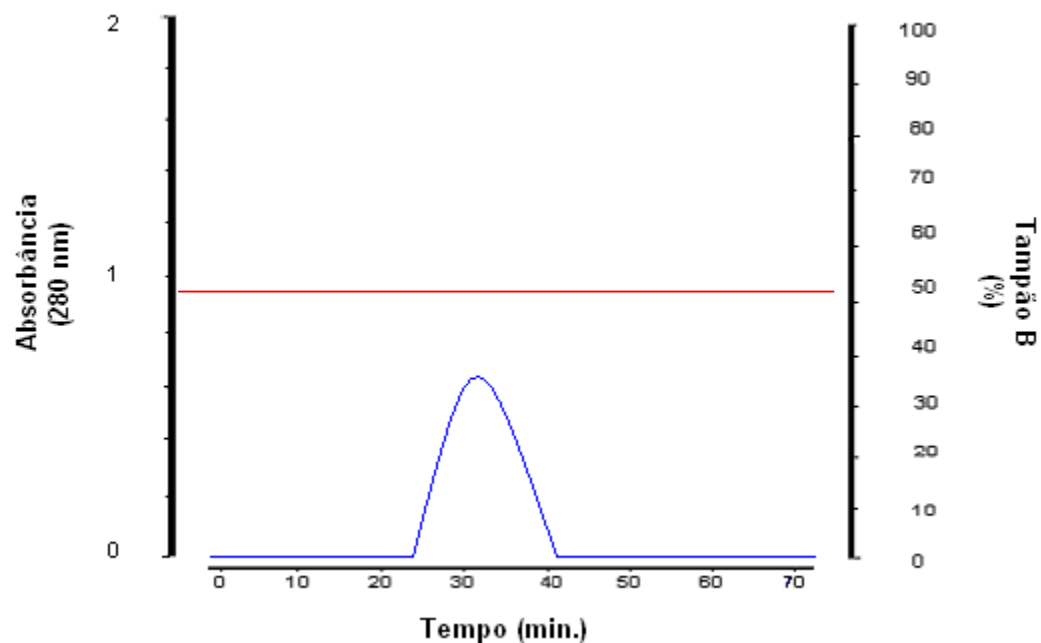


Figura 19 – Perfil da massa molar do efluente da indústria papeleira a pH 9,0 após 48 h de tratamento com *Paenibacillus* sp. em cromatografia de permeação em gel, utilizando resina Sephadex G-75. Tampão NaOH e LiCl em sistema isocrático, fluxo de 2,0 mL/min.

De acordo com SAHOO e GUPTA (2005) estudos da distribuição da massa molar após a remoção da cor de efluentes são utilizados para determinar a modificação que ocorreu em grupos cromotróficos responsáveis pela cor. Através da comparação do perfil da fração eluída do efluente e das frações eluídas após o tratamento com os microrganismos, verifica-se diminuição nas massas molares. As áreas das frações sofreram redução de aproximadamente 60% e 70% com o tratamento por *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp., respectivamente, confirmando que compostos foram depolimerizados durante o tratamento.

Ensaio cromatográfico com o efluente da indústria papeleira, não tratado e após o tratamento com o fungo *A. fumigatus*, mostraram que as frações eluídas apresentaram decréscimo significativo nos compostos de alto e médio peso molecular, e baixa concentração de compostos de baixo peso molecular, confirmando assim a

depolimerização e degradação bioquímica dos compostos responsáveis pela coloração do efluente SAHOO e GUPTA (2005).

Um estudo realizado por NAGARATHNAMMA et al. (1999) revelou que *Ceriporiopsis subvermispota* foi capaz de degradar compostos presentes no efluente da indústria papeleira. Ensaio utilizando HPLC indicaram que macromoléculas apresentavam pesos moleculares de 16 kDa. Após o tratamento com o fungo, essas macromoléculas foram degradadas a compostos de baixo peso molecular (< 1 kDa).

6. CONCLUSÕES

- *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. foram aptos a produzir MnP em meio alcalino contendo xilana como única fonte de carbono;
- O estudo da adição de indutores ao meio de cultivo mostrou que a Indulina AT foi o principal indutor responsável pelo aumento da atividade da MnP de *B. pumilus*, enquanto a presença de indutores não afetou a produção de MnP por *Paenibacillus* sp;
- A purificação do caldo bruto de cultivo dos microrganismos, em cromatografia de interação hidrofóbica, utilizando coluna Fenil Sepharose, permitiu a eluição de duas frações protéicas (FI e FII), sendo que apenas a FI de cada microrganismo apresentou atividade de MnP;
- As maiores atividades das enzimas purificadas ocorreram em pH alcalino, e à temperatura de 25 °C para *B. pumilus* e de 35 °C para *Paenibacillus* sp;
- A atividade de MnP observada no caldo bruto de cultivo de *B. pumilus* foi quase três vezes superior à encontrada para a de *Paenibacillus* sp. No entanto, a atividade da enzima de *B. pumilus* purificada foi inferior devido a perdas ocorridas durante as etapas de purificação.
- O cultivo das bactérias no efluente da indústria do papel mostrou que maior remoção de cor e DQO ocorreram em pH 9,0 e 45 °C, após 48 h.
- De acordo com os resultados obtidos, é possível afirmar que as bactérias *B. pumilus* e *Paenibacillus* sp. apresentam potencial para aplicação na remoção da cor do efluente da indústria papeleira.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K. H.; CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G. M. – Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Appl. Env. Microbiol. 66(8): 3357-3362, 2000.
- ALEXANDRE, G. e ZHULIN, I. B. – Laccases are widespread in bacteria. Tibtech. 18: 41-42, 2000.
- ANGELO, R. S. - Modo de ação de xilanases de *Aspergillus* sp 2M1 em sequências de branqueamento de polpas de *Eucalyptus grandis* totalmente livres de cloro. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, Brasil, março, 1999.
- ANTONPOULOS, V. T.; HERNANDEZ, M.; ARIAS, M. E.; MAVRAKOS, E.; BALL, A. S. – The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57(1-2): 92-97, 2001.
- ARORA, D. S. e GILL, P. K. – Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. Biores. Technol. 77(1): 89-91, 2001.
- ARORA, D. S. e GILL, P. K. – Production of ligninolytic enzymes by *Phlebia floridensis*. W. J. Microbiol. Biotechnol. 21: 1021-1028, 2005.
- BABOROVÁ, P.; MODER, M.; BALDRIAN, P.; CAJTHAMLOVÁ, K.; CAJTHAML, T. – Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. Res. Microbiol. 157(3): 248-253, 2006.
- BAJPAI, P. e BAJAPAI, B. K. – Biological color removal of pulp and paper mill wastewater. J. Biotechnol. 33 211-220, 1994.
- BANAT, M. B.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHAN, R. – Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. Biores. Technol. 58: 217-227, 1996.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; STHARDY, G. E. – Veratryl alcohol as inducer of laccase by ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on polymeric dye Poly R-478. Lett. Appl. Microbiol. 23: 93-96, 1996.
- BARBOSA, A. M. e DEKKER, R. F. H. – Polyphenol oxidases produced by *Botryosphaeria* sp.: effects os aeration, veratryl alcohol and sodium lignosulfonate concentrarions. Proc. Environmental Biotechnology Conference, Massey University, Palmerston North. New Zealand. 1-4 september 2: p. 404, 1996.
- BOER, C. G.; OBICI, L.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. – Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. Proc. Biochem. 41(5): 1203-1207, 2006.

- BOLLAG, J. M. ; SHUTTLEWORTH, K. L.; ANDERSON, D. H. – Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(12): 3086-3091, 1988.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G.; REID, I. D.; LANTHIER, P.; YAGYCHI, M. – Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azino bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl. Environm. Microbiol.* 61(5): 1876-1880, 1995.
- BRADFORD, M. M. – A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- BUMPUS, J. A. – Microbial degradation of azo dyes. In: SINGH, V. P. *Biotransformations: microbial degradation of health risk compounds.* p. 157-177, 1995.
- CALL, H. P. – Proc. Int. Non-Chlorine Bleaching Conference, Paper 4-3, 16 p, 5-9, 1995.
- CASTILLO, M. D.; ANDERSSON, A.; ANDER, P.; STENSTROM, J.; TORSTENSSON, L. – Establishment of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on unsterile straw in solid substrate fermentation system intended for degradation of pesticides. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 17(6): 627-633, 2001.
- CHAMPAGNE, P. P. e RAMSAY, J. A. – Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 276-285, 2005.
- CHEFETZ, B.; CHEN, Y.; HADAR, YITZHAK – Purification and Characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Appl. Env. Microbiol.* 64(9): 3175-3179, 1998.
- CHENG, X.; JIA, R.; LI, P.; TU, S.; ZHU, Q.; TANG, W.; LI, X. – Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme. *Enz. Microb. Technol.* 41(3): 258-264, 2007.
- CHUNG, N.; KANG, G. Y.; KIM, G. H.; LEE, I. S.; BANG, W. G. – Effect of nutrient nitrogen on the degradation of pentachlorophenol by white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11(4): 704-708, 2001.
- DIAMANTIDIS, G.; EFFOSSE, A.; POTIER, P.; BALLY, R. – Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rizoapheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biol. Biochem.* 32: 919-927, 2000.
- DUARTE, M. C. T.; PORTUGAL, E. P.; PONEZI, A. N.; BIM, M. A.; TAGLIARI, C. V.; FRANCO, T. T. – Production and purification of alkaline xylanases. *Bioresour. Technol.* 68: 49-53, 1997.

- DUARTE, M. C. T.; PORTUGAL, E. P.; PONEZI, A. N.; BIM, M. A.; TAGLIARI, C. V.; FRANCO, T. T. – Production and purification of alkaline xylanases by partitioning in aqueous two-phase systems. *Bioresour. Technol.* 66: 49-53, 1998.
- EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. E. – The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Env. Microbiol.* 62(4): 1151-1158, 1996.
- EMTIAZI, G. e NAHVI, I. – Multi-enzyme production by *Cellulomonas* sp. grown on wheat straw. *Biom. Bioen.* 19(1): 31-37, 2000.
- FANG, J.; HUANG, F.; GAO, P. J. – Optimization of cellobiose dehydrogenase production by *Schizophyllum commune* and effect of the enzyme on kraft pulp bleaching by ligninases. *Proc. Biochem.* 34(9): 957-961, 1999.
- FARNET, A. M.; CRIQUET, S.; TAGGER, S.; GIL, G.; LE PETIT, J. – Purification, partial characterization, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Can. J. Microbiol.* 46(3): 189-194, 2000.
- FAURE, D.; BOUILLANT, M. L.; JACOUD, C.; BALLY, R. Phenolic derivatives related to lignin metabolism as substrates for *Azospirillum* laccase activity. *Phytoch.* 42(2): 357-359, 1996.
- FIELD, J. A.; DE JONG, E.; FEIJO-COSTA, G.; DE BONT, J. A. M. – Screening for ligninolytic fungi applicata to the biodegradation of xenobiotics. *Titech.* 11: 44-49, 1993.
- GARG, S. K. e MODI, D. R. – Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* 19(2): 85-112, 1999.
- GHOSH, P. e SINGH, A. – Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass. *Adv. Applied Microbiol.* 39: 295-327, 1993.
- GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J. M. – Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorremed. J.* 3 (1): 1-25, 1999.
- GILL, P. K. e ARORA, D. S. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 30(1): 28-33, 2003.
- GIVAUDAN, A.; EFFOSSE, A.; FAURE, D.; POTIER, P.; BOUILLANT, M. L.; BALLY, R. – Polyphenol oxidase from *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere : evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 108: 205-210, 1993.
- HAKALA, T. K.; LUNDELL, T.; GALKIN, S.; MAIJALA, P.; KALKKINEN, N.; HATAKKA, A. – Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. *Enz. Microb. Technol.* 36: 461-468, 2005.

- HOSHINO, F.; KAJINO, T.; SUGIYAMA, H.; ASAMI, O.; TAKAHASHI, H. – Thermally stable and hydrogen peroxide tolerant manganese peroxidase (MnP) from *Lenzites betulinus*. FEBS Letters. 530: 249-252, 2002.
- HULLO, M. F.; MOSZER, I.; DANCHIN, A.; MARTIN-VERSTRAETEM, I. – CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. J. Bacteriol. 183(18): 5426-5430, 2001
- HUSSAIN, Q. e JAN, U. – Detoxification of phenols nad aromatic amines from polluted wastewater by using phenol oxidases. J. Scient. Ind. Res. 59(4): 286-293, 2000.
- JOYCE, T. W.; CHANG, H-M.; CAMPBELL, A. G.; GERRARD, E. D.; KIRK, T. K. A continuous biological process to decolorize bleach plant effluents. Biotechnol. Adv 2: 301-8, 1984.
- KAMITSUJI, H.; HONDA, Y.; WATANABE, T.; KUWAHARA, M. – Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65: 287-294, 2004.
- KANAYAMA, N.; SUZUKI, T.; KAWAI, K. – Purification and characterization of an alkaline manganese peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1. J. Biosc. Bioeng. 93(4): 405-410, 2002.
- KANTELINEN, A.; HATAKKA, A.; VIIKARI, L. – Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlebia radiata*. Appl. Biochem. Biotechnol. 31: 234-239, 1989.
- KARIMINIAAE-HAMEDAANI, H. R.; SAKURAI, A.; SAKAKIBARA, M. – Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus. Dyes and Pigments. 72(2): 157-162, 2005.
- KATAGIRI, N.; TSUTSUMI, Y.; NISHIDA, T. – Correlation of brightening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation durint biobleaching of kraft pulp by white-rot fungi in the solid-state fermentation system. Appl. Environ. Microbiol. 61: 617-622, 1995.
- KOGA, S.; OGAWA, J.; CHOI, Y.-M.; SHIMIZU, S. – Novel bacterial peroxidase without catalase activity from *Flavobacterium meningosepticum*: purification and characterization. Biochem. Biophys. Acta 1435: 117-126, 1999.
- KUMARAN, S.; SASTRY, C. A.; VIKINESWARY, S. – Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. W. J. Microbiol. Biotechnol. 13: 43-49, 1997.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. – Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phaerochaete chrysosporium*. FEBS Letter 169:247-250, 1984.
- LAEMMLI, U. K. – Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685, 1970.

- LEE, Y. J. e SHIN, K. S. – Purification and properties of laccase of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. J. Microbiol. 37(3): 148-153, 1999.
- LEISOLA, M. S. A. e FIECHTER, A. – New trends in lignin biodegradation. In: MIZRAHI, A.; WEZEL, A. L. Advances in Biotechnol. Proces. 5. New York, Alan R. Liss, Inc., p.59-89, 1985.
- LEISOLA, M. S. A. e WALDNER, R. In: ZADRAZIL, F. & REINIGER, P. (eds) Treatment of lignocellulosics with White rot fungi. Elsevier Appl. Science, London, pp. 37-42, 1988.
- LEVIN, L. e FORCHIASSIN, F. – Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. Acta Biotechnol. 21(2): 179-186, 2001.
- LO, S. C.; HO, Y. S.; BUSWELL, J. A. – Effect of phenolic monomers on the production of laccases by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*, and partial characterization of a major laccase component. Mycologia 93(3): 413-421, 2001.
- MACHUCA, A; AOYAMA, H.; DURÁN, N. C. – Production and characterization of thermostable phenoloxidases of the ascomycete *Thermoascus aurantiacus*. Biotechnol. Appl. Biochem. , 27: 217-223, 1998.
- MAKKAR, R. S.; TSUNEDA, A.; TOKUYASU, K.; MORI, T. – *Lentinula edodes* produces a multicomponent protein complex containing manganese (II)-dependent peroxidase, laccase and beta-glucosidase. FEMS Microbiol. Lett. 200(2): 175-179, 2001.
- MANDELS, N. e STENBERG, D. – Recent advances in cellulase technology. J. fermentation Technol. 54: 267-286, 1976.
- MANZANARES, P.; FAJARDO, S.; MARTÍN, C. – Production of ligninolytic activities when treating paper pulp effluents by *Trametes versicolor*. J. Biotechnol. 43: 125-132, 1995.
- MEHNA, A.; BAJPAI, P.; BAJPAI, P.K. – Studies on decolorization of effluent from a small pulp mill utilizing agriresidues with *Trametes versicolor*. Enz. Microb. Technol. 17: 18-22, 1995.
- MIKIASHVILI, N.; ELISASHBILI, V.; WASSER, S.; NEVO, E. – Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. Biotech. Lett. 27: 955-959, 2005.
- MIN, K. L.; KIM, Y. H.; KIM, Y. W.; JUNG, H. S.; HAH, Y. C. – Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. Arch. Biochem. Biophys. 392(2): 279-286, 2001.
- MOREIRA, M. T.; PALMA, C.; MIELGO, I.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M. – In vitro degradation of a polymeric dye (Poly R-478) by manganese peroxidase. Biotechnol. Bioeng. 75(3): 362-368, 2001a.

- MOREIRA, M. T.; SIERRA-ALVAREZ, R.; LEMA, J. M.; FEIJOO, G.; FIELD, J. A. – Oxidation of lignin in eucalyptus kraft pulp by manganese peroxidase from *Bjerkandera* sp strain BOS55. *Biores. Technol.* 78(1): 71-79, 2001b.
- MOREIRA, M. T.; FEIJOO, G.; CANAVAL, J.; LEMA, J. M. – Semipilot-scale bleaching of kraft pulp with manganese peroxidase. *Wood Sci. Technol.* 37: 117-123, 2003.
- MUNKITTRICK, K. R.; SERVOS, M. R.; CAREY, J. H.; VAN DER KRAAK, G. J. – Environmental impacts of pulp and paper wastewater: Evidence for a reduction in environmental effects at North American pulp mills since 1992. *Water Sci. Technol.* 35: 329-338, 1997.
- MUNOZ, C.; GUILLEN, F.; MARTINEZ, A. T.; MARTINEZ, M. J. – Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl. Env. Microbiol.* 63(6): 2166-2174, 1997.
- NAGARATHNAMMA, R.; BAJPAI, P.; BAJPAI, P. K. – Studies on decolourization, degradation and detoxification of chlorinated lignin compounds in kraft bleaching effluents by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Proc. Biochem.* 34: 939-948, 1999.
- OKINO, L. K.; MACHADO, K. M. G.; FABRIS, C.; BONONI, V. L. R. – Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 16(8-9): 889-893, 2000.
- PANT, D. e ADHOLEYA, A. – Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolorization of molasses distillery wastewater by fungi under solid state fermentation. *Biodeg.* 18(5): 647-59, 2007.
- PAPINUTTI, V. L. e FORCHIASSIM, F. – Optimization of manganese peroxidase and laccase production in the South American fungus *Fomes sclerodermeus* (Lév.) Cke. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 536-541, 2003.
- PATEL, R.; THAKKER, G.; RAO, K. – Potential use of white-rot fungus *Antrodia* sp. RK1 for pulping. *J. Biotechnol.* 36: 19-23, 1994.
- PEKAROVICOVA, A.- Xylanases and ligninases in pulp bleaching. *Chemicke Listy* 90(3): 155-164, 1996.
- RAGUNATHAN, R. e SWAMINATHAN, K. – Biological treatment of a pulp and paper industry effluent by *Pleurotus* spp. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 20(4): 389-393, 2004.
- RAJARATHANAM, S. e BANO, Z. – *Pleurotus* mushrooms: Part III: biotransformations of natural lignocellulosic wastes; commercial applications and implications. *CRC Crit. Rev. in Food Sci. Nutr.* 28(1): 31-113, 1989.
- RAJARATHANAM, S.; SHASHIREKA, M. N.; BANO, Z. – Biopotentialities of the basidiomycetes. *Advances in Appl. Microbiol.* 37: 233-361, 1992.
- REID, I. – Biological pulping in paper manufacture. *Tibtech.* 9: 262-265, 1991.

- ROBERTSON, L. R. e SCHWINGEL, W. R. – Effect of water reuse on paper machine microbiology. In: Proceedings of the 1997 Environmental Conference, vol. 1. TAPPI Press, Norcross, GA, p. 87-93, 1997.
- RODAKIEWICZ-NOWAK, J. KASTURE, S. M.; DUDEK, B.; HABER, J. – Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. J. Mol. Catalysis B-Enzymatic 11(1): 1-11, 2000.
- RODRIGUEZ, E.; PICKARD, M. A.; DUHALT-VAZQUEZ, T.- Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. Current Microbiol. 38: 27-32, 1999.
- RUBIA, T.; LINARES, A.; PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; ROMERA, J.; MARTÍNEZ, J. – Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the ligninolytic fungus *Phanerochaete flavidio-alba*. Res. Microbiol. 153: 547-554, 2002.
- RUIZ-DUENAS, F. J.; CAMARERO, S.; PEREZ-BOADA, M.; MARTINEZ, M. J.; MARTINEZ, A. T. – A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. Biochem. Society Transactions 29: 116-122, 2001.
- SAHOO, D. e GUPTA, R. – Evaluation of ligninolytic microorganisms for efficient decolorization of a small pulp and paper mill effluent. Proc. Biochem. 40: 1573-1578, 2005.
- SANCHEZ-AMAT, A.; LUCAS-ELÍO, P.; FERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-BORRÓN, J. C.; SOLANO, F. – Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. Biochimica et Biophys. Acta 1547: 104-116, 2001.
- SCHERER, M. e FISCHER, R. – Molecular characterization of a blu-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol. Lett. 199(2): 207-213, 2001.
- SCHLIEPHAKE, K.; MAINWARING, D. E.; LONERGAN, G. T.; JONES, I. K.; BAKER, W. L. – Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. Enz. Microbial Technol. 27(1-2): 100-107, 2000.
- SCHNEIDER, P.; CASPERSEN, M. B.; MONDORF, K.; HALKIER, T.; SKOV, L. K.; OSTERGAARD, P. R.; BROWN, K. M.; BROWN, S. H.; XU, F. – Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. Enz. Microbial Technol. 25(6): 502-508, 1999.
- SELVAM, K.; SWAMINATHAN, K.; HOON SONG, M.; SNAG CHAE, K. – Biological treatment of pulp and paper industry effluent by *Fomes lividus* e *Trametes versicolor*. W. J. Microbiol. Biotechnol. 18: 523-526, 2002.
- SIIKA-AHO, M.; PERE, J.; SUURNÄKKI, A.; TENKANEN, M.; BUCHERT, J.; VIIKARI, L. – Applications of enzymes in pulp and paper industry. 7th Braz. Symp. on the Chem. of Lignins and other Wood Components, p. 327-339 Sept. 2-5, 2001.
- SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S.; OLIVEIRA, P. R. – Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. Enz. Microbial Technol. 37: 324-329, 2005.

- SMIRNOV, S. A.; KOROLEVA, O. V.; GAVRILOVA, V. P.; BELOVA, A. B.; KLYACHKO, N. L. – Laccases from basidiomycetes: Physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds. *Biochem.* 66(7): 774-779, 2001.
- SREBOTNIK, E. e HAMMELL, K. E. – Degradation os nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *J. Biotechnol.* 81(2-3): 179-188, 2000.
- STANDARD METHODS – For examination of water e wastewater. Centennial Edition, 21st Ed. 2005.
- SUGUIMOTO, H. H.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; CASTRP-GOMEZ, R. J. H. – Veratryl álcool stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 194(2): 235-238, 2001.
- TEKERE, M.; ZVAUYA, R.; READ, J. S. – Ligninolytic enzyme production in selected sub-tropical white rot fungi under different culture conditions. *J. Basic Microbiol.* 41(2): 115-129, 2001.
- THOMPSON, G.; SWAIN, J.; KAY, M.; FORSTER, C. F. – The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Biores. Technol.* 77: 275-286, 2001.
- THURSTON, C. F. – The structure and function on fungal laccases. *Microbiol.* 140: 19-26, 1994.
- TINOCO, R.; PICKARD, M. A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. – Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Lett. in Appl. Microbiol.* 32(5): 331-335, 2001.
- TREVOR, M. D'S; MERRITT, C. S.; REDDY, C. A. – Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied Environ. Microbiol.* 65(12): 5307-5313, 1999.
- TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. – Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* 41: 1-17, 1995.
- UMA, L.; KALAISELVI, R.; SUBRAMANIAN, G. – Isolation of a ligninolytic for the bacterium for the degradation and possible utilization of coir waste. *Biotechnol. Lett.* 16: 303-308, 1994.
- VASCONCELOS, A. F. D.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SCARMINIO, I. S.; REZENDE, M. I. – Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Proc. Biochem.* 35(10): 1131-1138, 2000.
- VENKATARAMAN, T. S. – Pollution abatement for small paper mills – problems and prospects. *Chem Wkly (India)* 9: 89-94, 1990.
- VIKARI, L.; SUNDQUIST, J.; KETTUNEN, J. - Xylanase enzymes promote pulp bleaching. *Paperi ja Puu* 73: 384, 1991.

- XU, F. J.; KULYS, J. J.; DUKE, K.; LI, K.; KRIKSTOPAITIS, K.; DEUSSEN, H. J. W.; ABBATE, E.; GALINYTE, V.; SCHNEIDER, P. - Redox chemistry in laccase-catalysed oxidation of n-hydroxy compounds. *Appl. Environm. Microbiol.* 66(5): 2052-2056, 2000.
- WANG, Y.; VAZQUEZ-DUHALT, R.; PICKARD M. A. – Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. *Current Microbiol.* 45: 77-87, 2002.
- YAYER, D. S.; XU, F.; GOLIGHTLY, E. J.; BROWN, K. M.; BROWN, S. H.; REY, M. W.; SCHNEIDER, P.; HALKIER, T.; MONDORF, K. DALBOGE, H. – Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Env. Microbiol.* 62(3): 834-841, 1996.
- ZHAO, J. e KWAN, H. S. – Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Appl. Env. Microbiol.* 65(11): 4908-4913, 1999.