

Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr)

Reutilisation of orange waste for production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr)

Ana Maria ALEXANDRINO¹, Haroldo Garcia de FARIA²,
Cristina Giatti Marques de SOUZA³, Rosane Marina PERALTA^{4*}

Resumo

Neste trabalho propomos o aproveitamento dos resíduos de laranja gerados após remoção do suco como substrato para a obtenção de enzimas hidrolíticas e oxidativas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos, tais como: lacase (EC 1.10.3.2), manganês peroxidase (EC 1.11.1.14), xilanase (EC 3.2.1.8) e endo-1,4 glucanase (EC 3.2.1.4), pelo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* cultivado em estado sólido. O fungo desenvolveu-se bem no resíduo, em diferentes umidades iniciais e sem a necessidade de qualquer suplementação. O meio à base de resíduo de laranja proporcionou a obtenção de elevadas atividades de enzimas com grande potencial de uso industrial, especialmente lacase (74,3 U.g⁻¹ substrato após 15 dias de cultivo) e manganês peroxidase (6,8 U.g⁻¹ substrato após 30 dias de cultivo).

Palavras-chave: resíduos agroindustriais; enzimas ligninolíticas; enzimas celulolíticas; lacase.

Abstract

In this work, orange waste as a substrate to produce hydrolytic and oxidative enzymes involved in the degradation of lignocellulolytic materials, such as laccase (EC 1.10.3.2), manganese peroxidase (EC 1.11.1.14), xylanase (EC 3.2.1.8) and endo-1,4 glucanase (EC 3.2.1.4) by the Basidiomycete *Pleurotus ostreatus* was used. The fungus was able to grow in the orange waste at different moisture contents without any supplementation. The orange waste medium provided the conditions to produce high activities of important industrial enzymes, especially laccase (75 U.g⁻¹ substrate, after 15 days of cultivation) and Mn peroxidase (6.8 U.g⁻¹ substrate, after 30 days of cultivation).

Keywords: industrial wastes; ligninolytic enzymes; cellulolytic enzymes; laccase.

1 Introdução

Nos últimos anos, há um interesse crescente no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais^{26,27,29,34}. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos. O uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de poder ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza.

A laranja está entre as frutas mais produzidas e consumidas no mundo, sendo que sua produção ultrapassa as 80 milhões de toneladas/ano. A citricultura é uma das atividades agrícolas que mais vem se desenvolvendo na região noroeste do Estado do Paraná, sendo produzidas mais de 200 mil toneladas anuais do produto⁵. Em média, 34% da produção é transformada em suco, mas em grandes países produtores (Brasil e Estados Unidos), esta porcentagem chega a 96%, o que gera grande quantidade de resíduos. Este material equivale a 50% do peso da fruta e tem uma umidade aproximada de 82%⁵.

Atualmente o uso principal dos resíduos da laranja é como complemento para a ração animal, tendo boa aceitação por bovinos e caprinos^{14,18}. Algumas limitações fazem com que estes resíduos tenham uma utilização restrita, entre elas a grande quantidade de água que contêm, o que acarreta problemas de coleta, transporte e armazenamento. Devido ao elevado custo de secagem, há interesse das empresas em desenvolver mercados para o bagaço cítrico úmido. Este interesse é maior, particularmente, para aquelas pequenas esmagadoras de laranja que produzem suco natural engarrafado ou para grandes empresas que não pretendem, em suas fábricas futuras, despende o alto investimento necessário à secagem do bagaço de laranja⁹.

Vários estudos têm proposto outros usos para os resíduos da laranja, incluindo a obtenção de fertilizantes orgânicos¹³, pectina¹⁹, óleos essenciais²⁸, compostos com atividade antioxidante² e várias enzimas, incluindo pectinases^{9,25} e amilases⁶. Apesar de todas essas possibilidades, os resíduos das indústrias de suco de laranja permanecem em sua maior parte inutilizados.

Pleurotus spp. (Jacq:Fr) Kumm. (Pleurotaceae, Basidiomycetes superiores) é um grupo de cogumelos com alto valor nutricional, possuindo diversas propriedades terapêuticas e aplicações biotecnológicas^{3,4}. São chamados de fungos causadores da podridão branca da madeira, por eficientemente degradarem a lignina, um polímero fenólico recalcitrante encontrado nos vegetais⁸. Tal habilidade deve-se ao fato de produzirem diversas enzimas lignocelulolíticas, principalmente lacases, Mn peroxidase e peroxidase versátil, que têm numerosas aplicações industriais^{4,8,32}. As lacases têm sido aplicadas

Recebido para publicação em 1/8/2006

Aceito para publicação em 23/4/2007 (001808)

¹ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá – UEM

² Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá – UEM

³ Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá – UEM

⁴ Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Avenida Colombo, 5790, CEP 87020-900, Maringá - PR, Brasil,

E-mail: rmperalta@uem.br, rmperalta@wmet.com.br

*A quem a correspondência deve ser enviada

em diferentes processos na indústria de bebidas e alimentos, indústrias têxteis, papelarias e indústria farmacêutica, assim como em processos de biorremediação^{11,21,37}.

A cultura em estado sólido é definida como sendo o tipo de cultivo no qual um microorganismo cresce numa mistura de material sólido (água-insolúvel), na ausência ou presença de limitada quantidade de água livre^{10,22}. Ela imita o meio natural dos basidiomicetos e, em geral, possibilita a obtenção de elevadas atividades de enzimas, incluindo enzimas ligninolíticas²⁶. O crescimento do microorganismo pode ocorrer na superfície ou em todo substrato, dependendo da porosidade e da umidade do substrato¹⁰.

A escolha por um substrato específico para o cultivo em estado sólido, leva em consideração uma série de fatores, principalmente relacionados ao custo e à viabilidade. O cultivo em substratos lignocelulósicos possibilita fornecer elementos à nutrição fúngica, semelhante ao que ocorre em habitats naturais. Devido à ampla disponibilidade de resíduos de laranja gerados na região e com o objetivo de agregar valor a tais resíduos e minimizar o impacto ambiental causado pelo acúmulo destes resíduos, neste trabalho propomos o uso de resíduos de laranja como substrato para a obtenção de enzimas hidrolíticas e oxidativas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos, tais como: lacase (EC 1.10.3.2), manganês peroxidase (EC 1.11.1.14), xilanase (EC 3.2.1.8) e endo-1,4 glucanase (EC 3.2.1.4), por *Pleurotus ostreatus* cultivados em estado sólido.

2 Material e métodos

2.1 Microorganismo

Pleurotus ostreatus CCB2 foi obtido da Coleção de Culturas do Instituto de Botânica de São Paulo. Em laboratório, a espécie é mantida por repiques periódicos em ágar batata dextrose (BDA). Os inóculos foram obtidos de placas totalmente colonizadas, com até duas semanas de idade e consistiram de discos com 10 mm de diâmetro.

2.2 Preparo dos resíduos de laranja

Os resíduos de laranja foram obtidos de indústrias de suco da região de Maringá - PR e não receberam qualquer tratamento além da secagem e moagem. A secagem foi realizada em estufa de ventilação forçada, à temperatura de 35 °C até peso constante. Após a secagem, os resíduos foram triturados em partículas com diâmetro médio de 4 mm.

2.3 Condições de cultivo

Quatro gramas de resíduo de laranja seco foram colocados em frascos Erlenmeyer com capacidade para 250 mL. Solução mineral foi adicionada ao substrato para a obtenção de umidades iniciais variando de 50 a 90% (p.v⁻¹). Os meios foram esterilizados em autoclave por 15 minutos, a 121 °C. Quatro discos de 10 mm de diâmetro obtidos das culturas de *P. ostreatus* em BDA foram assepticamente transferidos para os frascos. As culturas foram mantidas em temperaturas variáveis

de 20 a 35 °C, por até 30 dias, na presença ou ausência da luz. As culturas foram interrompidas a cada cinco dias e, quando possível, as massas miceliais obtidas foram cuidadosamente retiradas com auxílio de uma espátula, lavadas com água destilada duas vezes e secas em estufa a 60 °C até peso constante para determinação da biomassa³¹.

2.4 Extração das enzimas

Após a retirada da biomassa, as enzimas foram extraídas adicionando-se 20 mL de água destilada ao substrato das culturas remanescente e estes foram então mantidos a 8 °C, sob agitação de 120 por 30 minutos. Os materiais sólidos foram separados por filtração em gaze e os filtrados foram centrifugados por 10 minutos, a 10.000 g. Os sobrenadantes límpidos foram utilizados como fontes das enzimas.

2.5 Determinação das atividades enzimáticas

A atividade de lacase foi medida utilizando-se como substrato siringaldazina ($\epsilon_{525} = 65,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A mistura reativa consistiu de 1,5 mL de tampão fosfato (100 mM, pH 6,5), 0,2 mL de siringaldazina (0,5 mM em solução etanólica) e 0,1 mL de filtrado da cultura. A oxidação do substrato após 5 minutos e a 30 °C foi estimada em 525 nm^{-17} .

A atividade da Mn peroxidase foi medida pela oxidação de 10 mM MnSO_4 a 30 °C, em 50 mM malonato de sódio, pH 4,5 e em presença de 0,5 mM H_2O_2 . O íon mangânico Mn^{3+} forma complexo com malonato, o qual absorve a 270 nm ($\epsilon_{270} = 11,590 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)³⁶.

As atividades de xilanase, amilase, pectinase e endoglucanase foram determinadas pelo aparecimento de açúcares redutores a partir da hidrólise dos substratos xilano, amido, pectina e carboximetilcelulose (1% em tampão citrato 50 mM e pH 5,5), respectivamente, pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico²⁰.

Atividades β -glicosidase e β -xilosidase foram determinadas utilizando-se os substratos sintéticos p-nitrofenil- β -glicopiranosídeo e p-nitrofenil- β -xilopiranosídeo, respectivamente¹⁶.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir 1 μmol produto/minuto a 30 °C. As atividades enzimáticas foram expressas como unidades internacionais por grama de substrato seco ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$).

2.6 Outros métodos analíticos

Carboidratos solúveis totais foram estimados pelo método do fenol sulfúrico, utilizando glicose como padrão⁷. A quantidade de açúcares redutores foi estimada pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico²⁰, utilizando glicose como padrão.

2.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA e comparados pelo teste Tukey ($p < 0,05$) usando o programa GraphPad Prism® (Graph Pad Software, San Diego, USA).

3 Resultados e discussão

3.1 Efeito da umidade inicial no crescimento e na produção de enzimas por *P. ostreatus*

Em todas as temperaturas testadas (20 a 35 °C), nenhuma diferença foi observada no crescimento do fungo pela exposição à luz. Análises visuais permitiram concluir que o fungo cresceu melhor em temperaturas entre 25 e 30 °C. Em vista destes resultados, os cultivos foram mantidos à temperatura de 28 °C e no escuro.

A forma de desenvolvimento da biomassa fúngica foi fortemente afetada pela umidade dos substratos. Análises visuais das culturas permitiram concluir que o desenvolvimento e o crescimento do fungo foram mais precoces quando a umidade inicial foi superior a 75%. Foram consideradas como adequadas as umidades iniciais que permitiram completa colonização dos substratos até o décimo dia de cultivo, a 28 °C. Para as culturas em que a umidade inicial variou entre 75 e 80%, o fungo cresceu de forma homogênea nas partículas do substrato sólido. Nas culturas em que a umidade inicial foi superior a 80%, o crescimento foi caracterizado pela formação de uma massa micelial espessa, acima do substrato. Tal massa micelial foi facilmente removida do substrato residual, permitindo a determinação da biomassa fúngica produzida.

A produção de diversas enzimas oxidativas e hidrolíticas por *P. ostreatus* foi determinada após 10 dias de cultivo em cinco umidades iniciais distintas (Figuras 1 e 2).

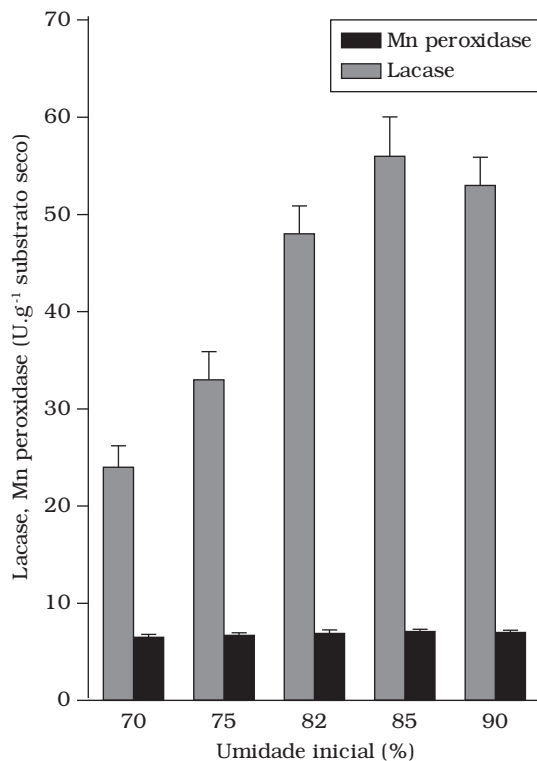


Figura 1. Efeito da umidade inicial na produção de enzimas oxidativas por *P. ostreatus* cultivado em resíduo de laranja. Os cultivos foram desenvolvidos a 28 °C por 10 dias

Amilase e pectinase não foram detectadas nos filtrados das culturas. Lacase e Mn peroxidase foram as principais enzimas oxidativas encontradas nos filtrados das culturas. A produção de lacase foi positivamente afetada pelo aumento da umidade inicial ($p < 0,05$), sendo a atividade mais alta encontrada nas culturas com umidade inicial de 85% ($56,0 \pm 4,3$ U.g⁻¹ substrato, Figura 1). O mesmo não ocorreu com a produção de Mn peroxidase, que parece não ter sido afetada pela variação da umidade dos cultivos, apresentando uma atividade de $6,50 \pm 0,43$ U.g⁻¹ substrato (Figura 1). O mesmo ocorreu com a produção das enzimas hidrolíticas xilanase, endoglucanase, β -xilosidase e β -glicosidase ($p > 0,05$) (Figura 2). Baixos níveis de celulase e xilanase foram detectados. Esses resultados estão de acordo com a observação geral de que *Pleurotus* spp exibem baixas atividades xilanolíticas e celulolíticas durante o estágio anamórfico de desenvolvimento^{24,33}.

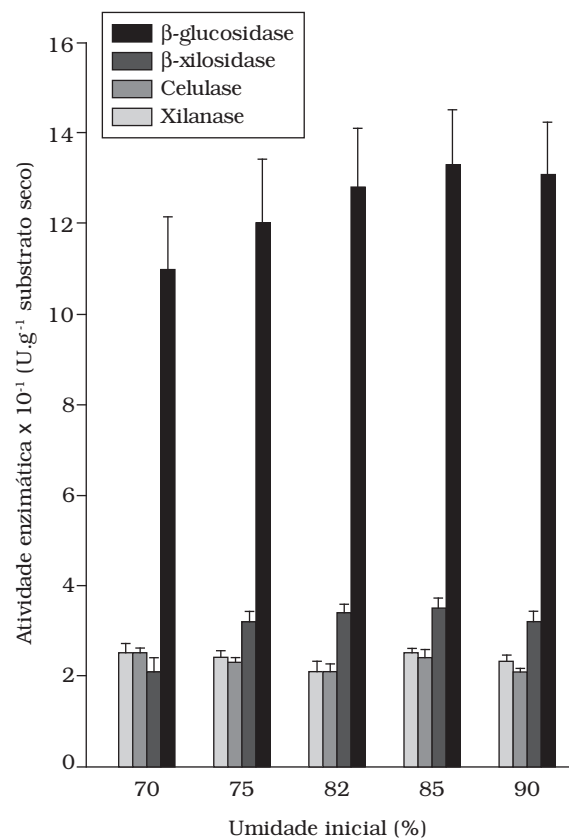


Figura 2. Efeito da umidade inicial na produção de enzimas hidrolíticas por *P. ostreatus* cultivado em resíduo de laranja. Os cultivos foram mantidos a 28 °C por 10 dias.

3.2 Produção de biomassa e enzimas em cultivos com 85% de umidade inicial

A característica de crescimento micelial superficial em substrato com umidade inicial de 85% possibilitou a separação da biomassa do resíduo de laranja remanescente. Máxima biomassa fúngica foi obtida após 20 dias de cultivo ($90 \pm 5,7$ mg.g⁻¹ de substrato seco), com um valor médio de $74 \pm 5,6$ mg.g⁻¹ de substrato seco. Podemos observar que o fungo utiliza ativamente os açúcares redutores como fonte de carbono nos primeiros

cinco dias, mas que após este período, a quantidade de açúcares redutores permanece constante, sugerindo que eles estejam sendo produzidos a partir da hidrólise dos polissacarídeos presentes no material. O resíduo de laranja é rico em polissacarídeos solúveis, principalmente pectina (22% do peso seco). Quando os valores de umidade utilizados foram superiores a 80%, houve dificuldade de crescimento micelial em direção às camadas mais inferiores do substrato sólido, forçando o fungo a se desenvolver nas camadas mais superficiais do substrato. Desta forma, tal cultivo é mais propriamente considerado como cultura de superfície. A concentração de biomassa fúngica na superfície das culturas permitiu que as mesmas fossem separadas do substrato, e o crescimento pode ser avaliado pela determinação direta da biomassa fúngica produzida (Figura 3).

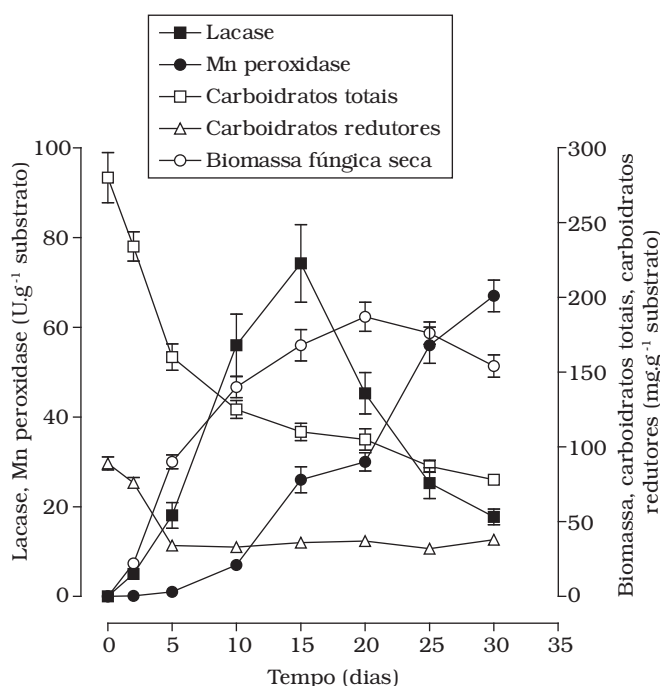


Figura 3. Produção de enzimas e crescimento de *P. ostreatus* em cultivos utilizando resíduo de laranja com umidade inicial de 85%

O efeito do tempo de cultivo no resíduo de laranja na produção das enzimas oxidativas por *P. ostreatus* é também apresentado na Figura 3. Nas condições de cultivo utilizadas neste trabalho, a produção de lacase e Mn peroxidase parece ser dependente do crescimento do fungo. Máxima atividade lacase (75 U.g^{-1} de substrato seco) foi obtida após 15 dias de cultivo, enquanto máximo de atividade Mn peroxidase ($6,8 \text{ U.g}^{-1}$ substrato seco) foi alcançado no trigésimo dia de cultivo. A produção das enzimas xilanase e endoglucanase pelo fungo, no meio de resíduo de laranja, à alta umidade inicial, foi maior no quinto dia de cultivo, $0,65 \pm 0,07$ e $0,43 \pm 0,05 \text{ U.mg}^{-1}$ de substrato, respectivamente. A produção de outras enzimas hidrolíticas, tais como: amilase e pectinase, foi baixa (valores inferiores a $0,2 \text{ U.g}^{-1}$ de substrato seco). Entretanto, a redução na quantidade de carboidratos totais solúveis nos meios de cultura (Figura 3), sugere que a pectina esteja sendo degradada, apesar de nossos resultados não mostrarem uma efetiva produção de pectinases. A pectina é um hetero-

polissacarídeo complexo e várias são as enzimas que atuam em sua estrutura²⁵. Nem todas produzem açúcares redutores, como são os casos da pectina liase e das pectina-esterases. Desta forma, uma possível atividade pectinolítica pode não ter sido detectada devido à técnica utilizada neste trabalho para determinação da atividade de pectinase.

Os substratos tradicionais para o cultivo dos fungos causadores da podridão branca da madeira incluem: farelo e palha de trigo, palha de aveia, palha de arroz, bagaço de cana e alguns outros resíduos lignocelulósicos^{1,4,5,34,38}. Mais recentemente, uma série de novos substratos têm sido propostos, muitos deles são as partes não-comestíveis de alimentos, tais como: cascas, bagaços, sementes e vegetais^{12,13,15,23,29,30}. O baixo custo do resíduo de laranja, associado à capacidade de crescimento do microorganismo sem necessidade de qualquer suplementação, suporta o uso de resíduo de laranja como substrato para crescimento e produção de enzimas por *P. ostreatus*.

4 Conclusões

Várias estratégias têm sido desenvolvidas para utilizar parte das vastas quantidades de resíduos lignocelulósicos gerados pelas atividades agrícolas e pelas indústrias de processamento de alimentos. Os resíduos de laranja gerados pela indústria de sucos apresentam umidade superior a 80%, o que dificulta seu transporte, armazenamento e uso como ração animal. Os dados obtidos neste trabalho sustentam o uso de resíduo de laranja como um substrato adequado para o cultivo de *P. ostreatus* e produção das enzimas lacase e Mn peroxidase, ambas com grande potencial de uso em diferentes processos industriais, visto que o resíduo de laranja sozinho proporcionou as condições nutricionais necessárias para o crescimento do fungo, não sendo necessária adição suplementar de fonte de carbono ou nitrogênio, e altas atividades das enzimas foram produzidas em períodos relativamente curtos. Níveis mais altos da Mn peroxidase foram detectados nos cultivos mais longos, e novos experimentos devem ser realizados para verificar se uma maior produção poderia ser obtida em cultivos com tempos de incubação superiores a 30 dias.

O aproveitamento dos resíduos de laranja com umidade inicial alta e sem a necessidade de secagem prévia, reduziram ainda mais os custos de produção destas importantes enzimas.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo CNPq, CAPES, Fundação Araucária e UEM. Os autores agradecem o apoio técnico de M.A.F. Costa e A. Chaves.

Referências bibliográficas

- ARDON, O.; KEREM, Z.; HADAR, Y. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. **J. Biotechnol.**, v. 51, n. 3 p. 201-207, 1996.
- BOCCO, A. et al. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, n. 6, p. 2123-2129, 1998.

3. CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Edible mushrooms and their cultivation**. Boca Raton, Fla: CRC Press Inc., 1989.
4. COHEN, R. L.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 58, n. 5 p. 582-594, 2002.
5. CORAZZA, M.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Quim. Nova**, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.
6. DJEKRIFF-DAKHMOCHE, S. et al. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for alpha-amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **J. Food Eng.**, v. 73, n. 2, p. 190-197, 2006.
7. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.
8. ERIKSSON, K. E. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. New York: Springer, Berlin Heidelberg, 1990.
9. GARZON, C. G.; HOURS, R. A. Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid state culture. **Biores. Technol.**, v. 39, n. 1, p. 93-95, 1992.
10. GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, n. 1, p. 85-101, 2003.
11. GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potential of extracellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enz. Microb. Technol.**, v. 35, n. 4, p. 339-354, 2004.
12. GOMEZ, J. et al. Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Corioliopsis rigida* under solid-state conditions. **J. Food Eng.**, v. 68, n. 4, p. 315-319, 2005.
13. GUERRERO, C. C.; BRITO, J. C. Re-use of industrial orange wastes as organic fertilizers. **Bior. Technol.**, v. 53, n. 1, p. 43-51, 1995.
14. ITAVO, L. C. V. et al. Substituição da silagem de milho pela silagem do bagaço de laranja na alimentação de vacas leiteiras: consumo, produção e qualidade do leite. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 29, n. 5, p. 1498-1503, 2000.
15. KALMIS, E.; SARGIN, S. Cultivation of two *Pleurotus* species on wheat straw substrates containing olive mill waste water. **Intern. Biodeterioration and Biodegradation**, v. 53, n. 1, p. 43-47, 2004.
16. LENARTOVICZ, V. et al. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*. **Proc. Biochem.**, v. 38, n. 11, p. 1775-1780, 2003.
17. LEONOWICZ, A.; GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enz. Microbiol. Technol.** v. 3, n. 1, p. 55-58, 1981
18. LOUSADA, Jr., J. E. et al. Consumo e digestibilidade aparente de sub-produtos do processamento de frutas em ovinos. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 34, n. 2, p. 591-601, 2005.
19. MA, E.; CERVERA, Q.; SANCHEZ, G. M. M. Integrated utilization of orange peel. **Biores. Technol.**, v. 44, n. 1, p. 61-63, 1993.
20. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
21. MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURAN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Sci. Technol.**, v. 13, n. 6-7, p. 205-216, 2002.
22. MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, R. P.; TENGERTY, R. P. Principles of solid state fermentation, in: J. E. SMITH; D. R. BERRY; B. KRISTIANSEN (eds). **The filamentous Fungi**, vol. 4, Fungal Technology, p. 117-144. Arnold, London, 1983.
23. MORAIS, H.; FORGÁCS, E.; CSERHÁTI, T. Enzyme production of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* in shaken cultures completed with agro-industrial wastes. **Eng. Life Sci.**, v. 5, n. 2, p. 152-157, 2005.
24. MUNOZ, C. et al. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. **Curr. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 1997.
25. NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Production of pectolytic enzymes – a review. **Bioproc. Eng.**, v. 19, n. 4, p. 355-361, 1998.
26. PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Curr. Sci.**, v. 77, n. 2, p. 149-162, 1999.
27. REDDY, G. V. et al. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor caju*). **Proc. Biochem.**, v. 38, n. 10, p. 1457-1462, 2003.
28. REDDY, J. B.; HENDRIX, C. M. In: Fruit Juice Processing Technology. NAGY, S.; CHEN, C. S.; SHAW, P. E. (eds). **Ag. Science**. Florida, 1993.
29. ROSALES, E.; COUTO S. R.; SANROMÁN, M. A. Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. **J. Food Eng.**, v. 66, n. 4, p. 419-423, 2005.
30. ROSALES, E.; COUTO, S. R.; SANROMÁN, A. New uses of food waste: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, n. 9, p. 701-704, 2002.
31. SOUZA, D. F. et al. Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. **J. Bas. Microbiol.**, v. 46, n. 2, 2006.
32. STAJIC, M. et al. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enz. Microb. Technol.**, v. 38, n. 1, p. 65-73, 2006.
33. TAN, Y. H.; WAHAB, M. N. Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 13, n. 6, p. 613-617, 1997.
34. VILLAS-BÔAS, S.L.; ESPOSITO, E.; MITCHELL, D. A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2002.
35. VOGEL, H.J.A. Convenient grower medium for *Neurospora crassa*. **Benet Beel (5.1)**, v. 13, n. 1, p. 42-44, 1956.
36. WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 33, p. 23688-23695, 1992.
37. WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnol. Adv.**, v. 22, n. 3, p. 161-187, 2003.
38. ZADRAZIL, F. Cultivation of *Pleurotus*. **The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms**. In: CHANG, S. T.; HAYES, W. A. (eds), New York: Academic Press, 1978.