



Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0702645-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0702645-5

(22) Data do Depósito: 03/04/2007

(43) Data da Publicação do Pedido: 24/03/2009

(51) Classificação Internacional: C12N 1/14; C12N 9/02; C12N 9/08; C12R 1/645

(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LACASES E/OU MANGANÊS PEROXIDASES EM LARGA ESCALA E MEIO DE CULTIVO SÓLIDO

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL. CGC/CPF: 88648761000103. Endereço: Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 - Cidade Universitária, Caxias do Sul, RS, BRASIL(BR), 95.020-972

(72) Inventor: ALDO JOSÉ PINHEIRO DILLON; STELA MARIS DA SILVA; LETÍCIA OSÓRIO DA ROSA

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 03/04/2007, observadas as condições legais

Expedida em: 21 de Março de 2017.

Assinado digitalmente por:

Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patente



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LACASES E/OU MANGANÊS PEROXIDASES EM LARGA ESCALA E MEIO DE CULTIVO SÓLIDO

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção é relacionada a processos biotecnológicos de produção de fenol-oxidases, a preparações contendo as mesmas. Mais especificamente, as enzimas produzidas pelo processo da presente invenção são lacases e/ou manganês peroxidases. O processo da invenção compreende o cultivo do fungo *Pleurotus sajor-caju* em meio sólido, no qual são adicionadas diferentes concentrações de metais como cobre, ferro, alumínio, zinco, níquel e cromo, ou combinações dos mesmos. As preparações contendo tais enzimas são úteis em diversas aplicações industriais e/ou ambientais.

Antecedentes da Invenção

[0002] Os cogumelos comestíveis são fungos pertencentes à classe Basidiomycetes. A maior parte das espécies comestíveis enquadram-se na ordem Agaricales, na qual encontram-se duas das principais famílias: Boletaceae (com as espécies *Boletus edulis* e *Boletus luteus*) e a família Agaricaceae (com as espécies *Agaricus bisporus* - champignon - e *Lentinula edodes* - shiitake). No mercado, distinguem-se claramente dois nichos: o do champignon (white botton) - *Agaricus bisporus* -, a espécie mais explorada e comercializada no mundo; e o dos exóticos ou de especialidade, que engloba espécies como *Auricularia spp.*, *Flamulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Hypsizygus marmoreus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus spp.*, *Pholiota nameko*, *Tremella fuciformis* e *Volvariella spp.*, cujo volume de produção e comercialização está em escala muito inferior ao do primeiro.

[0003] As espécies de *Pleurotus spp.* são bastante difundidas em vários países e ocupam o segundo lugar em produção no mundo, com destaque para a China, primeira produtora. As principais espécies cultivadas são *Pleurotus*

ostreatus, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus cystidus*, *Pleurotus citrinopileatus* e *Pleurotus flabellatus*, havendo outras de menor importância econômica. Conhecido como cogumelo da ostra, a produção mundial desse grupo diminuiu nos últimos anos. Entre 1990 e 1999, a produção desse grupo de cogumelos caiu de 900 mil para 875,6 mil toneladas (diminuição de 2,7%). A China era responsável por 87% da produção do mundo. Nos Estados Unidos, a produção de *Pleurotus spp.* foi de 1,62 mil toneladas em 2000, 4,4% abaixo da safra anterior. A produção das espécies *P. ostreatus* e *P. cornucopiae*, as principais cultivadas no Japão, caíram de aproximadamente 36 mil toneladas em 1989 para 13 mil toneladas em 1997, uma diminuição de 64% em oito anos.

[0004] O *Pleurotus* se desenvolve em temperaturas de 15 a 28° C, produzindo uma série de enzimas ligno-celulasicas, que o permite degradar facilmente a lignina e a celulose da madeira, assim como outros substratos vegetais utilizados para o seu cultivo. Os fungos do gênero *Pleurotus spp.* secretam as enzimas fenol-oxidases para remover tanto fenóis potencialmente tóxicos liberados durante a degradação da lignina, como toxinas produzidas por outros organismos. Como consequência, estas enzimas, que são inespecíficas, têm aplicação potencial no tratamento de efluentes contendo polifenóis ou corantes, como na indústria têxtil, resquícios de lignina, da indústria de papel e celulosas, bem como na gradação de fungicidas, inseticidas, hidrocarbonetos aromáticos, resíduos fenólicos e vários xenobióticos, que são reconhecidos como poluentes ambientais.

[0005] As lacases são enzimas envolvidas na degradação da lignina e produzidas por diversos organismos. São enzimas multiméricas que catalisam a oxidação de uma variedade de compostos fenólicos e são largamente distribuídas entre os fungos filamentosos. Devido à sua baixa especificidade por substratos, seu potencial para utilização em aplicações biotecnológicas tem sido objeto de investigação. Para a atividade catalítica de lacase são necessários quatro átomos de cobre por unidade de proteína ativa: tipo 1 (T1), que usualmente exibe um grande pico no espectro visível, próximo de 610 nm,

quando o cobre está no estado cúprico (Cu^{2+}); tipo 2 (T2), que não é detectado no espectro visível, pode ser observado por espectroscopia de ressonância para-magnética (EPR) e tipo 3 (T3), que consiste em um par de cobres centralizados, com máxima absorvância em 330 nm e são *antiferromagneticamente* emparelhados por uma ligação atravessada.

[0006] Alguns microrganismos como os fungos são capazes de degradar a lignina e compostos estruturalmente relacionados pela produção de enzimas extracelulares como lignina-peroxidase (LiP), manganês-peroxidase (MnP) e lacases; e de enzimas ligadas à membrana como as enzimas da família do citocromo P-450. O mecanismo exato pelo qual os polímeros de lignina são despolimerizados e mineralizados não é completamente conhecido. Sendo a lignina um polímero com ligações aleatórias, o sistema envolvido em sua degradação deve também agir não especificamente. Assim, não é surpresa que o sistema ligninolítico destes fungos também atue em uma grande variedade de poluentes aromáticos.

[0007] A produção de manganês peroxidase ou peroxidase dependente do manganês é aparentemente limitada a certos fungos basidiomicetos, e até agora, não se evidenciou qualquer bactéria, levedura e nenhum basidiomiceto micorrízico capaz de produzir esta enzima. A capacidade de sintetizar MnP está distribuída entre grupos de basidiomicetos taxonomicamente distintos. Espécies colonizadoras de madeira, pertencente às famílias Meruliaceae, Coriolaceae e Polyporaceae, assim como basidiomicetos decompositores de serapilheira, das famílias Strophariaceae (família de *Psilocybe castanella*) e Tricholomataceae expressam atividade de MnP. O peso molecular de MnP varia de 38 a 62,5 kDa, mas a maioria das enzimas purificadas têm peso molecular próximo a 45 kDa. Isoenzimas de MnP são freqüentemente produzidas e até 11 isoformas diferentes foram descritas para *Ceriporiopsis subvermispora*. Essas isoformas diferiram principalmente nos pontos isoelétricos, que estiveram na faixa ácida (pH 3-4), embora isoformas na faixa neutra e menos ácida foram encontradas em determinados fungos. A MnP é

uma glicoproteína com Fe protoporfirínico IX como grupo prostético, dependente de H₂O₂ para sua atividade. A oxidação de lignina e outros compostos xenobióticos por MnP é dependente da disponibilidade de íons de manganês. Seu ciclo catalítico é semelhante ao de LiP; no entanto, o Mn²⁺ atua como doador de elétrons para gerar o composto II.

[0008] As lacases e manganês-peroxidases apresentam aplicações em diversos processos biotecnológicos que incluem desde a detoxificação de efluentes da indústria papelreira, têxtil e petroquímica, até seu uso como ferramentas para diagnóstico médico, agentes de biorremediação, como catalisadores para manufatura de medicamentos anti-câncer e mesmo como ingredientes em cosméticos. No entanto, os altos custos de produção e a fácil inativação enzimática restringem economicamente o emprego das mesmas. Deste modo, um dos objetivos do processo da presente invenção é a produção mais econômica em meio sólidos para a produção de lacases e MnP. Isso é obtido associadamente à adição de diferentes concentrações dos metais cobre, ferro, alumínio, zinco, níquel e cromo, aumentando a produtividade do processo e assim obtendo alternativas para a produção das enzimas lacases e MnP em escala industrial. O processo da presente invenção foi conduzido em experimentos onde observou-se o aumento de secreção de lacases e Mn-peroxidases, descritos em detalhe mais adiante.

[0009] A literatura patentária contempla alguns documentos relacionados a processos de produção de enzimas fenol-oxidases. Embora nenhum dos documentos encontrados antecipe ou sequer sugira, ainda que indiretamente, o conceito inventivo da presente invenção, são aqui citados alguns documentos como referência.

[0010] O documento WO 01/98518, intitulado "Biotransformation of biologically active compounds made of various classes substances by means of laccase and manganese peroxidase enzymes", é relacionado a um processo de biotransformação de ingredientes biologicamente ativos de várias classes de substâncias químicas. No referido processo, o sobrenadante de cogumelos

lignolíticos em solução aquosa é usado como meio de proporcionar as referidas biotransformações.

[0011] O documento WO 02/18551 é relacionado a um processo de produção de enzimas lignolíticas utilizando fungos do gênero Agaricales. O referido documento tem por objetivo proporcionar um método econômico e efetivo para produzir as enzimas manganês peroxidases (MnP) e lignina-peroxidase (LiP), em um processo cíclico ou contínuo. Entretanto, os fungos usados são de outro gênero, o que acarreta condições de processo e produtividades completamente distintas.

[0012] O pedido de patente norte-americano US 2006/0063246 se refere a novas enzimas lacase obtidas a partir de espécies do gênero *Thielavia*. A referida enzima pode ser utilizada para diversas aplicações, em particular para aumentar a claridade do denim.

[0013] Dentre as diversas vantagens técnicas da presente invenção, sobressai a produção mais econômica de lacases e MnP, através do cultivo de *Pleurotus sajor caju* em meio sólido. A adição de diferentes concentrações dos metais cobre, ferro, alumínio, zinco, níquel e cromo, é associada a um aumento de produtividade do processo, proporcionando assim alternativas para a produção das enzimas lacases e MnP de alta atividade em escala industrial.

Sumário da Invenção

[0014] É um objeto da presente invenção proporcionar um processo em larga escala de produção de fenol-oxidases de alta atividade.

[0015] É objeto adicional da presente invenção proporcionar um meio de cultivo sólido para a produção de enzimas fenol-oxidases por fungos. Em uma concretização preferencial da invenção, sendo, portanto, outro de seus objetos, é proporcionado um meio de cultivo sólido preparado em sacos plásticos compreendendo serragem de *Pinus spp*, farelo de cereal e sais.

[0016] É ainda um adicional objeto da presente invenção proporcionar um meio de manutenção e/ou para a inoculação de *Pleurotus sajor-caju*. Em uma concretização preferencial da invenção, sendo, portanto, outro de seus objetos, são proporcionados meios econômicos de manutenção do fungo compreendendo serragem de *Pinus spp*, farelo de cereal moído e intumescido, sais, e ágar-ágar.

[0017] Em outro um aspecto da invenção, sendo, portanto, um de seus objetos, a produção de fenol-oxidades ocorre mediante o cultivo em meio sólido de *Pleurotus sajor-caju*, sendo adicionados ao meio diferentes concentrações dos metais cobre, ferro, alumínio, zinco, níquel e cromo, ou combinações dos mesmos. Em uma concretização preferencial da invenção, a concentração final dos metais no meio de cultivo, ou a mescla dos sais dos metais é de 30mg/100g de meio.

[0018] Em outro um aspecto da invenção, sendo, portanto, outro de seus objetos, são proporcionadas preparações contendo lacases e manganês peroxidases de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em meio sólido.

[0019] Em outro aspecto da presente invenção, sendo, portanto, um outro de seus objetos são proporcionadas fenol-oxidases com grande capacidade de remoção de fenóis potencialmente tóxicos liberados durante a degradação da lignina, como toxinas produzidas por outros microrganismos, sendo portanto úteis no tratamento substâncias tóxicas e/ou efluentes industriais.

[0020] Esses e outros objetos da presente invenção serão melhor compreendidos e valorizados a partir da descrição detalhada da invenção a seguir, que tem como objetivo apenas ilustrar um dos inúmeros meios de se realizar a invenção, não limitando portanto seu escopo.

Breve Descrição das Figuras

[0021] A Figura 1 mostra a atividade da lacase em meios contendo metais após 7, 14 e 21 dias de cultivo.

[0022] A Figura 2 mostra a atividade da enzima manganês peroxidase em meios contendo metais após 7, 14 e 21 dias de cultivo.

[0023] A Figura 3 mostra a atividade da lacase em meios contendo metais após 7 e 14 dias de cultivo.

[0024] A Figura 4 apresenta a atividade de manganês peroxidase em meios contendo metais após 7 e 14 dias de cultivo.

Descrição Detalhada da Invenção

[0025] É descrito a seguir o processo de produção de enzimas fenol-oxidases utilizando o fungo da Linhagem PS 2001 de *Pleurotus sajor-caju*, em cultivo em meio sólido contendo os metais cobre, ferro, níquel, cromo, ou um combinações dos mesmos. O referido fungo parece ser originário da Índia e foi introduzido no Brasil há algumas décadas, sendo atualmente conhecido e amplamente disponível em diversas coleções de cultura no mundo. Não houve, portanto, acesso a material biológico ou recursos genéticos, nos termos do disposto no art. 31 da Medida Provisória n° 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, originária da Medida Provisória n° 2.052, de 29 de junho de 2000, e, ainda, o disposto na Resolução No. 23, de 10 de novembro de 2006, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGEN. Além disso, qualquer outra linhagem de fungos do gênero *Pleurotus*, em especial a espécie *Pleurotus sajor-caju* pode ser utilizada, como aquelas disponíveis em diversas coleções de cultura no mundo. Em uma concretização preferencial da presente invenção, as enzimas fenol-oxidases produzidas pelo presente processo são lacases e manganês peroxidases. As fenol-oxidases aqui descritas são inespecíficas e têm aplicação potencial industrial no tratamento de efluentes contendo corantes, como na indústria têxtil, e de resquícios de lignina da indústria de papel e celuloses. As fenol-oxidases produzidas pelo presente processo também podem ser utilizadas na degradação de fungicidas, inseticidas, hidrocarbonetos aromáticos, resíduos fenólicos e vários xenobióticos, que são reconhecidos como poluentes ambientais. Dentre outras finalidades, as

enzimas fenol-oxidasas produzidas pelo processo da presente invenção apresentam grande capacidade de remoção de fenóis potencialmente tóxicos liberados durante a degradação da lignina, como toxinas produzidas por outros organismos, sendo uma excelente vantagem em relação aos processos existentes no estado da técnica.

[0026] O processo de produção das enzimas lacases e manganês peroxidases pode ser melhor compreendido e valorizado através dos exemplos descritos a seguir:

Exemplo 1: Preparação do meio de manutenção da linhagem fúngica

[0027] Para a preparação do meio de manutenção da linhagem fúngica do fungo *Pleurotus sajor-caju* utilizou-se, nesta concretização preferencial, uma mistura dos seguintes componentes: serragem específica, farelo de cereal, o qual se encontrava devidamente moído e intumescido em água destilada, sal básico e ágar-ágar. Nesta concretização preferencial da presente invenção, a serragem utilizada é de *Pinus spp* na concentração de 2% (p/p), o farelo de cereal é o trigo, em uma concentração de 2% (p/p), o sal básico é o carbonato de cálcio numa concentração de 0,2% (p/p) e a concentração de ágar-agar utilizada foi de 2%. Após o preparo do meio de manutenção fúngica, o mesmo foi autoclavado na temperatura de 120°C e na pressão de 1 atm, durante 30 minutos.

[0028] Para o desenvolvimento dos cultivos das linhagens foram utilizados tubos inclinados contendo o meio de manutenção, a 25°C, durante 14 dias, e para armazenamento da linhagem foram guardados a 4°C e transferidos a cada seis meses.

[0029] Antes da aplicação do fungo em meio sólido, os fungos do *Pleurotus sajor-caju* são feitos inóculos do mesmo, com a utilização de colônias de oito dias, desenvolvidas em placas de Petri contendo o meio de manutenção, iniciadas a partir de um disco de ágar colonizado de 8 mm de diâmetro, disposto no centro da placa.

Exemplo 2: Preparação do meio de cultivo sólido (MCS)

[0030] O meio utilizado para o cultivo sólido (MCS) desta concretização preferencial foi preparado com 94% (p/p) de serragem de *Pinus* spp, acrescida de 5% (p/p) de farelo de trigo e 1% (p/p) de carbonato de cálcio. Para o crescimento fúngico no meio de cultivo sólido foram utilizados sacos de polipropileno nas dimensões de 15,5 x 25 cm, os quais funcionam como fermentadores. Nestes, a cada meio constituído por 198g de serragem (peso úmido), acrescentou-se água, para obter umidade em valores próximos a 66%. Posteriormente, os sacos plásticos contendo os meios de cultura foram esterilizados em uma autoclave, na pressão de 1 atm, durante duas horas. Os assim formados sistemas de cultivo contendo os diferentes tratamentos foram constituídos de três sacos de polipropileno para cada tratamento, preenchidos com meio MCS. Estes, após autoclavagem, foram inoculados pela disposição de um disco de 1,5 cm de diâmetro, retirados com um cilindro de vidro, a partir da extremidade de placas preparadas para inóculo. Os sacos de polipropileno contendo os meios foram inoculados e mantidos à temperatura de 28°C, para o desenvolvimento micelial, durante 7, 14 e dias; após esse período foram coletadas amostras em sextuplicatas para análises de determinação da produção de lacases e MnP na presença de metais. Aos sacos de cultivo contendo o MCS, adicionaram-se soluções de sulfato cúprico, sulfato de zinco, sulfato ferroso, sulfato de alumínio, sulfato de cromo III e sulfato níqueloso e uma mescla de todos os sais juntos contendo 5,0 mg de cada sal até atingir uma concentração final de 30 mg/100g de meio, sendo as soluções adicionadas antes da autoclavagem do meio. Foram realizados também testes onde uma mescla contendo 10,0 mg de cada sal anteriormente citado foi adicionada ao meio, totalizando uma concentração de 60mg/100g no meio.

Exemplo 3: Obtenção de lacases e manganês peroxidases; determinação da atividade enzimática

[0031] Para a obtenção das enzimas e as determinações enzimáticas do cultivo sólido, o conteúdo dos sacos de cultivo foram homogeneizados manualmente e três alíquotas de 25g, de cada um dos tratamentos aplicados,

foram suspensas em 50 mL de água destilada gelada, agitadas por 30 min a 160 rpm a 5°C. Os sólidos foram removidos por filtração a vácuo, com papel filtro e centrifugadas a 5000g, durante 30 min. O extrato aquoso foi utilizado para as determinações de enzimas. Todas as atividades enzimáticas foram expressas em unidades internacionais por mL ($U \cdot mL^{-1}$), definidas como número de μ mol liberado do produto por mL, por minuto, nas condições do teste e posteriormente expressadas por grama do substrato fermentado.

[0032] A atividade da lacases foi determinada com o uso do substrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). A mistura reacional para ABTS contém 0,45 mM do ABTS, 90 mM de tampão acetato de sódio pH 5,0 e 1 mL de amostra adequadamente diluída. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância em 420 nm, durante 90 seg a 25°C, utilizando-se $\epsilon = 3,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot M^{-1}$.

[0033] A atividade de manganês peroxidases também foi determinada pelo método proposto na presente invenção. A mistura reacional consistiu de 50 μ g. mL^{-1} de vermelho de fenol, 50 μ M de sulfato de manganês, 50 μ M de H_2O_2 , 12,5 mM de lactato de sódio, 500 μ g. mL^{-1} de albumina bovina e tampão succinato de sódio pH 4,5, sendo adicionados 0,5 mL de amostra. Após 5 min a 30°C, as reações foram interrompidas pela adição de 40 μ L de NaOH 2M. A formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorbância (610nm), sendo considerado a absorbância zero, uma amostra com tempo zero de reação e utilizando-se $\epsilon_{610} = 4,46 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Exemplo 4: Processo de produção das enzimas lacase e manganês peroxidase; análise dos resultados

[0034] Nos testes realizados para quantificar a produção enzimática de lacases, liberadas em meio sólido na presença dos metais cobre, zinco, ferro e alumínio, nos diferentes tratamentos após 7, 14 e 21 dias de cultivo sólido, observou-se nas análises no 21º dia, um aumento da produção enzimática em todos os meios onde foram adicionados os metais sendo a produção superior ao controle. Esse fato pode ser comprovado através do gráfico mostrado na

figura 1 do presente relatório. O aumento da produção da lacase num meio contendo metais é um avanço dentro da área biotecnológica, sendo uma vantagem da invenção em relação aos processos de produção de fenol-oxidases já existentes. A maior produção de lacases foi obtida nos meios onde foram adicionados metais, em uma etapa mais longa de desenvolvimento, pode indicar uma resposta adaptativa do fungo a altas concentrações de metais.

[0035] A figura 2 mostra a produção da enzima manganês peroxidase (MnP) em diferentes estágios de desenvolvimento do fungo *Pleurotus sajor-caju* crescido em meios sólidos em 9, 14 e 21 dias, aos quais foram adicionados isoladamente, sais de cobre, zinco, ferro e alumínio. Observa-se uma alta produção de MnP em uma etapa inicial de desenvolvimento, correspondente aos 7 dias, no meio de cultivo ao qual foi adicionado sulfato de alumínio. Durante as etapas posteriores de desenvolvimento, todos os meios aos quais foram adicionados os demais sais com metais, apresentaram produção de MnP altamente superior aquelas encontradas no controle, indicando que a presença dos metais nas concentrações empregadas, foram favoráveis a produção de MnP em todas as etapas de desenvolvimento. Estes dados mostram que existe significativo aumento de produtividade com o uso de metais na produção de Mn-peroxidases.

[0036] A Figura 3 mostra dados de ensaios com sulfato de cromo, sulfato de níquel, em concentrações de 30mg/100g, todos os sais associados em concentrações de 30mg/100g meio (concentração final de todos os metais), uma concentração duas vezes maior do que a testada inicialmente, utilizando todos os sais associados, totalizando 60mg/100g de meio (SC2). Os resultados obtidos mostram que a atividade de lacases em cultivos com 7 dias de desenvolvimento foi estimulada pela presença de sais de cromo ao meio.

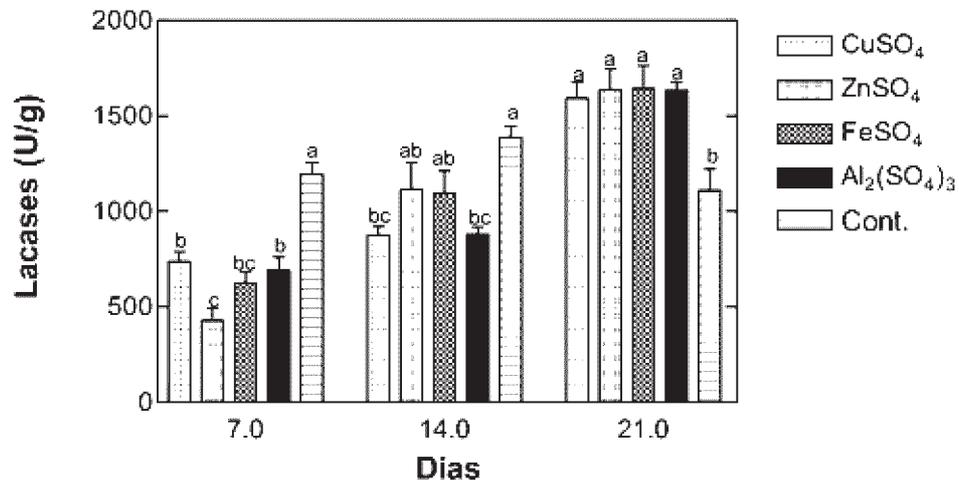
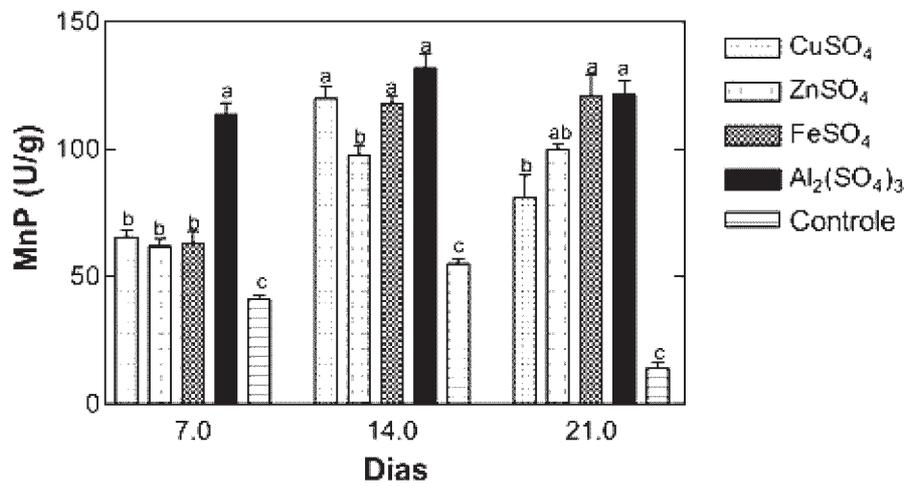
[0037] A atividade de MnP em meios contendo sulfato de cromo III, sulfato de níquel e todos os metais associados em duas diferentes concentrações, pode ser observada na Figura 4. Conforme os dados obtidos, a produção de MnP nos meios no qual cromo e níquel foram adicionados, em 7

dias de cultivo, também foi melhorada quando comparada ao controle. Do mesmo modo que para a produção de lacases, a adição de cromo ao meio de cultivo em uma etapa inicial de desenvolvimento promoveu uma estimulação na produção de MnP em um curto período de tempo.

[0038] Pequenas variações na forma de conduzir a invenção aqui descrita devem ser compreendidas como dentro do espírito da invenção e do escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Processo de Produção de Lacases e/ou Manganês Peroxidases em larga escala **caracterizado por** compreender a adição, a uma cultura em meio sólido e/ou semi-sólido de *Pleurotus sajor caju*, e metais selecionados do grupo que compreende cobre, ferro, alumínio, zinco, níquel e cromo, ou combinações dos mesmos, onde as concentrações finais dos metais no meio, ou mescla dos sais dos metais, ser pelo menos 30mg/100g de meio.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato** da referida cultura e/ou meio ser mantido em uma temperatura de 25°C.
3. Meio de cultivo sólido, **caracterizado pelo fato** de compreender, em saco plástico:
 - a) serragem, preferencialmente *Pinus spp*, na concentração de 2% (p/p);
 - b) farelo de cereal moído e intumescido apresentando aproximadamente 66% de umidade, preferencialmente trigo, na concentração de 2% (p/p); e
 - c) sais contendo metais selecionados do grupo que compreende cobre, ferro, alumínio, zinco, níquel e cromo, ou combinações dos mesmos, onde as concentrações finais dos metais no meio, ou mescla dos sais dos metais, ser pelo menos 30mg/100g de meio.

Figuras**Figura 1****Figura 2**

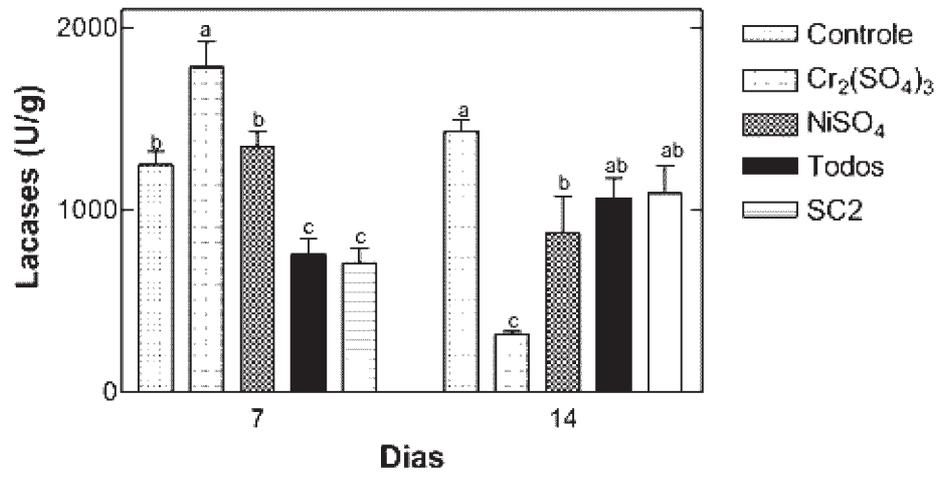


Figura 3

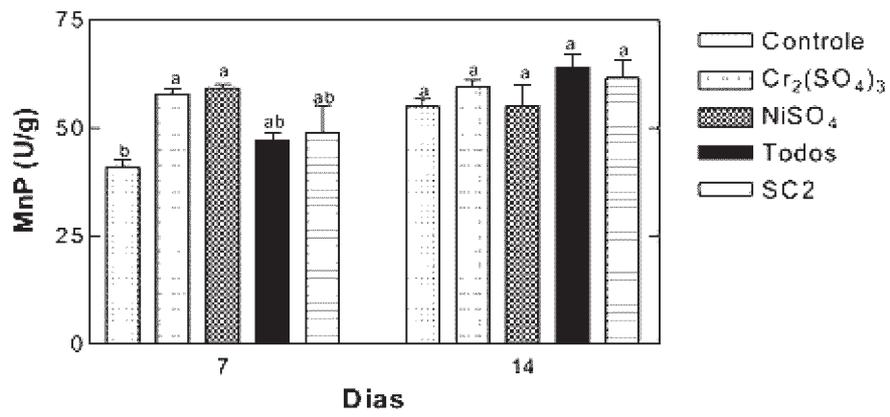


Figura 4