

# Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em substratos agroindustriais

## Oxidative enzymes activities from *Lentinula edodes* on agribusiness substrate

Magali Regina<sup>1\*</sup>; Fernando Broetto<sup>2</sup>; Giovanni Giovannozzi-Sermanni<sup>3</sup>;  
Rosita Marabotini<sup>4</sup>; Cláudio Peranni<sup>4</sup>; Giani Andréa Linde<sup>5</sup>;  
Nelson Barros Colauto<sup>5</sup>; Luiza Doretto Paccola-Meirelles<sup>6</sup>

### Resumo

O basidiomiceto *Lentinula edodes* tem sua atividade enzimática relacionada, principalmente, ao tipo de resíduo agroindustrial utilizado como substrato. O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade das enzimas oxidativas lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) de três linhagens de *L. edodes*, em sistema estacionário, cultivadas a 25 °C, na ausência de luz, em substratos compostos de 20% de farelo de arroz, 1% de CaCO<sub>3</sub> e 79% de casca de arroz (CA), serragem de eucalipto (SE), bagaço de mandioca (BM) e bagaço de cana-de-açúcar (BC), ajustados à 60% de umidade. As atividades de Lac e MnP foram maiores nos substratos a base de serragem de eucalipto (SE) e bagaço de cana-de-açúcar (BC). A atividade de LiP não foi induzida pelos substratos testados. Os substratos à base de casca de arroz (CA) e bagaço de mandioca (BM), não se mostraram adequados na indução da produção de Lac ou MnP, mas podem ser utilizados como aditivos para aumentar a porosidade, disponibilidade de ar e fornecer polissacarídeos de fácil metabolização.

**Palavras-chave:** Shiitake, resíduos, enzimas oxidativas, substrato, lacase

### Abstract

Basidiomycete *Lentinula edodes* has its related enzymatic activity mainly on the agribusiness waste kind used as a substrate. The objective of this work was to verify the activity of oxidative enzymes lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) of three *L. edodes* strains, in stationary system, cultivated the 25 °C, in the absence of light, in substrates with 20% of bran of rice, 1% of CaCO<sub>3</sub> and 79% of rice husk (CA), eucalyptus sawdust (SE), cassava bagasse (BM) and sugarcane bagasse (BC), adjusted to 60% of humidity. The Lac and MnP activities were bigger in eucalyptus sawdust (SE) and sugarcane bagasse (BC). The LiP activity was not induced for tested substrates. The rice husk (CA) and cassava bagasse (BM) substrates, although are not adequate to produce Lac or MnP, can be used as additives to increase the porosity, air availability and easy metabolism polysaccharides.

**Key words:** Shiitake, waste, oxidative enzymes, substrate, laccase

<sup>1</sup> Pesquisadora, recém-doutora do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina. (UEL) – E-mail: magaregina@hotmail.com

<sup>2</sup> Docente do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu-SP

<sup>3</sup> Docente do Departamento de Agrobiologia e Agroquímica, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo-IT

<sup>4</sup> Pesquisadores do Departamento de Agrobiologia e Agroquímica, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo-IT

<sup>5</sup> Docentes da Universidade Paranaense – UNIPAR, Laboratório de Biologia Molecular, Umuarama-PR

<sup>6</sup> Docente do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Londrina-PR

\* Autor para correspondência

## Introdução

Acelulose, hemicelulose e lignina são os principais componentes das células vegetais, sendo uma das mais importantes fontes renováveis de carbono para a produção de biocompostos de interesse comercial (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; KANG et al., 2004; BALDRIAN; VALÁŠKOVÁ, 2008). O Brasil tem uma das maiores áreas de cultivo do Planeta, produzindo anualmente uma diversidade de resíduos agrícolas que são subutilizados e poderiam ser aproveitados como substrato para cultivo de fungos decompositores capazes de produzir biomassa e compostos de interesse comercial (EIRA; BRAGA; COLAUTO, 1997).

O *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, popularmente conhecido como shiitake, é um fungo basidiomiceto pertencente ao grupo dos saprófitas lignocelulolíticos. Este fungo é normalmente utilizado na conversão de resíduos agroindustriais em cogumelos de importância gastronômica e funcional (BUSWELL; CHANG, 1993). Além da produção de cogumelos o micélio do *L. edodes* pode ser utilizado no biobranqueamento de materiais (ONYSKO, 1993; MESSNER; STREBOTNIK, 1994; REID; PAICE, 1994), na biodegradação de poluentes (FIELD et al., 1993; BARR; AUST, 1994) e na produção de biocompostos de interesse comercial, como metabólitos secundários e enzimas (BUSWELL; CHANG, 1993).

Lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacase e  $H_2O_2$  peroxidase são enzimas extracelulares produzidas por fungos degradadores brancos que estão envolvidas na degradação da lignina (BUSWELL, 1991; KIRK; FARRELL, 1987). Destas, a lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP) são as principais enzimas ligninolíticas extracelulares do *L. edodes* (HATVANI; MÉCS, 2003), sendo a MnP uma glicoproteína (GLENN; GOLD, 1985). Outros fungos produzem, além destas, a lignina peroxidase (Lip), enquanto outros, apenas uma delas (ARORA; BRIDGE;

BHATNAGAR, 2004). Vários fatores afetam a produção de enzimas lignocelulolíticas em basidiomicetos decompositores, assim como a velocidade de crescimento do micélio, produção de biomassa e biocompostos (LEATHAM; KIRK, 1983) que estão diretamente relacionados ao tipo de substrato.

Os substratos comumente utilizados para produção de cogumelos e outros biocompostos são o bagaço de cana-de-açúcar, farelo de arroz (ROSSI; MONTEIRO; MACHADO, 2001), bagaço de mandioca (BEUX; SOCCOL, 1996), serragem, sabugo de milho (PRZYBYLOWICZ; DONOGHUE, 1988) e farelo de aveia (LEATHAM, 1985). A escolha de um ou mais substratos depende principalmente de sua disponibilidade na região (EIRA; MINHONI, 1996) do clima, da cultura regional da população e da tecnologia regional (RAJARATHNAM; BANO, 1992). Os fungos que apresentam uma maior capacidade de produção de enzimas oxidativas são, provavelmente, mais eficientes na bioconversão da matéria-prima, portanto a escolha do substrato mais eficiente para cada linhagem é um aspecto importante para se obter maior produtividade. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase pelo *Lentinula edodes*, quando cultivado em substratos constituídos de resíduos agrícolas da região de Botucatu-SP, de forma a selecionar os melhores substratos para a produção destas enzimas ligninolíticas.

## Materiais e métodos

As linhagens utilizadas foram *L. edodes* LE 95/17 (L17), LE 96/22 (L22) e Leax (Leax) da Micoteca do Módulo de Cogumelos, UNESP, Campus de Botucatu-SP e os resíduos agroindustriais: serragem de eucalipto, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de mandioca e casca de arroz foram obtidos na região de Botucatu.

As formulações dos substratos foram preparadas segundo Eira e Minhoni (1996) (Tabela 1), com umidade ajustada para 60%. Em seguida, frações de 25 g de cada formulação foram transferidas para Erlenmeyers de 250 ml e autoclavadas a 121 °C por 30 min.

**Tabela 1.** Porcentagem de matéria-prima na formulação dos substratos em base seca.

Matéria-prima	Substrato (%)			
	BM	CA	SE	BC
Bagaço de mandioca	79	-	-	-
Casca de arroz	-	79	-	-
Serragem de eucalipto	-	-	79	-
Bagaço de cana-de-açúcar	-	-	-	79
Farelo de arroz	20	20	20	20
CaCO <sub>3</sub>	1	1	1	1

O inóculo de cada linhagem foi previamente crescido em tubos de ensaio com meio de ágar-batata-dextrose, inclinados, durante 7 dias a 25 °C. Após o crescimento, foram adicionados 3 mL de água destilada esterilizada em cada tubo de cultura, dentro de câmara de fluxo laminar. Os tubos foram agitados por 10 s em vortex e a suspensão de cada uma das linhagens foi transferida, para Erlenmeyers contendo os diferentes substratos. Os frascos foram incubados a 25 °C, na ausência de luz, utilizando esquema fatorial 4x3 inteiramente casualizado. Após 8, 11, 14, 17 e 20 dias, após a inoculação, foram retirados 3 frascos de cultivo para a determinação, em triplicata, da atividade enzimática e umidade (105 °C). A atividade enzimática foi determinada através do extrato enzimático bruto que foi obtido adicionando-se 75 mL tampão de acetato de sódio, 50 mM pH 5,0, aos frascos de Erlenmeyers. Os frascos foram mantidos em agitador orbital a 50 rpm por 1 h, a temperatura ambiente e, em seguida, as amostras foram filtradas em filtro de 40-100 µm. A atividade de Lac, MnP e LiP, nas amostras filtradas, foram determinadas como descrito a seguir.

A atividade de Lac foi determinada pelo método modificado de Slomczynsky, Nakas e Tanenbaum (1995) com 50 µL de 2,6 dimetoxifenol (2 mM) em 150 µL de tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH 4,2) e 5 µL de extrato bruto. A oxidação do 2,6 dimetoxifenol foi acompanhada a 30 °C a 477 nm ( $\epsilon_{477} = 14600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

A atividade de lignina peroxidase (LiP) foi determinada pelo método modificado de Tien e Kirk (1984), através da oxidação do álcool veratrílico a veratrilaldeído (3,4 dimetoxibenzaldeído). A mistura reacional foi composta por 250 µL de solução de álcool veratrílico, composto por álcool veratrílico 8,0 mM em tampão de tartarato (0,1 M, pH 3,0), 200 µL de peróxido de hidrogênio (0,2 mM) e volume variável de extrato bruto, conforme a atividade enzimática. A reação foi acompanhada a 30 °C a 310 nm ( $\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

A atividade de MnP foi determinada pelo método modificado de Wariishi, Valli e Gold (1992) com 0,2 mL de MnSO<sub>4</sub> (0,1 mM) em 1,4 mL de tampão malonato (50 mM, pH 4,5), 0,2 mL de peróxido de hidrogênio 75 µM e 10 µL de extrato bruto. A formação do complexo de Mn(III)-malonato foi acompanhada a 30 °C, por 1 min, a 270 nm ( $\epsilon_{270} = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

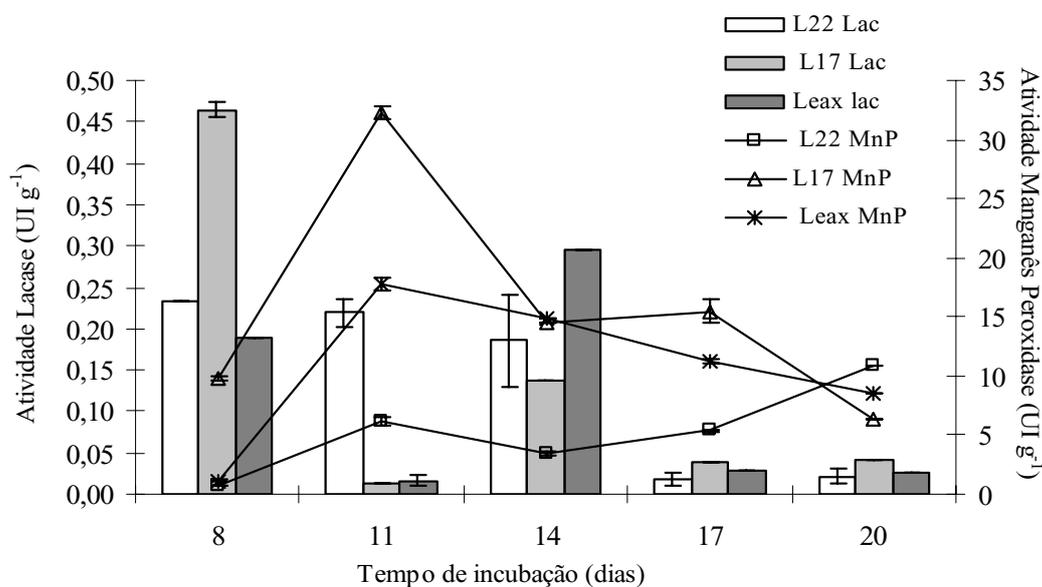
Toda atividade enzimática foi expressa em Unidade Internacional (UI), definida pela quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µM de substrato por minuto.

A metodologia estatística utilizada para avaliar os experimentos seguiu o modelo de regressão não-linear. Para a comparação dos parâmetros foi feita a análise de variância não paramétrica com aplicação do teste de Kruskal-Wallis. Nos casos em que houve diferença significativa foi aplicado o teste de Student-Newman-Kills ao nível de 5 % de significância.

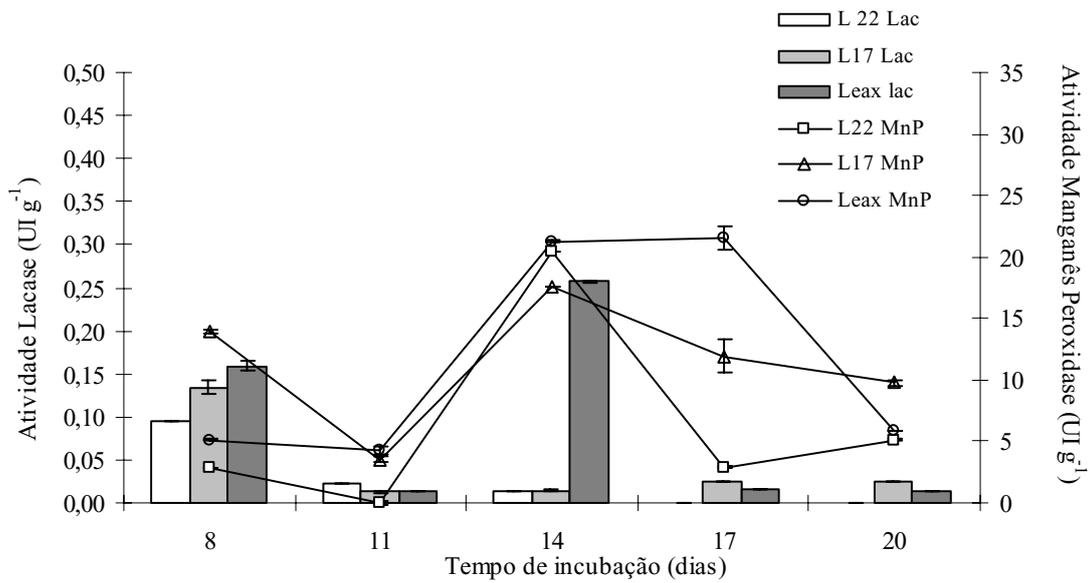
## Resultados e discussão

O substrato SE se mostrou o mais adequado para a produção de Lac em quase todas as linhagens avaliadas (Figura 1, 2, 3 e 4). A linhagem Leax foi a mais adequada para produção de Lac no substrato BC. Já as linhagem L22 e L17, foram as que apresentaram melhor produção de Lac no substrato SE, uma vez que do dia 8 ao 14 a atividade da linhagem L22 apresentou uma uniformidade de produção e a linhagem L17 apresentou um pico de atividade no 8º dia superior às demais linhagens, inclusive em comparação aos demais dias de incubação.

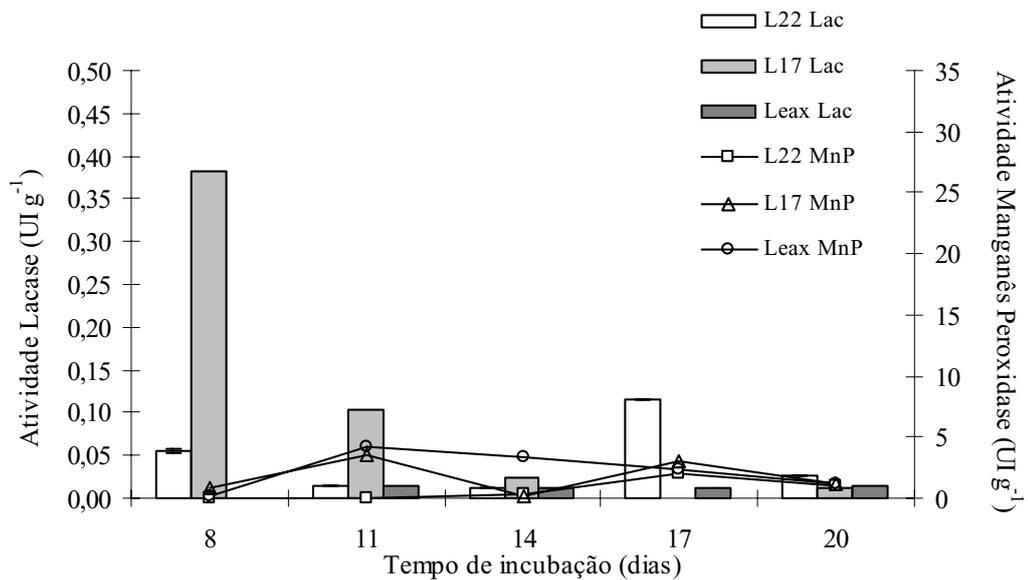
O substrato SE foi o melhor indutor de atividade de Lac devido, provavelmente, pela serragem de eucalipto ter uma maior concentração de lignina, assim como no substrato CA, apesar de conter sílica. Já no substrato BC a celulose é o maior componente e neste caso outra linhagem, a Leax, apresenta-se mais eficiente para a produção de Lac. Quando o substrato foi o BM, onde o amido remanescente da extração de fécula é um componente importante, houve a menor produção de Lac para todas as linhagens.



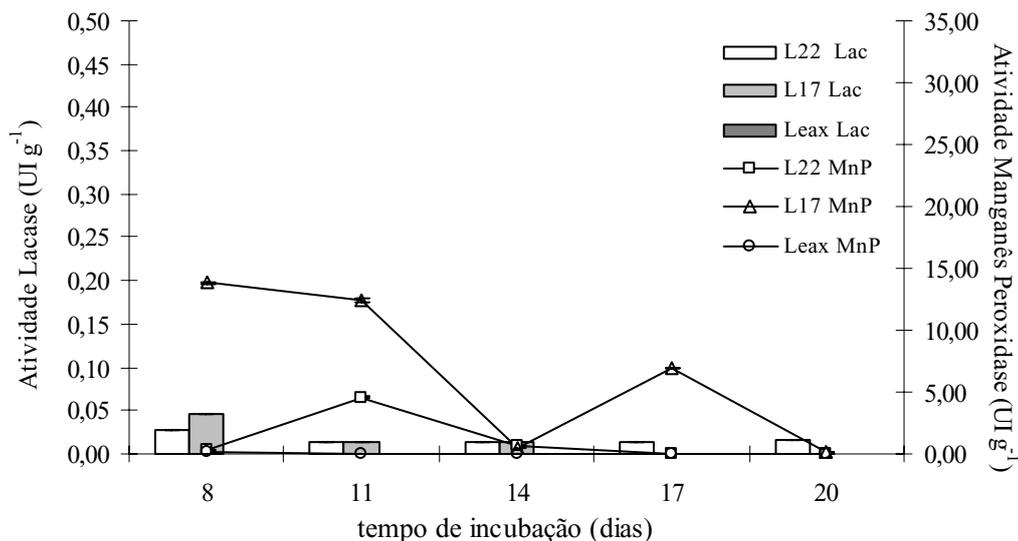
**Figura 1.** Atividade de lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP), das linhagens L17, L22 e Leax de *Lentinula edodes*, em unidade internacional (UI) por g de substrato SE desidratado. Barras verticais representam o desvio padrão.



**Figura 2.** Atividade de lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP), das linhagens L17, L22 e Leax de *Lentinula edodes*, em unidade internacional (UI) por g de substrato BC desidratado. Barras verticais representam o desvio padrão.



**Figura 3.** Atividade de lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP), das linhagens L17, L22 e Leax de *Lentinula edodes*, em unidade internacional (UI) por g de substrato CA desidratado. Barras verticais representam o desvio padrão.



**Figura 4.** Atividade de lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP), das linhagens L17, L22 e Leax de *Lentinula edodes*, em unidade internacional (UI) por g de substrato BM desidratado. Barras verticais representam o desvio padrão.

As linhagens de *L. edodes* não apresentaram atividade detectável da enzima LiP. Embora não tenha sido detectada, não se pode descartar completamente a sua ausência, pois são vários os fatores que contribuem para a ativação do sistema lignocelulolítico (KIRK; FARRELL, 1987; BUSWELL, 1991).

A linhagem L17 foi a mais eficiente na produção de MnP nos substratos SE, BC e BM, apesar de baixa produção no substrato CA, uma característica de todas as linhagens testadas (Figura 1, 2, 3 e 4). A linhagem L17 também foi a maior produtora de MnP no substrato SE. Isto sugere que as características genéticas da linhagem L17 relacionadas à síntese de MnP são menos influenciadas pelo tipo de substrato e, portanto, a L17 é mais indicada para ser utilizada em diversos substratos (Figura 1, 2, 3 e 4).

O substrato SE foi o melhor indutor de atividade de MnP, provavelmente, pela serragem de eucalipto ter uma maior concentração de lignina, assim como no substrato CA, apesar da quantidade de sílica. Já no substrato BC a celulose é o maior componente, porém neste caso a linhagem Leax não foi mais

eficiente na produção de MnP. No caso do substrato BM, devido ao amido remanescente ainda ser o maior componente, e no substrato CA, apesar de haver celulose, houve a mais baixa produção de MnP para todas as linhagens.

A atividade da MnP apresenta picos de atividade para a L22, enquanto a Leax consegue manter o pico de atividade por mais tempo no substrato BC (Figura 2). Comportamento similar pode ser verificado para MnP em SE (Figura 1). Este comportamento de síntese enzimática pode estar associado a uma maior capacidade de síntese de enzimas proteolíticas pela Leax. As proteases excretadas pelos fungos, não são normalmente seletivas, desta forma pode ocorrer a hidrólise enzimática da MnP por enzimas endógenas do fungo, promovendo uma drástica redução de atividade. Outro fator importante é a necessidade da presença de cofatores enzimáticos que podem estabilizar o sítio ativo enzimático e assim aumentar sua atividade (BUSWELL, 1991)

Verificando-se as atividades enzimáticas das linhagens, nos diferentes substratos, observou-se que, em geral, os maiores valores de atividade

enzimática foram obtidos no substrato SE, seguido do BC, sendo as menores atividades no CA e BM (Figura 1, 2, 3 e 4). Segundo Kadimaliev et al. (2003), as mudanças na atividade lignolítica e biosíntese de Lac e MnP pelos fungos, durante o cultivo em estado sólido, dependem do tipo de substrato usado. O desenvolvimento da habilidade ligninolítica requer condições nutricionais e culturais, incluindo substrato metabolizável, altos níveis de oxigênio, um limite de nitrogênio e várias outras condições de cultivo (KIRK; FARRELL, 1987; BUSWELL, 1991). Além disso, os tipos e quantidades de enzimas, que podem ser produzidas para a transformação da lignina em formas absorvíveis, são definidos pelo genótipo específico do fungo e associado à adaptação a um determinado substrato (SHEARER, 1995).

Embora nos substratos BM e CA foram obtidos os menores valores de atividade de Lac e MnP, foram nestes substratos que houveram a maior velocidade de crescimento micelial (resultados não apresentados). A baixa velocidade de crescimento micelial no substrato SE e BC associada à maior atividade de enzimas oxidativas, provavelmente, esta relacionada à dificuldade de degradar compostos nestes substratos. Desta forma, o substrato BM e CA podem ser utilizados em formulações alternativas de cultivo de basidiocarpos ou ainda como complemento de substrato devido ao rápido crescimento miceliano.

Para o substrato BM a pequena produção das enzimas pode estar associada à grande quantidade de amido residual do processo de extração de fécula. Conforme verificou Leatham (1985), compostos como polissacarídeos celulósicos e não-celulósicos, na parede celular de palhas, ficam mais disponíveis às enzimas hidrolíticas que os substratos com maior quantidade de lignina.

## Conclusões

Concluiu-se que a atividade de Lac e MnP são maiores nos substratos a base de serragem de

eucalipto (SE) e bagaço de cana-de-açúcar (BC). A atividade de LiP não é induzida pelos substratos SE, BC, CA e BM. Os substratos a base de casca de arroz (CA) e bagaço de mandioca (BM), apesar de não serem adequados para produzir Lac ou MnP, podem ser utilizados como aditivos para aumentar a porosidade, disponibilidade de ar e fornecer polissacarídeos de fácil metabolização ao fungo.

## Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsa de doutorado no Brasil e ao CNPq pela bolsa de doutorado sanduíche na Itália.

## Referências bibliográficas

- ARORA, D. K.; BRIDGE, P. D.; BHATNAGAR, D. *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*. Oxford: CRC, 2004.
- BALDRIAN, P.; VALÁŠKOVA, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 501-521, 2008.
- BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology*, London, v. 28, n. 2, p. 78-87, 1994.
- BEUX, M. R.; SOCCOL, C. R. Cultivo do fungo comestível *Lentinula edodes* em resíduos agroindustriais do Paraná através do uso de fermentação no estado sólido. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 14, n. 1, p. 11-24, 1996.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- BUSWELL, J. A. Fungal degradation of lignin. In: ARORA, D. K.; BHARAT, R.; MUKERJI, K. G.; KNUDSEN, G. R. (Ed.). *Handbook of applied mycology: soil and plants*. New York: Marcel Dekker. 1991. p. 425-480.
- BUSWELL, J. A.; CHANG, S. T. Edible mushrooms: attributes and applications. In: CHANG, S.T.; BUSWELL, J. A., MILES, P. G. (Ed.). *Genetics and breeding of edible mushrooms*. Philadelphia: Gordon and Breach Scientific, 1993. p. 297-324.
- EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. *Cultivo de cogumelos comestíveis*. Botucatu: FEPAF, 1996.

- EIRA, A. F.; BRAGA, G. C.; COLAUTO, N. B. Técnicas de cultivo de champignon (*Agaricus spp*). In: EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. (Org.). *Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis*. 2. ed. Botucatu: FEPAF, 1997, p. 45-47.
- FIELD, J. A.; JONG, E.; FEIJOO-COSTA, G.; BONT, J. A. M. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 44-49, 1993.
- GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, v. 242, n. 2, p. 329-341, 1985.
- HATVANI, N.; MÉCS, I. Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York, v. 55, n. 2, p. 199-203, 2003.
- KADIMALIEV, D. A.; REVIN, V. V.; ATYKYAN, N. A.; SAMUILOV, V. D. Effect of wood modification on lignin consumption and synthesis of lignolytic enzymes by the fungus *Panus (Lentinus) tigrinus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, New York, v. 39, n. 5, p. 488-492, 2003.
- KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, Essex, v. 91, n. 2, p. 153-156, 2004.
- KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v. 41, n. 1, p. 465-505, 1987.
- LEATHAM, G. F. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 50, n. 4, p. 859-867, 1985.
- LEATHAM, G. F.; KIRK, T. K. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 65-67, 1983.
- MESSNER, K.; STREBOTNIK, E. Biopulping: and overview of developments in environmentally safe paper-making technology. *FEMS Microbiology Review*, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 351-364, 1994.
- ONYSKO, K. A. Biological bleaching of chemical pulps: a review. *Biotechnology Advances*, New York, v. 11, n. 2, p. 179-198, 1993.
- PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. *Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation*. Iowa: kendall/Hunt, 1988.
- RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. Biopotentialities of basidiomycetes. *Advances in Applied Microbiology*, San Diego, v. 37, p. 233-361, 1992.
- REID, I. D.; PAICE, M. G. Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiology Review*, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 369-376, 1994.
- ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.36, n. 6, p. 887-891, 2001.
- SHEARER, C. A. Fungal competition. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 73, Suppl. 1, p. 1259-1264, 1995.
- SLOMCZYNSKI, D.; NAKAS, J. P.; TANENBAUM, S. W. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea*. *Applied Environmental Microbiology*, Boston, v. 61, n. 3, p. 907-912, 1995.
- TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 81, n. 8, p. 2280-2284, 1984.
- WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 267, n. 33, p. 23688-23695, 1992.