

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LACASE DE *Pleurotus sajor-caju*  
USANDO VINHAÇA DA CANA-DE-AÇÚCAR PROVENIENTE DA  
INDÚSTRIA SUCROENERGÉTICA**

Autor: Joberson Alves Junior

Orientadores: Prof. Luiz Fernando Romanholo Ferreira, D.Sc.

Prof. Ranyere Lucena de Souza, D.Sc.

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2018

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LACASE DE *Pleurotus sajor-caju* USANDO  
VINHAÇA DA CANA-DE-AÇÚCAR PROVENIENTE DA INDÚSTRIA  
SUCROENERGÉTICA

Joberson Alves Junior

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
ENGENHARIA DE PROCESSOS

Aprovada por:



Luiz Fernando Romanholo Ferreira, D.Sc.



Ranyere Lucena de Souza, D.Sc.



Alvaro Silva Lima, D.Sc.



Aline Leite Pereira Costa de Oliveira, D.Sc.



Daniel Pereira da Silva, D.Sc.

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2018

---

A474p      Alves Junior, Joberson  
Produção e purificação da Lacase de Pleurotus sajor-caju usando  
vinhaça de cana-de-açúcar proveniente da indústria sucroenergética /  
Joberson Alves Junior; orientação [de], Prof. ° Dr.° Luiz Fernando  
Romanholo Ferreira, Prof.° Dr.° Ranyere Lucena de Souza– Aracaju:  
UNIT, 2018.

55 f. il.: 30cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) -  
Universidade Tiradentes, 2018

Inclui bibliografia.

1. Biomassa. 2. Descoloração. 3. Sistema aquoso bifásico. I. Alves  
Junior, Joberson. II. Ferreira, Luiz Fernando Romanholo. (orient.) III.  
Souza, Ranyere Lucena de. (orient.). IV. Universidade Tiradentes. V.  
Título.

CDU: 664. 111: 604.4: 577.15

---

SIB- Sistema Integrado de Bibliotecas

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LACASE DE *Pleurotus sajor-caju* USANDO  
VINHAÇA DA CANA-DE-AÇÚCAR PROVENIENTE DA INDÚSTRIA  
SUCROENERGÉTICA

Joberson Alves Junior

A lacase (EC 1.10.3.2), excretada pelo fungo *Pleurotus sajor-caju* (CCB 020), foi produzida em fermentação submersa utilizando como substrato vinhaça de cana-de-açúcar proveniente da indústria sucroenergética. É importante reaproveitar o potencial deste subproduto poluidor para a síntese de enzimas de interesse biotecnológico durante seu processo de degradação. Para maior síntese da lacase o uso de indutores é fundamental, visando, conseqüentemente, redução do custo final da enzima. A enzima foi purificada utilizando sistema aquoso bifásico (SAB). O melhor indutor utilizado foi o  $\text{CuSO}_4$  (sulfato de cobre), que na concentração de 0,4 mM aumentou a produção de lacase em 4 vezes, obtendo atividade enzimática de 539,3 U/L. A indução por etanol também ocorreu, atingindo atividade enzimática de 364,5 U/L ao utilizar a concentração de 2% de etanol, tendo um aumento de 2,8 vezes se comparado a amostra controle. Ao final da fermentação, foi produzido 10,08 g/L de biomassa fúngica com conseqüente descoloração da vinhaça de 92%, e remoção da turbidez de 99,2%. Durante o processo de purificação enzimática, a lacase tendeu a migrar para fase de topo do sistema, rica em polímero, e o maior fator de purificação obtido foi de 2,88, encontrado em sistemas compostos por 12% (m/m) de PEG 1500 e 20% (m/m) de tampão citrato (pH 6,0). Assim, esse estudo mostrou que o uso de indutores pode aumentar a síntese de lacase por *P. sajor-caju* usando vinhaça como substrato, além de, durante o processo fermentativo, reduzir cor e turbidez deste resíduo poluidor.

Palavras-chave: biomassa, descoloração, indução, sistema aquoso bifásico.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

PRODUCTION E PURIFICATION OF LACCASE OF *Pleurotus sajor-caju* USING VINASSE OF SUGARCANE FROM THE SUCROENERGÉTIC INDUSTRY

Joberson Alves Junior

The laccase, excreted by the fungus *Pleurotus sajor-caju*, was produced in submerged fermentation using as substrate sugarcane vinasse from the sugarcane industry. It is important to reuse the potential of this polluting by-product for the synthesis of enzymes of biotechnological interest during its degradation process. For greater synthesis of laccase the use of inducers is fundamental, aiming, consequently, reduction of the final cost of the enzyme. The enzyme was purified using aqueous two-phase system (ATPS). The best inducer used was CuSO<sub>4</sub> (copper sulphate), which at a concentration of 0.4 mM increased the production of laccase by 4 times, obtaining enzymatic activity of 539.3 U/L. Induction by ethanol also occurred, reaching enzymatic activity of 364.5 U/L when using the concentration of 2% of ethanol, having an increase of 2.8 times when compared to the control sample. During the enzymatic purification process, laccase tended to migrate to the polymer's high-end system phase, and the highest purification factor obtained was 2.88, found in systems composed of 12% PEG 1500 and 20% citrate buffer (pH 6.0). Thus, this study showed that the use of inducers can increase the synthesis of laccase by *P. sajor-caju* using vinasse as a substrate, and during the fermentation process, reduce the color and turbidity of this pollutant residue.

Keywords: biomass, decolorization, induction, aqueous two-phase system.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>4</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1. PLEUROTUS SAJOR-CAJU.....</b>	<b>5</b>
<b>3.2. VINHAÇA.....</b>	<b>6</b>
<b>3.3. LACASE.....</b>	<b>8</b>
3.3.1 PRODUÇÃO DA LACASE.....	10
3.3.2 PURIFICAÇÃO DA LACASE.....	13
3.3.2.1 <i>Sistemas Aquosos Bifásicos</i> .....	14
3.3.3 APLICAÇÕES DA LACASE.....	16
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1. MICRORGANISMO.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2. VINHAÇA.....</b>	<b>18</b>
<b>4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO DE P. SAJOR-CAJU EM FRASCOS AGITADOS.....</b>	<b>19</b>
<b>4.4. PRODUÇÃO DE LACASE POR P. SAJOR-CAJU.....</b>	<b>19</b>
<b>4.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE.....</b>	<b>20</b>
<b>4.6. DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....</b>	<b>21</b>
<b>4.7. DESCOLORAÇÃO E REMOÇÃO DA TURBIDEZ.....</b>	<b>21</b>
<b>4.8. DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA FÚNGICA.....</b>	<b>21</b>
<b>4.9. PURIFICAÇÃO DA LACASE.....</b>	<b>22</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1. PRODUÇÃO E INDUÇÃO DA LACASE.....</b>	<b>25</b>
5.1.1 INDUÇÃO DA LACASE POR SULFATO DE COBRE.....	27
5.1.2 INDUÇÃO DA LACASE POR ETANOL.....	29
5.1.3 INDUÇÃO DA LACASE POR THF.....	31
<b>5.2. PRODUÇÃO DE BIOMASSA.....</b>	<b>31</b>
<b>5.3. DESCOLORAÇÃO E REMOÇÃO DA TURBIDEZ.....</b>	<b>32</b>
<b>5.4. PURIFICAÇÃO DA LACASE.....</b>	<b>35</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>41</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1- REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE UMA LACASE.....</b>	<b>9</b>
<b>FIGURA 2- ESTRUTURA DO SÍTIO CATALÍTICO DA LACASE.....</b>	<b>10</b>
<b>FIGURA 3- SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO FORMADO POR POLÍMERO E SAL.....</b>	<b>15</b>
<b>FIGURA 4- FUNGO PLEUROTUS SAJOR-CAJU CCB 020 EM SUA FASE VEGETATIVA (MICELIAL) CULTIVADO EM MEIO MEA (MALT EXTRACT AGAR) EM PLACA DE PETRI.....</b>	<b>18</b>
<b>FIGURA 5- VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR COM PH 3,8 A 25°C.....</b>	<b>19</b>
<b>FIGURA 6: BIOMASSA FÚNGICA PRODUZIDA APÓS 15 DIAS DE CULTIVO DO P. SAJOR-CAJU EM FRASCOS AGITADOS A 25°C E 180 RPM, EM MEIO COMPOSTO POR VINHAÇA, ANTES (A) E APÓS (B) SECAGEM.....</b>	<b>22</b>
<b>FIGURA 7- SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO EM TUBO FALCON CONSTITUÍDO POR POLÍMERO (POLIETILENOGLICOL - PEG) NA FASE DE TOPO E SAL (TAMPÃO CITRATO) NA FASE DE FUNDO.....</b>	<b>23</b>
<b>FIGURA 8- ATIVIDADE DA LACASE (U/L) (●) DE P. SAJOR-CAJU DURANTE 15 DIAS DE CULTIVO A 28°C (± 2°C) E 180 RPM EM MEIO 100% VINHAÇA.....</b>	<b>26</b>
<b>FIGURA 9- ATIVIDADE DA LACASE (U/L) DE P. SAJOR-CAJU EM AMOSTRA DE CONTROLE (●) E INDUZIDA POR CuSO<sub>4</sub> EM CONCENTRAÇÕES DE 1,0 MM (●), 0,6 MM (●) E 0,4 MM (●), DURANTE 15 DIAS DE CULTIVO A 28°C (± 2°C) E 180 RPM.....</b>	<b>28</b>
<b>FIGURA 10- ATIVIDADE DA LACASE (U/L) DE P. SAJOR-CAJU EM AMOSTRA DE CONTROLE (●) E INDUZIDA POR ETANOL EM CONCENTRAÇÕES DE 3% (V/V) (●), 2% (V/V) (●) E 1% (V/V) (●), DURANTE 15 DIAS DE CULTIVO A 28°C (± 2°C) E 180 RPM... </b>	<b>30</b>
<b>FIGURA 11- BIOMASSA (G/L) E ATIVIDADE DA LACASE (U/L) (●) PRODUZIDA PELO P. SAJOR-CAJU EM MEIO CONTENDO VINHAÇA PURA (CONTROLE) E VINHAÇA</b>	

*COM  $CuSO_4$  E ETANOL COMO INDUTORES, CULTIVADOS DURANTE 15 DIAS A 28°C ( $\pm 2^\circ C$ ) E 180 RPM.....31*

**FIGURA 12-** *DESCOLORAÇÃO (%) (●) E REMOÇÃO DA TURBIDEZ (%) (●) DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM SUA FORMA IN NATURA (0), APÓS TRATAMENTO UTILIZANDO P. SAJOR-CAJU POR 3 DIAS, 6 DIAS, 9 DIAS, 12 DIAS E 15 DIAS A 28°C ( $\pm 2^\circ C$ ) E 180 RPM.....33*

**FIGURA 13-** *COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA LACASE EM DIFERENTES VALORES DE PH (5,0; 6,0 E 7,0) PARA SISTEMA COMPOSTO POR PEG 4000 E TAMPÃO CITRATO.....36*

**FIGURA 14-** *DADOS DE COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ( $K_E$ ) E FATOR DE PURIFICAÇÃO (PF) DA LACASE NAS FASES DE TOPO E FUNDO DO SISTEMA PEG EM DIFERENTES PESOS MOLECULARES (1500, 4000, 6000 E 8000 G/MOL) E TAMPÃO CITRATO (PH 6,0) A 25°C.....37*



## LISTA DE TABELAS

<i>TABELA 1- RESÍDUOS AGRÍCOLAS UTILIZADOS NO CULTIVO DE ALGUMAS ESPÉCIES DE PLEUROTUS.....</i>	<i>6</i>
<i>TABELA 2- COMPOSIÇÃO QUÍMICA MÉDIA DA VINHAÇA.....</i>	<i>7</i>
<i>TABELA 3- INDUTORES USADOS NA PRODUÇÃO DA LACASE.....</i>	<i>12</i>
<i>TABELA 4- TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO REALIZADAS EM LACASE.....</i>	<i>13</i>
<i>TABELA 5- ATIVIDADE DA LACASE (U/L) NO TOPO E FUNDO DO SISTEMA COMPOSTO POR PEG 4000 E TAMPÃO CITRATO EM DIFERENTES pH (5,0; 6,0 E 7,0).....</i>	<i>35</i>
<i>TABELA 6- DADOS DE FATOR DE PURIFICAÇÃO (PF) E RECUPERAÇÃO (Y) DA LACASE NAS FASES DE TOPO E FUNDO DO SISTEMA COMPOSTO POR PEG 1500 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E TAMPÃO CITRATO (PH 6,0) A 25°C.....</i>	<i>38</i>
<i>TABELA 7- DADOS DE FATOR DE PURIFICAÇÃO (PF) E RECUPERAÇÃO (Y) DA LACASE NAS FASES DE TOPO E FUNDO DO SISTEMA COMPOSTO POR 12% DE PEG 1500 E TAMPÃO CITRATO (PH 6,0) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES A 25°C.....</i>	<i>38</i>

# Capítulo 1

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria sucroenergética é um setor de grande importância para o Brasil, sendo o etanol da cana-de-açúcar o mais bem sucedido programa de combustível alternativo já desenvolvido no mundo (UNICA, 2017). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), em 2017 foram produzidos aproximadamente 28 bilhões de litros de etanol no país, com previsão para continuar com a alta produção nos próximos anos. Entretanto, uma planta tradicional de produção de etanol gera entre 9 e 14L de efluente, conhecido como vinhaça, por litro de etanol produzido (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2017).

A vinhaça é composta por água, minerais inorgânicos, sólidos em suspensão e poluentes orgânicos, como compostos fenólicos e melanoidina. Apresenta cor castanha, efeito corrosivo devido ao seu baixo pH (3,5 – 5,0), com elevada demanda química de oxigênio (DQO) (70 – 150 g/L) e valores elevados de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (35 – 50 g/L), tornando um efluente poluente, complexo e de difícil degradação (ROBLES-GONZÁLEZ *et al.*, 2012). É utilizada como fertilizantes em irrigação de culturas, no entanto, pode provocar efeitos no solo como saturação e elevação do pH (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2017). Nos corpos hídricos faz com que o oxigênio dissolvido na água seja consumido mais rápido, comprometendo a biota aquática (MOHANA *et al.*, 2009). O lençol freático também pode ser contaminado pelas impurezas da vinhaça por percolação profunda da água de irrigação, que infiltram e atingem aquíferos subterrâneos (GONZÁLEZ e MEJÍA, 2015). Portanto, a vinhaça deve passar por um tratamento antes de ser descartada ou reutilizada.

A degradação deste efluente da indústria sucroenergética por microrganismos provou ser uma eficiente forma de tratamento, principalmente utilizando o basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju* (CCB 020) (FERREIRA *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2011; VILAR *et al.*, 2017). A alternativa de biodegradação é também um método com fins biotecnológicos, pois no processo fermentativo o fungo produz e excreta enzimas de grande interesse comercial, como a lacase (EC 1.10.3.2). Essa enzima é produzida principalmente por fungos que catalisam reações com diferentes substratos orgânicos e inorgânicos, e apresentam grande potencial para aplicações biotecnológicas, tais como na indústria alimentícia, na deslignificação de compostos celulósicos, no branqueamento de papel, na degradação de

corantes sintéticos, no tratamento de águas residuais, na formulação de biosensores e na degradação de pesticidas (RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013; MANAVALAN *et al.*, 2013; SPINA *et al.*, 2015; ZENG *et al.*, 2017).

Com tantas aplicações, a produção da lacase tem atraído muita atenção, podendo ser aumentada de forma considerável pelo uso de indutores ao substrato (MANAVALAN *et al.*, 2013; FOKINA *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016; ZHUO *et al.*, 2017). Compostos aromáticos, como pirogalol e ácido ferúlico, tem sido eficazes em estimular a produção da lacase por *P. sajor-caju* (ZUCCA *et al.*, 2011), porém a maioria desses compostos são prejudiciais para o ser humano ou possuem um custo elevado, impedindo seu uso em aplicações industriais. Alguns autores relatam que diferentes álcoois poderiam ser mais adequados e possuem vantagem econômica para induzir a produção de enzimas (BARBOSA *et al.*, 2012; MANAVALAN *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ *et al.*, 2015). Outro indutor bastante conhecido é o cobre, pois eleva a produção de lacase por fungos devido à presença de átomos de cobre em seu sítio catalítico (KHAMMUANG *et al.*, 2013; FOKINA *et al.*, 2016).

A depender da aplicação e pensando em produção comercial, é necessário que a lacase passe por um processo de purificação. Dentre as técnicas mais comuns aplicadas para purificação dessa enzima estão a filtração seguida de ultrafiltração por membrana (ZUCCA *et al.*, 2011), precipitação seguida por diálise (HALABURGI *et al.*, 2011), congelamento a -20°C e descongelamento seguida por centrifugação (JORDAAN *et al.*, 2004) e técnicas cromatográficas (SCHWIENHEER *et al.*, 2015). Utilizando essas técnicas são necessárias varias etapas de purificação para que se obtenha a enzima pura, o que causa perda de atividade enzimática e elevado custo (NADAR *et al.*, 2017). Sendo assim, uma alternativa que tem sido utilizada para a separação e purificação de biomoléculas, como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos, é a extração líquido-líquido utilizando sistemas aquosos bifásicos (SAB), que possui baixo custo e boa eficiência, como pureza e atividade enzimática (BARBOSA *et al.*, 2011; PRINZ *et al.*, 2014; RAJAGOPALU *et al.*, 2016; TRASVIÑA *et al.*, 2017). O SAB se forma quando dois compostos solúveis em água, geralmente um polímero e um sal, são misturados acima das concentrações críticas de cada um desses componentes que ao atingir o equilíbrio termodinâmico se separam resultando em duas fases imiscíveis (GLYK *et al.*, 2014).

A importância desse estudo está na utilização combinada de materiais e técnicas de custo reduzido para produção de lacase por *P. sajor-caju*, a fim de que ao final do processo se

possa obter a enzima com preço menor. Além do projeto ser de natureza ambiental, biodegradando a vinhaça, é também consciente no uso de materiais de natureza degradável, como o citrato, por exemplo, tornando-o ambientalmente mais correto. Portanto, o presente estudo procura produzir lacase de *P. sajor-caju* durante o processo de biodegradação da vinhaça de cana-de-açúcar, bem como testar possíveis indutores em diferentes concentrações, visando maior produção enzimática. Em seguida, utilizar SAB para purificação da enzima, estudando diferentes condições, como pH e composições do sistema, para obter a enzima de forma mais purificada.

# Capítulo 2

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é produzir a enzima Lacase de *Pleurotus sajor-caju* utilizando vinhaça como substrato e diferentes compostos como possíveis indutores, e em seguida avaliar sua purificação por uso de sistemas aquosos bifásicos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- Avaliar a relação entre a degradação da vinhaça provocada pelo *P. sajor-caju* e a produção de lacase;
- Selecionar e avaliar o melhor indutor (etanol, sulfato de cobre e tetrahidrofurano) e sua melhor concentração para a produção de lacase;
- Avaliar a produção de biomassa pelo fungo *P. sajor-caju*;
- Purificar a lacase de *P. sajor-caju* através de sistemas baseados em PEG/tampão citrato, avaliando qual a melhor composição (pH, peso molecular do PEG e concentrações) para sistema aquoso bifásico;

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. *Pleurotus sajor-caju*

O gênero *Pleurotus* possui alto potencial biotecnológico, podendo ser usado como alimento, na biorremediação, na síntese de compostos bioquímicos, na produção de etanol e até mesmo na área da medicina (MADHAVI e LELE, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2011; OYELEKE *et al.*, 2012; RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013; MANAVALAN *et al.*, 2013; SPINA *et al.*, 2015).

Os membros desse gênero são os principais responsáveis pela podridão branca da madeira, se desenvolvendo sobre a mesma em decomposição. Os fungos da podridão branca, como são conhecidos, são caracterizados pela capacidade de degradar a lignina de tecidos lenhosos por meio da ação de enzimas produzidas, como a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e a lacase (Lac), onde a expressão dessas enzimas depende das condições de crescimento aplicada ao fungo (ERIKSSON *et al.*, 1990; HATAKKA, 1994; FERRAZ, 2004).

O gênero pode ser cultivado a partir de diversos resíduos agrícolas, que funcionam como substrato para o crescimento do fungo. A Tabela 1 mostra alguns resíduos já utilizados.

**Tabela 1:** Resíduos agrícolas utilizados no cultivo de algumas espécies de *Pleurotus*.

FONTE	FUNGOS	RESÍDUOS
<b>DIAS et al. (2003)</b>	<i>P. sajor-caju</i>	Palha de feijão e palha de milho
<b>REDDY et al. (2003)</b>	<i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i>	Resíduo de banana
<b>DONINI et al. (2005)</b>	<i>Pleurotus spp.</i>	Palha de soja e sabugo de milho
<b>PAZ et al. (2006)</b>	<i>P. sajor-caju</i>	Bagaço de uva
<b>ALEXANDRINO et al. (2007)</b>	<i>P. ostreatus</i>	Resíduo de laranja
<b>GREGORI et al. (2008)</b>	<i>P. ostreatus</i>	Farelo de trigo e serragem de faia
<b>AGUIAR et al. (2010)</b>	<i>P. sajor-caju</i> , <i>P. ostreatus</i> e <i>P. ostreatoroseus</i>	Bagaço de cana-de-açúcar
<b>BERNARDI et al. (2013)</b>	<i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i>	Campim-elefante, resíduos de mamona e palha de arroz
<b>CORRÊA et al. (2016)</b>	<i>Pleurotus spp.</i>	Resíduos de algodão, palha de trigo, casca de café e talos de ervilha e amendoim
<b>ERGUN e UREK (2017)</b>	<i>P. ostreatus</i>	Casca de batata

O *P. sajor-caju* (CCB 020) possui grande habilidade saprofítica de colonização, podendo colonizar substratos esterilizados, pasteurizados (60 a 90°C) e fermentados. Apresenta grande variabilidade fenotípica, podendo ser cultivado em regiões com diferentes condições climáticas e culturais (ZADRAZIL, 1980). Estudo mostrou a análise de 15 cepas de *P. sajor-caju*, derivados de diversas localidades e obteve-se valores de pH entre 4 e 8 e temperaturas entre 15 e 30°C, indicando a possibilidade de cultivo em condições climáticas diversificadas (KASHANGURA et al., 2006).

### 3.2. VINHAÇA

O fungo pode ser cultivado em resíduos encontrados na natureza, de origem vegetal, que podem ser aproveitados como fonte de nutrientes para os fungos. FERREIRA et al. (2010) utilizaram a vinhaça, efluente derivado da indústria sucroenergética, para o cultivo de diversos microrganismos, incluindo o fungo *P. sajor-caju*.

Quando o mosto da cana-de-açúcar é fermentado passa a ser conhecido como vinho ou vinhoto, que pode ser destilado para a recuperação do álcool restando a vinhaça, que é caracterizada como um efluente ou resíduo ácido, com pH entre 3,7 e 4,8, com emissão de um forte cheiro característico (FREIRE e CORTEZ, 2000). A presença de compostos fenólicos (8.000 – 10.000 mg/L), melanoidinas e caramelo, contribuem para sua cor escura e tornam a vinhaça de difícil degradação. Para a produção de 1 litro de álcool são gerados cerca de 9 a 14 litros de vinhaça, assim uma típica destilaria pode gerar cerca de meio milhão de litros de vinhaça por dia (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2017).

A vinhaça tem a característica de ser um efluente com alto poder poluidor. Seu principal constituinte é a matéria orgânica, que se encontram sob a forma de ácidos orgânicos e cátions, como potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). Sua composição química varia a depender da qualidade da cana-de-açúcar, das etapas de fermentação, do sistema de destilação, das condições industriais e do clima (SILVA *et al.*, 2007; ROBLES-GONZÁLEZ *et al.*, 2012). A Tabela 2 mostra a composição química média da vinhaça, procedentes de mostos de melaço, misto e caldo.

**Tabela 2:** Composição química média da vinhaça.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>MELAÇO</b>	<b>MISTO</b>	<b>CALDO</b>
<b>Nitrogênio (g/L)</b>	0,77	0,46	0,28
<b>Fósforo (g/L)</b>	0,19	0,24	0,20
<b>Potássio (g/L)</b>	6,00	3,06	1,47
<b>Cálcio (g/L)</b>	2,45	1,18	0,46
<b>Magnésio (g/L)</b>	1,04	0,53	0,29
<b>Sulfato (g/L)</b>	3,73	2,67	1,32
<b>Matéria Orgânica (g/L)</b>	52,04	32,63	23,44
<b>Ferro (ppm)</b>	80,00	78,00	69,00
<b>Cobre (ppm)</b>	5,00	21,00	7,00
<b>Zinco (ppm)</b>	3,00	19,00	2,00
<b>Manganês (ppm)</b>	8,00	6,00	7,00
<b>pH</b>	4,40	4,10	3,70

Fonte: Adaptado de FREIRE e CORTEZ, 2000.

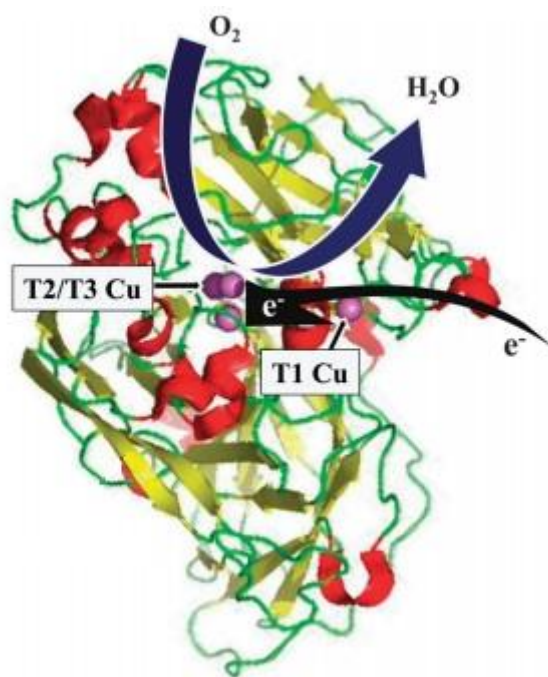


A vinhaça pode ser utilizada como fertilizantes em fertirrigação de culturas, no entanto, pode provocar efeitos no solo como a saturação, aumentando sua capacidade de reter água, e elevação do pH (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2017). Nos corpos hídricos, ao ser lançada diretamente, a vinhaça faz com que o oxigênio dissolvido na água seja consumido mais rápido, devido à degradação da matéria orgânica contida no efluente por microrganismos, comprometendo a biota aquática (MOHANA *et al.*, 2009). O lençol freático também pode ser contaminado pelas de impurezas da vinhaça por percolação profunda da água de irrigação, que infiltram nas recargas dos aquíferos (GONZÁLEZ e MEJÍA, 2015).

Portanto, com esse efeito poluidor da vinhaça e estimando produções ainda mais elevadas de álcool, seja tradicional ou celulósico, o efluente deve ser reaproveitado ou tratado antes de ser descartado no ambiente. Sua degradação por fungos é uma alternativa de tratamento com fins biotecnológicos, visto que no processo fermentativo o fungo produz e excreta enzimas, como a lacase.

### **3.3. LACASE**

A lacase (EC 1.10.3.2) é uma enzima ligninolítica produzida principalmente pelos fungos da podridão branca. São membros da família de proteínas multi-cobres e catalisam a oxidação de polifenóis e substâncias aromáticas, ocorrendo simultaneamente à redução de oxigênio dissolvido à água (BALDRIAN, 2006). A atividade enzimática da lacase está ligada a três centros de cobre. Na Figura 1 é possível notar a disposição das cadeias polipeptídicas em cores diferentes e as esferas rosas representam os íons de cobre do sítio catalítico.



**Figura 1:** Representação da estrutura tridimensional de uma Lacase.

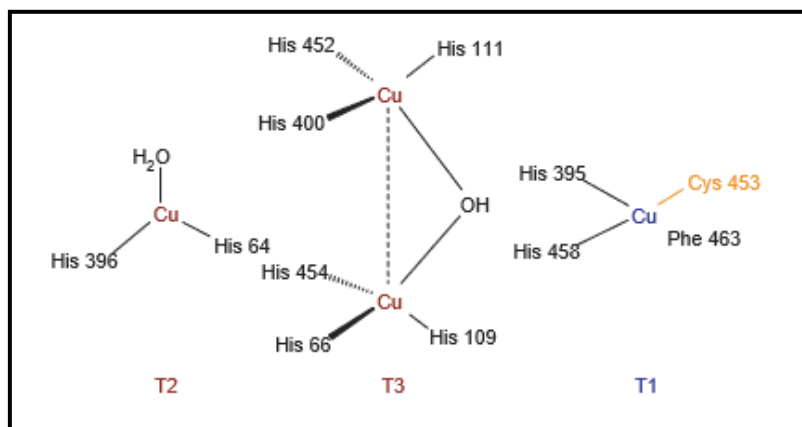
Fonte: Adaptado de Liu *et al.*, 2014.

A enzima possui baixa especificidade, o que faz com que possa agir sobre um vasto espectro de substrato e quando adicionado ao meio de reação uma molécula mediadora as lacases são capazes de degradar compostos aromáticos recalcitrantes com alto potencial de oxido-redução. Essas características fornecem a enzima um grande valor para o desenvolvimento de tecnologias ambientalmente seguras nos processos de polpa e papel e na biorremediação de efluentes industriais (DAHIYA *et al.*, 2001; NILADEVI e PREMA, 2008; BRIJWANI *et al.*, 2010; ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2011; CAMPOS *et al.*, 2014; SPINA *et al.*, 2015; VILAR *et al.*, 2017).

O pH ótimo das lacases depende do tipo de substrato que é usado, variando entre 5 e 9, a temperatura ótima pode variar a depender da origem da enzima, entre 20 a 80°C, e o ponto isoelétrico é em torno de 4,5 (BALDRIAN, 2006; MOROZOVA *et al.*, 2007).

Os átomos de cobre no seu sítio catalítico são classificados em três tipos: cobre Tipo 1, cobre Tipo 2 e cobre Tipo 3, que estão representados na Figura 2. O cobre Tipo 1 é encarregado de oxidar o substrato e conceder a cor azul-esverdeada típica de proteínas multi-cobres (GIARDINA *et al.*, 2010), o cobre Tipo 2 e Tipo 3 se unem em uma combinação formando uma estrutura trinuclear que está envolvida na ligação com o oxigênio, a qual está

coordenada por 8 resíduos de histidina. O cobre Tipo 3 é constituído por dois átomos de cobre antiferromagneticamente acoplados (SUNDARAN *et al.*, 1997).



**Figura 2:** Estrutura do sítio catalítico da Lacase. Fonte: RIVA, 2006.

### 3.3.1 Produção da Lacase

A lacase do *P. sajor-caju* é uma enzima extracelular secretada para o meio pelo micélio do fungo. Vários parâmetros afetam a produção da lacase durante o seu cultivo, os quais incluem: presença ou ausência de indutores ou inibidores, pH, temperatura, tempo de incubação, agitação, tipo de cultivo e a espécie de microrganismo utilizada (GIANFREDA *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2010; STRONG e CLAUS, 2011).

O pH e temperatura da produção da enzima diferem bastante, mas a maioria dos autores estão de acordo que o pH inicial (antes da inoculação) deve estar entre 4,5 e 6 e a temperatura ótima de incubação deve estar entre 25 e 30°C, culturas com temperaturas superiores a 30°C apresentam uma atividade enzimática reduzida (BRIJWANI *et al.*, 2010; PATRICK *et al.*, 2011; ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2015; FOKINA *et al.*, 2016; VILAR *et al.*, 2017).

A fermentação pode ocorrer de forma submersa ou em estado sólido. A fermentação submersa envolve o cultivo do fungo em meio líquido, contendo nutrientes necessários no substrato para seu crescimento. A formação de micélios durante o crescimento das células fúngicas podem causar limitação do oxigênio e da transferência de massa e algumas estratégias já tem sido empregadas para lidar com essas limitações, como a imobilização

celular (AGUIAR *et al.*, 2010; BRIJWANI *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2011; BERNARDI *et al.*, 2013; CORREA *et al.*, 2016; ERGUN e UREK, 2017).

A produção de lacase em meio líquido é influenciada pela agitação. A agitação de forma suave favorece a produção da enzima, enquanto a agitação excessiva compromete a sua produção devido ao estresse mecânico causado e aos danos que a agitação pode provocar aos micélios (COUTO e TOCA-HERRERA, 2007), como exemplo HESS *et al.* (2002) verificaram que a produção de lacase por *Trametes multicolor* diminuiu consideravelmente quando o fungo foi cultivado sobre agitação, enquanto que GALHAUP *et al.* (2002) descobriram que com a agitação a produção da lacase de *Trametes pubescens* aumentou duas vezes, e a atividade enzimática também foi superior.

A espécie do fungo também influencia na produção da lacase (FERREIRA *et al.*, 2011), por exemplo, *Phlebia fascicularia* e *Dichomitus squalens* são melhores produtoras de lacase do que *Trametes versicolor*, em condições de cultivos por 20 dias em 10 mL de MSB (meio composto por caldo de sais minerais) distribuídos em frascos erlenmeyers de 100 mL e inoculados com 2 discos miceliais de 7 mm de diâmetro, obtidos do cultivo dos fungos em placas de Petri com meio YGA (ágar, levedura e glicose) sendo incubados a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  (ARORA e GILL, 2000).

A promoção da produção de lacase tem atraído muita atenção devido ao seu potencial de aplicação em áreas ambientais e industriais (ZHUO *et al.*, 2017). A produção pode ser aumentada de forma considerável pela adição de vários suplementos ao substrato. Esses suplementos são conhecidos como indutores, pelo fato de induzirem uma maior produção da enzima, que pode ser o substrato da própria enzima ou um composto estruturalmente análogo. Dentre os fatores que influenciam a maior produção da lacase estão à natureza química do indutor, a quantidade adicionada, e o momento em que sua adição influencia a maior produção da lacase (GIANFREDA *et al.*, 1999; PATRICK *et al.*, 2011; MANAVALAN *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ *et al.*, 2015). A adição de compostos xenobióticos como a xilidina, lignina e álcool veratrílico aumenta e induz a atividade da lacase (PATRICK *et al.*, 2011; HALABURGI *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2011). Um estudo mostrou que a adição de celobiose pode induzir a atividade da lacase em algumas espécies de *Trametes* (BRIJWANI *et al.*, 2010). O cobre também foi mostrado para exibir o efeito da indução sobre a atividade da lacase por vários autores, como PASSARINI *et al.* (2015) e FONSECA *et al.* (2016). O etanol é apontado como um indutor barato e pouco tóxico para a produção de lacase (HERNÁNDEZ

*et al.*, 2015). Utilizando etanol, LEE *et al.* (1999) induziram a lacase de *T. versicolor*, MANAVALAN *et al.* (2013) induziram a produção de lacase por *Ganoderma lucidum*, utilizando concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5% (v/v), onde se obteve uma maior atividade enzimática com 3% de etanol após 15 dias, sendo 6,5 vezes maior que a amostra de controle.

Além disso, outro aspecto que pode influenciar a produção enzimática é a utilização de resíduos agrícolas como substrato para o crescimento do fungo, onde alguns são descritos também como indutores para maior atividade enzimática, como farelo de milho, arroz e trigo, casca de laranja, pomelo e tamarindo, bagaço e palha de trigo (MUÑOZ *et al.*, 1997; SINGHAL *et al.*, 2009; MANAVALAN *et al.*, 2013). A Tabela 3 mostra alguns indutores usados para uma maior produção da lacase em determinada espécie fúngica.

**Tabela 3:** Indutores usados na produção da lacase.

<b>INDUTOR</b>	<b>FUNGO</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
<b>ABTS</b>	<i>Trametes versicolor</i>	AMUTHA e ABHIJIT (2015).
<b>Ácido ferúlico</b>	<i>Pleurotus sajor-caju</i> ;	PATRICK <i>et al.</i> (2011);
<b>Cobre</b>	<i>Dichomitus squalens</i> ; <i>Trametes</i> <i>sp.</i>	KANNAIYAN <i>et al.</i> (2012); FONSECA <i>et al.</i> (2016).
<b>Etanol</b>	<i>Trametes versicolor</i> ;	LEE <i>et al.</i> (1999);
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> .	HERNÁNDEZ <i>et al.</i> (2015).
<b>Guaiacol</b>	<i>Trametes versicolor</i> .	KUHAR e PAPINUTTI (2014).
<b>Resíduos agrícolas</b>	<i>Ganoderma lucidum</i> ; <i>Pleurotus</i> <i>eryngii</i> .	MUÑOZ <i>et al.</i> (1997); MANAVALAN <i>et al.</i> (2013).
<b>Seringaldazina</b>	<i>Trametes versicolor</i> .	AMUTHA e ABHIJIT (2015).
<b>Xilidina</b>	<i>Pleurotus sajor-caju</i> .	ZUCCA <i>et al.</i> (2011).

A produção extracelular da lacase dispensa o uso de técnicas de extração intracelular, que geralmente leva a perda de rendimento. A partir do cultivo em meio líquido é mais fácil se extrair, permitindo a extração total das enzimas extracelulares produzidas (BARR e AUST, 1994, AGUIAR *et al.*, 2010).

### 3.3.2 Purificação da Lacase

A purificação de uma enzima permite eliminar ou diminuir o quantitativo de impurezas que poderiam inibir a enzima. Todo o conhecimento atual sobre a estrutura e as propriedades físico-químicas da lacase é baseado no estudo de proteínas purificadas (BALDRIAN, 2006; MAYOLO-DELOISA *et al.*, 2009; RATANAPONGLEKA, 2012; RAJAGOPALU *et al.*, 2016). A maioria das lacases são enzimas extracelulares, o que facilita bastante o procedimento de purificação (COUTO e TOCA-HERRERA, 2006).

Algumas etapas de purificação são requeridas para que se possa obter a amostra livre de pigmentos e outras proteínas contaminantes. Muitos passos, como ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio ou solventes orgânicos, e cromatografia de exclusão molecular ou troca iônica, já foram usadas para purificação de lacase a partir do filtrado da cultura (SAITO *et al.*, 2003; HALABURGI *et al.*, 2011; VISWANATH *et al.*, 2014). Sendo assim, a primeira etapa é aquela que ocorre a remoção do material insolúvel, consistindo na concentração do meio de cultura normalmente por centrifugação, filtração ou ultrafiltração (GIANFREDA *et al.*, 1999; MADHAVI e LELE, 2009). A Tabela 4 mostra técnicas utilizadas para purificação da lacase, utilizando combinações destas.

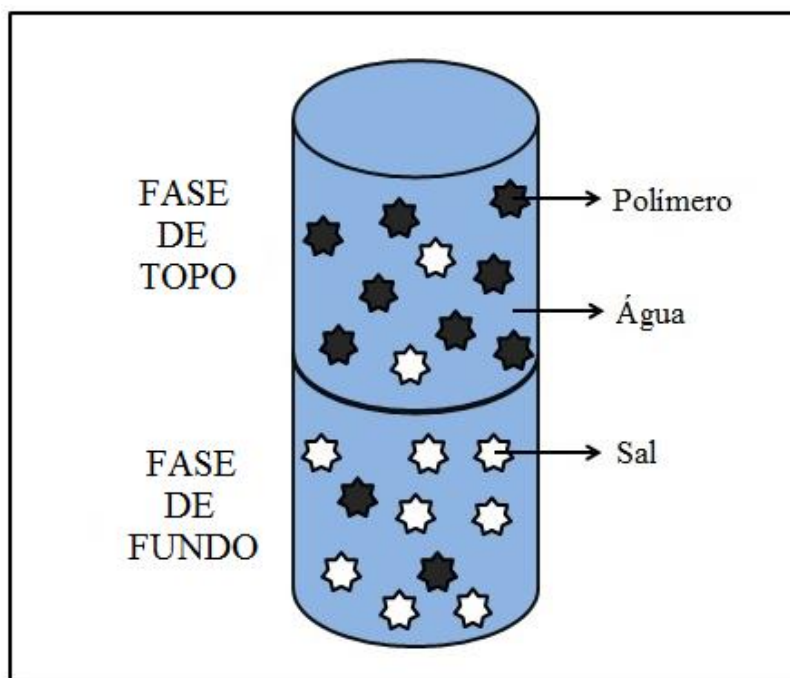
**Tabela 4:** Técnicas de purificação realizadas em lacase.

<b>TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
Filtração seguida por Ultrafiltração por membrana	ZUCCA <i>et al.</i> , 2011
Precipitação com sulfato de amônia ou acetona, seguida por dialise para retirada dos sais	HALABURGI <i>et al.</i> , 2011; YOUNES e SAYADI, 2011
Congelamento a -20°C e descongelamento seguida por centrifugação	JORDAAN <i>et al.</i> , 2004
Cromatografia de troca iônica	SAITO <i>et al.</i> , 2003
Cromatografia de partição	SCHWIENHEER <i>et al.</i> , 2015
Cromatografia de afinidade	JAIWAL <i>et al.</i> , 2015
Cromatografia de permeação em gel	SOUZA e PERALTA, 2003

### 3.3.2.1 Sistemas Aquosos Bifásicos

A extração líquido-líquido utilizando sistemas aquosos bifásicos (SAB) é uma técnica alternativa para a purificação de solutos como biopartículas, compostos inorgânicos e orgânicos, metais e outros. O método consiste em particionar a molécula de interesse para uma das fases do sistema e concentra-la e purifica-la nessa fase, em que possui maior afinidade. Boa parte dos custos de produção (50 a 90%) vem desde as fases de extração e purificação, sendo assim, o SAB faz-se uma metodologia eficiente para reduzir esses custos e garantir ótimos níveis de qualidade, como pureza e atividade enzimática (DIAMOND e HSU, 1992; WU *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2011).

O SAB se forma quando dois compostos solúveis em água são misturados acima das concentrações críticas termodinâmicas, e ao atingir o equilíbrio se separam, resultando em duas fases imiscíveis (fase de topo e a fase de fundo). A maior parte do SAB é constituído por água, sendo os demais constituintes formados geralmente por polímeros e sais inorgânicos, podendo o sistema ser formado pela mistura de dois polímeros ou um polímero e um sal, não sendo tóxicos nem inflamáveis, tornando-o um sistema ambientalmente seguro. A água funciona como solvente para as duas fases e proporciona um ambiente ameno para a enzima, com poucas chances de desnaturação. A Figura 3 representa um sistema aquoso bifásico, na qual a fase de topo é rica em polímero e a fase de fundo rica em sal. As condições fornecidas pelo SAB são adequadas para a maioria das biomoléculas, permitindo uma recuperação com alta pureza e sem perda de atividade biológica. Além disso, outra característica importante é a possibilidade de controlar o pH do meio usando soluções tampão, que é importante quando o objetivo é a purificação de proteínas (WU *et al.*, 2011; RATANAPONGLEKA, 2012; GLYK *et al.*, 2014; PRINZ *et al.*, 2014).



**Figura 3:** Sistema Aquoso Bifásico formado por polímero e sal.

Dentre outras propriedades importantes das fases que podem contribuir para a distribuição da molécula entre a fase de topo e de fundo estão: a natureza química dos componentes formadores do SAB, a massa molar e concentração dos polímeros, pH, temperatura e a adição de sais inorgânicos (RATANAPONGLEKA, 2012).

Estudos recentes mostram o potencial da utilização de SAB na purificação da lacase. RAJAGOPALU *et al.* (2016) utilizaram um SAB formado por polietilenoglicol 8000 (PEG-8000) e solução de fosfato de potássio para purificar lacase de *Hericium erinaceus*, obtendo um rendimento de 99% e fator de purificação de 8,03. SILVÉRIO *et al.* (2013) investigaram SABs compostos por um polímero e um sal e compostos por dois polímeros diferentes para purificar lacase comercial, mostrando a eficácia do sistema através dos coeficientes de partição (K) encontrados e obtendo melhor resultado para sistemas baseados em PEG/sulfato de lítio, com  $K=2,08$ . Estes estudos indicam a possibilidade promissora do uso de SABs no próprio meio fermentativo.



### 3.3.3 Aplicações da Lacase

A lacase é amplamente estudada até os dias de hoje devido ao elevado número de aplicações em diferentes áreas da biotecnologia (GIARDINA *et al.*, 2010; MANAVALAN *et al.*, 2013; FOKINA *et al.*, 2016; VILAR *et al.*, 2017).

A lacase pode ser aplicada em diversas áreas da indústria alimentícia. Na fabricação de pão pode ser utilizada para aumentar o volume específico do pão e diminuir a dureza da migalha e da mastigação (RENZETTI *et al.*, 2010). Na estabilização do vinho, a enzima tem o objetivo de remover fenóis do mosto, facilitando a regeneração e posterior reutilização, além de inibir oxidantes, evitando a descoloração (RIEBEL *et al.*, 2017). Ainda na indústria vinícola, pode ser usada na preparação de rolhas de cortiça, diminuindo o gosto da rolha que pode ocorrer no vinho engarrafado (MADHAVI e LELE, 2009). Pode ser utilizada para clarificar suco de frutas, reduzindo fenóis que causam forte turvação e afetam a qualidade do sumo (LETTERA *et al.*, 2016).

Na indústria do papel, a lacase é de fundamental importância para a remoção da lignina, permitindo obter papel na cor branca e melhorando sua flexibilidade (MAYER e STAPLES, 2002; MADHAVI e LELE, 2009). Pode ser utilizada ainda no clareamento da polpa de eucalipto, sem a utilização de cloro, melhorando as propriedades da polpa (SHARMA *et al.*, 2014); e na descoloração de pigmentos fúngicos sobre papel envelhecido e pergaminhos (EL MONSSEF *et al.*, 2016).

O uso da lacase na indústria têxtil proporciona benefícios como a diminuição do uso de água e energia, o uso de menores quantidades de produtos químicos e processos de produção mais rápidos e sustentáveis (POLAK *et al.*, 2016). A enzima pode ser utilizada para descolorir corantes e bibranquear tecidos (IRACHETA-CÁRDENAS *et al.*, 2016; TEERAPATSAKUL *et al.*, 2017; BAGEWADI *et al.*, 2017; ZHUO *et al.*, 2017). Pode reduzir os custos do branqueamento do algodão, se combinada com peróxido de hidrogênio, produzindo níveis de brancura superiores aos métodos convencionais (GONÇALVES *et al.*, 2014).

A enzima também é utilizada em processos de biorremediação, sendo empregada para diminuir o impacto ambiental causado por efluentes industriais, como na remoção de disruptores endócrinos químicos, herbicidas, xenobiótico, entre outros, que comumente

poluem águas residuais e agrícolas (KUMAR *et al.*, 2014; YOUSEFI-AHMADIPOUR *et al.*, 2016; DAÂSSI *et al.*, 2016; ELDRIDGE *et al.*, 2017; ZENG *et al.*, 2017). Pode ser aplicada como biossensor para avaliar a contaminação industrial, determinando a presença de pesticidas no ambiente, baseando-se na inibição enzimática (KUDUNGA *et al.*, 2011; STRONG e CLAUS, 2011).

Na área da medicina é usada em protocolos de detecção de outras enzimas ou como marcador enzimático para análises imunoquímicas, histoquímicas, citoquímicas e testes para detecção de ácidos nucleicos (MADHAVI e LELE, 2009). Pode atuar como bactericida e fungicida, sendo usada em combinação com uma proteína ou peptídeo capaz de destruir células microbianas (MINUSSI *et al.*, 2002; SAMPAIO *et al.*, 2016). São usadas como catalisadores para a síntese de produtos importantes na indústria farmacêutica, como fármacos anticancerígenos, antioxidantes, anti-inflamatórios, analgésicos e antiproliferativos (KUDUNGA *et al.*, 2011; CANNATELLI e RAGAUSKAS, 2015; QWEBANI-OGUNLEYE *et al.*, 2017).

A lacase possui ainda outras aplicações, como na produção de bioetanol, oxidando compostos inibidores da fermentação (KACEM *et al.*, 2016; ZABED *et al.*, 2017). Com o auxílio da lacase, é possível melhorar a produção de biogás e eliminar compostos tóxicos liberados no processo de combustão, sendo um sistema de grande potencial de aplicação para remoção *in situ* de substâncias tóxicas em indústrias (HOM-DIAZ *et al.*, 2016; PRASETYO *et al.*, 2016). A lacase pode ser usada em células combustíveis, possibilitando a conversão de energia química em energia elétrica (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2014; ARROCHA *et al.*, 2014; NETO *et al.*, 2016).

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

#### 4.1. MICRORGANISMO

O fungo *Pleurotus sajor-caju* (CCB 020) (Figura 4) foi cedido pelo Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), situado na Universidade Tiradentes (Aracaju/SE, Brasil) e mantido refrigerado a 4°C em placas de Petri com 25 mL de meio MEA (*Malt Extract Agar*) preparado com 30 g de extrato de malte, 3 g de peptona de farinha de soja e 15 g de ágar para cada 1000 mL de água destilada. Após o preparo do meio de cultura, o mesmo foi autoclavado a 121°C e 1 atm por 15 minutos, antes da repicagem do fungo. O fungo foi repicado a cada 3 meses, para manutenção, ou 10 dias antes do uso em experimentos.



**Figura 4:** Fungo *Pleurotus sajor-caju* CCB 020 em sua fase vegetativa (micelial) cultivado em meio MEA (*Malt Extract Agar*) em placa de Petri.

#### 4.2. VINHAÇA

A vinhaça da cana-de-açúcar (Figura 5) usada nesse trabalho foi gentilmente doada pela Usina São José do Pinheiro (10°46'10.8"S,37°12'48.3"O), do setor sucroenergético, localizada na cidade de Laranjeiras, Sergipe, Brasil. O resíduo foi recolhido em galões de 5 L e mantido refrigerado a -4°C. Antes da sua utilização, o volume desejado foi deixado em temperatura ambiente para sua aclimação e foi medido seu pH, que variou entre 3,78 e 3,84.



**Figura 5:** Vinhaça de cana-de-açúcar com pH 3,8 a 25°C.

#### **4.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *P. sajor-caju* EM FRASCOS AGITADOS**

O cultivo de *P. sajor-caju* usando vinhaça como substrato foi realizado em frascos agitados e ocorreu em Erlenmeyers de 250 mL, contendo um volume de meio de 100 mL. Foram testados 3 possíveis indutores para potencializar a produção de lacase, que foram adicionados a vinhaça durante a fermentação: o etanol, o sulfato de cobre e o tetrahydrofurano (THF).

Assim, a fermentação consistiu no ajuste do pH da vinhaça para 6,0, utilizando solução de NaOH (1 M), e a adição de 100 mL de vinhaça em cada Erlenmeyer. Os frascos foram autoclavados a 121°C e 1 atm por 15 minutos. Após o resfriamento, foi realizada a inoculação do fungo, sendo utilizados 3 discos de 1 cm de diâmetro de meio de cultura MEA contendo micélio recém repicado. Após a inoculação, os frascos foram levados para um *Shaker* em condições de agitação de 180 rpm e temperatura de 28°C ( $\pm$  2°C) por 15 dias, sendo as amostras recolhidas a cada 3 dias.

#### **4.4. PRODUÇÃO DE LACASE POR *P. sajor-caju***

Para encontrar o melhor indutor da lacase foram utilizadas concentrações diferentes de indutores. Uma fermentação com vinhaça pura foi feita para ser utilizada como controle. Para

o etanol e o THF, foi adicionada a vinhaça antes da inoculação as concentrações de 1, 2 e 3 %. Para o sulfato de cobre, as concentrações de 0,4 mM; 0,6 mM e 1 mM foram adicionadas a vinhaça antes do material ter sido autoclavado.

A fermentação ocorreu por 15 dias em frascos agitados, e as amostras foram recolhidas a cada 3 dias. Essas amostras foram filtradas à vácuo em papel de filtro, o sobrenadante foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e a biomassa foi acomodada em placa de Petri para análises de peso seco. A atividade da lacase foi determinada através das leituras de absorvância encontradas com o auxílio de espectrofotômetro, sendo as reações realizadas em triplicata.

#### 4.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE

A atividade da lacase foi realizada segundo o protocolo de SZKLARZ (1989), sendo determinada usando uma mistura contendo 0,3 mL de tampão de citrato-fosfato (0,05M), 0,1 mL de solução contendo siringaldazina, que é a solução que inicia a reação, e 0,6 mL de solução enzimática bruta. Com o auxílio do espectrofotômetro foi possível medir a oxidação da siringaldazina, por meio do monitoramento do aumento da absorvância a 525 nm após 10 minutos de reação. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de siringaldazina por minuto, usando o coeficiente de extinção molar de  $6,5 \times 10^4 \text{ L/mol.cm}$ . A atividade da lacase foi expressa em unidade de enzima por litro de caldo enzimático (U/L).

Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizada a Equação 1.

$$\frac{U}{L} = \frac{\Delta Abs}{\epsilon \times R \times t} \times 10^6 \quad (1)$$

onde:  $\Delta Abs$  é a variação da absorvância ( $Abs_{\text{final}} - Abs_{\text{inicial}}$ ),  $\epsilon$  é o coeficiente de absorção molar ( $\epsilon_{525\text{nm}} = 6,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $R$  é o volume de solução da amostra,  $t$  é o tempo de reação em minutos e U/L é a Unidade Internacional, que internacionalmente significa  $\mu\text{mol min}^{-1}$ .

#### **4.6. DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS**

A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) com auxílio de um espectrofotômetro a um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 595 nm. A curva de calibração foi determinada utilizando albumina bovina como padrão.

#### **4.7. DESCOLORAÇÃO E REMOÇÃO DA TURBIDEZ**

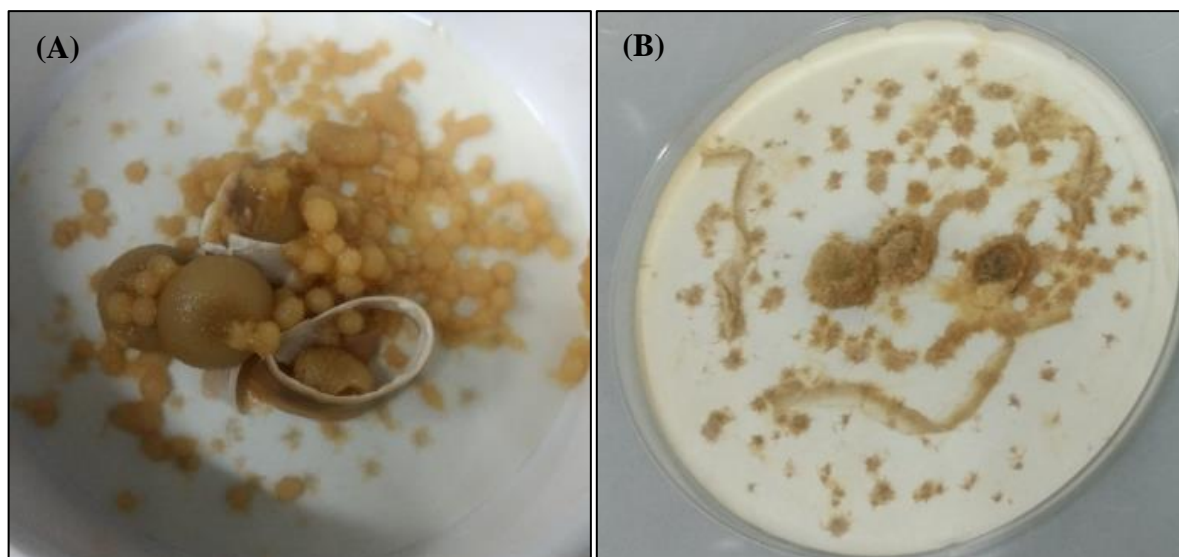
O sobrenadante foi filtrado e a sua absorvância (abs) foi medida ( $\lambda = 475$  nm) usando um espectrofotômetro *Varian Cary 50*. Para calcular a descoloração da vinhaça foi aplicada a Equação 2:

$$\text{Descoloração (\%)} = \frac{(\text{Abs inicial} - \text{Abs final})}{\text{Abs inicial}} \times 100 \quad (2)$$

A turbidez foi medida utilizando um turbidímetro portátil *HI 98703*, e os valores expressos em NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez).

#### **4.8. DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA FÚNGICA**

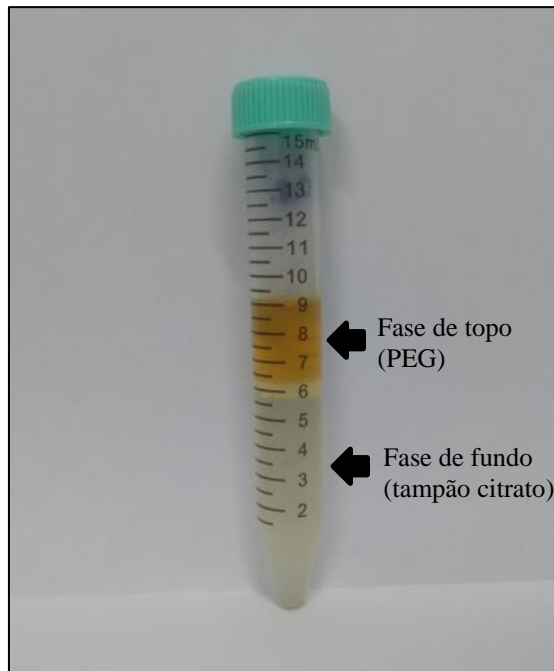
A concentração de biomassa (Figura 6) foi calculada por secagem da massa micelial. A biomassa retida no papel filtro foi seca em estufa a 45°C até atingir peso constante. A massa seca final foi determinada pela diferença entre a massa do papel de filtro com a biomassa.



**Figura 6:** Biomassa fúngica produzida após 15 dias de cultivo do *P. sajor-caju* em frascos agitados a 25°C e 180 rpm, em meio composto por vinhaça, antes (A) e após (B) secagem.

#### 4.9. PURIFICAÇÃO DA LACASE

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) (Figura 7) foram formados pelo polímero polietilenoglicol (PEG) em diferentes pesos moleculares (1500, 4000, 6000 e 8000 g.mol<sup>-1</sup>) e tampão citrato, sendo preparados em tubos de centrifuga graduados pesando as quantidades apropriadas do PEG, do tampão citrato, água e caldo enzimático. Os tubos foram homogeneizados em vórtex, e centrifugados a 3000 rpm por 20 minutos colocados em equilíbrio em um banho termostático a 25 ± 1°C e pressão atmosférica durante 12 horas. As fases de topo e fundo dos sistemas foram cuidadosamente coletadas com uma agulha longa. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em seguida os parâmetros de purificação foram determinados.



**Figura 7:** Sistema aquoso bifásico em tubo Falcon constituído por polímero (polietilenogicol - PEG) na fase de topo e sal (tampão citrato) na fase de fundo.

O coeficiente de partição foi definido como a concentração de proteína ou atividade enzimática na fase de topo, dividida pelo valor correspondente na fase de fundo. Sendo  $K_P$  o coeficiente de partição das proteínas e  $K_E$  o coeficiente de partição da enzima, encontrados através das Equações (3) e (4):

$$K_P = \frac{C_T}{C_F} \quad (3)$$

$$K_E = \frac{AE_T}{AE_F} \quad (4)$$

onde:  $C_T$  é a concentração de proteína total (mg/L) na fase de topo,  $C_B$  é a concentração de proteína total na fase de fundo,  $EA_T$  é a atividade enzimática (U/L) na fase de topo e  $EA_B$  é a atividade enzimática na fase de fundo.

Para avaliar o processo de purificação, a atividade específica enzimática (SA, U/mg de proteína) foi calculada pela equação (5), a enzima recuperada na fase de topo ( $R_{ET}$ , %) e fundo ( $R_{EB}$ , %) foi calculada através das equações (6) e (7), respectivamente, após calcular razão volumétrica entre as fases ( $R_V$ ), e por fim o fator de purificação (PF – vezes), calculado de acordo com a equação (8).



$$SA = \frac{EA}{C} \quad (5)$$

$$R_{ET} = \frac{100}{1 + \frac{1}{R_V K_E}} \quad (6)$$

$$R_{EB} = \frac{100}{1 + R_V K_E} \quad (7)$$

$$FP = \frac{SA}{SA_i} \quad (8)$$

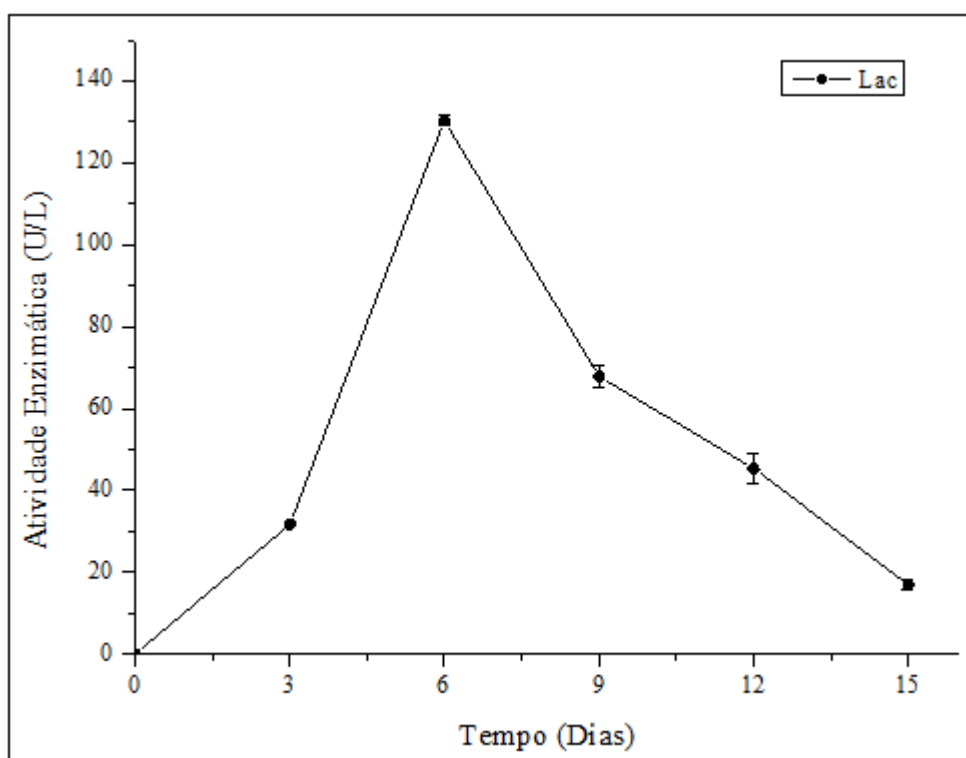
onde: o fator de purificação (FP) foi calculado utilizando a razão entre a atividade específica (SA) nas fases de topo ou fundo (dependendo da fase em que a enzima é concentrada) e da atividade específica (SA<sub>i</sub>) da Lacase após o processo de fermentação.

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1. PRODUÇÃO E INDUÇÃO DA LACASE

O cultivo do *P. sajor-caju* em vinhaça foi realizado durante 15 dias a 28°C e 180 rpm de agitação. Devido às condições de adaptação do fungo *P. sajor-caju* ao meio, o pH foi ajustado para 6,0 uma vez que a pH ácido proveniente da vinhaça pode causar a desnaturação da enzima (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2015). Os ajustes das condições de cultivo para esse fungo e meio de cultivo foram reproduzidas de trabalhos anteriores, justificando a alteração do pH para uma melhor biodegradação do resíduo (FERREIRA *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2011; VILAR *et al.*, 2017).

O processo fermentativo deve ser acompanhado pela produção da enzima, do consumo do substrato e como o crescimento do fungo. Assim, a produção da enzima lacase é mostrada na Figura 8, onde podemos observar que a maior produção ocorreu no 6º dia de cultivo com atividade de 130,3 U/L. Para o mesmo fungo e meio (100% vinhaça), AGUIAR *et al.* (2010), através de fermentação semissólida, obtiveram atividade de lacase máxima de 10,53 U/L durante os 6 primeiros dias de fermentação. FERREIRA *et al.* (2010), utilizando fermentação submersa, obtiveram produção de 400 U/L no 9º dia de cultivo e VILAR *et al.* (2017) de 400 U/L no 12º dia. Essa diferença entre atividades enzimática se deve a fatores como a composição química da vinhaça, a procedência do mosto utilizado para sua geração, se de melação, misto ou do caldo.



**Figura 8:** Atividade da lacase (U/L) (●) de *P. sajor-caju* durante 15 dias de cultivo a 28°C e 180 rpm em meio 100% vinhaça.

A produção de lacase por *P. sajor-caju* pode variar a depender das condições de crescimento do fungo. FOKINA *et al.* (2016) obtiveram produção de 70 U/L em 7 dias de cultivo em meio YGA (*yeast extract-agar-glucose*) a 28°C e agitação de 120 rpm. O efeito da temperatura e pH na produção da lacase de *P. sajor-caju* foi estudado em meio *Kirk* modificado, variando a temperatura entre 20 e 35°C em intervalos de 5°C e o pH do meio entre 4 e 6 em intervalos de 0,5, onde as condições ótimas encontradas foram de 30°C e pH 6, com atividade enzimática de 620 U/L, sob condições de agitação de 125 rpm (PATRICK *et al.*, 2011). Outro estudo utilizou um meio líquido de crescimento composto por glicose (10g), asparagina (1g), extrato de levedura (0,5g), sulfato de magnésio (0,01g), sulfato de ferro (II) (0,01g) e água Milli-Q (1L), onde se obteve atividade da lacase de aproximadamente 17 U/L no 8º dia de cultivo, a 30°C (SAHAY *et al.*, 2008). Em escala a nível industrial, LIU *et al.* (2016) produziram lacase de *Pycnoporus sp.* atingindo 80 U/mL em um biorreator de 5 toneladas, utilizando um meio composto por maltose, extrato de levedura e peptona.

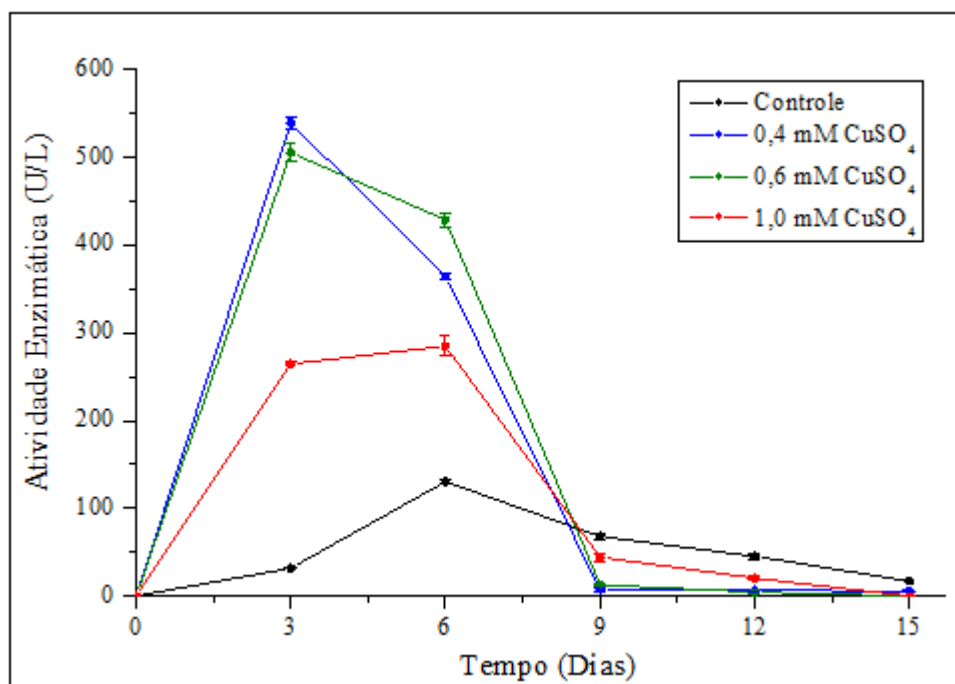
Nota-se que a produção da lacase pode variar de acordo com as condições de cultivo, como por exemplo, o pH, a temperatura e tempo de incubação, agitação, meio de cultivo,

presença de indutores e a espécie de microrganismo utilizada (BRIJWANI *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2010; STRONG e CLAUS, 2011).

### 5.1.1 Indução da Lacase por Sulfato de Cobre

O uso de indutores é de grande importância para aumentar a produção enzimática (ZHUO *et al.*, 2017), e o cobre é conhecido na literatura por elevar de forma considerável a atividade da lacase (KHAMMUANG *et al.*, 2013; FOKINA *et al.*, 2016).

Nossos resultados podem ser observados na Figura 9. As concentrações de 1,0 mM e 0,6 mM de  $\text{CuSO}_4$  resultou em atividades enzimáticas máximas de 285 e 505,5 U/L, respectivamente, no 6º e 3º dia de cultivo. A maior atividade da lacase ocorreu no 3º dia e foi 539,3 U/L, na concentração de 0,4 mM de  $\text{CuSO}_4$ , sendo 4 vezes maior que a amostra controle, que consistia de 100% vinhaça como meio de cultivo, o que mostra a importância do uso de indutores para redução do tempo de fermentação para obtenção da enzima lacase, que reduziria os custos de produção comercial da enzima. Esse resultado corrobora com os dados encontrados por MANAVALAN *et al.* (2013) para a produção de lacase pelo fungo *Ganoderma lucidum*, onde se obteve um aumento de 7,5 vezes em um meio nutritivo com amido adicionando 0,4 mM de  $\text{CuSO}_4$ , sendo esta a melhor concentração dentre as testadas (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mM).



**Figura 9:** Atividade da Lacase (U/L) de *P. sajor-caju* em amostra de controle (●) e induzida por CuSO<sub>4</sub> em concentrações de 1,0 mM (●), 0,6 mM (●) e 0,4 mM (●), durante 15 dias de cultivo a 28°C e 180 rpm.

O cobre influencia a produção através da transcrição de genes da lacase fúngica, embora os mecanismos que conduzem a indução ainda estejam sob investigação (PEZZELLA *et al.*, 2013). Outra hipótese está relacionada aos átomos de cobre presentes no sítio catalítico da enzima. Ao adicionar mais cobre ao meio, o mesmo atua como um co-fator enzimático, aumentando o número de grupos funcionais associados a catálise enzimática e elevando, conseqüentemente, a atividade da lacase (GIARDINA *et al.*, 2010). A concentração de CuSO<sub>4</sub> afeta a atividade enzimática, na qual, para o fungo estudado, concentrações mais baixas proporcionaram maior atividade. Apesar do cobre ser essencial para induzir a produção de lacase por basidiomicetos, existe uma quantidade ideal necessária para cada espécie, e quantidades acima da ideal leva a redução na atividade enzimática. Uma das explicações para isso é que em altas concentrações, o cobre atua como um potente inibidor para o crescimento do fungo (RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2003). Isso pode ser confirmado por estudo realizado por PATRICK *et al.* (2011), no qual foram testadas concentrações entre 0,1 e 2,0 mM para produção de lacase por *P. sajor-caju* e obtiveram os melhores resultados nas concentrações de 0,1 e 0,2 mM. Outros autores obtiveram resultados semelhantes, atingindo

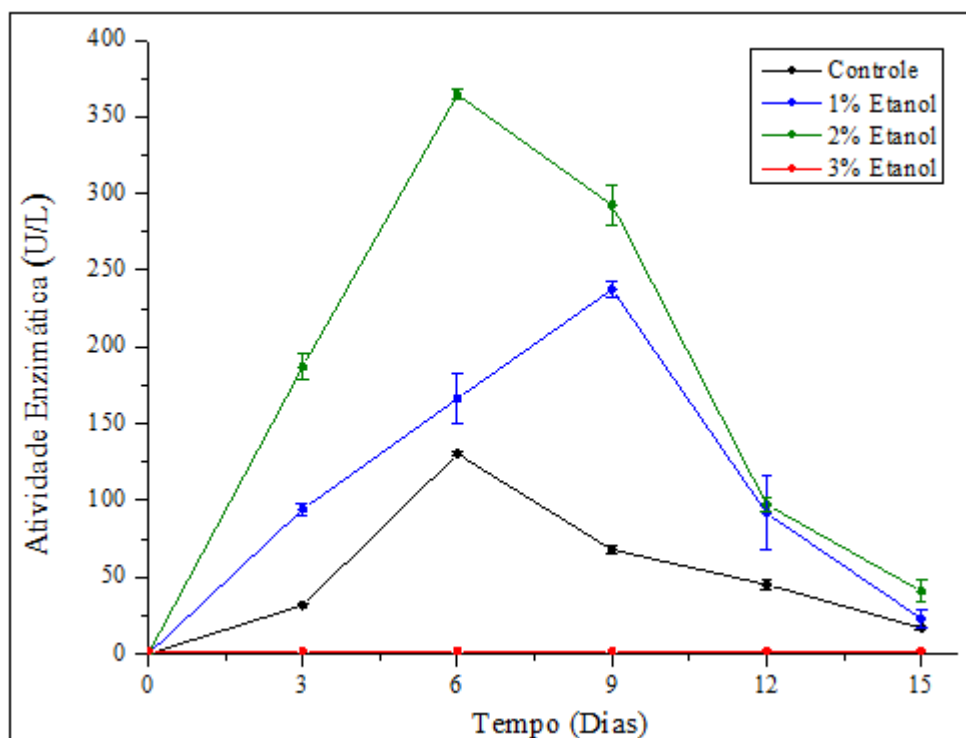
altas produções da lacase de *Lentinus polychrous* em concentrações de 0,1 e 0,3 mM de CuSO<sub>4</sub> e baixas produções em concentrações de 1,0 e 3,0 mM (KHAMMUANG *et al.*, 2013).

Resultados similares de indução da lacase produzida por *P. sajor-caju* foram encontrados utilizando 0,3 mM de CuSO<sub>4</sub> como indutor, onde a atividade enzimática foi aumentada em 3,7 vezes (PATRICK *et al.*, 2011). Em outro estudo, a produção da lacase teve um aumento de 70 U/L para aproximadamente 185 U/L ao adicionar 1,0 mM de CuSO<sub>4</sub>, obtendo uma indução de 2,6 vezes em 7 dias de fermentação, sendo o indutor adicionado 3 dias após a inoculação (FOKINA *et al.*, 2016). O presente trabalho obteve aumento da atividade enzimática em 4 vezes utilizando 0,4 mM de CuSO<sub>4</sub> e o pico máximo de atividade foi encontrado com o tempo de fermentação reduzido em 3 dias, em relação a amostra controle (100% vinhaça).

### 5.1.2 Indução da Lacase por Etanol

O uso de álcoois, como o etanol, foi relatado como substituto de compostos aromáticos, como pirogalol e ácido ferúlico, na indução de lacase por *P. sajor-caju*, diminuindo os custos do processo e evitando danos ao ser humano (MANAVALAN *et al.*, 2013).

Os resultados para a indução da enzima por etanol são apresentados na Figura 10. A maior atividade enzimática encontrada para a lacase foi de 364,5 U/L no 6º dia, para o cultivo contendo 2% de etanol, obtendo indução de 2,8 vezes e sendo esta a concentração ótima para o fungo. Com 1% de etanol encontrou-se atividade enzimática de 237,5 U/L no 9º dia de cultivo. Para a concentração 3% de etanol não houve atividade enzimática, provavelmente por esta maior concentração ser tóxica para o *P. sajor-caju*, impedindo o seu crescimento e consequente produção de enzimas. Vale a pena salientar que a vinhaça já apresenta etanol residual proveniente do processo de destilação, o que explicaria a concentração de 3% ter inibido o crescimento fúngico e consequentemente a não produção da enzima, já que trabalhos realizados por MANAVALAN *et al.* (2013) mostram indução da enzima utilizando concentrações de até 5% de etanol utilizando o fungo *G. lucidum*.



**Figura 10:** Atividade da lacase (U/L) de *P. sajor-caju* em amostra de controle (●) e induzida por etanol em concentrações de 3% (v/v) (●), 2% (v/v) (●) e 1% (v/v) (●), durante 15 dias de cultivo a 28°C e 180 rpm.

Apesar de o etanol ser apontado como indutor da lacase, pouco se sabe sobre o modo de indução. Alguns autores sugerem que o etanol pode induzir os genes da enzima através de um estresse oxidativo, causado pela ruptura da membrana, promovendo a secreção da enzima (CROWE e OLSSON, 2001; LOMASCOLO *et al.*, 2003).

Um fator que pode afetar a indução por etanol é o nitrogênio encontrado no meio de cultivo. HERNÁNDEZ *et al.* (2015) induziram a produção de lacase por *Pycnoporus sanguineus* utilizando 3 g/L de etanol e uma fonte de nitrogênio simples (mineral) ou complexa (orgânica). Obteve-se valor de atividade enzimática de 31 U/L para fermentações compostas com o etanol e a fonte de nitrogênio complexa, e 1,6 U/L para etanol e fonte de nitrogênio simples, mostrando que a produção depende das condições de fornecimento de nitrogênio, que na presença de fontes complexas o etanol possui um efeito positivo na produção da enzima. Os resultados encontrados pelo autor confirmam a indução da lacase fúngica por etanol no presente trabalho, visto que a vinhaça é uma fonte de nitrogênio orgânica.

Para a lacase de *G. lucidum* houve indução por etanol em todas as concentrações testadas (1, 2, 3, 4 e 5% v/v), sendo a maior com 3% (v/v) de etanol, cultivada em meio basal por 15 dias a 30°C e induzindo em 14 vezes (2,5 U/mL) a produção da lacase, mostrando que esse fungo possui alta tolerância ao etanol (MANAVALAN *et al.*, 2013).

### 5.1.3 Indução da Lacase por THF

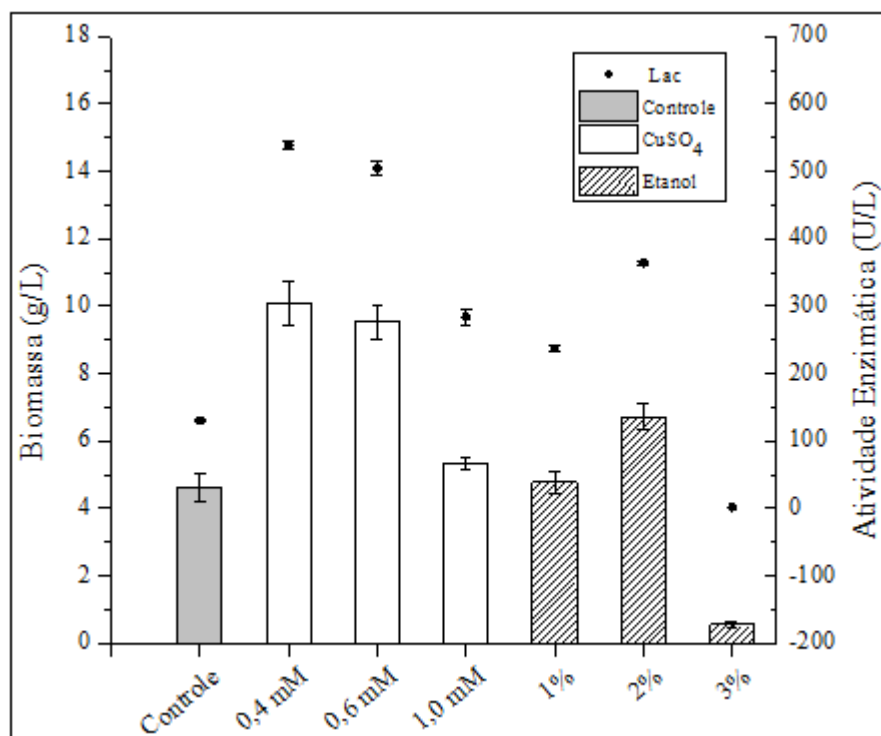
O tetrahidrofurano (THF) é um éter cíclico, completamente miscível em água, e foi testado como possível indutor da lacase excretada pelo *P. sajor-caju* (SU *et al.*, 2002; PURKAYASTHA e MADHURIMA, 2013). A tentativa é de que sua adição ao meio pudesse causar um estresse oxidativo, aumentando a síntese enzimática. A intenção é de que, caso a indução ocorresse, pudéssemos trabalhar com SABs baseados em THF/tampão citrato, facilitando a purificação da enzima.

Para o estudo, o THF foi adicionado ao meio nas concentrações de 1, 2 e 3%, porém, o composto acabou inibindo fortemente o crescimento fúngico e conseqüentemente a produção da lacase, não havendo atividade enzimática em nenhuma das concentrações testadas.

## 5.2. PRODUÇÃO DE BIOMASSA

A biomassa é uma importante fonte para inóculo, sendo utilizada como aditivos alimentares e para extração de compostos antimicrobianos, aromas, polissacarídeos, antioxidantes e etc (KIRSCH *et al.*, 2016). Neste sentido, o cultivo de *P. sajor-caju* em meio contendo vinhaça e CuSO<sub>4</sub> como indutor resultou em quantidade de biomassa de 10,08 g/L, sendo esta a maior encontrada no presente trabalho. A Figura 11 mostra a quantidade de biomassa produzida nas diferentes condições de meio, sendo o controle constituído por vinhaça pura e as demais por vinhaça e indutores. Observa-se que quanto maior a atividade enzimática maior é a produção de biomassa. Ao relacionar a quantidade de biomassa produzida e a produção da lacase pode-se notar que a produção da enzima esta diretamente relacionada à quantidade de biomassa, corroborando com estudos encontrados na literatura (DAS *et al.*, 1997, LIU *et al.*, 2016; VILAR *et al.*, 2017).





**Figura 11:** Biomassa (g/L) e atividade da Lacase (U/L) (●) produzida pelo *P. sajor-caju* em meio contendo vinhaça pura (controle) e vinhaça com CuSO<sub>4</sub> e etanol como indutores, cultivados durante 15 dias a 28°C (± 2°C) e 180 rpm.

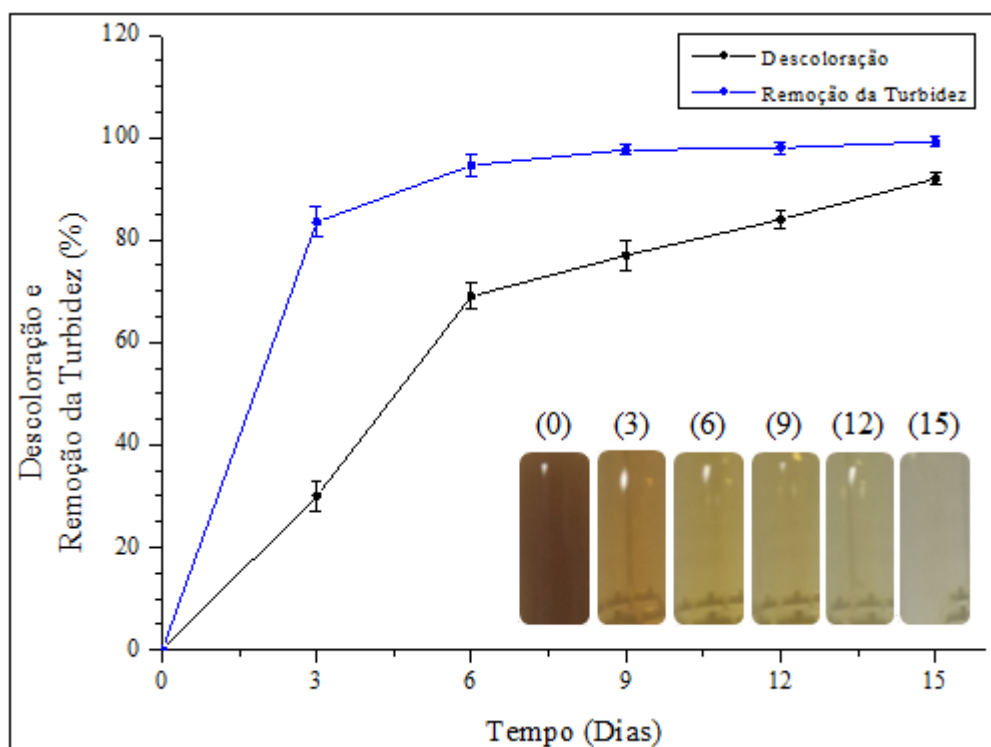
A quantidade de biomassa produzida por *P. sajor-caju* em um estudo em meio contendo vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar durante 30 dias de fermentação, encontrando 117,87 g/L, sendo esse alto valor atribuído a natureza altamente nutritiva do meio utilizado (AGUIAR *et al.*, 2010). Utilizando o mesmo fungo, VILAR *et al.* (2017) obtiveram produção de biomassa de 22,06 g/L em meio contendo vinhaça enriquecida com glicose, mostrando a importância da glicose para maior produção da biomassa. Em outro estudo, se analisou a relação entre produção de biomassa e lacase, cultivando o fungo em solução mineral, e a máxima quantidade de biomassa encontrada de 5,2 g/L foi associada a maior atividade da lacase (40 U/mL), confirmando relação entre a produção de enzimas e o crescimento do microrganismo (BETTIN *et al.*, 2011).

### 5.3. DESCOLORAÇÃO E REMOÇÃO DA TURBIDEZ

A vinhaça é altamente poluente e possui a cor escura devido à presença compostos fenólicos, como ácido tânico e ácido húmico, e melanoidinas, que são biopolímeros

recalcitrantes gerados a partir da reação de Maillard, na qual são combinados aminoácidos com açúcares (carboidratos) (ROBLES-GONZÁLEZ *et al.*, 2012; ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2011). Sendo assim, é de fundamental importância seu tratamento antes do descarte ou reutilização, diminuindo sua coloração e removendo sua turbidez.

O processo de descoloração e remoção da turbidez da vinhaça se inicia a partir do 3º dia de fermentação. A Figura 12 mostra a descoloração e remoção da turbidez da vinhaça em meio sem adição de indutores durante 15 dias de fermentação. Os valores máximos alcançados foram de 92% e 99,2% para remoção da cor e turbidez, respectivamente, após o 15º dia de cultivo, em meio sem adição de indutores.



**Figura 12:** Descoloração (%) (●) e remoção da turbidez (%) (●) da vinhaça de cana-de-açúcar em sua forma *in natura* (0), após tratamento utilizando *P. sajor-caju* por 3 dias, 6 dias, 9 dias, 12 dias e 15 dias a 28°C ( $\pm$  2°C) e 180 rpm.

Os resultados de descoloração apresentados nesse trabalho (92%) estão próximos aos já descritos na literatura, com valores próximos de 99 e 96%, para 15 dias de cultivo. Para a remoção da turbidez, os valores (99,2%) são ainda mais próximos (99 e 97%) (FERREIRA *et al.*, 2010; VILAR *et al.*, 2017). A descoloração e remoção da turbidez da vinhaça se deve a atividade das enzimas, que atacam os compostos recalcitrantes responsáveis por essa cor

característica (FUESS *et al.*, 2014). Esses resultados mostram a consistência dos nossos dados utilizando *P. sajor-caju* para o tratamento biológico da vinhaça.

Os meios compostos por vinhaça e indutor também tiveram uma boa remoção de cor, variando entre 81 e 92% de descoloração, com exceção da concentração de 3% de etanol que não houve a remoção da cor da vinhaça, mostrando a relação com a presença da enzima. O mesmo ocorreu para os resultados da remoção da turbidez, ao passo que ao todas as amostras induzidas com  $\text{CuSO}_4$  obtiveram remoção entre 97,8 e 99%, e as induzidas por 1 e 2% de etanol obtiveram 92,6 e 97,8%, respectivamente. Assim como na descoloração da vinhaça, a concentração de 3% de etanol não apresentou remoção da turbidez na presença do *P. sajor-caju*, o provável motivo se deve a concentração ter sido tóxica ao fungo, fazendo com que o fungo não se proliferasse e assim não produzisse enzimas.

Estudos relatam a descoloração e remoção da turbidez da vinhaça utilizando outros tratamentos e microrganismos, como 89,7% de descoloração e 79,2% de remoção da turbidez obtidos por CAMPOS *et al.* (2014), ao tratar o resíduo com microrganismos presentes em lodo ativado e em varias etapas de processo (fermentação com sistema de alto fluxo, filtração, floculação química, fermentação com sistema de baixo fluxo, neutralização e desinfecção). THANAPIMMETHA *et al.* (2017) obtiveram 88,5% de remoção da cor da vinhaça utilizando o processo eletro-fenton. RODRÍGUEZ *et al.* (2012) utilizaram um reator de leito fluidizado anaeróbio para tratar a vinhaça através de comunidades microbianas (bactérias e archaea). O fungo *Phanerochaete chrysosporium* foi usado por DAHIYA *et al.* (2001) para tratar vinhaça, obtendo 80% de descoloração. Para todos os casos a remoção da cor está atribuída a degradação da melanoidina, sendo que para os tratamentos biológicos ocorre devido a atividade enzimática, seja microbiana ou produzida por fungos.

Os resultados mostram que a adição de  $\text{CuSO}_4$  e etanol como indutores da lacase não interferem na degradação da melanoidina, a síntese e excreção de enzimas pelo fungo continua ocorrendo, quebrando esses compostos complexos presentes na vinhaça. A eficiência do *P. sajor-caju* em descolorir a vinhaça e sua capacidade em degradar compostos recalcitrantes foi provada nesse trabalho, corroborando com outros existentes na literatura (FERREIRA *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2011; VILAR *et al.*, 2017), obtendo altas taxas de descoloração e redução da turbidez.

#### 5.4. PURIFICAÇÃO DA LACASE

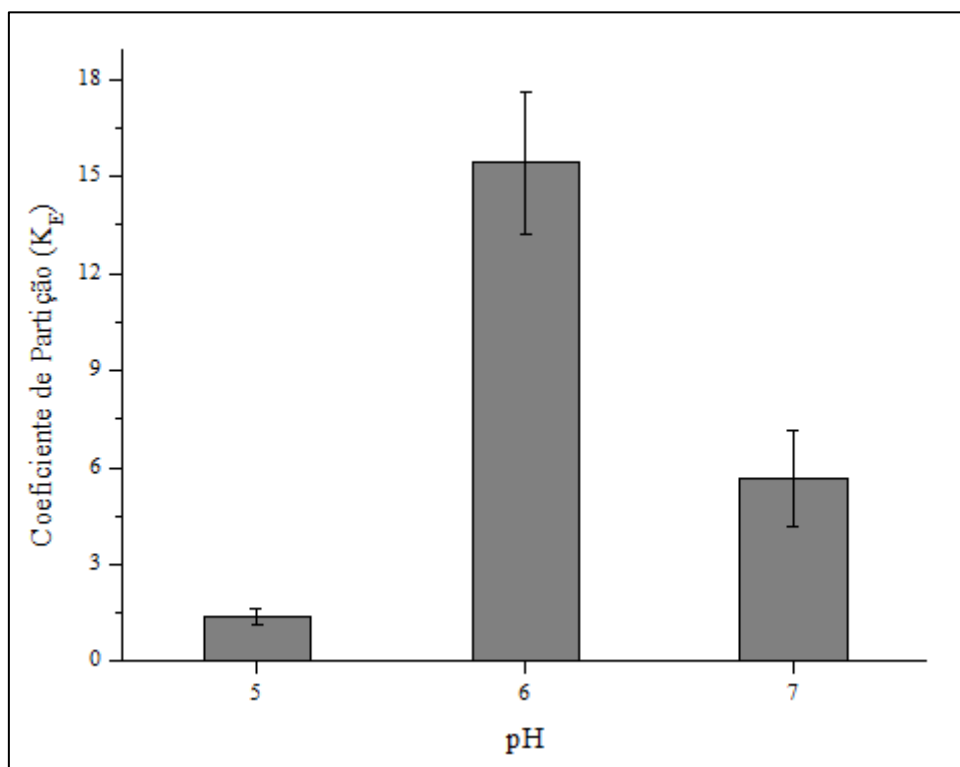
SABs a base de PEG + tampão citrato foram utilizados para a purificação da enzima lacase produzida a partir da degradação da vinhaça utilizando o fungo *P. sajor-caju*. Os sistemas foram preparados inicialmente utilizando 10% (m/m) de PEG + 15% (m/m) de tampão citrato + 45% (m/m) de água e 30% (m/m) do caldo enzimático à 25°C. As condições para o regime bifásico para os sistemas formados por PEG e tampão citrato foram previamente descritas na literatura (AZEVEDO *et al.*, 2009).

A estabilidade e a partição da enzima em diferentes valores de pH (5,0; 6,0 e 7,0) foi investigada em sistemas contendo PEG 4000 e tampão citrato. A Tabela 5 mostra a influencia do pH na atividade enzimática nas fases de topo e fundo do sistema. Os resultados mostram que a maior atividade enzimática é obtida na fase de topo para o pH 6,0. Esses resultados estão associados à estabilidade da lacase pelo qual pH mais extremos, como entre 3,0 a 5,0 e 9,0 a 10,0 proporcionam grandes diminuições na atividade enzimática (SILVÉRIO *et al.*, 2013). Assim, as demais etapas de otimização da purificação foram conduzidas em SABs utilizando o tampão citrato com o pH 6,0.

**Tabela 5:** Atividade da Lacase (U/L) no topo e fundo do sistema composto por PEG 4000 e tampão citrato em diferentes pH (5,0; 6,0 e 7,0).

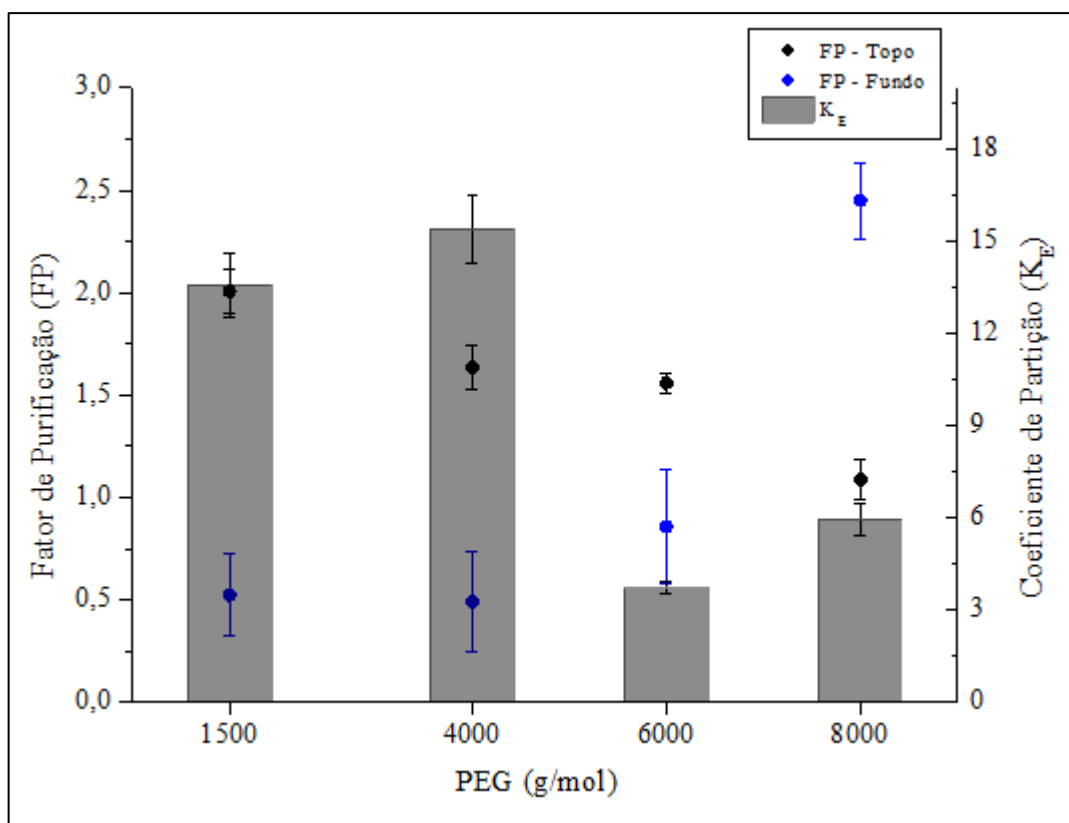
pH	Atividade da Lacase	Atividade da Lacase
	no topo (U/L)	no Fundo (U/L)
5,0	27,40 ± 5,81	21,94 ± 4,56
6,0	507,25 ± 24,30	195,36 ± 17,98
7,0	438,71 ± 20,56	78,83 ± 10,28

Ainda no estudo da influencia do pH, a Figura 13 mostra seu impacto na partição da lacase ao obter os resultados de coeficiente de partição da enzima. A fase polimérica do sistema carrega uma carga positiva, enquanto a fase rica em sal tem uma carga negativa. Assim, o particionamento para fase superior do sistema ( $K_E > 1$ ) pode ser explicado devido ao ponto isoelétrico (pI) da lacase ser ácido (4,5) e conseqüentemente as cargas superficiais negativas, fazendo com que para os valores de pH estudado (5,0; 6,0 e 7,0) prefiram se mover para fase superior, rica em polímero, enquanto que as proteínas carregadas positivamente se movem para fase inferior (rica em sal) (BALDRIAN *et al.*, 2006; NADAR *et al.*, 2017).



**Figura 13:** Coeficiente de Partição da Lacase em diferentes valores de pH (5,0; 6,0 e 7,0) para sistema composto por PEG 4000 e tampão citrato.

Com o objetivo de melhorar a purificação, PEGs com diferentes massas moleculares foram investigados (1500, 4000, 6000 e 8000 g/mol) para a partição da lacase. Os sistemas foram preparados em concentrações fixas de 10% (m/m) de PEG e 15% (m/m) de tampão citrato (pH 6,0) e os resultados de coeficiente de partição da enzima ( $K_E$ ) e fator de purificação (PF) são mostrados na Figura 14. Verifica-se que utilizando o PEG 1500 se obtêm maior fator de purificação, sendo esse o melhor para se trabalhar com essa lacase. A separação da enzima entre as fases do sistema foi preferencialmente para a fase de topo (rica em PEG) com  $K_E > 1$  em todos os sistemas estudados, mostrando que a lacase é relativamente hidrofóbica e tem boa interação com o PEG, corroborando com estudos feitos por RATANAPONGLEKA (2012).



**Figura 14:** Dados de coeficiente de partição ( $K_E$ ) e fator de purificação (FP) da Lacase nas fases de topo e fundo do sistema PEG em diferentes pesos moleculares (1500, 4000, 6000 e 8000 g/mol) e tampão citrato (pH 6,0) a 25°C.

O efeito da massa molecular do PEG desempenhou um importante mecanismo de purificação da lacase, ou seja, o fator de purificação foi maior seguindo esta ordem: PEG 1500 > 4000 > 6000 > 8000. Segundo RATANAPONGLEKA (2012), ao aumentar o peso molecular do PEG o resultado é um aumento do comprimento da cadeia do polímero e um efeito de exclusão, causando redução do volume livre e dando ao polímero uma conformação mais compacta com ligações hidrofóbicas intramoleculares, dificultando a partição de proteína na fase de topo. Esses resultados corroboram com descritos por SÁNCHEZ-TRASVIÑA *et al.* (2017), onde a lacase de *Trametes versicolor* teve preferência para a fase superior do sistema formado por PEG e fosfato de potássio, e ao aumentar o peso molecular do PEG a recuperação da lacase na fase rica em PEG diminuiu.

Seguindo as etapas de purificação, o efeito da concentração de PEG 1500 (10 - 18% m/m) na purificação da lacase foi investigado. A concentração de tampão citrato foi mantida constante em 15% (m/m). A Tabela 6 mostra os resultados de fator de purificação e recuperação da lacase nas fases de topo e fundo dos sistemas. A interação hidrofóbica entre o

PEG e a superfície da enzima aumenta com o aumento da concentração do polímero até a concentração de 12% (m/m) com valores de FP = 2,31. Em concentrações de PEG acima de 12% (m/m), o fator de purificação diminuiu, provavelmente porque a alta concentração do polímero no sistema aumenta a viscosidade e tensão interfacial entre as fases, dificultando a partição da enzima para a fase superior (MAYOLO-DELOISA *et al.*, 2009).

**Tabela 6:** Dados de fator de purificação (PF) e recuperação ( $R_E$ ) da Lacase nas fases de topo e fundo do sistema composto por PEG 1500 em diferentes concentrações e tampão citrato (pH 6,0) a 25°C.

PEG 1500	FP topo	FP fundo	$R_E$ topo (%)	$R_E$ fundo (%)
10%	2,01 ± 0,11	0,04 ± 0,01	86,53 ± 3,0	13,47 ± 3,0
12%	2,31 ± 0,13	0,02 ± 0,01	99,81 ± 0,0	0,19 ± 0,0
15%	2,18 ± 0,08	0,04 ± 0,01	99,46 ± 0,0	0,54 ± 0,0
18%	1,95 ± 0,10	0,05 ± 0,02	99,18 ± 0,0	0,81 ± 0,0

O efeito da concentração (15 – 24%, m/m) de tampão citrato a pH 6,0 nos SABs para a purificação da lacase também foi investigado e os resultados são apresentados na Tabela 7. O aumento da concentração de sal até 20% purificou a lacase mais para a fase rica em PEG (fase de topo) com PF = 2,88. Este efeito é conhecido como *salting-out*, pelo qual as enzimas são parcialmente hidratadas com o aumento da concentração do sal e são mais facilmente expulsas para a fase oposta (BARBOSA *et al.*, 2011). Em concentrações acima de 20% (m/m) a purificação da lacase diminuiu consideravelmente, provavelmente pelo aumento da densidade da fase rica em sal (MAYOLO-DELOISA *et al.*, 2009).

**Tabela 7:** Dados de fator de purificação (FP) e recuperação ( $R_E$ ) da Lacase nas fases de topo e fundo do sistema composto por 12% de PEG 1500 e tampão citrato (pH 6,0) em diferentes concentrações a 25°C.

Tampão citrato	FP topo	FP fundo	$R_E$ topo (%)	$R_E$ fundo (%)
15%	2,31 ± 0,13	0,02 ± 0,01	99,81 ± 0,0	0,19 ± 0,0
18%	2,65 ± 0,11	0,04 ± 0,01	99,88 ± 0,0	0,12 ± 0,0
20%	2,88 ± 0,08	0,03 ± 0,01	99,92 ± 0,0	0,08 ± 0,0
22%	0,95 ± 0,02	0,01 ± 0,00	99,58 ± 0,0	0,42 ± 0,0
24%	0,72 ± 0,13	0,01 ± 0,00	99,47 ± 0,0	0,53 ± 0,0

Assim, a lacase obtida a partir da degradação da vinhaça utilizando o fungo *P. sajor-caju* foi purificada 2,88 vezes com recuperação de 99,92% para a fase de topo do sistema utilizando SAB baseados em PEG + tampão citrato (pH 6,0), no entanto, a eletroforese deve ser investigada para confirmação da pureza da lacase extraída.

MAYOLO-DELOISA *et al.* (2009) obtiveram fator de purificação de 2,48 e recuperação de 95% ao utilizar sistema formado por PEG 1000 e fosfato de potássio para recuperar lacase produzida por *Agaricus bisporus*. RATANAPONGLEKA (2012) purificou a lacase de *Lentinus polychrous* 1,98 vezes, com recuperação de 99% em sistemas PEG 4000 e fosfato de potássio. A lacase de *P. sapidus* foi purificada 1,68 vezes, com rendimento de recuperação de 105% para a fase de topo do sistema PEG 3000 e fosfato (PRINZ *et al.*, 2014). Mais recentemente, RAJAGOPALU *et al.* (2016) obtiveram fator de purificação de 8,03 vezes e recuperação de 99,4% da lacase de *Hericium erinaceus* para fases de fundo do SAB formado por PEG 8000 + tampão fosfato.

Portanto, a busca em desenvolver processos para a purificação da lacase produzida a partir da degradação da vinhaça utilizando PEG foi escolhida por ser eficaz na supressão da desnaturação da lacase, e o sal de citrato devido sua natureza biodegradável e não tóxico, o que caracteriza todo este processo como ambientalmente mais correto.



### 6. CONCLUSÕES

O estudo relata que o uso de indutores, como  $\text{CuSO}_4$ , aumentam significativamente a síntese de lacase por *P. sajor-caju* usando vinhaça como substrato. A enzima foi purificada por meio de sistemas aquosos bifásicos, em uma única etapa de purificação, e o maior fator de purificação encontrado nesse estudo foi de 2,88, com o sistema composto de 12% de PEG 1500 (m/m), 20% de tampão citrato (m/m), 30% do caldo enzimático (m/m) e 38% de água (m/m), apresentando afinidade com a fase polimérica do sistema e mostrando que SAB é uma técnica promissora para purificação da lacase produzida em meio contendo vinhaça. A vinhaça foi tratada, obtendo descoloração de 92% e remoção da turbidez de 99,2%. Portanto, esse estudo utilizou com sucesso o uso de indutores junto ao resíduo altamente poluente para produção enzimática, agregando valor ao subproduto da indústria sucroenergética e consequentemente possibilitando a redução do custo de produção em função da redução do tempo de fermentação e aumento da atividade enzimática, visando sua viabilidade para aplicação em maior escala.

### 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AGUIAR, M. M.; FERREIRA, L. F. R.; MONTEIRO, R. T. R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, n. 5, p. 1245-1254, 2010.
- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G. D.; SOUZA, C. G. M. D.; PERALTA, R. M. Reutilisation of orange waste for production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus*. *Food Science and Technology (Campinas)*, v. 27 n. 2 , p. 364-368, 2007.
- AMUTHA, C.; ABHIJIT, M. Screening and isolation of laccase producers, determination of optimal condition for growth, laccase production and choose the best strain. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, v. 6, n. 4, p. 1, 2015.
- ARORA, D. S.; GILL, P. K. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technology*, v. 73, n. 3, p. 283-285, 2000.
- ARROCHA, A. A., CANO-CASTILLO, U., AGUILA, S. A., & VAZQUEZ-DUHALT, R. Enzyme orientation for direct electron transfer in an enzymatic fuel cell with alcohol oxidase and laccase electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 61, p. 569-574, 2014.
- AZEVEDO, A.M., GOMES, A.G., ROSA, P.A., FERREIRA, I.F., PISCO, A.M., AIRES-BARROS, M.R. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol–sodium citrate aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, v. 65, n. 1, p. 14-21, 2009.
- BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2017.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS microbiology reviews*, v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.
- BARBOSA, J. M. P., SOUZA, R. L., FRICKS, A. T., ZANIN, G. M., SOARES, C. M. F., & LIMA, Á. S. Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged

- fermentation using an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*, v. 879, n. 32, p. 3853-3858, 2011.
- BARBOSA, J.M.P., SOUZA, R.L., MELO, C.M.D., FRICKS, A.T., SOARES, C.M.F., LIMA, Á.S. Biochemical characterisation of lipase from a new strain of *Bacillus sp.* ITP-001. *Química Nova*, v. 35, n. 6, p. 1173-1178, 2012.
- BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science & Technology*, v. 28, n. 2, p. 78A-87A, 1994.
- BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. do. Evaluation of growth and production of *Pleurotus sp.* in sterilized substrates. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 80, n. 3, p. 318-324, 2013.
- BETTIN, F., DA ROSA, L.O., MONTANARI, Q., CALLONI, R., GAIO, T.A., MALVESSI, E., DA SILVEIRA, M.M., DILLON, A.J.P. Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. *Process biochemistry*, v. 46, n. 3, p. 758-764, 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P. V. Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzyme Research*, v. 2010, 2010.
- CAMPOS, C.R., MESQUITA, V.A., SILVA, C.F., SCHWAN, R.F. Efficiency of physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal into the environment. *Waste management*, v. 34, n. 11, p. 2036-2046, 2014.
- CANNATELLI, M. D.; RAGAUSKAS, A. J. Laccase-catalyzed synthesis of 2, 3-ethylenedithio-1, 4-quinones. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 119, p. 85-89, 2015.
- CARDOSO, G. B., SOUZA, I. N., MOURÃO, T., FREIRE, M. G., SOARES, C. M. F., & LIMA, Á. S. Novel aqueous two-phase systems composed of acetonitrile and polyols: phase diagrams and extractive performance. *Separation and Purification Technology*, v. 124, p. 54-60, 2014.

- CHEN, S., MA, D., GE, W., BUSWELL, J.A. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 218, n. 1, p. 143-148, 2003.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Disponível em [http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2&Pagina\\_objcmsconteudos=2#A\\_objcmsconteudos](http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos), Acesso em 09/11/2017.
- CORRÊA, R. C. G., BRUGNARI, T., BRACHT, A., PERALTA, R. M., & FERREIRA, I. C. Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp.(Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends in Food Science & Technology*, v. 50, p. 103-117, 2016.
- COUTO, S. R.; TOCA-HERRERA, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology advances*, v. 24, n. 5, p. 500-513, 2006.
- COUTO, S. R.; TOCA-HERRERA, J. L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology advances*, v. 25, n. 6, p. 558-569, 2007.
- CROWE, J. D., OLSSON, S. Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 5, p. 2088-2094, 2001.
- DAÂSSI, D., PRIETO, A., ZOUARI-MECHICHI, H., MARTÍNEZ, M. J., NASRI, M., & MECHICHI, T. Degradation of bisphenol A by different fungal laccases and identification of its degradation products. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 110, p. 181-188, 2016.
- DAHIYA, J., SINGH, D., NIGAM, P. Decolourisation of synthetic and spentwash melanoidins using the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* JAG-40. *Bioresource Technology*, v. 78, n. 1, p. 95-98, 2001.
- DAS, N., SENGUPTA, S., MUKHERJEE, M. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Applied and environmental microbiology*, v. 63, n. 10, p. 4120-4122, 1997.
- DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. In: *Bioseparation*. Springer Berlin Heidelberg, p. 89-135, 1992.

- DIAS, E. S.; KOSHIKUMO, E. M. S.; SCHWAN, R. F.; SILVA, R. D. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.
- DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. D. Desenvolvimento in vitro de *Pleurotus spp.* sob a influência de diferentes substratos e dextrose. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 72, n. 3, p. 331-338, 2005.
- ELDRIDGE, H. C., MILLIKEN, A., FARMER, C., WENDLAND, N., COWARD, L., GREGORY, D. J., & JOHNSON, C. M. Efficient remediation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by *Lentinula edodes* (shiitake) laccase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 10, p. 64-68, 2017.
- EL MONSSEF, R. A. A.; HASSAN, E. A.; RAMADAN, E. M. Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. *Annals of Agricultural Sciences*, v. 61, n. 1, p. 145-154, 2016.
- ERGUN S. O.; UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid-state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Sciences*, 2017.
- ERIKSSON, K. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. Morphological aspects of wood degradation by fungi and bacteria. In: Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. *Springer Berlin Heidelberg*, p. 1-87, 1990.
- ESPAÑA-GAMBOA, E., MIJANGOS-CORTES, J., BARAHONA-PEREZ, L., DOMINGUEZ-MALDONADO, J., HERNÁNDEZ-ZARATE, G., ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. *Waste Management & Research*, v. 29, n. 12, p. 1235-125, 2011.
- ESPAÑA-GAMBOA, E., VICENT, T., FONT, X., MIJANGOS-CORTÉS, J., CANTO-CANCHÉ, B., ALZATE, L. Phenol and color removal in hydrous ethanol vinasse in an air-pulsed bioreactor using *Trametes versicolor*. *Journal of Biochemical Technology*, v. 6, n. 3, p. 982-986, 2015.
- ESPAÑA-GAMBOA, E., VICENT, T., FONT, X., DOMINGUEZ-MALDONADO, J., CANTO-CANCHÉ, B., & ALZATE-GAVIRIA, L. Pretreatment of vinasse from the sugar refinery industry under non-sterile conditions by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor and its effect when coupled to an UASB reactor. *Journal of Biological Engineering*, v. 11, n. 1, p. 6, 2017.

- FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. *Educs*, 2004.
- FERREIRA, L. F., AGUIAR, M., POMPEU, G., MESSIAS, T. G., & MONTEIRO, R. R. Selection of vinasse degrading microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 9, p. 1613-1621, 2010.
- FERREIRA, L.F.R., AGUIAR, M.M., MESSIAS, T.G., POMPEU, G.B., LOPEZ, A.M.Q., SILVA, D.P., MONTEIRO, R.T. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 74, n. 1, p. 132-137, 2011.
- FOKINA, O., EIPPER, J., KERZENMACHER, S., FISCHER, R. Selective natural induction of laccases in *Pleurotus sajor-caju*, suitable for application at a biofuel cell cathode at neutral pH. *Bioresource technology*, v. 218, p. 455-462, 2016.
- FONSECA, M. I., TEJERINA, M. R., SAWOSTJANIK-AFANASIUK, S. S., GIORGIO, E. M., BARCHUK, M. L., ZAPATA, P. D., & VILLALBA, L. L. Preliminary studies of new strains of *Trametes sp.* from Argentina for laccase production ability. *brazilian journal of microbiology*, v. 47, n. 2, p. 287-297, 2016.
- FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. Vinhaça de cana-de-açúcar. *Agropecuária*, 2000.
- FUESS, L.T., GARCIA, M.L. Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. *Journal of environmental management*, v. 145, p. 210-229, 2014.
- GALHAUP, C., WAGNER, H., HINTERSTOISSER, B., & HALTRICH, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30 n. 4, p. 529-536, 2002.
- GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, v. 3, n. 1, p. 1-26, 1999.
- GIARDINA, P., FARACO, V., PEZZELLA, C., PISCITELLI, A., VANHULLE, S., & SANNIA, G. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 67, n.3, p. 369-385, 2010.
- GLYK, A.; SCHEPER, T.; BEUTEL, S.. Influence of different phase-forming parameters on the phase diagram of several PEG–salt aqueous two-phase systems. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 59, n. 3, p. 850-859, 2014.

- GONÇALVES, C. C. D. M., PAIVA, P. C. D. A., DIAS, E. S., SIQUEIRA, F. G. D., & HENRIQUE, F. Evaluation of the cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (fries) sing. on cotton textile mill waste for mushroom production and animal feeding. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 34, n. 1, p. 220-225, 2011.
- GONÇALVES, I., MARTINS, M., LOUREIRO, A., GOMES, A., CAVACO-PAULO, A., & SILVA, C. Sonochemical and hydrodynamic cavitation reactors for laccase/hydrogen peroxide cotton bleaching. *Ultrasonics sonochemistry*, v. 21, n. 2, p. 774-781, 2014.
- GONZÁLEZ, L.; MEJÍA, M. Impact of Ferti-Irrigation with Vinasse on Groundwater Quality. *Irrigation and Drainage*, v. 64, n. 3, p. 400-407, 2015.
- GREGORI, A.; ŠVAGELJ, M.; PAHOR, B.; BEROVIC, M.; POHLEVEN, F. The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. *New biotechnology*, v. 25, n. 2, p. 157-161, 2008.
- HALABURGI, V. M., SHARMA, S., SINHA, M., SINGH, T. P., & KAREGOUDAR, T. B. Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 5, p. 1146-1152, 2011.
- HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS microbiology reviews*, v. 13, n. 2-3, p. 125-135, 1994.
- HERNÁNDEZ, C. A., SANDOVAL, N., MALLERMAN, J., GARCÍA-PÉREZ, J. A., FARNET, A. M., PERRAUD-GAIME, I., & ALARCÓN, E. Ethanol induction of laccase depends on nitrogen conditions of *Pycnoporus sanguineus*. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 18, n. 4, p. 327-332, 2015.
- HESS, J., LEITNER, C., GALHAUP, C., KULBE, K. D., HINTERSTOISSER, B., STEINWENDER, M., & HALTRICH, D. Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. p. 229-241, 2002.
- HOM-DIAZ, A., PASSOS, F., FERRER, I., VICENT, T., & BLÁNQUEZ, P. Enzymatic pretreatment of microalgae using fungal broth from *Trametes versicolor* and commercial laccase for improved biogas production. *Algal Research*, v. 19, p. 184-188, 2016.

- IRACHETA-CÁRDENAS, M. M., ROCHA-PEÑA, M. A., GALÁN-WONG, L. J., ARÉVALO-NIÑO, K., & TOVAR-HERRERA, O. E. A *Pycnoporus sanguineus* laccase for denim bleaching and its comparison with an enzymatic commercial formulation. *Journal of environmental management*, v. 177, p. 93-100, 2016.
- JAISWAL, N.; PANDEY, V. P.; DWIVEDI, U. N. Purification of a thermostable alkaline laccase from papaya (*Carica papaya*) using affinity chromatography. *International journal of biological macromolecules*, v. 72, p. 326-332, 2015.
- JORDAAN, J.; PLETSCHKE, B. I.; LEUKES, W. D. Purification and partial characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. *Enzyme and microbial technology*, v. 34, n. 7, p. 635-641, 2004.
- KACEM, I., KOUBAA, M., MAKTOUF, S., CHAARI, F., NAJAR, T., CHAABOUNI, M., & CHAABOUNI, S. E. Multistage process for the production of bioethanol from almond shell. *Bioresource technology*, v. 211, p. 154-163, 2016.
- KHAMMUANG, S., YUWA-AMORNPITAK, T., SVASTI, J., SARNTHIMA, R. Copper induction of laccases by *Lentinus polychrous* under liquid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 2, n. 4, p. 357-362, 2013.
- KANNAIYAN, R., MAHINPEY, N., MANI, T., MARTINUZZI, R. J., & KOSTENKO, V. Enhancement of *Dichomitus squalens* tolerance to copper and copper-associated laccase activity by carbon and nitrogen sources. *Biochemical engineering journal*, n. 67, p. 140-147, 2012.
- KASHANGURA, C.; HALLSWORTH, J. E.; MSWAKA, A. Y. Phenotypic diversity amongst strains of *Pleurotus sajor-caju*: implications for cultivation in arid environments. *Mycological research*, v. 110, n. 3, p. 312-317, 2006.
- KIRSCH, L.D.S., MACEDO, A.J.P.D., TEIXEIRA, M.F.S. Production of mycelial biomass by the Amazonian edible mushroom *Pleurotus albidus*. *Brazilian journal of microbiology*, v. 47, n. 3, p. 658-664, 2016.
- KUDANGA, T., NYANHONGO, G. S., GUEBITZ, G. M., & BURTON, S. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. *Enzyme and microbial technology*, v. 48, n. 3, p. 195-208, 2011.



- KUHAR, F.; PAPINUTTI, L. Optimization of laccase production by two strains of *Ganoderma lucidum* using phenolic and metallic inducers. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 46, n. 2, p. 144-149, 2014.
- KUMAR, V. V., KIRUPHA, S. D., PERIYARAMAN, P., & SIVANESAN, S. Screening and induction of laccase activity in fungal species and its application in dye decolorization. *African Journal of Microbiology Research*, v. 5, n. 11, p. 1261-1267, 2011.
- KUMAR, V. V.; SIVANESAN, S.; CABANA, H. Magnetic cross-linked laccase aggregates—bioremediation tool for decolorization of distinct classes of recalcitrant dyes. *Science of The Total Environment*, v. 487, p. 830-839, 2014.
- LEE, I. Y., JUNG, K. H., LEE, C. H., & PARK, Y. H. Enhanced production of laccase in *Trametes vesicolor* by the addition of ethanol. *Biotechnology Letters*, v. 21, n. 11, p. 965-968, 1999.
- LETTERA, V., PEZZELLA, C., CICATIELLO, P., PISCITELLI, A., GIACOBELLI, V. G., GALANO, E., SANNIA, G. Efficient immobilization of a fungal laccase and its exploitation in fruit juice clarification. *Food chemistry*, v. 196, p. 1272-1278, 2016.
- Liu, X. W., Li, W. W., & Yu, H. Q. Cathodic catalysts in bioelectrochemical systems for energy recovery from wastewater. *Chemical Society Reviews*, v. 43, n. 22, p. 7718-7745, 2014.
- LIU, J., YU, Z., LIAO, X., LIU, J., MAO, F., HUANG, Q. Scalable production, fast purification, and spray drying of native *Pycnoporus* laccase and circular dichroism characterization. *Journal of Cleaner Production*, v. 127, p. 600-609, 2016.
- LOMASCOLO, A., RECORD, E., HERPOËL-GIMBERT, I., DELATTRE, M., ROBERT, J.L., GEORIS, J., ASTHER, M. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, n. 4, p. 618-624, 2003.
- LÓPEZ-GONZÁLEZ, B., DECTOR, A., CUEVAS-MUÑIZ, F. M., ARJONA, N., CRUZ-MADRID, C., ARANA-CUENCA, A., & LEDESMA-GARCÍA, J. Hybrid microfluidic fuel cell based on Laccase/C and AuAg/C electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 62, p. 221-226, 2014.

- MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: properties and applications. *BioResources*, v. 4, n. 4, p. 1694-1717, 2009.
- MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; THANGAVELU, K. P.; HEESE, K. Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical engineering journal*, v. 70, p. 106-114, 2013.
- MAYER, A. M., & STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, v. 60, n.6, p. 551-565, 2002.
- MAYOLO-DELOISA, K., DEL REFUGIO TREJO-HERNANDEZ, M., RITO-PALOMARES, M. Recovery of laccase from the residual compost of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v. 44, n. 4, p. 435-439, 2009.
- MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, v. 13, n. 6, p. 205-216, 2002.
- MODARESSI, K., TAYLOR, K.E., BEWTRA, J.K., BISWAS, N. Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A from water: protective effect of PEG on enzyme activity. *Water research*, v. 39, n. 18, p. 4309-4316, 2005.
- MOHANA, S.; ACHARYA, B. K.; MADAMWAR, D. Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. *Journal of Hazardous Materials*, v. 163, n. 1, p. 12-25, 2009.
- MOROZOVA, O. V., SHUMAKOVICH, G. P., GORBACHEVA, M. A., SHLEEV, S. V., & YAROLOV, A. I. "Blue" laccases. *Biochemistry*. v. 72, n. 10, p. 1136-1150, 2007.
- NADAR, S.S., PAWAR, R.G., RATHOD, V.K. Recent Advances in Enzyme Extraction Strategies: A Comprehensive Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 101, p. 931-957, 2017.
- NETO, S. A., ZIMBARDI, A. L. R. L., CARDOSO, F. P., CREPALDI, L. B., MINTEER, S. D., JORGE, J. A., & DE ANDRADE, A. R. Potential application of laccase from *Pycnoporus sanguineus* in methanol/O<sup>2</sup> biofuel cells. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 765, p. 2-7, 2016.
- NILADEVI, K. N.; PREMA, P. Immobilization of laccase from *Streptomyces psammoticus* and its application in phenol removal using packed bed reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 7, p. 1215-1222, 2008.

- NING, Y. J., WANG, S. S., CHEN, Q. J., LING, Z. R., WANG, S. N., WANG, W. P., ZHU, M. J. An extracellular yellow laccase with potent dye decolorizing ability from the fungus *Leucoagaricus naucinus* LAC-04. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 93, p. 837-842, 2016.
- QWEBANI-OGUNLEYE, T., KOLESNIKOVA, N. I., STEENKAMP, P., DE KONING, C. B., BRADY, D., & WELLINGTON, K. W. A one-pot laccase-catalysed synthesis of coumestan derivatives and their anticancer activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017.
- OYELEKE, S. B., DAUDA, B. E. N., OYEWOLE, O. A., OKOLIEGBE, I. N., & OJEBODE, T. Production of bioethanol from cassava and sweet potato peels. *Advances in Environmental Biology*, p. 241-246, 2012.
- PASSARINI, M. R. Z., OTTONI, C. A., SANTOS, C., LIMA, N., & SETTE, L. D. Induction, expression and characterisation of laccase genes from the marine-derived fungal strains *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 and *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330. *AMB express*, v. 5, n. 1, p. 19, 2015.
- PATRICK, F., MTUI, G., MSHANDETE, A. M., & KIVAIISI, A. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju*. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 50, p. 10166-10177, 2011.
- PAZ, M. F.; VIEIRA, E.; BREYER, C. A.; GIOVANNI, R. N.; BERTOLDI, F. C. Cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de Uva Isabel. *Evidencia: biotecnologia e alimentos*, n. 2, p. 187-194, 2006.
- PEZZELLA, C., LETTERA, V., PISCITELLI, A., GIARDINA, P., SANNIA, G. Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 97, n. 2, p. 705-717, 2013.
- POLAK, J., JAROSZ-WILKOLAZKA, A., SZUSTER-CIESIELSKA, A., WLIZLO, K., KOPYCINSKA, M., SOJKA-LEDKOWICZ, J., & LICHAWSKA-OLCZYK, J. Toxicity and dyeing properties of dyes obtained through laccase-mediated synthesis. *Journal of Cleaner Production*, v. 112, p. 4265-4272, 2016.
- PRASETYO, E. N., SEMLITSCH, S., NYANHONGO, G. S., LEMMOUCHI, Y., & GUEBITZ, G. M. Laccase oxidation and removal of toxicants released during combustion processes. *Chemosphere*, v. 144, p. 652-660, 2016.

- PRINZ, A., HÖNIG, J., SCHÜTTMANN, I., ZORN, H., & ZEINER, T. Separation and purification of laccases from two different fungi using aqueous two-phase extraction. *Process Biochemistry*, v. 49, n. 2, p. 335-346, 2014.
- PURKAYASTHA, D.D., MADHURIMA, V. Interactions in water-THF binary mixture by contact angle, FTIR and dielectric studies. *Journal of Molecular Liquids*, v. 187, n. 0, p. 54-57, 2013.
- RAJAGOPALU, D., SHOW, P. L., TAN, Y. S., MUNIANDY, S., SABARATNAM, V., & LING, T. C. Recovery of laccase from processed *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr) Pers. fruiting bodies in aqueous two-phase system. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 122, n. 3, p. 301-306, 2016.
- RATANAPONGLEKA, K. Partitioning behavior of laccase from *Lentinus polychrous* Lev in aqueous two phase systems. *Songklanakarinn Journal of Science & Technology*, v. 34, n. 1, 2012.
- REDDY, G. V., BABU, P. R., KOMARAIHAH, P., ROY, K. R. R. M., & KOTHARI, I. L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 10, p. 1457-1462, 2003.
- RENZETTI, S., COURTIN, C. M., DELCOUR, J. A., & ARENDT, E. K. Oxidative and proteolytic enzyme preparations as promising improvers for oat bread formulations: rheological, biochemical and microstructural background. *Food Chemistry*, v. 119, n. 4, p. 1465-1473, 2010.
- RIEBEL, M., SABEL, A., CLAUS, H., XIA, N., LI, H., KÖNIG, H., FRONK, P. Antioxidant Capacity of Phenolic Compounds on Human Cell Lines as Affected by Grape-Tyrosinase and Botrytis-Laccase Oxidation. *Food Chemistry*. 2017.
- RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology*, v. 24, n. 5, p. 219-226, 2006.
- RIVERA-HOYOS, C. M., MORALES-ÁLVAREZ, E. D., POUTOU-PIÑALES, R. A., PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M., RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R., & DELGADO-BOADA, J. M. Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, v. 27, n. 3, p. 67-82, 2013.

- ROBLES-GONZÁLEZ, V., GALÍNDEZ-MAYER, J., RINDERKNECHT-SEIJAS, N., POGGI-VARALDO, HM. Treatment of mezcal vinasses: A review. *Journal of biotechnology*, v. 157, n. 4, p. 524-546, 2012.
- RODRÍGUEZ, E., LOPES, A., POLANCO, M.F., STAMS, A.J., GARCÍA-ENCINA, P.A. Molecular analysis of the biomass of a fluidized bed reactor treating synthetic vinasse at anaerobic and micro-aerobic conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 93, n. 5, p. 2181-2191, 2012.
- SAITO, T., HONG, P., KATO, K., OKAZAKI, M., INAGAKI, H., MAEDA, S., & YOKOGAWA, Y. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family *Chaetomiaceae*) isolated from soil. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, n. 4, p. 520-526, 2003.
- SAHAY, R., YADAV, R.S.S., YADAV, K.D.S. Purification and characterization of extracellular laccase secreted by *Pleurotus sajor-caju* MTCC 141. *Chinese Journal of Biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 2068-2073, 2008.
- SAMPAIO, L. M., PADRÃO, J., FARIA, J., SILVA, J. P., SILVA, C. J., DOURADO, F., & ZILLE, A. Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: Antimicrobial, kinetic and stability properties. *Carbohydrate polymers*, v. 145, p. 1-12, 2016.
- SÁNCHEZ-TRASVIÑA, C., MAYOLO-DELOISA, K., GONZÁLEZ-VALDEZ, J., RITO-PALOMARES, M. Refolding of laccase from *Trametes versicolor* using aqueous two phase systems: Effect of different additives. *Journal of Chromatography A*, v. 1507, p. 25-31, 2017.
- SCHWIENHEER, C., PRINZ, A., ZEINER, T., & MERZ, J. Separation of active laccases from *Pleurotus sapidus* culture supernatant using aqueous two-phase systems in centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 1002, p. 1-7, 2015.
- SHARMA, A., THAKUR, V. V., SHRIVASTAVA, A., JAIN, R. K., MATHUR, R. M., GUPTA, R., & KUHAD, R. C. Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents: A pilot scale study. *Bioresource technology*, v. 169, p. 96-102, 2014.

- SINGHAL, A.; CHOUDHARY, G.; THAKUR, I. S. Optimization of growth media for enhanced production of laccase by *Cryptococcus albidus* and its application for bioremediation of chemicals A paper submitted to the Journal of Environmental Engineering and Science. *Canadian Journal of Civil Engineering*, v. 36, n. 7, p. 1253-1264, 2009.
- SILVA, M. AS da; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.
- SILVÉRIO, S. C., RODRÍGUEZ, O., TAVARES, A. P., TEIXEIRA, J. A., & MACEDO, E. A. Laccase recovery with aqueous two-phase systems: enzyme partitioning and stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 87, p. 37-43, 2013.
- SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *Journal of basic microbiology*, v. 43, n. 4, p. 278-286, 2003.
- SPINA, F., CORDERO, C., SCHILIRÒ, T., SGORBINI, B., PIGNATA, C., GILLI, G., BICCHI, C., VARESE, G.C. Removal of micropollutants by fungal laccases in model solution and municipal wastewater: evaluation of estrogenic activity and ecotoxicity. *Journal of Cleaner Production*, v. 100, p. 185-194, 2015.
- STRONG, P. J.; CLAUS, H. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 41, n. 4, p. 373-434, 2011.
- SU, Q., ROWLEY, K.G., BALAZS, N.D.H. Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography B*, v. 781, n. 1-2, p. 393-418, 2002.
- SZKLARZ, G. D., ANTIBUS, R. K., SINSABAUGH, R. L., & LINKINS, A. E. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*, p. 234-240, 1989.
- TEERAPATSAKUL, C., PARRA, R., KESHAVARZ, T., & CHITRADON, L. Repeated batch for dye degradation in an airlift bioreactor by laccase entrapped in copper alginate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 120, p. 52-57, 2017.
- THANAPIMMETHA, A., SRINOPHAKUN, P., AMAT, S., SAISRIYOOT, M. Decolorization of molasses-based distillery wastewater by means of pulse electro-

- Fenton process. *Journal of environmental chemical engineering*, v. 5, n. 3, p. 2305-2312, 2017.
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR – ÚNICA. Disponível em [www.unica.com.br/download.php?idSecao=17&id=31214393](http://www.unica.com.br/download.php?idSecao=17&id=31214393), Acesso em 12/10/2017.
- VILAR, D.S., CARVALHO, G.O., PUPO, M.M., AGUIAR, M.M., TORRES, N.H., AMÉRICO, J.H., CAVALCANTI, E.B., EGUILUZ, K.I.B., SALAZAR-BANDA, G.R., LEITE, M.S., FERREIRA, L.F.R. Vinasse degradation using *Pleurotus sajor-caju* in a combined biological–electrochemical oxidation treatment. *Separation and Purification Technology*, v. 192, p. 287-296, 2017.
- VISWANATH, B., RAJESH, B., JANARDHAN, A., KUMAR, A. P., & NARASIMHA, G. Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme research*, 2014.
- WANG, Y., LIU, Y., HAN, J., & HU, S. Application of water-miscible alcohol-based aqueous two-phase systems for extraction of dyes. *Separation Science and Technology*, v. 46, n. 8, p. 1283-1288, 2011.
- WU, X., LIANG, L., ZOU, Y., ZHAO, T., ZHAO, J., LI, F., & YANG, L. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). *Food Chemistry*, v. 129, n. 2, p. 443-453, 2011.
- YOUNES, S. B.; SAYADI, S. Purification and characterization of a novel trimeric and thermotolerant laccase produced from the ascomycete *Scytalidium thermophilum* strain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 73, n. 1, p. 35-42, 2011.
- YOUSEFI-AHMADIPOUR, A., BOZORGI-KOSHALSHAHI, M., MOGHARABI, M., AMINI, M., GHAZI-KHANSARI, M., & FARAMARZI, M. A. Laccase-catalyzed treatment of ketoconazole, identification of biotransformed metabolites, determination of kinetic parameters, and evaluation of micro-toxicity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 133, p. 77-84, 2016.
- ZABED, H., SAHU, J. N., SUELY, A., BOYCE, A. N., & FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017.
- ZADRAZIL, F. Influence of ammonium nitrate and organic supplements on the yield of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) sing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 9, n. 1, p. 31-35, 1980.

- ZENG, S.; QIN, X.; XIA, L. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. *Biochemical Engineering Journal*, v. 119, p. 92-100, 2017.
- ZHUO, R., YUAN, P., YANG, Y., ZHANG, S., MA, F., & ZHANG, X. Induction of laccase by metal ions and aromatic compounds in *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 and decolorization of different synthetic dyes by the extracellular laccase. *Biochemical Engineering Journal*, v. 117, p. 62-72, 2017.
- ZUCCA, P., RESCIGNO, A., OLIANAS, A., MACCIONI, S., SOLLAI, F. A., & SANJUST, E. Induction, purification, and characterization of a laccase isozyme from *Pleurotus sajor-caju* and the potential in decolorization of textile dyes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 68, n. 2, p. 216-222, 2011.