



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR**

ANA JULIA DOS REIS BUZZO

**LACASES DE *Oudemansiella canarii*: PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA DESCOLORAÇÃO
DO CORANTE ANTRAQUINÔNICO AZUL BRILHANTE
DE REMAZOL R**

MARINGÁ

2018

ANA JULIA DOS REIS BUZZO

**LACASES DE *Oudemansiella canarii*: PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA DESCOLORAÇÃO
DO CORANTE ANTRAQUINÔNICO AZUL BRILHANTE
DE REMAZOL R**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Marina Peralta

MARINGÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

B992L Buzzo, Ana Julia dos Reis
Lacases de *Oudemansiella canarii*: produção, caracterização e aplicação na descoloração do corante antraquinônico azul brilhante de remazol R / Ana Julia dos Reis Buzzo. -- Maringá, PR, 2018. 29 f.: il. color.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Rosane Marina Peralta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2018.

1. Lacases. 2. Corantes industriais. 3. Corantes - Indústrias têxteis. I. Peralta, Rosane Marina, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDD 23.ed. 667.25

ANA JULIA DOS REIS BUZZO

**LACASES DE *Oudemansiella canarii*: PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA DESCOLORAÇÃO DO
CORANTE ANTRAQUINÔNICO AZUL BRILHANTE DE REMAZOL
R**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 16 de Fevereiro de 2018

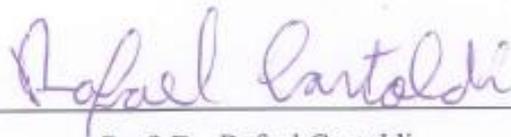
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Rosane Marina Peralta
Universidade Estadual de Maringá



Dr. Geferson Almeida Gonçalves
Prefeitura Municipal de Maringá



Prof. Dr. Rafael Castoldi
Universidade Estadual de Maringá

Dedico esse trabalho aos meus pais

Leonildo e Cleuza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as bênçãos concedidas.

À minha orientadora Profa. Dra. Rosane Marina Peralta pela grande oportunidade, pela paciência e por me ajudar sempre que precisei.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, por todos os ensinamentos, especialmente a Profa. Dra. Cristina Giatti Marques de Souza.

Aos meus colegas de laboratório que estiveram comigo no dia a dia, em especial à Tatiane Brugnari que me ensinou bastante coisa e teve muita paciência e disposição sempre e ao Alex Graça Contato que sempre me apoiou e incentivou.

Aos meus pais e irmãs que me deram e me dão muito suporte, incentivos e amor, e por acreditarem em mim e me desejarem um futuro profissional de sucesso.

À minha querida sobrinha Luna por todos os momentos de alegria.

A todos os meus amigos, pois sem eles eu não teria conseguido. Obrigada por toda a força, abraços e felicidades vividas.

À minha amiga de infância Ana Carolina P. Meyer a qual está sempre ao meu lado e peço a Deus que sempre esteja.

Ao meu grande amigo Marcos Rodrigues Maldonado, que divide comigo uma sintonia única desde a faculdade. Que continuemos sendo um o suporte do outro.

A duas amigas muito especiais que entraram na minha vida para somar: Raquel Abrão e Camila Iembo agradeço por todo apoio e momentos bem vividos que me proporcionaram e por todos que ainda vamos compartilhar. “Pra nós todo amor do mundo”.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá. A presente dissertação está apresentada na forma de um artigo científico.

Após incorporação das sugestões da banca e versão para o inglês, o artigo será submetida ao periódico científico Waste and Biomass Valorization (fator de Impacto JCR=1,337).

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO - As lacases (EC 3.10.3.2) são cobre-enzimas oxidativas que oxidam preferencialmente substratos fenólicos. Associadas às peroxidases (lignina peroxidase e peroxidase dependente de manganês), estas enzimas são conhecidas como enzimas ligninolíticas e são amplamente estudadas graças às suas diversas aplicações tecnológicas e ambientais. As lacases mais estudadas são aquelas produzidas pelos basidiomicetos causadores da podridão branca da madeira, especialmente as espécies *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* e *Picnoporus sanguineus*. *Oudemansiella canarii* é um basidiomiceto comestível causador da podridão branca da madeira presente em diversos biomas brasileiros, mas inexplorado em relação às suas enzimas ligninolíticas. O presente trabalho teve como objetivos (1) avaliar a capacidade de *O. canarii* produzir a lacase em cultivos em estado sólido utilizando diversos resíduos agrícolas como substrato; (2) caracterizar a enzima bruta; (3) avaliar a capacidade da enzima bruta de descolorir o corante antraquinônico azul de brilhante remazol R (RBBR).

MATERIAIS E MÉTODOS - Os cultivos em estado sólido foram realizados utilizando-se como substratos bagaço de cana, farelo de trigo e serragem de eucalipto, em diferentes proporções, variando-se também a umidade inicial e o tempo do cultivo. Os cultivos foram mantidos no escuro em estufa a 28 °C sendo interrompidos pela adição de água, maceração e filtração para extração das enzimas. Os filtrados foram centrifugados e considerados como extrato enzimático bruto. A produção de lacase foi avaliada utilizando-se como substrato ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)). Os seguintes parâmetros foram avaliados na caracterização parcial da lacase bruta: efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade térmica; massa molecular aparente e constantes cinéticas (K_M e V_{max}). Finalmente, utilizou-se a lacase bruta na descoloração do corante antraquinônico azul brilhante de remazol R na presença e ausência de mediadores ácido violúrico e acetilacetona.

RESULTADOS E DISCUSSÃO - A melhor condição de cultivo para a produção de lacase por *O. canarii* foi umidade inicial de 80%, tempo de cultivo de 10 dias e uma mistura bagaço de cana e farelo de trigo (1:1). Nestas condições, obteve-se um extrato bruto contendo 20000 U/L da lacase. A associação de substratos foi benéfica, pois soma propriedades nutricionais dos mesmos, influenciando diretamente no crescimento do fungo e na produção de enzimas. A enzima apresentou um pH ótimo de 4.0 e temperatura ótima de 50 °C. Porém, na ausência do substrato, a lacase de *O. canarii* foi estável à temperaturas até 40° C. A massa molecular aparente da enzima avaliada por eletroforese foi 31,4 kDa. A lacase apresentou, utilizando-se ABTS como substrato, um $K_M = 98,96$ mmol/L e $V_{max} = 13744$ mg.L⁻¹min⁻¹. A enzima foi capaz de eficientemente descolorir o corante RBBR obtendo-se uma descoloração de 90,8% após 5 h de incubação.

CONCLUSÕES - Pode-se concluir que o basidiomiceto *Oudemansiella canarii* é um bom produtor de lacase e, que a mesma apresenta características desejáveis de uma enzima industrial. Essa enzima também se mostrou potente na descoloração do corante RBBR sendo uma possível alternativa para o tratamento de efluentes contaminados por esse corante.

PALAVRAS-CHAVES: *Oudemansiella canarii*, lacase, corantes industriais, mediadores.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION – Laccases (EC 3.10.3.2) are oxidases that contain several copper atoms and catalyse oxidations of phenolic substrates. When associated with peroxidases such as lignin peroxidase (LiP) and Manganese-dependent peroxidase (MnP), these enzymes are known as lignolytic enzymes and are widely studied due to their technological and environmental applications. The most studied laccase are those produced by White rot fungus (WRF) notably *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Picnoporus sanguineus* species. *Oudemansiella canarii* is an edible basidiomycete present in different Brazilian biomes and little is known about its ligninolytic enzymes. Therefore, the present study aimed (1) to evaluate the ability of *O. canarii* to produce laccase in solid-state culture; (2) characterize the crude enzyme; (3) and evaluate the crude enzyme's capacity to decolorize the Remazol Brilliant Blue R (RBBR), an anthraquinone dye.

METHODS – The solid-state cultures were made using sugarcane bagasse, wheat bran and eucalyptus sawdust as substrate. The initial moisture and incubation time were also varied. The cultures were incubated statically at 28 °C in the absence of light. Laccase was extracted from the cultures by addition of water and the material was macerated and filtered. The material containing crude laccase was centrifuged and named crude enzyme extract. Laccase activity was performed spectrophotometrically by oxidation of 2,2-azino-bis-(3-ethyl-bezothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). The following parameters were evaluated in crude enzyme extract characterization: effect of pH and temperature on laccase activity and thermal stability; apparent molecular mass and kinetic constants (K_M e V_{max}). Finally, the crude enzyme extract was used to discolor the anthraquinone dye Remazol Brilliant Blue R in the presence and absence of mediators (violuric acid and acetylacetone).

RESULTS AND DISCUSSION – The best laccase activity produced by *O. canarii* was obtained using sugarcane bagasse with wheat bran (1:1) as substrate, after 10 days of incubation at 80% of initial moisture. In these conditions, the crude enzyme extract presented an activity of 20000 U/L. The associations of different substrates were beneficial since the nutritional properties of both complete each other. It directly influences the fungus growth and enzymes production. The optimum pH and temperature of the enzyme was 4.0 and 50 °C, respectively. In the absence of the substrate, however, the same enzyme was stable at temperatures up to 40 °C. The apparent molecular mass evaluated by SDS PAGE was 31,4 kDa and, using ABTS as substrate, the enzyme showed $K_M = 98,96$ mmol/L and $V_{max} = 13744$ mg.L⁻¹min⁻¹. The enzyme produced by *O. canarii* in the conditions of this study was able to efficiently decolorized the RBBR. It was obtained 90.8% of decolorization in 5 hours of incubation.

CONCLUSION – The basidiomycete *Oudemansiella canarii* is a good producer of laccase and its enzyme presents desirable industrial characteristics. The enzyme efficiently decolorized the RBBR, being na possible alternative to treat effluents contaminated by this dye.

KEYWORDS: *Oudemansiella canarii*, laccase, dyes, mediators.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação da capacidade de lacases de diferentes fontes na descoloração do corante Azul Brilhante de Remazol R.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Oudemansisella canarii*. A: corpo de frutificação; B: desenvolvimento de micélio em meio agarificado; C: desenvolvimento de micélio em cultivo em estado sólido.

Figura 2: Estrutura química do corante antraquinônico RBBR.

Figura 3: Produção de lacase por *Oudemansisella canarii* em cultivo em estado sólido utilizando diferentes resíduos lignocelulósicos como substrato. FT = farelo de trigo; SE = serragem de eucalipto; BC = bagaço de cana.

Figura 4: Efeito do tempo de cultivo na produção de lacase por *Oudemansisella canarii* em cultivos em estado sólido utilizando diferentes resíduos lignocelulósicos como substrato. FT=farelo de trigo; BC=bagaço de cana.

Figura 5: Efeito da umidade inicial na produção de lacase por *Oudemansisella canarii* em cultivo em estado sólido utilizando FT + BC (1:1) como substrato. A umidade inicial variou entre 75, 80 e 83%.

Figura 6: Efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade da lacase de *Oudemansisella canarii*.

Figura 7: Estabilidade térmica da lacase de *Oudemansisella canarii* por uma hora em diferentes temperaturas.

Figura 8: Zimograma pós SDS-PAGE da lacase de *Oudemansisella canarii*, visualizada com ABTS. A: lacase (banda verde) do *Oudemansisella canarii* em gel com ABTS. B: padrões (Sigma) utilizados como referência de peso molecular: albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), pepsina (34,7 kDa), tripsinogênio (24 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa) e citocromo c (12,6 kDa). As bandas protéicas do padrão foram coradas com Coomassie Blue R.

Figura 9: Cinética da lacase produzida por *Oudemansisella canarii*.

Figura 10: Descoloração do corante RBBR em meio reacional contendo diferentes atividades de lacase de *O. canarii*.

Figura 11: Efeito dos mediadores ácido violúrico e acetilacetona na descoloração de RBBR pela lacase de *O. canarii*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS – 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

BC – Bagaço de cana

FES – Fermentação em estado sólido

FS – Fermentação submersa

FT – Farelo de trigo

Lac – Lacase

LiP – Lignina Peroxidase

MnP – Manganês Peroxidase

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SE – Serragem de eucalipto

RBBR – azul brilhante de Remazol R

LACASES DE *Oudemansiella canarii*: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA DESCOLORAÇÃO DO CORANTE ANTRAQUINÔNICO AZUL BRILHANTE DE REMAZOL R

Ana Julia dos Reis Buzzo¹, Tatiane Brugnari¹, Alex Graça Contato¹, Mariene Marques Nolli¹, Adelar Bracht¹, Rosane Marina Peralta¹.

¹Universidade Estadual de Maringá – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – CEP 87020-900 Maringá – Paraná – email: anajuliabuzzo@hotmail.com

RESUMO

As lacases (EC 1.10.3.2) são cobre oxidases largamente distribuídas na natureza, sendo mais estudadas as produzidas pelos fungos da podridão branca. Estas enzimas são capazes de oxidar diferentes compostos aromáticos fenólicos e também substratos não fenólicos na presença de mediadores. Possuem diversas aplicações industriais e biotecnológicas e as lacases mais estudadas são as dos basidiomicetos decompositores da madeira. *Oudemansiella canarii* é um fungo da podridão branca comum no território brasileiro praticamente inexplorado como um produtor de enzimas. O objetivo deste trabalho foi estudar a lacase produzida pelo basidiomiceto *Oudemansiella canarii* em cultivos em estado sólido utilizando uma mistura de bagaço de cana e farelo de trigo, caracterizá-las quanto às suas propriedades físico-químicas e avaliar seu potencial tecnológico na descoloração do corante industrial azul brilhante remazol (RBBR). Lacase de *O. canarii* mostrou ter uma massa molecular de 31,4 kDa e apresentou máxima oxidação do substrato ABTS em pH 4,0 e temperatura de 50 °C. Na oxidação do substrato ABTS, a lacase de *O. canarii* obedeceu a cinética de Michaelis-Menten, com K_M de 98,96 mmol/L e V_{max} de 13744 mg.L⁻¹ min⁻¹. A lacase de *O. Canarii* foi efetiva na descoloração do corante antraquinonico RBBR na ausência e presença de mediadores sintéticos ácido violúrico e acetilacetona, mostrando-se potencialmente útil na biorremediação de efluentes industriais têxteis.

Palavras chaves: *Oudemansiella canarii*, lacase, corantes industriais, mediadores.

INTRODUÇÃO

Lacases (EC.1.10.3.2) são cobre oxidases que catalisam a oxidação de fenólicos e aminas aromáticas com concomitante redução do O₂ a água. As lacases têm várias funções biológicas, incluindo degradação de polímeros complexos como a lignina, lignificação, detoxificação, polimerização de melanina, entre outras. Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza e são encontradas em fungos, bactérias, plantas e insetos (STRONG & CLAUS, 2011). As lacases mais estudadas são as dos fungos basidiomicetos envolvidos na podridão branca da madeira. Nestes fungos, as lacases, em associação com as peroxidases dependente de manganês (Mn peroxidases) e as peroxidases capazes de oxidar o modelo de lignina veratril álcool (lignina peroxidase), estão envolvidas na degradação da lignina, um polímero fenólico altamente recalcitrante (PERALTA et al., 2017, SOUZA et al., 2006). Lacases fúngicas são glicoproteínas extracelulares que geralmente ocorrem como isoenzimas, com estruturas monoméricas, diméricas ou poliméricas todas mostrando uma arquitetura tipo beta-barril (PERALTA et al., 2017).

As lacases apresentam especificidade ampla em relação ao substrato. Apesar dos substratos fenólicos serem mais facilmente oxidados pelas lacases, sua ação oxidativa pode ser estendida a substratos não fenólicos pela inclusão de mediadores. Mediadores são compostos orgânicos de baixa massa molecular que primeiro são oxidados pela lacase e depois oxidam os compostos não fenólicos que a lacase sozinha não é capaz de oxidar (PERALTA et al., 2017). Por conta da capacidade das lacases de oxidar diferentes compostos fenólicos e não fenólicos estas enzimas tem sido bastante utilizadas na biorremediação de xenobióticos incluindo corantes sintéticos, herbicidas, pesticidas, compostos policíclicos aromáticos, produtos farmacêuticos, disruptores endócrinos como bisfenol A, entre vários outros (MOTA et al., 2015; COELHO-MOREIRA et al., 2013; FREITAS et al., 2017). As espécies *Agaricus bisporus*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis adusta*, *Coprinus cinereus*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Rigidoporus lignosus* e *Trametes versicolor* são exemplos de basidiomicetos produtores de lacases largamente utilizados em processos de biorremediação (PERALTA et al., 2017).

Todos os anos grandes quantidades de resíduos agro-industriais são formados. Encontrar alternativas para a reutilização desses resíduos é de grande importância considerando os aspectos ambientais e econômicos. Por isso, uma das abordagens apropriadas para este propósito é a fermentação em estado sólido (FES), que é definida como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos na ausência total ou parcial

de água livre, podendo conter concentrações significativas de carboidratos solúveis e indutores de síntese de enzimas que garantem eficiência na produção de enzimas ligninolíticas (ERGUN et al., 2017).

Os fungos promovem a decomposição de substratos lignocelulósicos de maneira eficiente. Dessa forma, diferentes resíduos agrícolas podem ser usados como substratos para a produção de alimentos e também, favorecer sua reciclagem (RUEGGER et al., 2001). A reutilização de resíduos agro-industriais como substratos para a FES é muito favorável devido à sua disponibilidade, baixo custo e características que permitem obter diferentes compostos de valor agregado, além de ser uma alternativa que não prejudica o meio ambiente. Além disso, o crescimento de fungos filamentosos em substratos sólidos simula o habitat natural do mesmo e tal substrato atua como fonte de carbono e energia. Essa vantagem tem relação direta com a produção de enzimas (maiores rendimentos e produtividade) quando comparada com a fermentação submersa (FS). O sucesso de uma produção enzimática pode ser alcançado através da seleção de microrganismos e condições de processo de fermentação melhoradas. Primeiramente é necessário encontrar microrganismos que produzem, em quantidades elevadas, sua enzima de interesse (DELABONA et al., 2012).

A FES, portanto, permite o uso de subprodutos e resíduos de indústrias alimentícias e agrícolas como, por exemplo, farelo de trigo, bagaço de cana de açúcar, farelo de arroz, espiga de milho, entre outros. Especialmente os resíduos das indústrias alimentícias são ricos em açúcares logo, devido a sua natureza orgânica são facilmente assimilados por microrganismos e considerados muito adequados como matéria prima para a produção de metabólitos secundários com significado industrial (ERGUN et al., 2017). A escolha do resíduo deve ser baseada na abundância deste na região, o que reflete no custo do mesmo e também suas características físico-químicas e nutricionais devem ser de interesse. Por exemplo, no Brasil a cana de açúcar é uma das maiores monoculturas agrícolas, fornecendo assim uma enorme quantidade de resíduos, porém possui baixo valor nutricional. Devido a essa questão, o farelo de trigo que é uma boa fonte de nitrogênio, tem sido utilizado como substrato junto com o bagaço de cana na produção de enzimas por diferentes fungos (DELABONA et al., 2012).

Os cogumelos do gênero *Oudemansiella* são comestíveis e consumidos ao redor do mundo. Tal gênero inclui as espécies *O. radicata*, *O. canarii*, *O. orientalis*, *O. hongoi* entre

outras (MAGINGO et al., 2004). Eles são comuns no território brasileiro e são responsáveis por colonizar muitas plantas como, por exemplo, a Araucária (RUEGGER et al., 2001). Muitas espécies desse gênero possuem compostos bioativos e alguns deles atuam como estimuladores imunológicos, anti-hipertensivos, anti-câncer e antibiótico (XU et al., 2016). O gênero *Oudemansiella* é considerado um decompositor da madeira mas quase nada é conhecido a respeito de suas enzimas ligninolíticas, incluindo as lacases. As exceções são a descrição da produção de celulases e lacases por *Oudemansiella radicata* (BALARAJU et al., 2010) e de uma piranose oxidase geradora de H₂O₂ por *Oudemansiella mucida* (DANIEL et al., 1994). A espécie *Oudemansiella canarii* é comum em vários biomas brasileiros incluindo a Mata Atlântica (ROSA; CAPELARI, 2009), Floresta Amazônica e Pantanal (BONONI et al., 2008) (Fig. 1).

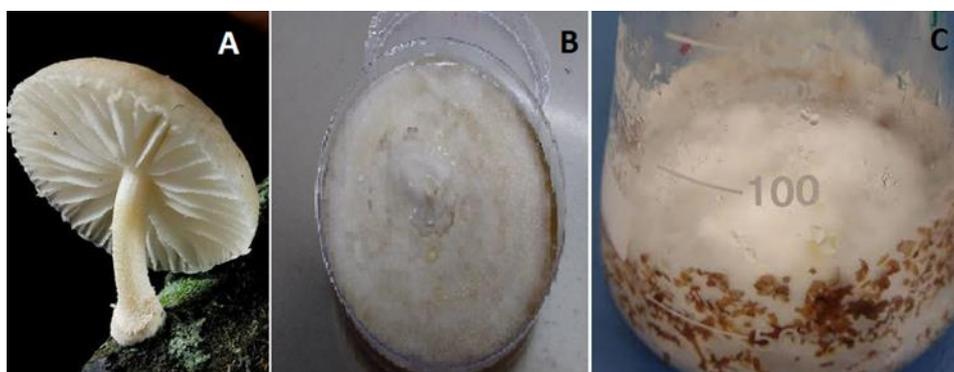


Fig.1: *Oudemansiella canarii*. A: corpo de frutificação; B: desenvolvimento de micélio em meio agarificado; C: desenvolvimento de micélio em cultivo em estado sólido. Fonte: A: <http://ismaeljsnature.blogspot.com.br/2013/08/oudemansiella-canarii-o-cogumelo.html>; B e C: fotos tiradas de cultivos realizados neste trabalho.

Grandes quantidades de corantes são utilizadas pelas indústrias, principalmente a têxtil. Aproximadamente 15% deles encontram-se em águas residuais (MOTA et al., 2015) o que torna esses efluentes tóxicos e sua liberação no meio ambiente indesejável devido a efeitos nocivos como atividade carcinogênica e/ou a natureza mutagênica do corante. Eles podem ser removidos da natureza por métodos físicos, químicos ou biológicos, sendo os biológicos mais interessantes uma vez que as transformações enzimáticas são facilmente controladas, possuem impacto ambiental mínimo além de consumir baixo nível de energia. Os corantes antraquinônicos, como o Azul brilhante de Remazol R, são mais resistentes à degradação devido à sua estrutura aromática fundida (PERLATTI et al., 2012).

A descoloração de efluentes por diferentes fungos da podridão branca, como o *Fusarium* e *Aspergillus*, abriram caminho para prospecção de novos microrganismos

capazes de degradar xenobióticos (PERLATTI et al., 2012). Logo, esse trabalho descreve a otimização das condições de cultivo do *Oudemansiella canarii*, sua produção e caracterização parcial de lacase e avaliação preliminar dessa enzima na descoloração do corante sintético Azul brilhante de Remazol R (RBBR).

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) foi comprado da Sigma (Jurubatuba, SP, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados também possuem alto grau de pureza.

Microrganismo e preparo do inóculo

O fungo ligninolítico *Oudemansiella canarii* utilizado pertence à Coleção de Basidiomicetos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá. O isolado de *Oudemansiella canarii* foi gentilmente cedido pela EMBRAPA-FLORESTAS, Colombo, PR. Para manutenção do fungo em laboratório, repiques sucessivos são realizados em ágar extrato de Malte (Glicose 2%, extrato de malte 2%, peptona 0,1% e ágar 2%). Discos miceliais de 10 mm de diâmetro foram obtidos das placas de Petri cobertas por micélio e utilizados como inóculo.

Resíduos agro-industriais

Três resíduos foram utilizados como substrato sólido da FES: bagaço de cana, farelo de trigo e serragem de eucalipto, sendo puros ou combinados, em diferentes proporções. O bagaço de cana foi gentilmente cedido pela Usina Santa Terezinha (Maringá, PR, Brasil) e a serragem de eucalipto pela EMBRAPA-FLORESTAS (Curitiba, PR, Brasil). O farelo de trigo foi obtido em comércio local.

Condições de cultivo

A FES foi utilizada para cultivar o fungo e avaliar sua produção do extrato bruto rico em lacase utilizando diferentes fontes de carbono. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 5 g de substrato misturados com 20 mL de meio mineral Vogel 2% (VOGEL, 1956) a fim de obter uma umidade inicial de 80%. Cada frasco foi então esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos e inoculado com três discos miceliais (10 mm de diâmetro). Bagaço de cana (BC), farelo de trigo (FT), serragem de

eucalipto (SE) com FT (4:1), BC com FT (4:1) e BC com FT (1:1) foram os substratos utilizados. Os cultivos foram desenvolvidos no escuro, sob condições estacionárias a 28 °C por períodos variados de tempo. Os parâmetros avaliados foram o substrato utilizado, a umidade inicial do cultivo e o período de incubação.

Extração da enzima

Após o período de incubação, 20 mL de água destilada gelada foram adicionadas a cada frasco que, foram mantidos sob agitação leve por 20 minutos. O conteúdo do Erlenmeyer foi macerado e filtrado em gaze. Os materiais insolúveis foram eliminados por centrifugação a 8.000 rpm por 12 minutos à 4 °C e o sobrenadante (extrato bruto enzimático) foi mantido a -20 °C até seu uso.

Determinação das atividades enzimáticas

Lignina peroxidase (LiP), peroxidase dependente de manganês (MnP), peroxidase versátil (VP) e lacase (lac) foram avaliadas conforme descrito previamente por MOTA et al., (2015). A atividade da lacase (EC 1.10.3.2) foi mensurada com 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) em 50 mM de tampão acetato de sódio (pH 5.0). A oxidação do ABTS foi determinada pelo aumento da absorbância a 420 nm ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As atividades enzimáticas foram determinadas a 40 °C e os resultados foram expressos em unidades enzimáticas internacionais.

A atividade da peroxidase dependente de manganês (MnP; EC 1.11.1.13) foi mensurada espectrofotometricamente, seguindo a oxidação de MnSO_4 1 mM em tampão malonato de sódio 50 mM (pH 4.5) na presença de H_2O_2 0.1 mM. Os íons manganês formam um complexo com malonato que absorve a 270 nm ($\epsilon = 11,590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade da Lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) foi determinada espectrofotometricamente a 310 nm, através da medição da formação de veratraldeído dependente de H_2O_2 ($\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a partir de álcool veratílico também a 40 °C.

Caracterização parcial da lacase bruta: influência do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima.

O efeito do pH sobre a atividade da enzima livre foi avaliado variando-se o pH do meio reacional entre 2,0 e 7,0. O efeito da temperatura sobre a atividade da enzima livre foi determinado com ensaios enzimáticos à diferentes temperaturas de reação (30 a 65 °C) em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5.0). Para determinar a estabilidade térmica, o

extrato bruto obtido nas condições ótimas de cultivo foi incubado por uma hora a diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60°C) e a atividade remanescente foi quantificada em diferentes tempos (0 a 60 minutos).

Eletroforese e Zimograma

Uma SDS-PAGE foi realizada conforme Laemmli, (1970). Para detectar a atividade da lacase em gel de poliacrilamida depois da eletroforese, lavou-se o gel com uma solução de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5.0) e isopropanol 1:1 por 30 minutos e depois, por mais 30 minutos com tampão acetato para remover o SDS e fixar as proteínas no gel. O gel lavado foi transferido para uma placa de Petri com uma camada de ágar com ABTS (0,02 g de ABTS, 0,4 g de ágar e 40 mL de água). Esse esquema foi incubado a 25 °C até a aparição de bandas verdes. A massa molecular aparente da lacase foi calculada em comparação com a mobilidade eletroforética de um marcador protéico padrão: albumina de soro bovino (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), pepsina (34,7 kDa), tripsinogênio (24 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa) e citocromo c (12,6 kDa). As bandas protéicas do padrão foram coradas com o corante Coomassie Blue R.

Determinação dos parâmetros cinéticos do extrato bruto de lacase

Para determinar os parâmetros cinéticos (constante de Michaelis-Menten, K_M , e velocidade máxima, V_{max}), a atividade da lacase foi dosada avaliada em diferentes concentrações do substrato ABTS. As condições experimentais utilizadas foram temperatura de 40°C e pH 5.0 (tampão acetato 50 mmol/L).

Aplicações tecnológicas das lacases de *O. Canarii*

A capacidade da lacase produzida de descolorir o corante sintético antraquinônico Azul brilhante de Remazol R (RBBR; Figura 2) foi avaliada seguindo metodologia já padronizada em nosso laboratório e descrita em BOER et al., (2004). As reações de oxidação enzimática do corante sintético têxtil foram conduzidas a 40 °C, em tampão acetato de sódio, pH 5.0, utilizando o corante RBBR (150 ppm) e diferentes concentrações de extrato bruto enzimático na presença ou não dos mediadores acetilacetona e ácido violúrico. Nos ensaios sem mediadores o volume final de reação foi de 10 mL sendo 1,0 mL de enzima para cada 9,0 mL de corante diluído em tampão (concentração final do corante igual a 150 ppm). Foram testados extratos enzimáticos em diferentes concentrações (3,2 U/mL, 1,6 U/mL, 0,8 U/mL e 0,4 U/mL). Nos ensaios com mediadores o volume final também foi de 10 mL sendo 8,0 mL da mistura corante/tampão (150 ppm), 1 mL de

enzima (0,4 U/mL) e 1 mL de mediador. Os mediadores foram testados em duas concentrações finais diferentes: 2,5 mM e 5,0 mM para o ácido violúrico e 6,25 mM e 12,5 mM para a acetilacetona. No controle, adicionou-se água no lugar do extrato enzimático.

As misturas reacionais foram periodicamente introduzidas na cubeta de espectrofotômetro e as absorbâncias do corante foram medidas. O acompanhamento do percentual de descoloração foi feito no comprimento de onda máximo do RBBR (595 nm). Uma comparação entre as curvas de absorção espectral no visível (400 a 700 nm) do corante antes e após a ação das lacases na ausência e presença de mediadores foi realizada.

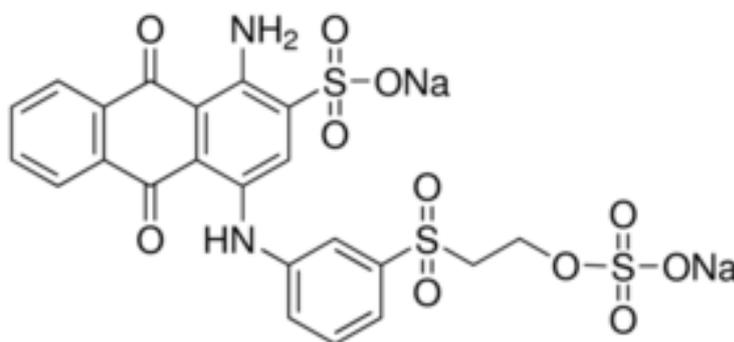


Figura 2: Estrutura química do corante antraquinônico Azul brilhante de remazol R (RBBR). Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r8001?lang=pt®ion=BR>

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de enzimas ligninolíticas pelo *Oudemansiella canarii* por fermentação em estado sólido

A partir do extrato bruto, altas concentrações de lacase foram detectadas (atividades acima de 20000 U/L) porém nenhuma atividade de Mn peroxidase ou de lignina peroxidase foram detectadas.

Influência da biomassa e do tempo na produção de lacase pelo *Oudemansiella canarii*

O resultado mostrado na Figura 3 aponta que, dentre os testados, o melhor substrato para produção de lacase por *Oudemansiella canarii* foi o FT + BC na proporção de 1:4, e a maior atividade obtida (7.997,33 U/L) foi em 10 dias de cultivo. A partir desse resultado, foram testadas outras possibilidades de substratos: farelo de trigo puro, bagaço de cana

puro e farelo de trigo com bagaço de cana na proporção de 1:1. Os tempos de interrupção de cultivo também foram diferentes: 5, 10, 15 e 20 dias, conforme mostra a Figura 4.

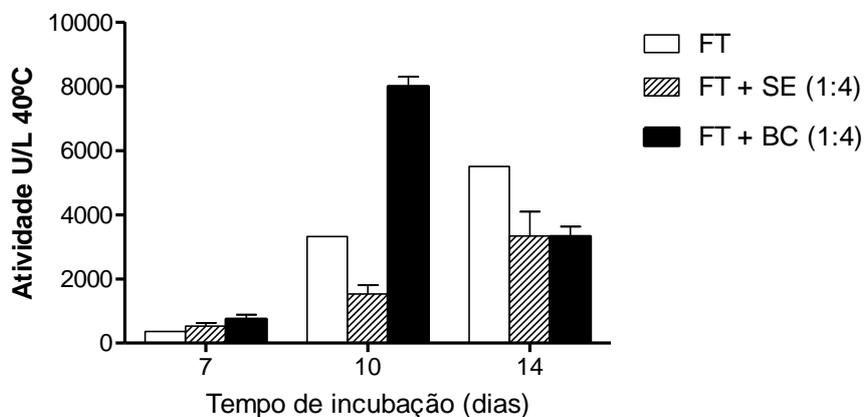


Figura3: Produção de lacase por *Oudemansiella canarii* em cultivo em estado sólido utilizando diferentes resíduos lignocelulósicos como substrato. FT=farelo de trigo; SE= serragem de eucalipto; BC = bagaço de cana.

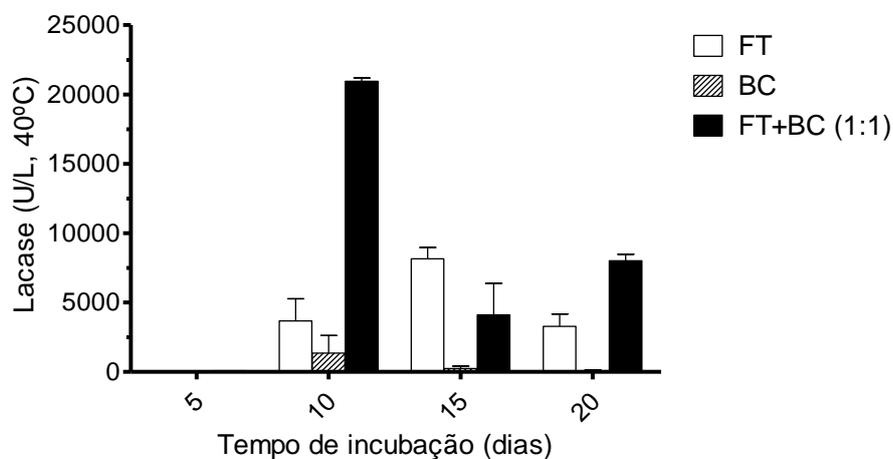


Figura 4: Efeito do tempo de cultivo na produção de lacase por *Oudemansiella canarii* em cultivos em estado sólido utilizando diferentes resíduos lignocelulósicos como substrato. FT=farelo de trigo; BC=bagaçõ de cana.

A Figura 4 indica a influência do tempo de incubação na produção de lacase pelo fungo *Oudemansiella canarii*. O presente estudo revelou que a produção de lacase atingiu maior atividade (20.951,25 U/L) em 10 dias de incubação com substrato composto de farelo de trigo e bagaço de cana (1:1). Em tempos maiores que 10 dias, a atividade enzimática diminuiu. Tal diminuição pode estar relacionada à desnaturação da enzima

provocada pela interação com outros constituintes do meio ou ainda, devido à depleção de nutrientes que estimulam a produção dos metabólitos secundários, resultando em menor rendimento da enzima (MEGHAVARNAM & JANAKIRAMAN, 2017).

Enquanto que a maior produção de lacase obtida nas condições desse trabalho, com o *Oudemansiella canarii*, foi no décimo dia de cultivo, Ergun & Urek (2017) relataram maior atividade de lacase produzida por *Pleorotus ostreatus* no décimo sétimo dia de cultivo em casca de batata (6708.3 U/L). Outro exemplo é o de Bazanella et al. (2013) que cultivou *Pleorotus pulmonaris* em diferentes substratos como o bagaço de cana, farelo de trigo e casca de abacaxi e, em dez dias de incubação obteve atividade de lacase igual a 640.0 U/L, 830.0 U/L e 1400.0 U/L, respectivamente. MOTA et al. (2015) relatou que a produção máxima de lacase por *Ganoderma lucidum* cultivado em resíduo de maracujá foi no décimo quarto dia (acima de 10000.0 U/L).

Efeito da umidade inicial na produção da lacase

Para avaliar o efeito da umidade no crescimento do *Oudemansiella canarii* os cultivos foram realizados utilizando como substrato FT+BC (1:1) e a umidade inicial variou entre 75, 80 e 83%.

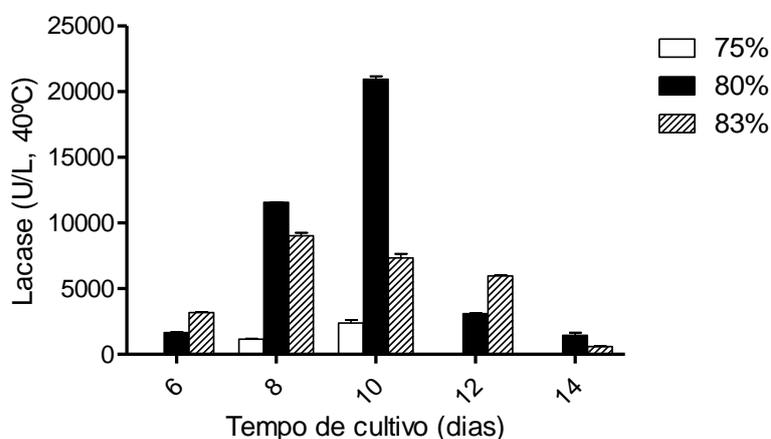


Figura 5: Efeito da umidade inicial e do tempo de cultivo na produção de lacase por *Oudemansiella canarii* em cultivo em estado sólido utilizando FT + BC (1:1) como substrato. A umidade inicial variou entre 75, 80 e 83%.

A Figura 5 mostra a influência da umidade inicial na produção de lacase por *Oudemansiella canarii*. Dentre os fatores importantes para o crescimento microbiano e para a produção enzimática em FES, a umidade inicial é um fator crítico que influencia tanto no crescimento quanto na biossíntese e secreção de diferentes metabólitos

(MEGHAVARNAM & JANAKIRAMAN, 2017). Quando a umidade inicial foi de 75%, em todos os tempos de incubação, as atividades enzimáticas foram menores do que os outros teores de umidade testados. Umidades abaixo da necessária para o microrganismo normalmente leva a menores atividades enzimáticas e isso pode estar relacionado a solubilidade reduzida dos nutrientes do substrato sólido e restrição do crescimento fúngico, diminuindo assim o rendimento enzimático. Quando a umidade foi de 80%, a atividade enzimática aumentou, quando comparada a umidade de 75% e atingiu o máximo em 10 dias de incubação (20.951,25 U/L). Na maioria dos tempos, a umidade de 85% promoveu atividades menores que a umidade de 80%. Essa diminuição de atividade conforme se aumenta a umidade pode estar relacionada à diminuição da porosidade e aglomeração de partículas, limitando assim a transferência de oxigênio (MEGHAVARNAM & JANAKIRAMAN, 2017).

Os extratos brutos obtidos sob as melhores condições (substrato FT+BC 1:1, tempo de cultivo de 10 dias e umidade inicial igual a 80%) foram utilizados nos experimentos de caracterização parcial da enzima.

Caracterização parcial da lacase de *O. canarii*

Determinação do pH ótimo e da temperatura ótima

O efeito do pH e da temperatura na atividade da lacase produzida por *Oudemansiella canarii* aparece na Figura 6, A e B, respectivamente.

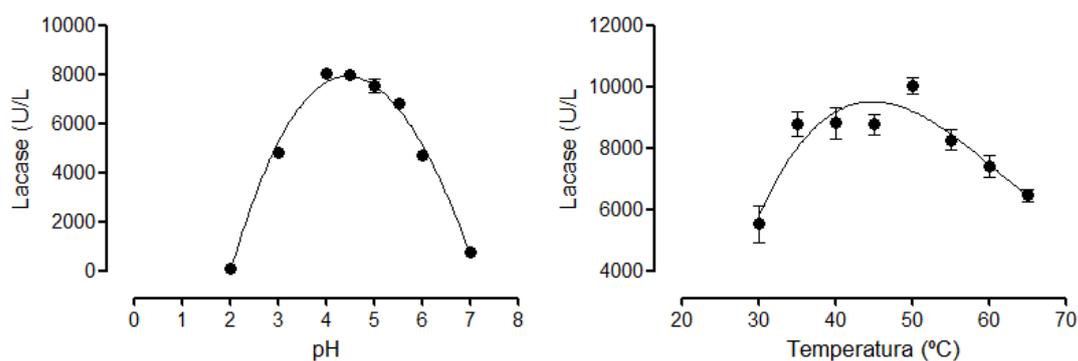


Figura 6: Efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade da lacase de *Oudemansiella canarii*.

Em relação ao pH, a enzima apresentou maiores atividades em valores entre 4 e 5. Quanto a temperatura, as maiores atividades de lacase obtidas foram em temperaturas entre 35 a 55 °C, sendo a maior atividade (9856,8 U/L) em 50 °C. Em temperaturas acima da

temperatura ótima, a atividade enzimática caiu, provavelmente devido a desnaturação da enzima em altas temperaturas.

Termoestabilidade da lacase de *O. canarii*

Para avaliar a estabilidade térmica da lacase de *Oudemansiella canarii*, a atividade foi dosada de quinze em quinze minutos em diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60 °C). Nos primeiros quinze minutos de reação, a atividade enzimática a 30 e a 40 °C diminuiu cerca de 21% enquanto que, a 50 °C, a atividade diminuiu 35,62% e a 60 °C, 75,67%. Nos demais tempos, a atividade a 30 e a 40 °C diminuiu relativamente pouco quando comparada a atividade da enzima a 50 e 60 °C após uma hora de reação. Logo, a enzima é pouco estável a 50 e 60 °C e capaz de manter uma certa atividade a 30 e 40°C. Os ensaios de determinação de pH e temperatura ótima e de termoestabilidade foram realizados utilizando-se 21.000 U/L da enzima.

Os resultados do teste de termoestabilidade se encontram na figura 7.

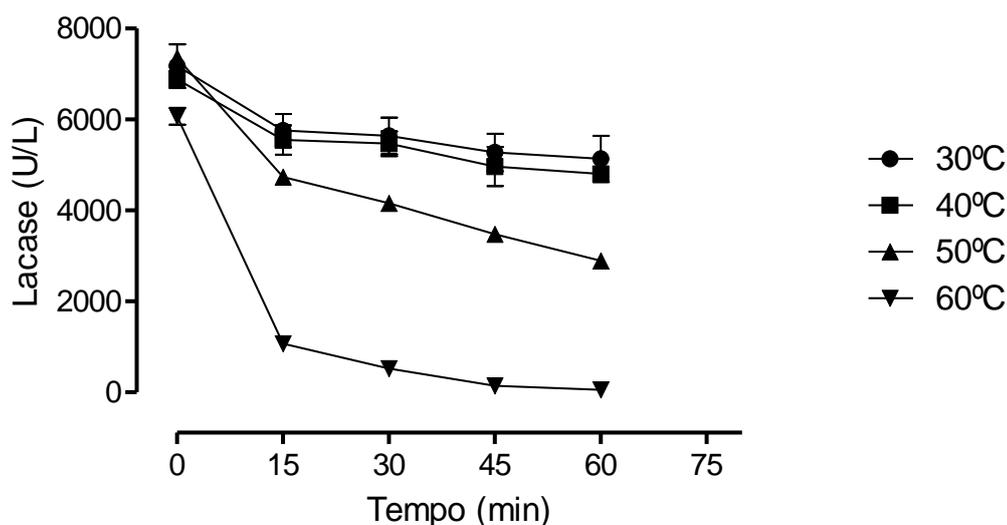


Figura 7: Estabilidade térmica da lacase de *Oudemansiella canarii* por uma hora em diferentes temperaturas

Eletoforese e Zimograma

A partir da eletroforese seguida por zimograma foi possível determinar o peso molecular da lacase produzida por *Oudemansiella canarii* nas condições de cultivos escolhidas para esse trabalho. O peso molecular aparente foi de 31,4 kDa (Figura 8).

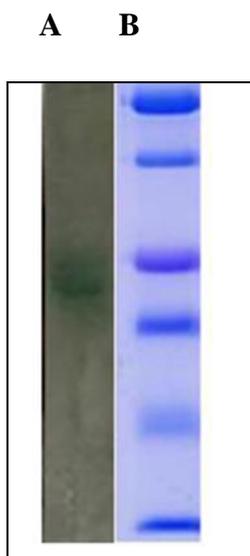


Figura 8: Zimograma após uma SDS-PAGE da lacase de *Oudemansiella canarii*, visualizada com ABTS. A: lacase (banda verde) do *Oudemansiella canarii* em gel com ABTS. B: padrões (Sigma) utilizados como referência de peso molecular: albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), pepsina (34,7 kDa), tripsinogênio (24 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa) e citocromo c (12,6 kDa). As bandas protéicas do padrão foram coradas com Coomassie Blue R.

Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos, K_M e V_{max} foram obtidos ao aplicar os valores experimentais à equação de Michaelis-Menten no programa Graph Prism (Figura 9). O valor do K_M foi de 98,96 mmol/L e V_{max} foi igual a 13744 $\text{mg.L}^{-1} \text{min}^{-1}$.

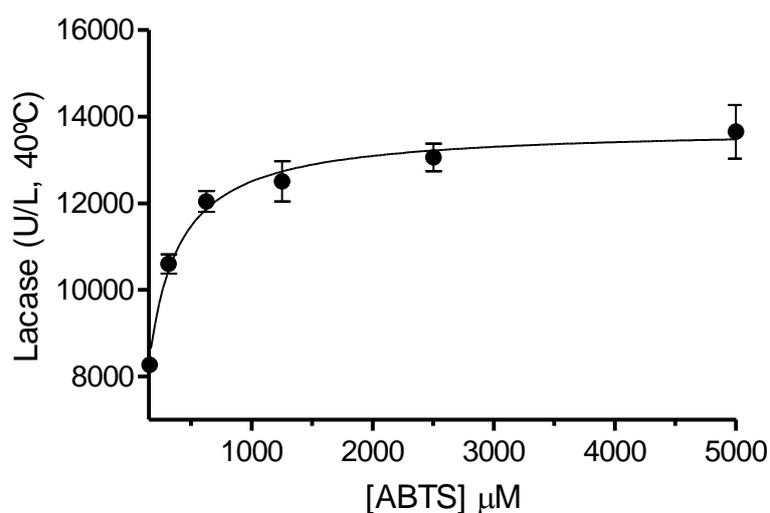


Figura 9: Efeito da concentração do substrato ABTS na atividade da lacase de *Oudemansiella canarii*.

Avaliação preliminar da descoloração do corante sintético RBBR por lacase de *Oudemansiella canarii*.

A lacase do *Oudemansiella canarii* foi eficiente na descoloração do RBBR uma vez que a solução, com o passar do tempo da reação ficou menos colorida. Os ensaios iniciais foram realizados sem mediador, com diferentes concentrações enzimáticas (Figura 10). Após 5 horas de reação, em meio reacional contendo lacase, o extrato puro (3,2 U/mL) promoveu uma descoloração de 91% do corante. Quando 0,4 U/mL de lacase estava presente no meio reacional, uma descoloração de 60,5% foi observada após 5 h.

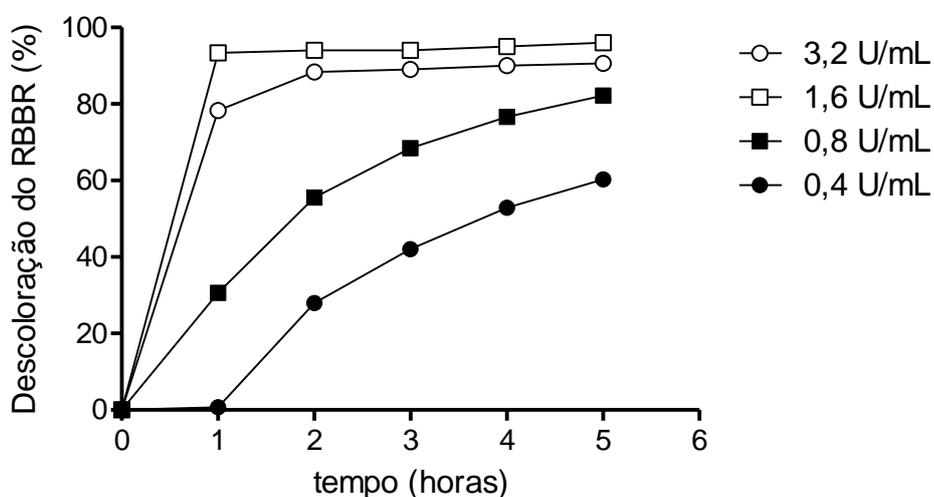


Figura 10.: Descoloração do corante RBBR em meio reacional contendo diferentes atividades de lacase.

Para avaliar se a adição de mediadores sintéticos poderia aumentar a ação de descoloração da lacase, o experimento foi conduzido utilizando-se ácido violúrico e acetilacetona (Fig. 11).

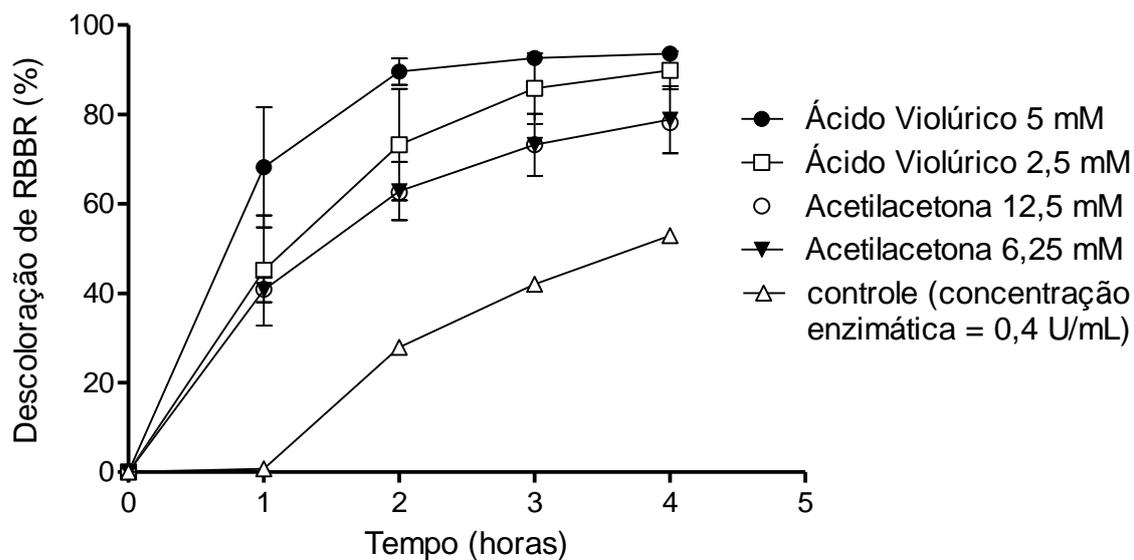


Figura 11: Efeito dos mediadores ácido violúrico e acetilacetona na descoloração de RBBR pela lacase de *O. canarii*.

Como pode ser observado na Figura 11, tanto o ácido violúrico quanto a acetilacetona aumentaram significativamente a descoloração em todos os tempos de reação. A Tabela 1 compara a descoloração do RBBR pela lacase de *O. Canarii* com as descolorações do mesmo corante conduzidas com lacases de outros microrganismos. Pode-se observar que a descoloração do RBBR pela lacase de *O. Canarii* compara-se com as descolorações obtidas com as lacases de outros microrganismos, fungos (incluindo fungos da podridão branca da madeira) e cianobactérias.

Tabela 1: Comparação da capacidade de lacases de diferentes fontes na descoloração do corante Azul Brilhante de Remazol R

Microorganismo	Enzima	Condições de descoloração	Resultado da descoloração	Referência
<i>Aspergillus</i> sp	Formulação comercial de lacase (Novo Nordisk)	pH 5,0 a 30 °C; [RBBR]= 20 mg/mL, tampão fosfato 50 mM, sob agitação, na presença ou ausência de mediador (HBT, hidroxibenzo-triazol, 0,12%).	72% em 1 h 100% em 1 h na presença do mediador HBT	Soares et al., 2001
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Extrato bruto	pH 4,5 a 30 °C [RBBR]= 50 µg/L, 2 U/mL de lacase, tampão acetato 20 mM, sob agitação	70% em 4 h	Palmieri et al., 2005
<i>Trametes trogii</i>	Fração purificada	pH 5,0 a 30 °C, [RBBR]=200 mg/L; lacase: 0,2 U/mL, tampão acetato 20 mM	72% em 1 h	Mechichi et al., 2006
<i>Cerrena</i> sp HYB07	Extrato bruto	pH 6,0 a 25 °C, [RBBR]=100 mg/L; lacase: 2 U/mL	>90% em 40 min.	Yang et al., 2016
<i>Spirulina platensis</i> CFTRI	Extrato bruto	pH 6,0 a 30 °C; [RBBR]= 100 mg/mL; lacase 1,5 U/mL; tampão citrato 50 mM; ausência e presença de mediador (HBT 0,1 mM).	7,5% em 4 h 15,4% em 4 h	Afreen et al., 2017
<i>Oudemansiella canarii</i>	Extrato bruto	pH 5,0 a 40 °C; agitação; [RBBR]= 150 ppm (150 mg/L), tampão acetato; lacase 0,4 U/mL, na ausência e presença de mediadores	60,5% em 5 h sem mediador; 95,8% em 2 h com ácido violúrico 5 mM; 70,1% em 2 h com acetilacetona 6,25 mM	Este trabalho

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que *Oudemansiella canarii* cultivado em condições em estado sólido utilizando como substrato uma mistura de farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar produz lacase como principal enzima ligninolítica. Esta lacase foi eficiente na descoloração do corante Azul brilhante de remazol R. Os mediadores sintético acetilacetona e ácido violúrico significativamente aumentaram a descoloração do RBBR. Estes achados sugerem que o fungo *Oudemansiella canarii* e sua enzima lacase podem ser utilizados em processos de biorremediação.

REFERÊNCIAS

- Afreen, S., Bano, F., Ahmad, N., Fatma, T. Screening and optimization of laccase from cyanobacteria with its potential in decolorization of anthraquinonic dye Remazol Brilliant Blue R. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **10**, 403-410 (2017)
- Balaraju, K., Park, K., Jahagirdar, S., Kaviyaran, V. Production of cellulase and laccase enzymes by *Oudemansiella radicata* using agro wastes under solid-state and submerged conditions. *Research in Biotechnology*. **1**, 21-28 (2010)
- Bazanella, G. C. S., Souza, D. F. S., Castoldi, R., Oliveira, R. F., Bracht, A., Peralta, R. M. Production of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus pulmonaris* in solid-state cultures and application in dye decolorization. *Folia Microbiol.* **58**, 641-647 (2013)
- Boer, C.G., Obici, I., Souza, C.G., Peralta, R.M. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. *Bioresource Technology*. **94 (2)**, 107-112 (2004)
- Bononi, V.L.R.; Oliveira, A.K.M., Quevedo, J.R., Gugliotta, A.M. Fungos macroscópicos do Pantanal do Rio Negro, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Hoehnea*. **35**, 489-511 (2008)
- Coelho-Moreira, J.S., Maciel, G.M., Castoldi, R.; Mariano, S.S.; Inácio, F.D.; Bracht, A; Peralta, R.M. Involvement of Lignin-Modifying Enzymes in the Degradation of Herbicides. *Herbicides-Advances in Research*. Intech, 165-188 (2013)
- Daniel, G.; Vole, J.; Kubatova, E. Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and

- Oudemansiella mucida*. Applied and Environmental Microbiology. **60**, 2524-2532 (1994)
- Delabona, P. S., Pirota, R. D. P. B., Codima, C. A., Tremacoldi, C. R., Rodrigues, A., Farinas, C. S. Using Amazon Forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. Biomass and Bioenergy. **37**, 243-250 (2012)
- Ergun, S. O., Urek, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. Annals of Agrarian Science. 1-5 (2017)
- Freitas, E.N., Bubna, G.A., Brugnari, T., Kato, C.G., Nolli, M., Rauen, T.G., Moreira, R. F. P. M., Peralta, R.A., Bracht, A., Souza, C.G.M., Peralta, R.M. Removal of bisphenol A and evaluation of ecotoxicity of degradation products by laccases from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*. Chemical Engineering Journal. **330**, 1361-1369 (2017)
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**, 680– 685 (1970)
- Magingo, F. S.; Oriyo, N. M.; Kivaisi, A. K.; Danell, E. Cultivation of *Oudemansiella tanzanica* nom. prov. on agricultural solid wastes in Tanzania. Mycologia. **96**, 197-204 (2004)
- Mechichi, T., Mhiri, N., Sayadi, S.: Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. Chemosphere. **64**, 998-1005 (2006)
- Meghavarnam, A. K., Janakiraman, S.: Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. **11**, 124-130 (2017)
- Mota, T. R., Kato, C. G., Peralta, R. A.; Bracht, A., Morais, G. R., Baesso, M. L., Souza, C. G. M., Peralta, R. M. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* laccase: evaluation of degradation products and toxicity. Water, Air, Soil and Pollution. **226**, 351 (2015)
- Palmieri, G., Giardina, P., Sannia, G. Laccase-Mediated Remazol Brilliant Blue R Decolorization in a Fixed-Bed Bioreactor. Biotechnology Progress. **21**, 1436-1441 (2005)

- Peralta, R.M., Silva, B.P., Correa, R.C.G., Kato, C.G., Seixas, F.A.V., Bracht, A. Enzymes from basidiomycetes: peculiar and efficient tools for biotechnology. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. 119-149 (2017)
- Perlatti, B., Silva, M. F. G. F., Fernandes, J. B., Forim, M. R. Validation and application of HPLC-ESI-MS/MS method for the quantification of RBBR decolorization, a model for highly toxic molecules, using several fungi strains. *Bioresource Technology*. **124**, 37-44 (2012)
- Rosa, L.H., Capelari, M. Agaricales fungi from Atlantic rain Forest fragments in Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. **40**, 846-851 (2009)
- Ruegger, M. J. S., Tornisielo, S.M.T., Bononi, V.L.R., Capelari, M. Cultivation of the edible mushroom *Oudemansiella canarii* (Jungh.) Höhn. in lignocellulosic substrates. *Brazilian Journal of Microbiology*. **32**, 211-214 (2001)
- Soares, G. M. B., Costa-Ferreira, M., Amorim, M. T. P. Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation. *Bioresource Technology*. **79**, 171-177 (2001)
- Souza, D. F., Tychanowicz, G.K., Souza, C.G.M., Peralta, R.M. Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonaris* on wheat bran solid state cultures. *Journal Basic Microbiology*. **46**, 126-134 (2006)
- Strong P. J., Claus, H. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. *Critical Review Environmental Science Technology*. **3(4)**, 373–434 (2011)
- Vogel, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microbial Genetics Bulletin*. **13**, 42–43 (1956)
- Xu, F., Li, Z., Liu, Y., Rong, C., Wang, S. Evaluation of edible mushroom *Oudemansiella canarii* cultivation on different lignocellulosic substrates. *Saudi Journal of Biological Sciences*. **23**, 607-613 (2016)
- Yang, J., Xu, X., Yang, X., Ye, X., Lin, J. Cross-linked enzyme aggregates of *Cerrena* laccase: Preparation, enhanced NaCl tolerance and decolorization of Remazol Brilliant Blue Reactive. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **65**, 1-7 (2016)