



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**UTILIZAÇÃO DE CASCA DE BANANA PARA A PRODUÇÃO DE  
LACASE POR *Pleurotus sajor-caju* CCB 019**

**Jamile Rosa Rampinelli**

**FLORIANÓPOLIS  
2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC**  
**CENTRO TECNOLÓGICO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA**  
**QUÍMICA**

**Jamile Rosa Rampinelli**

**UTILIZAÇÃO DA CASCA DE BANANA PARA A PRODUÇÃO DE**  
**LACASE POR *Pleurotus sajor-caju* CCB 019**

Tese submetida ao programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.

Área de concentração: Processos Biotecnológicos

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisabeth Wisbeck

**Florianópolis**  
**2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da  
UFSC.

Rampinelli, Jamile Rosa

Utilização da Casca de Banana para a Produção de Lacase por *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 / Jamile Rosa Rampinelli; orientador, Agenor Furigo Jr. ,  
coorientadora, Elisabeth Wisbeck. - Florianópolis, SC, 2016.

132 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro  
Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. *Pleurotus sajor-caju*. 3. lacase. 4. resíduos  
agroindustriais. I. Furigo Jr., Agenor. II. Wisbeck, Elisabeth. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
IV. Título.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**



A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida nos laboratórios da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, em Joinville, SC.



Dedico este trabalho

Ao meu marido, meus pais e meus irmãos, pelo incentivo, compreensão e imenso carinho em todos os momentos.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Agenor Furigo Jr pela orientação prestada durante a realização deste trabalho.

À Coorientadora Dr<sup>a</sup> Elisabeth Wisbeck pelo compromisso, dedicação e orientação deste trabalho.

Às professoras Dr<sup>a</sup> Mariane Bonatti Chaves, Dr<sup>a</sup> Marcia Luciane Lange Silveira e Dr<sup>a</sup> Sandra Aparecida Furlan meu mais profundo e sincero agradecimento pelo incentivo, dedicação e apoio profissional.

À banca examinadora por aceitar revisar este trabalho e participar da banca de defesa desta tese.

Aos alunos Josnel G. de Carvalho, Thaís S. Theodoro, Mahara P. de Melo, Ana Paula Coelho, Jaiane Seganfredo, Auriciane Arbigaus, pelo trabalho em conjunto realizado em laboratório.

À Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, pelo apoio técnico e financeiro.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente apoiaram a realização deste trabalho, meu muitíssimo obrigado.



## RESUMO

Fungos do gênero *Pleurotus* são conhecidos como produtores de lacases. Esta enzima tem vasta aplicação nas indústrias de bebidas, alimentos, têxteis, bem como na degradação diversos de poluentes ambientais. A fim de se minimizar os custos de produção desta enzima, diversos resíduos agroindustriais, normalmente disponíveis na região de produção, podem ser utilizados na formulação de meios de cultivo. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivos (a) caracterizar quimicamente os resíduos lignocelulósicos água de imersão de folhas secas de bananeira e pó de cascas de banana; (b) estudar a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju*, em frascos agitados e biorreator, utilizando resíduos da bananicultura na composição do meio de cultivo; (c) avaliar a influência da velocidade de agitação sobre a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju*; (d) caracterizar a enzima produzida; (e) avaliar a eficácia do caldo enzimático bruto sobre a degradação de bisfenol-A. Os experimentos em frascos agitados foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultivo inoculados com dois discos de ágar de 12 mm contendo micélio fúngico. Os frascos foram mantidos a 30 °C e agitação de 110 min<sup>-1</sup>, por 15 dias. Os experimentos em biorreator foram realizados em modelo BIOSTAT B da marca B. BRAUN com volume de trabalho de 4 L, sendo o inóculo 10% deste volume. O pH inicial foi ajustado em 6,0, a temperatura fixada em 30 °C, a aeração em 0,3 vvm e a velocidade de agitação em 100, 350 e 500 min<sup>-1</sup>, dependendo do experimento. Os resíduos água de imersão de folhas secas de bananeira e pó de cascas de banana apresentaram relação C:N iguais a 13,8 e 16,9, respectivamente. Os percentuais de cinzas foram 28,6 e 12,8% para água de imersão e pó de cascas de banana, respectivamente. O meio de cultivo OXI, formulado com resíduos da bananicultura, mostrou-se adequado para a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju*, sendo os maiores valores de atividade encontrados nos testes em frascos agitados (60 g L<sup>-1</sup> pó de cascas de banana) e em biorreator (45 g L<sup>-1</sup> pó de cascas de banana e 350 min<sup>-1</sup>) iguais a 2.416 e 1.850 U L<sup>-1</sup>, respectivamente. As atividades obtidas utilizando-se velocidades de agitação 100 e 500 min<sup>-1</sup> foram 200 e 9 vezes, respectivamente, inferiores às obtidas utilizando-se velocidade de 350 min<sup>-1</sup>. Encontrou-se como pH ótimo os valores de 2,5 e 3,0. Com relação à temperatura ótima, todas as temperaturas avaliadas (20, 30, 40 e 50 °C) apresentaram atividade relativa próxima a 100 %. Observou-se

maior estabilidade da enzima nos valores de pH 5 e 7; e temperatura de estabilidade na faixa de 20 a 40 °C. Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram 0,1 mM e 1,25 mM  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente. O caldo enzimático bruto foi capaz de degradar 100 % do bisfenol-A (500 mg  $\text{L}^{-1}$ ) em 48 h de incubação.

**Palavras Chaves:** *Pleurotus sajor-caju*, lacase, resíduos agroindustriais.

## ABSTRACT

Fungi of the *Pleurotus* genus are known as laccase producers. This enzyme is widely applied in the food, beverage and textile industries as well as in the degradation of various environmental pollutants. In order to minimize production costs for this enzyme, several agro-industrial wastes, normally available in the production area, may be used to formulate the culture media. Thus, the objectives of this study were to: (a) chemically characterize the lignocellulosic wastes: immersion water of dried banana leaves and banana peel powder; (b) study laccase production by *Pleurotus sajor-caju*, in shake flasks and bioreactor, using banana plantation wastes in the culture medium composition; (c) evaluate the influence of agitation speed on laccase production by *Pleurotus sajor-caju*; (d) characterize the enzyme produced; (e) evaluate the efficacy of the crude enzymatic broth on bisphenol-A degradation. The experiments in shake flasks were carried out in Erlenmeyer 500 mL flasks containing 100 mL of culture medium inoculated with two 12 mm agar discs containing fungal mycelium. The flasks were kept at 30 °C with 110 min<sup>-1</sup> agitation, for 15 days. The experiments in bioreactor were carried out in a B. BRAUN BIOSTAT B fermenter with 4 L work volume, with inoculum being 10 % of this volume. Initial pH was adjusted to 6.0, temperature fixed at 30 °C, aeration at 0.3 vvm and agitation speed at 100, 350 and 500 min<sup>-1</sup>, depending on the experiment. The water wastes from the immersion of dried banana leaves and banana peel powder had a C:N ratio equal to 13.8 and 16.9, respectively. Ash percentages were 28.6 and 12.8 % for immersion water and banana peel powder, respectively. The OXI culture medium, formulated with banana plantation wastes proved to be adequate for laccase production by *Pleurotus sajor-caju*, with the greatest activity values being found in tests with flasks agitated at (60 g L<sup>-1</sup> banana peel powder) and in bioreactor (45 g L<sup>-1</sup> banana peel powder and 350 min<sup>-1</sup>) equal to 2,416 and 1,850 U L<sup>-1</sup>, respectively. The activities obtained using 100 and 500 min<sup>-1</sup> agitation speeds were 200 and 9 times, respectively, lower than those obtained using a speed of 350 min<sup>-1</sup>. The values of 2.5 and 3.0 were considered ideal for the pH. In relation to ideal temperature, all evaluated temperatures (20, 30, 40 and 50 °C) showed activity relatively close to 100 %. Greater enzyme stability was observed with pH values of 5 and 7; and temperature stability in the range of 20 to 40 °C. The K<sub>m</sub> and V<sub>máx</sub> values were 0.1 mM and 1.25 mM min<sup>-1</sup>, respectively. The

crude enzymatic broth was able to degrade the bisphenol-A ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) 100 % in 48 h incubation.

**Keywords:** *Pleurotus sajor-caju*, laccase, agro-industrial wastes.

## NOMENCLATURA E SIMBOLOGIA

- ABTS – ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato)  
BPA – bisfenol-A  
BPF – bisfenol-F  
d – comprimento do passo  
DMP – 2,6- dimetoxifenol  
EDC – Endocrine Disrupting Compounds  
Gal – galactose  
Glc – glicose  
 $K_m$  – constante cinética de Michaelis-Menten  
 $L_0$  – atividade enzimática no início do processo  
Lac – lacase  
 $Lac_{máx}$  – atividade máxima de lacase  
 $L_m$  – atividade enzimática máxima obtida no cultivo  
Man – manose  
NP – nonilfenol  
OXI – meio contendo pó de cascas de banana, água de imersão de folhas secas de bananeira, glicose, tartarato de cobre e sulfato de cobre  
P – produtividade enzimática  
 $S_0$  – concentração de glicose no início do processo  
 $S_m$  – concentração de glicose no tempo do processo em que a atividade de lacase é máxima  
t – tempo  
TBBPA – tetrabromobisfenol-A  
TDA – meio de cultivo contendo trigo, dextrose e ágar  
 $t_p$  – tempo de cultivo em que a produtividade em lacase é máxima  
U – unidade internacional de atividade enzimática  
v – volume de amostra  
V – volume total da reação  
 $V_{máx}$  – velocidade máxima de reação  
Xyl – xilose  
 $Y_{L/S}$  – fator de conversão de glicose em atividade enzimática  
 $\epsilon$  – coeficiente de extinção molar



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação tridimensional da estrutura da isoenzima POXA1b da lacase proveniente de <i>P. ostreatus</i> .....	31
Figura 2 - Ciclo catalítico da lacase.....	32
Figura 3 - Classificação dos fungos .....	45
Figura 4 - Ciclo de vida de um basidiomiceto.....	46
Figura 5 - Esquema da função desempenhada pelas enzimas degradadoras de materiais lignocelulósicos.....	48
Figura 6 - <i>Pleurotus sajor-caju</i> encontrado na natureza.....	49
Figura 7 - Representação esquemática dos ensaios realizados no estudo de produção de lacase por <i>P. sajor-caju</i> .....	58
Figura 8 - Composição química da água de imersão de folhas secas de bananeira em termos de teor de matéria orgânica (%), carbono (%), nitrogênio total (%), proteína bruta (%), cinzas (%), composição monossacarídica (%), relação carbono/nitrogênio e pH.....	73
Figura 9 - Composição química das cascas de banana em termos de teor de hemicelulose (%), lignina (%), celulose (%), fibra bruta (%), nitrogênio (%), proteína (%), carboidratos totais (%), umidade (%), matéria orgânica (%), cinzas (%) e pH.....	74
Figura 10 - Valores médios $\pm$ desvio padrão de atividades de lacase ( $U L^{-1}$ ) obtidos com <i>P. sajor-caju</i> em meio de cultivo OXI 30.....	80
Figura 11 - Atividade de lacase (linha contínua), concentração de glicose (linha pontilhada) e pH (linha tracejada e pontilhada) em função do tempo (h) no cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em processo descontínuo simples, utilizando meio de cultivo OXI 30.....	82
Figura 12 - Valores médios $\pm$ desvio padrão de atividades de lacase ( $U L^{-1}$ ) obtidos com <i>P. sajor-caju</i> em meio de cultivo OXI 60.....	84
Figura 13 - Atividade de lacase (linha contínua), concentração de glicose (linha pontilhada) e pH (linha tracejada e pontilhada) em função do tempo (h) no cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em processo descontínuo simples, utilizando meio de cultivo OXI 45.....	88
Figura 14 - Atividade de lacase (linha contínua), concentração de glicose (linha pontilhada) e pH (linha tracejada e	

	pontilhada) em função do tempo (h) no cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em processo descontínuo simples, utilizando meio de cultivo OXI 45 e velocidade de agitação igual a 100 min <sup>-1</sup> .....	91
Figura 15 -	Atividade de lacase (linha contínua), concentração de glicose (linha pontilhada) e pH (linha tracejada e pontilhada) em função do tempo (h) no cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em processo descontínuo simples, utilizando meio de cultivo OXI 45 e velocidade de agitação igual a 500 min <sup>-1</sup> .....	92
Figura 16 -	Atividade relativa de lacase proveniente de <i>P. sajor-caju</i> em função do pH.....	96
Figura 17 -	Atividade relativa de lacase proveniente de <i>P. sajor-caju</i> em relação à temperatura.....	98
Figura 18 -	Cinética da estabilidade da lacase, proveniente de <i>P. sajor-caju</i> , em três valores de pH.....	99
Figura 19 -	Cinética da estabilidade da enzima lacase, proveniente do cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em meio de cultivo OXI 45, em diferentes valores de temperatura.....	101
Figura 20 -	Determinação de K <sub>m</sub> e V <sub>máx</sub> da lacsase obtida do cultivo de <i>P. sajor-caju</i> , em meio OXI 45.....	103
Figura 21 -	Percentual de degradação de bisfenol-A pelo caldo bruto contendo lacase proveniente de <i>P. sajor-caju</i> .....	105

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Patentes registradas no INPI, envolvendo à enzima lacase..38
- Tabela 2 – Área cultivada e produção da cultura da banana em Santa Catarina e na região de Joinville, em 2015.....55
- Tabela 3 – Valores máximos de atividade enzimática de lacase provenientes de diferentes espécies de *Pleurotus* obtidas por diferentes meios de cultivos, em frascos agitados.....86
- Tabela 4 – Valores médios  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros cinéticos obtidos do cultivo de *P. sajor-caju* em biorreator utilizando os meios de cultivos OXI 30 e OXI 45.....90
- Tabela 5 – Valores médios  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros cinéticos obtidos do cultivo de *P. sajor-caju* em biorreator utilizando velocidades de agitação 100, 350 e 500  $\text{min}^{-1}$ .....95
- Tabela 6 – Constantes cinéticas de lacases produzidas por fungos do gênero *Pleurotus*, utilizando diferentes substratos.....104



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
1.1 Objetivo geral.....	27
1.2 Objetivos específicos.....	27
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>29</b>
2.1 Enzimas.....	29
2.1.1 Lacases.....	29
2.1.2 Produção de lacase por fungos lignocelulotíficos.....	32
2.1.3 Aplicações.....	37
2.1.4 Caracterização da lacase.....	42
2.2 Fungos basidiomicetos.....	45
2.2.1 Gênero <i>Pleurotus</i> .....	48
2.2.2 Cultivo de <i>Pleurotus</i> .....	50
2.3 Resíduos lignocelulósicos.....	54
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
3.1 Descrição das etapas realizadas nos ensaios.....	57
3.2 Caracterização química.....	59
3.2.1 Obtenção das amostras.....	59
3.2.2 Teor de umidade e pH.....	59
3.2.3 Cinzas.....	59
3.2.4 Matéria orgânica.....	60
3.2.5 Carboidratos totais.....	60
3.2.6 Fibra bruta.....	60
3.2.7 Hemicelulose.....	61
3.2.8 Lignina.....	62
3.2.9 Celulose.....	63
3.2.10 Nitrogênio total.....	63
3.2.11 Composição monossacarídica.....	64
3.3 Micro-organismo e manutenção.....	65
3.4 Meios de cultivo.....	65
3.5 Condições de cultivo.....	66
3.5.1 Avaliação da produção de lacase em frascos agitados.....	66
3.5.2 Avaliação da produção de lacase em escala ampliada.....	66
3.5.3 Avaliação da influência da agitação sobre a produção de lacase.....	67
3.6 Caracterização da lacase.....	68
3.6.1 Determinação do pH ótimo e temperatura ótima.....	68
3.6.2 Estabilidade da enzima com o pH e a temperatura.....	68

3.7 Ensaio de degradação do bisfenol-A.....	69
3.8 Métodos analíticos.....	69
3.8.1 Concentração de glicose.....	69
3.8.2 Quantificação da atividade de lacase.....	70
3.9 Metodologias utilizadas para os cálculos cinéticos.....	71
3.9.1 Fator de conversão de glicose em lacase.....	71
3.9.2 Produtividade enzimática.....	71
3.9.3 Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ).....	71
3.10 Construção das curvas cinéticas e análises estatísticas.....	72
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
4.1 Caracterização química dos resíduos agroindustriais.....	73
4.2 Produção de lacase por P. sajor-caju.....	80
4.2.1 Produção de lacase em meio OXI 30.....	80
4.2.2 Produção de lacase em meio OXI 60 e em meio OXI 45...83	
4.2.3 – Influência da velocidade de agitação sobre a produção de lacase.....	91
4.4 Caracterização da lacase.....	96
4.4.1 Determinação do pH ótimo.....	96
4.4.2 Determinação da temperatura ótima.....	97
4.4.3 Estabilidade com o pH.....	99
4.4.4 Estabilidade com a temperatura.....	100
4.5 Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima de reo ( $V_{m\acute{a}x}$ ).....	102
4.6 Degradação do bisfenol-A.....	105
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>109</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>111</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>113</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As lacases são enzimas oxidativas que possuem aplicação em diversas áreas que vão desde a destoxificação de efluentes e resíduos das indústrias petroquímica, têxtil, alimentícia e de papel, biorremediação, remoção, precipitação ou transformação de compostos tóxicos e recalcitrantes. Desta forma, permitem a alteração das características de um determinado efluente ou resíduo, como aumento da sua biodegradabilidade ou diminuição da sua toxicidade, permitindo o tratamento posterior por processos biológicos convencionais ou a conversão destes em produtos de valor agregado, como drogas e cosméticos e ferramenta para diagnósticos médicos (HOFRICHTER, 2002; LIBARDI-JR *et al.*, 2011; JANUSZ *et al.*, 2013; ASGHER *et al.*, 2013). Sabe-se ainda, mais recentemente, do uso destas enzimas em diferentes aplicações ambientais (MIGLIORE *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2012; BALAN *et al.*, 2012; ASGHER *et al.*, 2013; CHANG e CHANG, 2014; HADIBARATA e KRISTANTI, 2014).

Fungos produzem uma grande variedade de metabólitos de interesse industrial tais como os antibióticos, enzimas, micotoxinas, vitaminas e polissacarídeos com atividade terapêutica (REDDY *et al.*, 2003; BONATTI *et al.*, 2004; GOMEZ *et al.*, 2007; ELISASHVILI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012; KNEZEVIC *et al.*, 2013; HADIBARATA e KRISTANTI, 2014). Dentre estes fungos, os fungos do gênero *Pleurotus* são capazes de crescer em uma grande variedade de resíduos agrícolas, degradando esses resíduos, ou seja, convertendo celulose, hemicelulose e lignina em compostos de menor peso molecular, os quais são utilizados para o seu crescimento. Neste processo produzem uma variedade de moléculas com atividade biológica destacando-se as enzimas celulases, hemicelulases, lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases (RAJARATHNAM *et al.*, 1992; BUSWELL *et al.*, 1996; BONATTI *et al.*, 2004; AGUIAR e FERRAZ, 2011; GUPTA *et al.*, 2013).

Lacases produzidas por basidiomicetos podem ser obtidas tanto por cultivo sólido, quanto por cultivo líquido. A produção de lacase por cultivo líquido apresenta algumas vantagens em relação ao cultivo sólido como maior possibilidade de controle de processo, menor tempo de cultivo (MARQUEZ-ROCHA *et al.*, 1999; ROSADO *et al.*, 2002; CUI e CHISTI, 2003; BETTIN *et al.*, 2011; TINOCO-VALÊNCIA *et al.*, 2014) e maior atividade de lacase (FENICE *et al.*, 2003). Neste tipo de cultivo, vários fatores merecem atenção a fim de se maximizar a

produção de lacase, como a composição do meio, temperatura, vazão de ar, velocidade de agitação e forma de condução do processo produtivo (BUSWELL *et al.*, 1996; MARQUEZ-ROCHA *et al.*, 1999; HESS *et al.*, 2002; MAJEAU, *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012; TINOCO-VALÊNCIA *et al.*, 2014; FERNANDEZ-ALEJANDRE *et al.*, 2016).

Apesar de se encontrar vasta literatura sobre a produção de lacases por fungos do gênero *Pleurotus*, apenas poucos estudos têm sido encontrados em relação à influência das condições de cultivo, principalmente em biorreator, sobre a produção de lacases por *Pleurotus sajor-caju*. E ainda assim, essas poucas informações apresentam-se muitas vezes divergentes, como dados de pH e temperatura ótimos para atividade da enzima, e valores de estabilidade da enzima com o pH e a temperatura, que são muitas vezes conflitantes, sendo estas informações extremamente importantes para a viabilidade de produção em maior escala quanto para decisão sobre o tipo de aplicação industrial.

Uma das principais limitações para as inúmeras aplicações industriais destas enzimas é o alto custo de produção (OSMA *et al.*, 2011; MANAVALAN *et al.*, 2013). Portanto, resíduos lignocelulósicos disponíveis na região de cultivo podem ser utilizados como substratos nas formulações dos meios de cultivo para a produção de enzimas, reduzindo os custos de produção e auxiliando na resolução dos problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza. A região nordeste do Estado de Santa Catarina produz grande quantidade de resíduos durante o cultivo e o processamento da banana, gerando grande quantidade de folhas secas de bananeira e de cascas de banana. Esses resíduos são definidos como fontes de carbono, mas também como indutores para a produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos (MUNOZ *et al.* 1997; ELISASHVILI *et al.*, 2009; LIBARDI-JR *et al.*, 2011; MANAVALAN *et al.*, 2013; JIN e NING, 2013; QUEVEDO-HIDALGO *et al.*, 2015).

Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju* em cultivo submerso utilizando resíduos da bananicultura no meio de cultivo adicionado de  $\text{CuSO}_4$ , em frascos agitados, determinar em escala ampliada os parâmetros cinéticos de produção de lacase e avaliar a influência da agitação mecânica sobre a produção da enzima, caracterizar a enzima em termos de pH ótimo e temperatura ótima, estabilidade com o pH e com a temperatura, determinar os valores de  $K_m$  e  $V_{m\text{áx}}$  e validar a eficácia do caldo enzimático bruto, conetendo lacase,

obtido dos cultivos em biorreator, na degradação do interferente endócrino bisfenol-A.

### **1.1 Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a utilização do pó de cascas de banana e da água de imersão na formulação do meio de cultivo para a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju* em cultivo submerso.

### **1.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar o pó de cascas de banana e a água de imersão de folhas secas de bananeira, resíduos agroindustriais utilizados na formulação do meio de cultivo;
- Avaliar a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju* em frascos agitados utilizando os resíduos agroindustriais no meio de cultivo;
- Determinar, em escala ampliada, os parâmetros cinéticos de produção da lacase;
- Avaliar a influência da agitação mecânica sobre a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju* em escala ampliada;
- Determinar a temperatura ótima e o pH ótimo para atuação da lacase produzida;
- Determinar a estabilidade da lacase produzida, em função do pH e da temperatura;
- Determinar a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima de reação ( $V_{máx}$ );
- Validar a eficácia do caldo enzimático bruto contendo lacase na degradação do interferente endócrino bisfenol-A.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Enzimas

Enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica e que estão presentes em todas as células vivas, onde exercem a função de catalisadores biológicos das reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo celular (LEHNINGER *et al.*, 1917; BON *et al.*, 2008). A complexa estrutura molecular enzimática é, majoritariamente, constituída por uma parte proteica que pode estar integrada a outras moléculas, como carboidratos e lipídios. São produzidas por todos os seres vivos, podendo ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas, com funções variadas (BON *et al.*, 2008).

Enzimas estão presentes em vários processos industriais, como nas indústrias têxtil, farmacêutica, de alimentos e de papel e celulose. O surgimento de novos campos de aplicação de enzimas, bem como o desenvolvimento de novas tecnologias que utilizem enzimas industriais, faz com que esta área seja de grande interesse científico. Segundo estudos realizados por analistas de mercado da Freedonia Group Incorporated (2016) a demanda mundial de enzimas crescerá 6,3% ao ano, representando US\$ 8,0 bilhões em 2016, refletindo uma recuperação contínua na economia mundial a partir da crise global de 2009. O mercado de enzimas está dividido em enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa) (MONTEIRO *et al.*, 2009).

#### 2.1.1 Lacases

Lacases comerciais, como a Denilite<sup>®</sup> da Novozymes estão sendo usadas na indústria têxtil para remoção do corante índigo, um processo que não danifica o tecido e que o deixa com aparência lavada ou manchada. A Novozymes ainda comercializa lacases sob os nomes comerciais Novozym<sup>®</sup> 51003 e Suberase<sup>®</sup> utilizadas como biossensor e no tratamento de rolhas de cortiça para envase de vinhos, respectivamente (PERALTA *et al.* 2004; ANSELMO *et al.*, 2008 *apud* BETTIN, 2010). A aplicação bem sucedida de lacases e o surgimento de

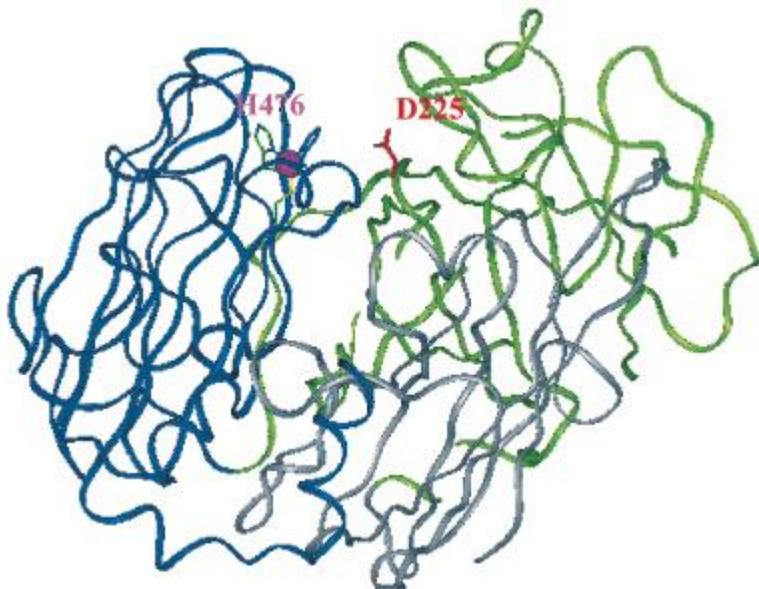
novos campos de aplicação, bem como o desenvolvimento de novas tecnologias que utilizem enzimas industriais, faz com que esta área seja de grande interesse científico e demande a produção de grandes quantidades de enzima a baixo custo.

As lacases são produzidas por diversos fungos, como os ascomicetos *Aspergillus*, *Neurospora* e *Podospora*, o deuteromiceto *Botrytis* e os basidiomicetos *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus* e *Trametes* (CARABAJAL *et al.*, 2012; JIN e NING, 2013; PARENTI *et al.*, 2013; UGIORO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013; FERNANDEZ-FUEYO *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2014; KUROSE *et al.*, 2014). Entre os fungos produtores de lacase, os basidiomicetos conhecidos por “fungos da podridão branca” são os mais eficientes na produção da enzima (LOMASCOLO *et al.*, 2003; COUTO e TOCA-HERRERA, 2007, BETTIN *et al.*, 2014).

Lacases (Lac) são polifenol-oxidases que contêm geralmente três átomos de cobre em seu centro catalítico e são também conhecidas como multicobre-oxidases (BALDRIAN, 2006).

A representação tridimensional da estrutura da isoenzima POXA1b da lacase proveniente do fungo *P. ostreatus* está apresentada na Figura 1 (GARZILLO *et al.*, 2001).

Figura 1 - Representação tridimensional da estrutura da isoenzima POXA1b da lacase proveniente de *P. ostreatus*, evidenciando os aminoácidos H476 e D225, além do cobre T1 (esfera violeta).

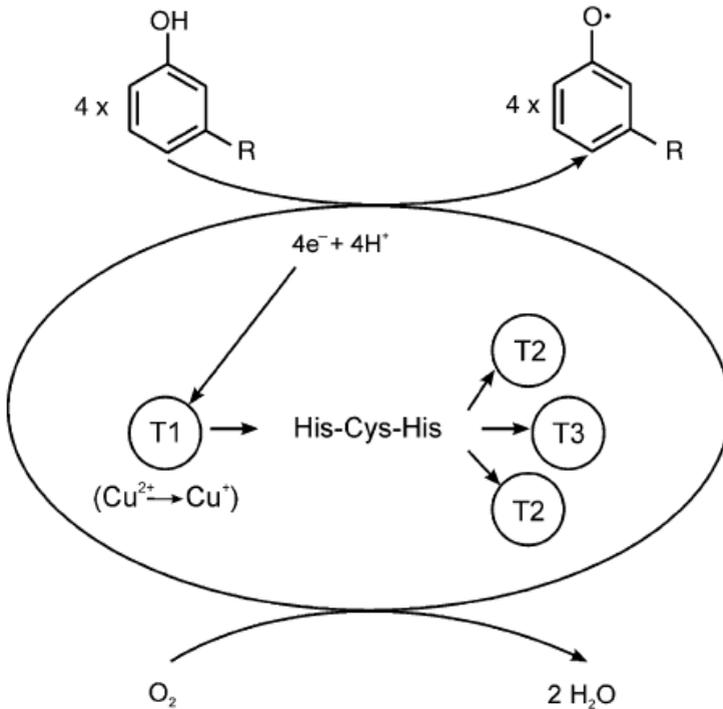


Fonte: GARZILLO *et al.* (2001).

Lacases são glicoproteínas capazes de catalisar reações de desmetilação, importantes em processos de biodegradação de cadeias poliméricas, com subsequente decomposição de macromoléculas de lignina pelo rompimento de anéis aromáticos (PERALTA *et al.*, 2004). Essas enzimas são capazes de catalisar a oxidação de compostos fenólicos, carreando elétrons que são utilizados na redução de oxigênio molecular a água. Além disso, catalisam reações de clivagem da ligação alquil-fenol, de ligações  $C\alpha-C\beta$  e de dímeros fenólicos de lignina, desmetoxilação, desmetilação, polimerização e despolimerização, entre outras (THURSTON, 1994; BALDRIAN, 2006).

Os substratos fenólicos são oxidados pelo cobre T1 e os elétrons são transferidos para T2 e T3 que, juntos, formam um centro trinuclear, onde o oxigênio molecular é reduzido à água, conforme apresentado na Figura 2 (BALDRIAN, 2006).

Figura 2 - Ciclo catalítico da lacase.



Fonte: BALDRIAN (2006).

### 2.1.2 Produção de lacase por fungos lignocelulotíticos

A atividade de lacase e o número de isoenzimas variam dependendo do meio e das condições de cultivo, da espécie fúngica e até mesmo da linhagem específica utilizada (ARMAS *et al.*, 2016). No entanto, existe uma complexidade em comparar resultados entre estes estudos. As atividades de lacases são medidas utilizando diferentes substratos e diferentes concentrações de substratos, tornando difícil saber a diferença entre as atividades enzimáticas relatadas. Segundo Baltierra-Trejo *et al.* (2015) os valores de atividade enzimática de lacase variam entre 3,5 e 484.000  $U L^{-1}$ . Segundo os autores essa grande variação, provavelmente, não está relacionada às propriedades das

enzimas, visto que existem inconsistências na definição e nos cálculos da atividade da enzima. Os artigos científicos atuais não divulgam a equação usada para o cálculo da atividade de lacase, por isso é muito difícil avaliar inconsistências nos relatórios publicados ou para saber como comparar os resultados, pois cálculos da atividade da enzima foram encontrados, pelo menos, em sete diferentes equações.

Ardon *et al.* (1996) elaboraram um extrato de talos de algodão por extração alcoólica em Soxhlet e estudaram a influência da adição deste extrato de talos no meio de cultivo de vários fungos, incluindo *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* e *Trametes versicolor* sobre a produção de lacase. A atividade da lacase aumentou à medida que aumentava a concentração do extrato e para *P. ostreatus* ( $0,5 \text{ U mL}^{-1}$ ), *P. pulmonarius* ( $0,9 \text{ U mL}^{-1}$ ) e *Trametes versicolor* ( $2,0 \text{ U mL}^{-1}$ ) as atividades aumentaram em, aproximadamente, 5, 3 e 12 vezes, respectivamente, na presença do extrato.

Munoz *et al.* (1997) avaliaram a influência dos indutores álcool veratrílico, veratrilaldeído, ácido vanílico, 2,5 xilidina, todos na concentração de 1 mM, comparados a  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de palha de trigo, acrescentados separadamente em um meio de cultivo contendo 56 mM de glicose e 22 mM de tartarato de amônio, sobre a produção de lacase por *P. eryngii*. A maior atividade de lacase ( $300 \text{ mU mL}^{-1}$ ) foi encontrada utilizando-se a palha de trigo como indutor, assim como, o tempo de cultivo para se alcançar a produção máxima, quando comparado aos outros indutores testados no trabalho.

Baldrian e Gabriel (2002) avaliaram a adição de metais e  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre a produção de lacase por *P. ostreatus* em meio de cultivo líquido. A adição de Ag, Hg, Pb, Zn e  $\text{H}_2\text{O}_2$  diminuíram a atividade de lacase, provavelmente devido a inativação da enzima pelos metais. A adição de 1mM de Cu aumentou em 8 vezes a atividade desta enzima quando comparado ao meio de cultivo controle, porém, influenciou negativamente o crescimento do fungo. Em nove dias de cultivo, o peso seco do meio contendo Cu ( $0,5$  a  $5 \text{ mM}$ ) na composição aumentou  $1,2$  a  $1,6 \text{ mg mL}^{-1}$ , enquanto o peso seco do meio controle aumentou  $3,1 \text{ mg mL}^{-1}$ . A adição de Cu aumentou a atividade de lacase independentemente do tempo em que o Cu foi adicionado. No entanto, quando adicionou-se Cu nos primeiros dias de cultivo, o aumento da atividade de lacase não foi imediato.

Tlecuitl-Beristain *et al.* (2008) estudaram a produção de lacase por *P. ostreatus* em cultivo submerso, utilizando meio mineral

adicionado de  $0,25 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  e pH 6,5. A concentração de cobre dificultou o crescimento fúngico ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) até 200 h, após este período o fungo cresceu com taxa de crescimento específico de  $0,02 \text{ h}^{-1}$ , chegando à fase estacionária em 450 h com  $7,8 \text{ g L}^{-1}$ . A atividade de lacase neste cultivo estava correlacionada ao crescimento fúngico, apresentando valores iguais a  $1.000 \text{ U L}^{-1}$  em 200 h, e  $12.000 \text{ U L}^{-1}$  na fase estacionária (450 h).

Zucca *et al.* (2011) estudaram a influência de alguns indutores, como ABTS (2,2-azino-bis-[3-ethyliazoline-6-sulfonate), ácido ferúlico, ácido gálico, ácido vanílico, sobre a produção da lacase por *P. sajor-caju*. Estes indutores foram adicionados, separadamente, na concentração de 10 mM em um meio de cultivo composto de 2% de extrato de malte, 0,5 % de extrato de levedura, 0,1 mM de  $\text{CuSO}_4$  e 10 mM de tampão fosfato de potássio, em pH 6,0. A adição do ácido ferúlico propiciou a maior atividade da enzima lacase ( $15 \text{ U mL}^{-1}$ ) quando comparado ao controle ( $1 \text{ U mL}^{-1}$ ).

Abo-State *et al.* (2011) estudaram os efeitos de diferentes concentrações de  $\text{CuSO}_4$  (0 – 900  $\mu\text{M}$ ) sobre a produção de lacase por *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*. A adição de  $\text{CuSO}_4$  aumentou a atividade de lacase para os dois fungos testados, exceto na concentração de 900  $\mu\text{M}$ . A maior produção de lacase por *P. sajor-caju* e por *P. ostreatus* foi obtida utilizando-se 200  $\mu\text{M}$  e 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ , sendo as atividades iguais a 1,3  $\text{U mL}^{-1}$  e 1,8  $\text{U mL}^{-1}$ , respectivamente.

Bettin *et al.* (2011) avaliaram a produção de lacase por *P. sajor-caju* PS-2001 em cultivo submerso. O meio de cultivo foi composto de 5  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose, 1,5  $\text{g L}^{-1}$  de caseína, solução mineral ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20  $\text{g L}^{-1}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  14  $\text{g L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3  $\text{g L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$  3  $\text{g L}^{-1}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  15,6  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{FeSO}_4$  50  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  14  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{CoCl}_2$  20  $\text{mg L}^{-1}$ , ureia 3  $\text{g L}^{-1}$ ) e dois indutores,  $\text{CuSO}_4$  100  $\text{mg L}^{-1}$  e ácido gálico 100  $\text{mg L}^{-1}$ . A produção máxima de lacase, 40  $\text{U mL}^{-1}$ , foi alcançada em 6 dias de cultivo, diminuindo para 20  $\text{U mL}^{-1}$  em 7 dias de cultivo e mantendo este nível até o fim do experimento. A concentração máxima de biomassa ( $5,2 \text{ g L}^{-1}$ ) e o consumo da fonte de carbono, coincidiram com a maior produção de lacase, em 6 dias de cultivo. Este cultivo apresenta um modelo cinético caracterizado pela aumento de concentração de enzima associada ao aumento da concentração celular. Os autores testaram também o oxigênio dissolvido e o pH e observaram que, em 3 dias de cultivo, houve uma diminuição da taxa de saturação

de oxigênio e do pH, com uma produtividade em lacase igual a  $0,280 \text{ U ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Manavalan *et al.* (2013) estudaram a produção de lacase por *Ganoderma lucidum* em meio de cultivo composto por  $10 \text{ g L}^{-1}$  de amido,  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $1 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,05 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ ,  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$ ,  $0,0011 \text{ g L}^{-1}$  de tiamina e pH 5,5. Neste meio de cultivo foram adicionados alguns indutores, como  $\text{CuSO}_4$ , ácido gálico e etanol, e alguns substratos lignocelulósicos, como farelos de arroz, de trigo e de milho e cascas de laranja e de tamarindo, todos na concentração de 1%. A adição destes indutores ao meio de cultivo propiciou aumento na produção de lacase. Para a adição de  $0,4 \text{ mM}$  de  $\text{CuSO}_4$ ,  $1 \text{ mM}$  de ácido gálico e 3% de etanol as atividades foram 1,5, 3,79 e  $1,18 \text{ U mL}^{-1}$ , respectivamente. A combinação desses indutores com os substratos lignocelulósicos propiciou atividades maiores, com valores entre 30 e  $80 \text{ U mL}^{-1}$ , um aumento de 416 vezes quando comparado ao meio controle.

Jin e Ning (2013) estudaram a produção de lacase por *Aspergillus fumigatus* adicionando ao meio de cultivo palha de arroz tratada com diferentes concentrações de NaOH. O meio de cultivo foi composto por  $10 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $3 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de KCl,  $1 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,01 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$  e 1% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . A adição de palha de arroz tratada ao meio de cultivo propiciou atividade de lacase igual a  $44.352 \text{ U L}^{-1}$ , em 24 horas de cultivo. Os autores observaram que concentrações de NaOH entre 0,25 a 0,318 M promoveram aumento da produção de lacase, no entanto, concentrações superiores de NaOH diminuíram a atividade da enzima. Segundo os autores estes resultados representam um método eficiente para a produção de lacase devido alta produtividade quando comparada a estudos anteriores realizados pelos mesmos autores.

Tinoco-Valência *et al.* (2014) avaliaram os efeitos no processo de produção de lacase por *P. ostreatus*. Os parâmetros avaliados, por meio de um planejamento fatorial  $2^3$ , foram agitação, aeração e indução pela adição de cobre. Os autores observaram que a agitação e a aeração influenciaram positivamente a concentração de biomassa, aumentando a sua concentração significativamente. No entanto, para a produção de lacase o efeito foi negativo, diminuindo a produção desta enzima. Altos valores de agitação e aeração causam estresse hidrodinâmico, o que pode ter originado baixas produções de lacase. A adição de cobre não

afetou o crescimento do fungo, pois a adição do composto ocorreu no final da fase exponencial, porém na produção de lacase apresentou aumento significativo.

Normalmente, a suplementação com indutores leva a um aumento no custo do processo produtivo. De acordo com pesquisa realizada por Osma *et al.* (2011), que avaliaram o custo de meios de cultivos suplementados com diferentes indutores e suas produtividades, apesar do aumento no custo, em alguns casos, ser de até quatro vezes quando comparado ao meio sem indutor, este aumento não se refletiu no preço final da enzima produzida, visto que a atividade enzimática foi aumentada em até 666 %. O alto custo da produção de lacase é uma das principais limitações para as inúmeras aplicações industriais desta enzima. Portanto, o uso de indutores para aumentar a produtividade do processo é recomendado, além da otimização do meio de cultivo (FELLOWS, 2008; MANAVALAN *et al.*, 2013). Infelizmente, a maioria dos compostos aromáticos (como os ácidos ferúlico e gálico) são muito prejudiciais para os seres humanos ou muito caros, impossibilitando o seu uso a partir de aplicações industriais. Segundo Manavalan *et al.* (2013) compostos de cobre poderiam ser utilizados como indutores economicamente mais vantajosos em processos para a produção de lacases. Compostos lignocelulósicos também têm sido utilizados como indutores para a produção de enzimas oxidativas. Trabalhos recentes têm mostrado que alguns resíduos lignocelulósicos estimulam a produção de lacases por basidiomicetos (LIBARDI-Jr *et al.* 2011; MANAVALAN *et al.*, 2013; JIN e NING, 2013; QUEVEDO-HIDALGO *et al.*, 2015).

Osma *et al.* (2011) avaliaram o custo do processo de produção de lacase por *Trametes pubescens*. Foram testados 45 meios de cultivo, o investimento com equipamentos e os gastos operacionais para a produção desta enzima. O custo do meio de cultivo representou, em todos os casos, a maior contribuição do custo total, enquanto o custo com equipamentos foi significativamente baixo, representando menos de 2% do custo total. Desta forma, a redução do custo do meio de cultivo é necessária para se atingir sistemas de produção de lacase economicamente viáveis.

### 2.1.3 Aplicações

O interesse por processos mais eficientes e ambientalmente favoráveis para os diversos setores da indústria tem impulsionado a pesquisa por catalisadores que liberam água como subproduto. A possibilidade de utilizar fungos de degradação branca nesta estratégia de biotratamento provém do fato que estes organismos possuem um sistema enzimático não-específico capaz de metabolizar uma grande diversidade de poluentes até dióxido de carbono e água. Lacases apresentam baixa especificidade por substratos, permitindo sua atuação sobre uma grande variedade de compostos, o que a torna uma enzima versátil e com potencial para ser utilizada em várias aplicações biotecnológicas. Podem ser empregadas em processos industriais como a descoloração do corante têxtil, branqueamento da celulose, desintoxicação de efluente das indústrias petroquímica, têxtil, alimentícia e de papel, biorremediação, produção de drogas e cosméticos e até como ferramenta para diagnósticos médicos (HOFRICHTER, 2002; PERALTA *et al.*, 2004; BALDRIAN, 2006; COUTO e TOCA-HERRERA, 2007; JANUSZ *et al.*, 2013; ASGHER *et al.*, 2013; PAPADOPOULOU *et al.*, 2013; HADIBARATA e KRISTANTI, 2014; EL-MONSSEF *et al.*, 2016).

O potencial de aplicação de lacases pode ser observado por meio das diversas patentes que vêm sendo depositadas no United States Patent Office – USPTO (2016), sendo encontrados 43 registros de patentes com a palavra “lacase” no título. Na Tabela 1 são mostradas as 18 patentes registradas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI (2016).

Tabela 1 - Patentes registradas no INPI, envolvendo à enzima lacase.

<b>Processo</b>	<b>Ano</b>	<b>Título</b>
008502-5	2014	Processo de obtenção da enzima lacase por fungo marinho, enzima lacase e uso da mesma
005349-1	2013	Nova lacase de “Ganoderma lucidum” capaz de intensificar a degradação enzimática da biomassa de lignocelulose
033506-9	2013	Método e composições para o controle genético de insetos-praga em plantas de algodão através do silenciamento de genes da família lacase
011308-1	2011	Lacase, polipeptídeo, ácido nucleico, vetor, célula recombinante, uso de um polipeptídeo, ácido nucleico, vetor ou célula, método para modificar biomassa, método para a produção de metabólitos ou produtos bionergéticos, composição detergente e co-cultura de pelo menos dois micro-organismos diferentes
003725-3	2011	Método para obtenção de enzima lacase a partir de “Arthrographis” sp.
0821576-6	2008	Processo para degradar uma micotoxina em um produto alimentício e uso de uma lacase
0721285-2	2007	Mediadores de lacase e métodos de uso
0708215-0	2007	Polipeptídeos com atividade de lacase
0516946-1	2005	Enzima lacase e seus usos
0111040-3	2001	Enzima de lacase e o gene codificado da enzima
0004323-0	2000	Biossensor amperométrico para determinação de compostos fenólicos – eletrodos de materiais carbonáceos com lacase imobilizada
0004038-0	2000	Produção de aromas naturais por lacase
0002329-9	2000	Processo de tratamento de efluente papeleiro kraft E1 pelo sistema de enzima-mediador: Lacase-hidroxamatos
0009302-5	2000	Utilização de n-acetilcisteína como agente

		reductor e da uma lacase como agente oxidante, processo de tintura de fibras queratinicas, composição, e, dispositivo com vários compartimentos
9708995-8	1997	Composições detergentes e amaciantes compreendendo enzima lacase e uso das mesmas
9709247-9	1997	Composição detergente compreendendo uma enzima celulase e uma enzima lacase
9508113-5	1995	Construção do DNA, enzima, vetor recombinante, célula hospedeira recombinante, processos para obter uma enzima lacase, para tingir cabelo e para polimerizar um substrato Lingossulfato em solução, para despolimerizar in situ pasta Kraft, para oxidar corantes ou precursores de corante, para tingir cabelo e para polimerizar ou oxidar um composto fenólico ou anilina, composição de corante
9507817-7	1995	Lacase de <i>Myceliophthora</i> substancialmente pura, construção de DNA, vetor recombinante, célula hospedeira recombinante, processo para obter enzima lacase, processo para melhorar o rendimento de lacase recombinante, processo para polimerizar um substrato de lignina ou lignossulfato em solução, processo para despolimerizar in situ pasta kraft, para oxidar corantes ou precursores de corantes, recipiente, e processo para polimerizar ou oxidar um composto fenólico ou anilina

Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL (2016).

As lacases, em função de sua característica de enzima oxidativa, têm sido muito estudadas nas últimas décadas, principalmente porque catalisam a oxidação de compostos aromáticos, uma das maiores classes de poluentes orgânicos e tóxicas (BON *et al.*, 2008; AKDOGANA e

PAZARLIOGLUB, 2011; LI *et al.*, 2012; MIGLIORE *et al.*, 2012; HADIBARATA e KRISTANTI, 2014).

Estas enzimas são utilizadas na modificação de ligninas industriais para obtenção de produtos de valor agregado, na indústria de polpa e do papel para a redução do volume de produtos químicos utilizados, nas indústrias têxtil e dos detergentes, para a inibição da transferência de corantes sintéticos (ZUCCA *et al.*, 2011; BALAN *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2012; PAPADOPOULOU *et al.*, 2013), na produção de resinas fenólicas. Ainda são utilizadas em tratamento de efluentes e resíduos industriais para resolver problemas específicos, como o tratamento de poluentes fenólicos, os quais são oxidados pela lacase originando polímeros insolúveis em água, de remoção mais fácil (BON *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2012) e na remoção, precipitação ou transformação de compostos tóxicos ou recalcitrantes, e a alteração das características de um determinado efluente, como o aumento da biodegradabilidade ou diminuição da toxicidade, permitindo o tratamento posterior por processos biológicos convencionais ou a conversão de materiais em produtos de valor agregado (BON *et al.*, 2008).

Há ainda, recentes relatos sobre o uso de fungos ligninocelulolíticos, por meio da utilização de enzimas oxidativas, para degradação de componentes interferentes endócrinos (EDCs) (LOFFREDO *et al.*, 2012, LIBARDI-JR *et al.*, 2012; CHANG e CHANG, 2014). Estes compostos (EDCs) são substâncias ou misturas exógenas presentes no ambiente capazes de interferir nas funções do sistema endócrino, causando efeitos adversos em um organismo intacto ou na sua prole segundo o Programa Internacional de Segurança Química (International Programme on Chemical Safety – IPCS) (FONTENELE *et al.*, 2009). Os compostos bisfenol-A (BPA), bisfenol-F (BPF), nonilfenol (NP) e tetrabromobisfenol-A (TBBPA) são exemplos de produtos químicos de desregulação endócrina que têm ganhado bastante atenção devido aos seus efeitos adversos causados em organismos saudáveis (CHANG e CHANG, 2014). Há algumas décadas, EDCs sintéticos têm sido intensamente introduzidos no ambiente, o que causou a exposição de animais e humanos a sua ação. Bisphenol-A é um composto químico utilizado em grandes quantidades na produção de polímeros e na síntese de papel, é encontrado em águas residuais, especialmente nas áreas industrializadas. Vários estudos têm sido realizados a fim de monitorar a presença destes compostos em alimentos devido ao contato do alimento com polímeros que contêm estas

substâncias, bem como em tecidos e fluidos corporais do corpo humano, incluindo urina, saliva e suor. Os resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* e os resultados dos estudos epidemiológicos confirmam a toxicidade, a ação mutagênica e cancerígena do BPA. Além disso, a exposição a este composto pode elevar o risco de obesidade, a diabetes e doenças cardíacas (LOFFREDO *et al.*, 2012; MICHALOWICZ, 2014).

A utilização de lacases produzidas por *P. eryngii* foram avaliadas por Chang e Chang *et al.* (2014) para a degradação de BPA, BPF, NP e TBBPA, na concentração inicial de 20 mg L<sup>-1</sup>. Todos os compostos testados foram degradados pelo caldo bruto enzimático de *P. eryngii* após 24 h de incubação, sendo observada uma redução de concentração dos EDCs de 95,5; 96,1; 93,7 e 92,3% para BPA, BPF, NP e TBBPA, respectivamente. A adição de 1mM de ABTS ao caldo de cultivo aumentou o percentual de degradação do compostos BPA (98,6%), BPF (98,9%), NP (96,9%) e TBBPA (96,1%).

Loffredo *et al.* (2012) estudaram a capacidade de degradação do BPA (46 mg L<sup>-1</sup>) por três fungos lignocelulolíticos *Trametes versicolor*, *Stereum hirsutum* e *P. ostreatus*. A presença de cada fungo, no geral, diminuiu a concentração de BPA. *Trametes versicolor*, removeu 35% do BPA em 7 dias. Em 23 dias de incubação *Stereum hirsutum* e *P. ostreatus* removeram 38% de BPA.

Libardi-Jr *et al.* (2012) estudaram a produção de lacase e a capacidade de degradação de EDCs pelo caldo enzimático concentrado originado dos cultivos de *P. ostreatus* e de *Phoma* sp.. Os EDCs avaliados foram bisfenol-A, 17 $\alpha$ -etilestradiol e t-nonifenol na concentração inicial de 25 mM. O BPA foi totalmente degradado em 24 h de incubação com o caldo proveniente do cultivo de *P. ostreatus* e totalmente degradado em 48 h de incubação no caldo enzimático de *Phoma* sp.. A degradação do 17 $\alpha$ -etilestradiol foi completa em 24 h de incubação no caldo de *P. ostreatus* e em 48 h no caldo de *Phoma* sp.. A concentração de nonilfenol foi reduzida em 90,4 % após 72 h de incubação com o caldo enzimático concentrado de *P. ostreatus*, por *Phoma* sp., de acordo com a análise de variância, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos em 24, 48 e 72 h de incubação do composto, ou seja, não houve degradação do composto pelo caldo enzimático deste fungo.

### 2.1.4 Caracterização da lacase

Tlecuitl-Beristain *et al.* (2008) estudaram a produção de lacase por *P. ostreatus* em cultivo submerso, com meio de cultivo composto por 10,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 2 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,02 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>, 0,3 g L<sup>-1</sup> de CaHPO<sub>4</sub>, 0,2 g L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>, 0,2 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>, 0,25 g L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub> e pH ajustado em 6,5. Nesta pesquisa, a enzima purificada apresentou maior atividade em pH 4,0 a 4,5, testados em faixa entre pH 2,0 a 8,0, e em temperatura entre 40 e 45 °C, em uma faixa testada entre 20 a 60 °C. Também foi analisado o parâmetro cinético K<sub>m</sub> de lacase, com valores de 90 µM.

Sahay *et al.* (2008) purificaram e caracterizaram parcialmente a enzima lacase excretada por *P. sajor-caju* utilizando sabugo de milho, pó de fibra de coco, serragem, palha de trigo e partículas de bagaço como meio de cultivo. O pH foi testado em uma faixa de 2,5 a 7,0 e considerado ótimo em pH 4,5. Em pH acima de 5,0 a atividade de lacase diminuiu 50%. Os maiores valores de atividade enzimática foram observados em 37 °C (20 a 60 °C). Em 45 °C atividade de lacase cai 50% da sua atividade.

Liu *et al.* (2009) otimizaram a produção e caracterizaram a lacase proveniente de *P. ostreatus*. A faixa de pH estabelecida para estudo foi de 1,0 a 8,0 e a faixa de temperatura de 25 a 80 °C, sendo 4,0 o pH ótimo e 50 °C a temperatura ótima de reação. Os valores de K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> encontrados foram de 0,31 mmol L<sup>-1</sup> e 303,25 mmol min<sup>-1</sup>, respectivamente. A estabilidade da enzima com o pH foi determinada em 25 °C em faixa de pH de 1,0 a 7,0 durante 60 min. A enzima ficou estável em pH 4,0 com atividade superior a 80%, após 60 min de reação. Os valores extremos de pH (pH 1,0 e pH 7,0) diminuíram a atividade para 0 e 10%, respectivamente, em 10 min de reação. A estabilidade da enzima com a temperatura (30 a 80 °C) foi determinada em pH 4,0 e o resultado mostrou que a temperatura ótima para esta enzima foi de 50 °C. O aumento da temperatura (acima de 50 °C) reduziu drasticamente a atividade da enzima, em torno de 30% da atividade de lacase inicial.

Zucca *et al.* (2011) estudaram a indução, purificação e caracterização parcial de lacase por *P. sajor-caju*. A atividade catalítica manteve-se praticamente inalterada depois de 8 h de incubação a 30 °C, sendo esta a temperatura ótima de reação (faixa de 30 a 70 °C). Em

temperaturas de 40 e 50 °C, 60% da atividade original manteve-se presente, enquanto a 60 °C apenas 40% da atividade inicial foi observada, após 8 h de incubação. Em temperatura de 70 °C, após 1 h de reação, a enzima foi completamente inativada. O pH ótimo foi determinado em faixa de 3,0 a 9,0, sendo o pH ótimo igual a 6,0. O valor de  $K_m$  foi determinado utilizando ABTS como substrato, apresentando valor de  $88,9 \pm 4,2 \mu\text{M}$ .

Bettin *et al.* (2011) estudaram a produção e a caracterização de lacase por *P. sajor-caju*. Os autores ao determinarem o pH ótimo, em uma faixa de pH 2,5 a 7,0, observaram três picos (2,4, 3,2 e 4,4) de pH, sendo os três picos definidos como pH ótimo devido a presença de diferentes isoformas de lacase produzidas por *P. sajor-caju*. A atividade enzimática diminuiu 30% da sua atividade inicial em pH acima de 5,0. A estabilidade da enzima com o tempo foi determinada em pH 3,2 em uma faixa de 20 a 50 °C e observaram temperatura ótima de 50 °C.

More *et al.* (2011) isolaram, purificaram e caracterizaram lacase proveniente de *Pleurotus* sp.. Observaram maior atividade de lacase em 65 °C, sendo a temperatura ótima determinada em uma faixa de 25 a 85 °C. Acima de 70 °C, observaram decréscimo de aproximadamente 100 % na atividade de lacase purificada. O pH ótimo foi determinado em 4,5, utilizando ABTS como substrato, utilizando uma faixa de 25 a 85 °C. A estabilidade térmica da enzima foi avaliada em uma faixa de 4 a 70 °C. A enzima lacase ficou estável entre 60 e 65 °C, diminuindo atividade a 70 °C. Em 75 °C, a enzima ficou estável durante 30 min e diminuiu 38% da sua atividade inicial em 90 min. A estabilidade da enzima com o tempo de estocagem também foi avaliada em temperatura ambiente e a -4 °C. A enzima apresentou-se estável por 20 dias quando estocada em temperatura ambiente e por 60 dias quando estocada a -4 °C. Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  também foram avaliados, obtendo-se 250 mM e  $0,33 \mu\text{mol min}^{-1}$ , respectivamente, para a lacase purificada utilizando ABTS como substrato.

Kumar *et al.* (2012) caracterizaram a enzima lacase proveniente de *P. ostreatus*. Os autores observaram um pH ótimo de 4,0 utilizando ABTS como substrato. O pH 7,0 apresentou a atividade relativa mais baixa encontrada no estudo. As investigações sobre a estabilidade ao pH revelaram que a enzima lacase é muito estável em ampla faixa de pH (4,5 a 8,0). Após 50 h de incubação, 97% da atividade de lacase foi mantida em pH de 4,5, 5,5 e 6,0. No entanto, a estabilidade foi reduzida, significativamente, em pH 8 (70%). A temperatura ótima foi em 45 °C,

sendo que em 60 °C houve uma redução em 40 % da sua atividade enzimática. Ainda, foi observado a atividade da lacase com o aumento da temperatura (25 a 60 °C) e o tempo (0 - 18h) de incubação. A enzima manteve-se estável a 25 °C durante todo o tempo de incubação. A 37 °C a atividade manteve-se estável por 4 h de incubação e, após 14 h, apresentou 50% de inativação. Na sua temperatura ótima (45 °C) a taxa de inativação foi 50% em 8 h de incubação. O parâmetro cinético  $K_m$  foi avaliado pelos autores, sendo observado  $0,69 \text{ mM} \pm 0,11$ ;  $0,13 \text{ mM} \pm 0,02$  e  $0,051 \text{ mM} \pm 0,01 \text{ mM}$  utilizando como substrato o guaiacol, ABTS, siringaldazina, respectivamente.

Libardi-Jr. *et al.* (2012) avaliaram a produção, purificação parcial e caracterização de lacase provenientes de *Phoma* sp. e de *P. ostreatus*. O meio Kirk foi utilizado por *P. ostreatus* adicionado de  $150 \mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  e  $40 \text{ g L}^{-1}$  de pó de cascas de banana. O pH 4,5 foi determinado como pH ótimo, utilizando ABTS como substrato em uma faixa de pH 3,0 a 8,0. Nesta mesma faixa de pH, a estabilidade foi testada em temperatura ambiente, sendo a maior estabilidade encontrada em pH 6,0. Após 24 h, a enzima manteve-se com cerca de 40% da atividade inicial em pH 6,0. Neste mesmo pH, em 72 h (tempo final de incubação) apenas 30% apresentou estabilidade. Valores inferiores de pH (pH 3,0) apresentaram as menores estabilidades, 0,65% da atividade inicial após 8 h de incubação, e em valores superiores (pH 8,0) restavam menos de 5% de atividade, em 4 h de incubação. O parâmetro cinético  $K_m$  foi de  $216 \mu\text{M}$  utilizando ABTS como substrato.

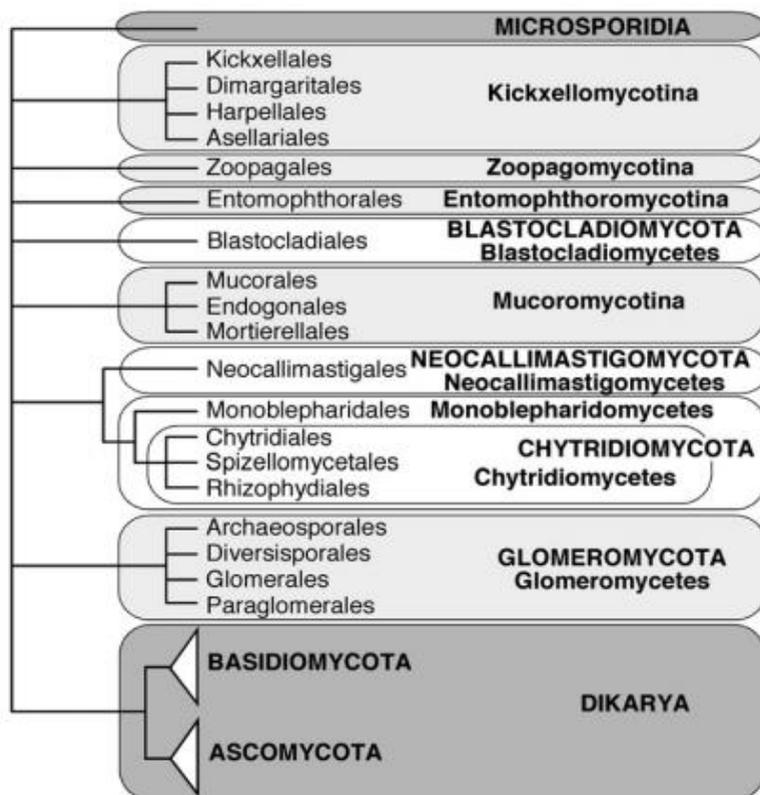
Diversos estudos têm buscado aumentar, por meio da modificação do meio e das condições de cultivo, a produção de lacases por diferentes basidiomicetos, pois este é um dos principais desafios do processo industrial, produzir enzimas de alta qualidade, de forma eficiente e com baixo custo. No entanto, estudos sobre a produção eficiente, em escala ampliada, de lacase por fungos do gênero *Pleurotus* são ainda escassos na literatura, podendo-se citar poucos autores como: Bettin *et al.* (2011), Tinovo-Valência *et al.* (2014), Quevedo-Hidalgo *et al.* (2015) e Fernandez-alejandre *et al.* (2016). Em função disso, buscou-se estudar o desempenho da espécie de *P. sajor-caju* CCB 019 na produção de lacase frente a diferentes composições e condições de cultivo alternativo.

## 2.2 Fungos basidiomicetos

Os fungos são seres vivos eucarióticos com um só núcleo, no caso das leveduras, ou multinucleados, como os fungos filamentosos ou bolores, incluindo os cogumelos (fungos macroscópicos) (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

Os fungos foram agrupados em um único reino, o Reino Fungi, por Whittaker em 1969, que reuniu todos os fungos com características típicas. Hibbett *et al.*, em 2007, propuseram uma nova classificação para os fungos (Figura 3).

Figura 3 - Classificação dos fungos segundo Hibbett *et al.* (2007).

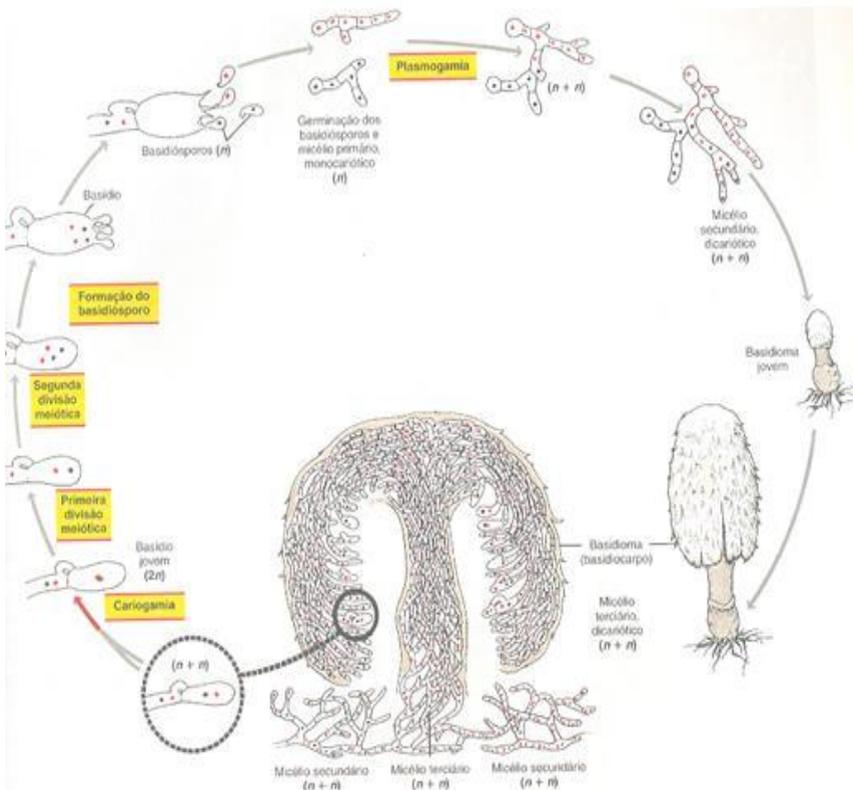


Fonte: HIBBETT *et al.* (2007).

Os fungos da classe dos basidiomicetos reproduzem-se de forma sexuada por intermédio de esporos (basidiósporos) ou, assexuada (reprodução vegetativa) pela multiplicação de qualquer fragmento do corpo de frutificação ou do micélio (PELCZAR *et al.*, 1996; RAVEN *et al.*, 2001).

O micélio consiste de hifas septadas, bem desenvolvidas, microscópicas, que podem ser facilmente observadas quando formam a massa micelial. A maioria dos basidiomicetos passa por três estágios miceliais, formando micélio primário, secundário e terciário. Na Figura 4 pode-se observar o ciclo de vida de um basidiomiceto.

Figura 4 - Ciclo de vida de um basidiomiceto.



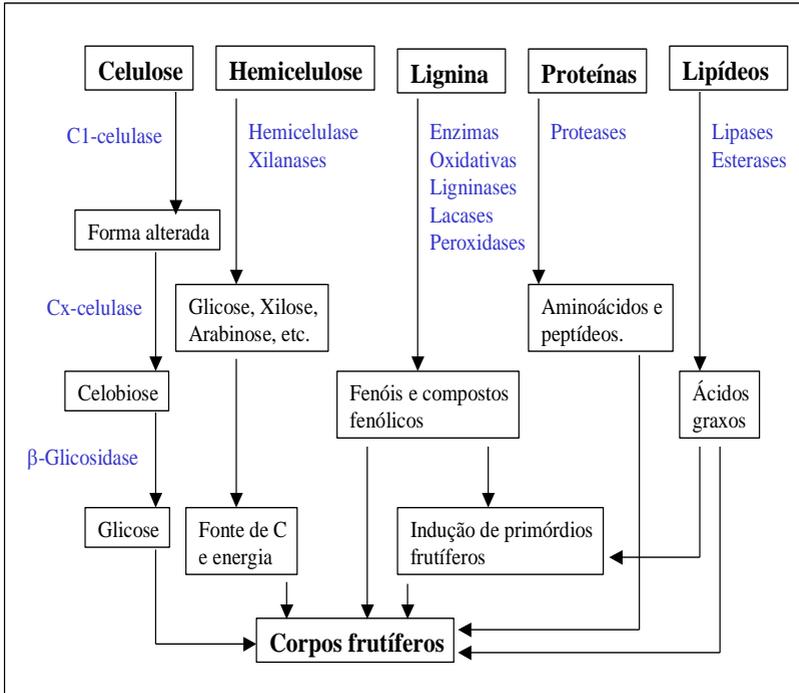
Fonte: RAVEN *et al.* (2001).

Basidiomicetos produzem basidiósporos que, ao entrar em contato com o substrato adequado, germinam sob determinadas condições climáticas, formando uma hifa e, posteriormente, dando origem ao micélio monocariótico (haplóide), denominado micélio primário. Este, por sua vez, forma o micélio dicariótico, possuindo dois núcleos haploides, dando origem ao micélio heterocariótico (micélio secundário). Este micélio pode vir a formar um basidiocarpo, também chamado de carpóforo ou corpo de frutificação, onde o micélio assume um crescimento ordenado para formar estruturas, ainda estéreis, que servirão de suporte para a formação dos basídios. Neste estágio o micélio é chamado de terciário. O micélio dicariótico forma o basidioma e em suas lamelas é formado o himênio com os basídios alinhados onde, finalmente, bilhões de basidiósporos são liberados (PUTZKE e PUTZKE, 2002; RAVEN *et al.*, 2001).

Os basidiomicetos são capazes de crescer em uma grande variedade de resíduos agrícolas. Esses organismos degradam esses resíduos, ou seja, convertem celulose, hemicelulose e lignina em compostos de menor peso molecular devido a produção de uma variedade de moléculas com atividades biológicas, destacando-se as enzimas celulases, hemicelulases, lacases e manganês e lignina peroxidases. Estas enzimas, ao degradarem os compostos lignocelulósicos, liberam nutrientes para o crescimento fúngico (RAJARATHNAM *et al.*, 1992; BUSWELL *et al.*, 1996; BONATTI *et al.*, 2004; AGUIAR e FERRAZ, 2011; GUPTA *et al.*, 2013).

Um esquema ilustrativo, onde se observa a função desempenhada pelas enzimas degradadoras de materiais lignocelulósicos foi elaborado por Rajarathnam *et al.* (1992) e é apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema da função desempenhada pelas enzimas degradadoras de materiais lignocelulósicos.



Fonte: RAJARATHNAM *et al.*, 1992.

### 2.2.1 Gênero *Pleurotus*

O gênero *Pleurotus* pertence à classe dos basidiomicetos e abrange várias espécies, sendo todas comestíveis (ZADRAZIL e KURTZMAN, 1984). É chamado de cogumelo ostra devido ao píleo possuir forma de concha e lamelas esbranquiçadas ou cinzas (Figura 6). No Brasil são também chamados de cogumelo caetetuba, cogumelo gigante ou fungi (RAVEN *et al.*, 2001; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; DIAS, 2010).

Figura 6 - *Pleurotus sajor-caju* encontrado na natureza.



Fonte: LEI (2014)

O gênero *Pleurotus* pertence ao grupo denominado “fungos de podridão branca”, por crescerem em troncos de árvores ou madeira morta, produzirem um micélio branco e degradarem tanto a lignina, um polímero fenólico recalcitrante encontrado nos vegetais, quanto a celulose. A degradação ocorre necessariamente de forma extracelular, uma vez que os componentes dos materiais lignocelulósicos devem ser inicialmente despolimerizados até compostos menores que são susceptíveis ao transporte pela parede celular e ao metabolismo intracelular do fungo envolvido (BONONI e TRUFEM, 1995; ROSADO *et al.*, 2002; CABRERA *et al.*, 2002; DIAS, 2010; AGUIAR e FERRAZ, 2011).

O complexo enzimático único pertencente ao *Pleurotus*, com enzimas como celulase, hemicelulase, ligninase, celobiase e lacase faz com que estes sejam usados não somente como fonte de alimento com alto valor nutritivo (BONATTI *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2013), mas também como produtores de enzimas, um dos maiores setores da indústria biotecnológica, que podem ser aplicadas em diferentes

processos na indústria de bebidas e alimentos, indústrias têxteis, papelarias e indústrias farmacêuticas, bem como em processos de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos, na degradação de poluentes ambientais e no tratamento de efluentes industriais (MARQUEZ-ROCHA *et al.*, 1999; REDDY *et al.*, 2003; GOMEZ *et al.*, 2007; ELISASHVILI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012; KNEZEVIC *et al.*, 2013; PAPADOPOULOU *et al.*, 2013; HADIBARATA e KRISTANTI, 2014).

### 2.2.2 Cultivo de *Pleurotus*

Fungos do gênero *Pleurotus* podem ser cultivados em meio sólido ou líquido. O cultivo em meio sólido consiste no preparo da matriz (*spawn*), caracterizada pelo crescimento micelial por meio de divisão celular, que tem um tempo de duração de 20 a 30 dias. Também é necessário o preparo do substrato, que inclui os processos de pasteurização e semeadura. O gênero *Pleurotus* cresce em uma ampla variedade de resíduos agro-florestais, tais como serragem, papel, palhas de cereais, milho, bagaço de cana de açúcar, resíduo de café, folhas de bananeira, resíduo de agave, polpa de soja, sem a necessidade de uma fermentação prévia do substrato, sendo considerado um fungo degradador primário (BANO e RAJARATHNAM, 1988; BONONI e TRUFEM, *et al.*, 1995; DIAS *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2008; DIAS, 2010; KUMAR *et al.*, 2012; EL-BATAL *et al.*, 2015). Após a colonização do substrato pelo micélio e em função da presença de luz, maior aeração e às vezes choque térmico, ocorre a indução dos primórdios frutíferos, que são pequenas saliências de cerca de um milímetro, que em 3 a 4 dias geram os corpos frutíferos que podem ser colhidos (MADAN *et al.*, 1987; BONONI e TRUFEM *et al.*, 1995; DIAS, 2010).

O cultivo sólido vem sendo utilizado para a produção de corpos frutíferos para fins alimentares (BONATTI *et al.*, 2004; DARWISH *et al.*, 2012; GUPTA *et al.*, 2013), para a extração de substâncias terapêuticas (ZHANG *et al.*, 2007; MIZUNO, 1999; MIZUNO, 2000; UKAWA *et al.*, 2000; OOI e LIU, 2000; YANG *et al.*, 2013; DEVI *et al.*, 2013; MARIGA *et al.*, 2014; FACCHINI *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2014) e para a bioconversão de resíduos lignocelulósicos de um modo geral (THOMAS *et al.*, 1998; PISCITELLI *et al.*, 2011; KOUTROTSIOS *et al.*, 2014). Os resíduos

lignocelulósicos são fontes de compostos como a celulose, hemicelulose e lignina, e vêm sendo utilizados como substratos no cultivo de basidiomicetos.

A região nordeste do estado de Santa Catarina produz grande quantidade de resíduos lignocelulósicos durante o cultivo e o processamento da banana, gerando grande quantidade de folhas de bananeira e de cascas de banana. O reaproveitamento destes resíduos como substrato no cultivo de *Pleurotus* contribui para o desenvolvimento de processos sustentáveis, permitindo agregar valor aos resíduos, além de removerem do ambiente material potencialmente poluente. A utilização desses resíduos ainda diminui os custos de produção de enzimas, considerado um dos principais obstáculos para sua produção em escala industrial (MENEZES e BARRETO, 2015).

Em comparação com o cultivo líquido, o cultivo em estado sólido apresenta dificuldades relacionadas, principalmente, ao controle do processo (temperatura, transferência de oxigênio), tempo relativamente longo para produção e contaminações frequentes pela manipulação do substrato. O cultivo em meio líquido é uma alternativa para evitar esses problemas quando pretende-se produzir compostos sintetizados por estes fungos, como enzimas, polissacarídeos, entre outros, pois permite maior controle das condições de cultivo, menor esforço e espaço para o cultivo, menor risco de contaminação, bem como produção de grandes quantidades de micélio num curto período de tempo, obtendo-se produtos de qualidade uniforme (MARQUEZ-ROCHA *et al.*, 1999; ROSADO *et al.*, 2002; CUI e CHISTI, 2003; BETTIN *et al.*, 2011; TINOCO-VALÊNCIA *et al.*, 2014).

O processo de cultivo em meio líquido pode ser conduzido de forma descontínua, semicontínua e contínua. Na maioria dos processos fermentativos industriais, o processo descontínuo é o mais utilizado. Este processo é constituído de duas etapas principais, o preparo do inóculo e a fermentação. A primeira etapa tem por finalidade preparar o micro-organismo em condições apropriadas, de modo a garantir o desenvolvimento adequado da segunda etapa, a fermentação (BORZANI *et al.*, 2001).

O cultivo submerso de fungos filamentosos tem sido empregado industrialmente para a produção de uma grande variedade de metabólitos de importância econômica e social tais como os antibióticos, enzimas, micotoxinas, vitaminas, polissacarídeos com atividade terapêutica, entre outros (CAVAZONI e ADAMI, 1992;

BURNS *et al.*, 1994; MAZIERO *et al.*, 1999; WISBECK *et al.*, 2002; ROSADO *et al.*, 2003; FELOW, 2008; PARENTI *et al.*, 2013; UGIORO *et al.*, 2013; FERNANDEZ-FUEYO *et al.*, 2014).

Independente da forma de condução do cultivo, alguns nutrientes são fundamentais para o desenvolvimento do fungo. Compostos energéticos de carbono e nitrogênio são nutrientes primários nos meios de cultivo para produção de fungos (BISARIA e MADAN, 1983), entretanto a fonte de carbono desempenha um papel importante para a produção de enzimas lignocelulolíticas (STAJIC *et al.*, 2006; ELISASHVILI e KACHLISHVILI, 2009). A grande maioria dos estudos sobre a produção de enzimas oxidativas indicam que basidiomicetos exibem uma ampla diversidade na sua resposta a fontes de carbono e suas concentrações no meio nutriente, as quais devem ser estudadas para aumentar ao máximo a síntese das enzimas oxidativas (ELISASHVILI e KACHLISHVILI, 2009). Janusz *et al.* (2013) relatam que o nível de atividade de lacase depende das fontes de carbono e nitrogênio e de suas concentrações (STAJIC *et al.*, 2006; MAJEAU *et al.*, 2010).

Quase todos os fungos estudados até hoje possuem lacase intracelular, no entanto, as lacases extracelulares são produzidas em maior quantidade, sendo esta qualidade um pré-requisito para fins industriais. A produção de lacase de fungos é influenciada por muitos parâmetros, tais como espécie fúngica, forma de condução de cultivo, agitação (cultivo estacionário ou agitado), aeração e tempo de cultivo. Entretanto, os fatores mais críticos são as fontes de carbono e nitrogênio e suas concentrações. O meio de crescimento pode ser sintético, natural ou semi-sintético, por exemplo, resíduos lignocelulósicos em meio de cultivo líquido artificial (MAJEAU *et al.*, 2010).

Stajic *et al.* (2006) estudaram diferentes fontes de carbono e de nitrogênio para a produção de lacase por espécies de *Pleurotus* (*P. ostreatus*, *P. pulmonarius* e *P. eryngii*) em meio líquido. Um meio sintético foi enriquecido com 1% de diferentes fontes de carbono: glicose, maltose, manitol, e xilana. A maior atividade de lacase ( $45,4 \text{ U L}^{-1}$ ) por *P. ostreatus* foi alcançada quando suplementaram o meio de cultivo com glicose. Entretanto, quando avaliaram *P. eryngii* e *P. pulmonarius* obtiveram maiores valores de lacase ( $134$  e  $22,7 \text{ U L}^{-1}$ , respectivamente) com a adição de xilana ao meio de cultivo. O meio suplementado com a fonte de carbono que propiciou a maior produção de lacase para cada espécie foi também suplementado com uma fonte de

nitrogênio inorgânica, sendo utilizado cloreto de amônio, nitrato de amônio, fosfato de amônio, sulfato de amônio ou nitrato de potássio, todos em uma concentração de 30 mM. Também foram testadas fontes de nitrogênio orgânicas, sendo utilizado peptona bacteriológica ou caseína, ambas em uma concentração de 0,5 %, ou licor de milho, na concentração de 0,8 %. As maiores atividades da enzima lacase para *P. ostreatus* (501 U L<sup>-1</sup>) e *P. pulomonarius* (335 U L<sup>-1</sup>) foram utilizando cloreto de amônio e sulfato de amônio, respectivamente. As concentrações destas fontes de nitrogênio também foram testadas e os autores afirmaram que quanto menor a concentração da fonte de nitrogênio maior a atividade de lacase.

Minerais específicos também devem ser adicionados ao meio de cultivo para maximizar a produção enzimática, como fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro e cloro e uma pequena quantidade de elementos traços que desempenham importante papel como constituintes de enzimas (como manganês, cobre, zinco, molibdênio, cromo, níquel, cobalto e boro). Microelementos são sais inorgânicos utilizados em pequenas quantidades pelas células fúngicas, os quais compreendem metais e não metais essenciais à composição de enzimas, vitaminas, proteínas, nucleotídeos, etc. São substâncias consideradas estabilizadoras destas macromoléculas. Os microelementos mais utilizados para o crescimento fúngico são: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, entre outros. Normalmente, os fosfatos e sulfatos são requeridos em maiores concentrações pelos micro-organismos em comparação com os outros sais inorgânicos (BARBOSA *et al.*, 2004; FELLOW, 2008, ORLANDELLI, *et al.*, 2012).

Indutores podem ser adicionados ao meio de cultivo quando o objetivo for aumentar a produção de enzimas lignocelulolíticas pelo fungo. Os indutores mais utilizados e indicados para a produção de enzimas oxidativas por fungos são: ácido ferúlico, 2,5-xilidina, ácido aminobenzoico, ácido veratrílico, ácido gálico e sulfato de cobre (ZUCCA *et al.*, 2011; ABO-STATE *et al.*, 2011; BETTIN *et al.*, 2011; TINOCO-VALÊNCIA *et al.*, 2014). Trabalhos recentes têm mostrado ainda que alguns resíduos lignocelulósicos estimulam a produção de enzimas oxidativas por basidiomicetos (LIBARDI-Jr *et al.* 2011; MANAVALAN *et al.*, 2013; JIN e NING, 2013; QUEVEDO-HIDALGO *et al.*, 2015), evidenciando o efeito indutor sobre a produção de enzimas.

O controle das condições de cultivo também se faz fundamental para o desenvolvimento adequado do fungo. Apesar do pouco conhecimento sobre a produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos em cultivo submerso, o pH e a concentração de oxigênio dissolvido devem ser rigorosamente controlados. Sabe-se ainda que, o cultivo líquido leva à produtividades mais elevadas destas enzimas em comparação com o cultivo sólido, uma exigência existente para a sua aplicação em processos biotecnológicos industriais (BETTIN *et al.*, 2011; PAPASPYRIDIA *et al.*, 2011; TINOCO-VALÊNCIA *et al.*, 2014). De acordo com Ardon *et al.* (1996), não existe correlação entre a quantidade de micélio produzida pelo fungo e sua atividade enzimática.

Para a produção de enzimas oxidativas em grande escala, os micro-organismos devem crescer bem em substratos baratos e apresentar altas produtividades, bem como a preparação da enzima deve ser estável (FELLOWS, 2008; ABDULLAH *et al.*, 2013).

### **2.3 Resíduos lignocelulósicos**

O aproveitamento de resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais, tem sido o objeto de diversas pesquisas devido ao impacto ambiental causado pela grande quantidade destes materiais liberados (BARBOSA *et al.*, 2005).

Os principais componentes dos resíduos lignocelulósicos são a celulose, a hemicelulose e a lignina. O teor de nitrogênio é, geralmente, muito baixo. A proporção percentual dos componentes celulose, hemicelulose e lignina, assim como do teor de nitrogênio, dependem do tipo de material, idade e estágio vegetativo (RAJARATHNAM *et al.*, 1992).

Santa Catarina ocupa o terceiro lugar entre os estados produtores de bananas no Brasil. Na safra de 2014 os melhores rendimentos foram obtidos no Paraná e em Santa Catarina, com, respectivamente, 64% e 62% acima da média nacional, de 14.628 kg ha<sup>-1</sup>. A banana catarinense abastece o mercado interno nacional e de exportação para países do Mercosul. No primeiro semestre de 2015, as exportações catarinenses fecharam em 22,2 mil toneladas, aumentando em 18% sua quantidade negociada com relação ao mesmo período de 2014, com 29% desse volume sendo destinados para a Argentina e 7% para o Uruguai (EPAGRI/CEPA, 2015).

A bananeira é uma cultura frutífera representativa também na

região de Joinville, por apresentar a maior produtividade, sendo responsável por 87% do volume total produzido no Estado, além de ser geradora de enormes quantidades de massa verde (EPAGRI/CEPA, 2015).

A Tabela 2 apresenta alguns dados relativos a esta cultura no Estado de Santa Catarina e na região de Joinville.

Tabela 2 - Área cultivada e produção da cultura da banana em Santa Catarina e na região de Joinvil, em 2015.

<b>Cultura da banana</b>	<b>Santa Catarina</b>	<b>Joinville</b>
Área (hectares)	29.902	14.022
Produção (toneladas)	710.371	384.524

Fonte: EPAGRI/CEPA (2015).

O meio de cultivo OXI, formulado para a produção de enzimas oxida, é composto de resíduos gerados em grandes quantidades em vários setores industriais, como as folhas secas de bananeira, cascas de banana e água de imersão. A região nordeste do Estado de Santa Catarina produz grande quantidade de resíduos durante o cultivo e o processamento da banana, gerando grande quantidade de folhas secas de bananeira e de cascas de banana. Segundo Sturion (1994) os resíduos da bananeira representam uma proporção equivalente a 40% do peso do fruto e as folhas representam 15 % da planta completa. Portanto utilizando os dados da Tabela 2, estima-se a quantidade de resíduo seco disponível no Estado de Santa Catarina em 2015 em 284 mil toneladas.

Estes resíduos têm sido utilizados na formulação do substrato para a produção de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus*. No processo de produção de corpos frutíferos do gênero *Pleurotus* o substrato (folhas secas de bananeira) precisa ser umidificado, o qual permanece imerso em água por 12 horas. Durante este período, muitos nutrientes são dissolvidos no meio líquido, o que justifica a proposta de utilização deste resíduo, juntamente com pó de cascas de banana, para a produção de enzimas lignocelulolíticas.

É reportado em literatura a presença de indutores variados para a produção de lacase em cultivo submerso, por basidiomicetos. Diversos estudos com diferentes organismos informam que o  $\text{CuSO}_4$  adicionado no meio de cultivo apresenta efeito positivo sob a produção de lacase (HESS *et al.*, 2002; STAJIC *et al.*, 2006; ABO-STATE *et al.*, 2011; BETTIN *et al.*, 2011; LIBARDI-Jr *et al.*, 2012; MANAVALAN *et al.*,

2013; TINOCO-VALÊNCIA *et al.*, 2014). Assim, o sulfato de cobre foi incorporado ao meio de cultivo OXI.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Descrição das etapas realizadas nos ensaios

Nos ensaios realizados buscou-se estudar o comportamento cinético da produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 em meio de cultivo OXI. Buscando a melhor compreensão da sequência de ensaios realizados durante este trabalho, faz-se aqui o relato de cada etapa (Figura 7). Para a produção de lacase foram realizados ensaios variando as concentrações de pó de cascas de banana e as condições de cultivo, sendo que esses ensaios foram divididos em 5 etapas:

Etapa 1 - Caracterizar quimicamente os compostos que formulam o meio de cultivo para a produção de lacase.

Etapa 2 - O objetivo desta etapa foi verificar o potencial de produção de lacase por *P. sajor-caju*, em frascos agitados, utilizando meio de cultivo OXI 30. Nesta etapa também foi realizada a ampliação de escala, sendo o cultivo realizado em biorreator utilizando o mesmo meio de cultivo. Neste experimento, em biorreator, foi realizado a avaliação dos parâmetros cinéticos. As condições de cultivo dos ensaios em biorreator de 4 L foram pH 6,0, temperatura em 30 °C, vazão de ar mantida em 0,3 vvm e a frequência dos agitadores em 350 min<sup>-1</sup>.

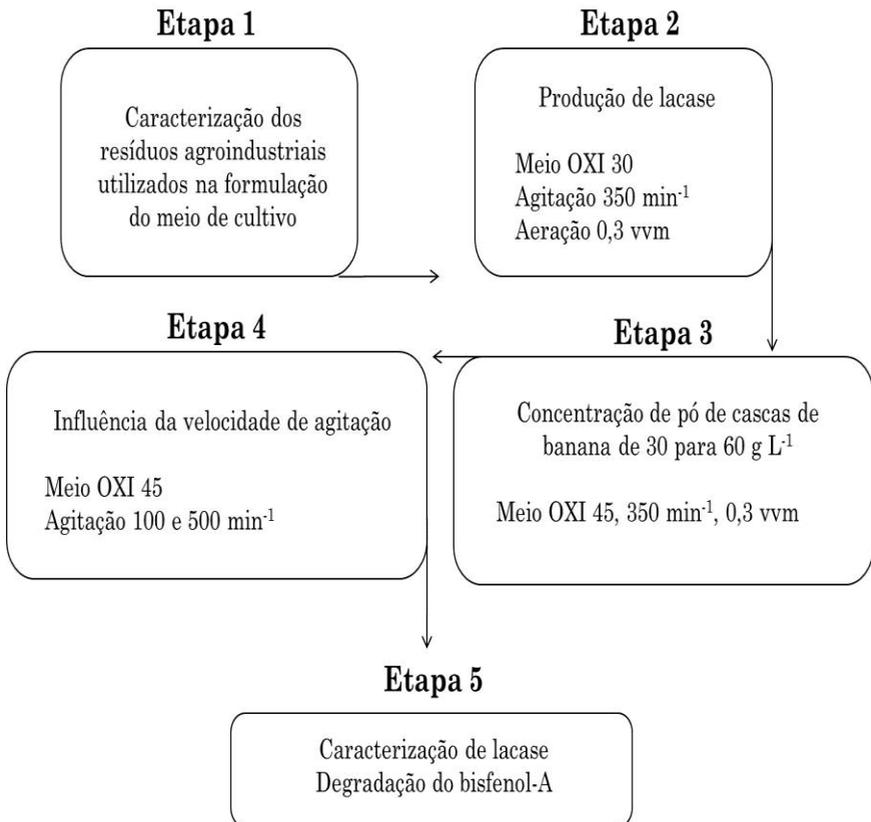
Etapa 3 – A fim de alcançar maior produção de lacase, um aumento na concentração de pó de cascas de banana foi proposto. A avaliação do meio OXI 60 para a produção de lacase por *P. sajor-caju* foi realizada em frascos agitados. No entanto, a ampliação de escala com este meio de cultivo não foi realizada devido à dificuldades nas condições de operação. Sendo assim, diminuiu-se a concentração de pó de cascas de banana para 45 g L<sup>-1</sup> e o meio foi denominado OXI 45. Este meio foi utilizado para o cultivo em biorreator nas mesmas condições de cultivo apresentadas na etapa 2.

Etapa 4 – Os parâmetros agitação e taxa de aeração foram modificados a fim de se obter valores superiores de produtividade enzimática. A frequência de agitação foi avaliada em 100 e 500 min<sup>-1</sup> e valores maiores de vazão de ar foram testados, já que a vazão utilizada em ensaios anteriores era baixa, 0,3 vvm. No entanto, não foi possível conduzir até o final do processo os ensaios utilizando maiores taxas de aeração devido às condições de operação em meio OXI 45.

Etapa 5 – O caldo enzimático bruto proveniente da condição de cultivo que apresentou maior produtividade enzimática foi utilizado na

caraterização enzimática da lacase, em termos de pH e temperatura ótimos e estabilidade com o pH e a temperatura. O caldo enzimático bruto, proveniente da condição de cultivo que apresentou maior produtividade enzimática, foi utilizado para avaliar a capacidade de degradação de bisfenol-A pela enzima lacase.

Figura 7 - Representação esquemática dos ensaios realizados no estudo de produção de lacase por *P. sajor-caju*.



## **3.2 Caracterização química**

### **3.2.1 Obtenção das amostras**

As cascas de banana e as folhas secas de bananeira foram obtidas empresa Tipycus – Garuva/Santa Catarina e secas a 60°C. As cascas de banana foram trituradas até formarem pó. As folhas secas de bananeira foram trituradas, em pedaços de 5 cm, e imersas em água por 12 h. O sobrenadante foi concentrado em rotavapor e liofilizado. A partir da massa de folhas secas de bananeira utilizada (150 g) obteve-se, aproximadamente, 3 litros de água de imersão que, após liofilização, renderam 1,2 g de amostra. O procedimento foi repetido a fim de se obter maior quantidade de material liofilizado.

### **3.2.2 Teor de umidade e pH**

O teor de umidade foi determinado secando-se as cascas de banana até massa constante à 105°C em estufa, segundo método A.O.A.C (1984). O seu valor foi determinado através da diferença de massa entre as cascas de banana úmidas e secas.

Para determinação do potencial hidrogeniônico utilizou-se um pHmetro Mettler Toledo.

### **3.2.3 Cinzas**

O percentual de cinzas foi calculado pela massa da amostra após incineração segundo método A.O.A.C (1984). Colocou-se 1,0 g de amostra em cápsulas de porcelanas previamente secas em mufla (QUIMIS, Q-318.24) e calcinou-se a 600°C durante 4 horas ou até a combustão total da matéria orgânica. Resfriou-se as cápsulas contendo amostra em dessecador e pesou-se em balança analítica (SHIMADZU AY220). O teor de cinzas foi determinado pela diferença entre a massa inicial da amostra e a massa da amostra após calcinação na mufla.

### 3.2.4 Matéria orgânica

O teor de matéria orgânica foi determinado utilizando a metodologia proposta por Kiehl (1985). Secou-se a amostra em estufa à 105°C por, no mínimo, 8 h e pesou-se. Calcinou-se a amostra seca por 2 h a 600°C e pesou-se. A diferença de massa entre a amostra calcinada e seca em estufa é o teor de matéria orgânica.

### 3.2.5 Carboidratos totais

Os carboidratos foram extraídos por refluxo com ácido clorídrico diluído durante 2,5 h e determinados colorimetricamente, segundo método A.O.A.C (1984). A determinação dos carboidratos ácido-digeríveis consistiu em deixar 0,5 g de amostra em contato com 50 mL de ácido clorídrico 0,6 N, em ebulição, por 2,5 h. Após, o hidrolisado foi filtrado em papel filtro quantitativo (faixa preta) e recolhido em balão volumétrico de 250 mL. Os açúcares redutores totais resultantes foram determinados colorimetricamente pelo método DNS.

O método DNS (MILLER, 1959) consiste na oxidação dos grupos aldeídos dos açúcares redutores a grupos carboxílicos, em presença de ácido 3,5-dinitrosalicílico. O ácido 3,5-dinitrosalicílico (agente oxidante) é, por sua vez, reduzido à ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, que apresenta coloração amarelada. A intensidade da coloração, medida a 540 nm, é proporcional à concentração de açúcar redutor na amostra. O reagente DNS, 0,5 mL, foi adicionado a 0,5 mL de amostra e a mistura foi aquecida em banho-maria à 100°C durante 5 min. Após este intervalo de tempo, a reação foi interrompida, resfriando-se a mistura em água com gelo. Em seguida foram adicionados 5 mL de água destilada e, após homogeneização, procedeu-se a leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-160.

### 3.2.6 Fibra bruta

A fibra bruta foi estimada como massa seca do resíduo que permanece após digestão ácida e alcalina, segundo método A.O.A.C (1984). A amostra (3,0 g) foi submetida à digestão ácida (200 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,255N) a uma temperatura de 150 °C. Após 30 min de

digestão, a mistura foi filtrada em papel filtro quantitativo (faixa preta) e lavada com água fervente até pH neutro. Em seguida a amostra foi submetida à digestão básica (200 mL NaOH – 0,313N) a uma temperatura de 150 °C durante 30 min. O tubo com amostra foi lavado com água fervente até pH neutro e após foi lavado duas vezes com 20 mL de álcool, vertendo-se a amostra, na última vez, em filtro quantitativo (faixa preta). O resíduo orgânico foi, então, lavado duas vezes com 10 mL de éter sulfúrico e colocado em cápsula de porcelana previamente seca em estufa (105 °C) e em mufla (600 °C) até massa constante. A cápsula contendo a amostra foi, primeiramente, seca em estufa a 105 °C por 2 h, colocada em dessecador e pesada e então, seca a 600 °C por 1 h, e novamente colocada em dessecador e pesada. Calculou-se a fibra bruta por diferença de massa da amostra obtida após secagem em estufa e após a calcinação na mufla.

### 3.2.7 Hemicelulose

Segundo Silva (1981), o teor de hemicelulose é calculado pela diferença entre a fibra detergente ácido (FDA) e a fibra detergente neutro (FDN). Para teor de FDA, foi pesado em balança analítica (METTLER AT 250), 1,0 g de amostra seca picada, adicionando 100 mL de solução detergente ácido (20 g de brometo-cetil-trimetilamônio e 1 L de ácido sulfúrico 1 N) e algumas gotas de antiespumante polipropileno glicol P 2000. Esta mistura foi aquecida até ebulição e mantida sob fervura por 1 h. Após, realizou-se a filtração a vácuo, em funil de Büchner com papel filtro quantitativo (faixa preta). O tubo com amostra foi lavado com água fervente por três vezes, vertendo a amostra na última vez. O filtro com a amostra foi também lavado com 20 mL de acetona, por duas vezes. A amostra retirada do filtro foi colocada em estufa a 105 °C por oito horas, colocada em dessecador para resfriar e então pesada. Os cadinhos foram previamente secos a 105°C por 20 min.

Para FDN, foi pesado, em balança analítica, 1,0 g de amostra seca triturada, adicionando 100 mL de solução detergente neutro (30 g de sulfato láurico de sódio, 18,61 g de EDTA, 6,81 g de borato de sódio, 4,56 g de fosfato ácido de sódio, 10 mL de 2-metaxietanol e 1 L de água), 0,5 g de sulfito de sódio e algumas gotas de antiespumante polipropileno glicol P 2000. Esta mistura foi aquecida até ebulição e mantida sob fervura por 1 h. Após, foi filtrado à vácuo, em funil de Büchner com papel filtro quantitativo (faixa preta). O tubo com amostra

foi lavado com água fervente por três vezes, vertendo a amostra na última vez. O filtro com a amostra foi também lavado com 20 mL de acetona, por duas vezes. A amostra retirada do filtro foi colocada em cápsula de porcelana previamente lavada, seca à 105 °C por 20 min, colocada em dessecador para resfriar e pesada. A cápsula com a amostra foi colocada em estufa à 105 °C por oito horas, colocado em dessecador para resfriar e então pesada.

O teor de hemicelulose foi calculado pela diferença de massa da amostra tratada com detergente ácido e tratada com detergente neutro.

### **3.2.8 Lignina**

O teor de lignina foi determinado segundo metodologia proposta por Silva (1981). A amostra, após ter sido oxidada com detergente ácido (FDA), foi utilizada para análise de lignina. A amostra foi retirada da cápsula utilizada para secagem, colocada em Gooch de porcelana e transferida para um recipiente de vidro com uma camada de 3 cm de água destilada. Foi adicionado, no Gooch, 30 mL de solução de permanganato de potássio tamponado, preparado segundo Silva (1981), e deixado por 15 min. O Gooch foi retirado e o seu conteúdo filtrado a vácuo.

A água destilada com a solução de permanganato de potássio do recipiente de vidro foi descartada e colocada nova camada de 3 cm de água destilada. O Gooch foi recolocado neste recipiente e novamente foi adicionado 30 mL de solução de permanganato de potássio tamponado e deixado por 90 min, agitando ocasionalmente. Após, o Gooch foi retirado e o conteúdo filtrado a vácuo.

Novamente, a água destilada do recipiente foi descartada e colocada nova camada de água destilada. O Gooch foi recolocado neste recipiente e foi adicionado 30mL de solução desmineralizadora, preparada de acordo com Silva (1981) e deixado por 10 min, agitando ocasionalmente. Após, o Gooch foi retirado e o conteúdo filtrado a vácuo. Esta operação foi repetida mais uma vez.

No filtro, a vácuo, o Gooch foi lavado duas vezes com 30 mL de etanol 80 % e duas vezes com 30 mL de acetona. A amostra foi, então, retirada do Gooch e colocada em cápsula previamente pesada em balança analítica (METTLER AT 250). A cápsula com a amostra foi colocada em estufa a 105 °C por 8 h, transferida para dessecador para resfriar e então pesada conforme Silva (1981).

O teor de lignina foi calculado pela diferença de massa entre a amostra digerida com detergente ácido (FDA) e a oxidação com o ácido acético e permanganato de potássio.

### **3.2.9 Celulose**

O teor de celulose, segundo metodologia proposta por Silva (1981), foi determinado pela diferença de massa entre o resíduo seco gerado através da análise de lignina e este mesmo resíduo calcinado em mufla à 500°C por 2 h.

### **3.2.10 Nitrogênio total**

O teor de nitrogênio total foi obtido utilizando-se o método de Kjeldahl, de acordo com a metodologia proposta pela A.O.A.C. (1984).

Pesou-se 0,1 g de amostra seca (à 60°C) e misturou-se 1,5 g de catalisador com a seguinte composição: selenito de sódio (6,42 %), sulfato de cobre (7,13 %) e sulfato de sódio anidro (69,45 %), macerados com almofaris e pistilo.

A amostra e o catalisador foram colocados em tubo de digestão de 300 mL e acrescentado 5,0 mL de ácido sulfúrico PA e colocado no digestor (TECNAL TE 005/50) à temperatura de 300 °C para que ocorresse a produção de sulfato de amônio. A amostra ficou digerindo até a coloração tornar-se esverdeada límpida e, então, deixou-se por mais 30 min, retirando-se para esfriar. Após, foi realizada a destilação do nitrogênio à quente em destilador (TECNAL TE 036/1). Foi adicionado ao tubo de digestão com a amostra, 10 mL de água destilada e foi acoplado ao equipamento. Após o tubo estar conectado, foi adicionado 10 mL de hidróxido de sódio (1:1). O sulfato de amônio na presença de hidróxido de sódio concentrado libera  $\text{NH}_3(\text{g})$ . Iniciou-se então o aquecimento da água para gerar vapor e extrair o nitrogênio da amostra digerida. Em frasco Erlenmeyer de 250 mL, foi colocado 20 mL de ácido clorídrico 0,1 N (fatorado), acoplado após o condensador, onde foi recolhido o nitrogênio destilado. A amônia foi recebida nesta solução de ácido clorídrico, sendo que a saída do condensador deve estar imersa na solução. Deixou-se destilando até não ocorrer reação com o reagente de Nessler, verificado através da não mudança de coloração do indicador. O reagente de Nessler é composto de hidróxido de sódio

(14,3 g), iodeto de mercúrio (5 g) e água até completar 100 mL, de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Luz (1985). O volume do destilado é de, aproximadamente, 100 mL.

O frasco Erlenmeyer foi retirado do conjunto de destilação e foi realizada titulação com hidróxido de sódio 0,1N (fatorado), utilizando como indicador fenolftaleína. Foi anotado o valor gasto de solução de hidróxido de sódio e calculado o teor de nitrogênio, de acordo com a Equação 3.1:

$$N = \frac{((V_1 \cdot N_1) - (V_2 \cdot N_2)) \cdot M}{m} \cdot 100 \quad [\%] \quad (3.1)$$

Onde:  $V_1$  = volume de ácido clorídrico (L);

$N_1$  = normalidade da solução de ácido clorídrico (0,1N);

$V_2$  = volume de hidróxido de sódio (L);

$N_2$  = normalidade da solução de hidróxido de sódio (0,1N);

$M$  = massa atômica do nitrogênio ( $14 \text{ g mol}^{-1}$ )

$m$  = massa da amostra (g).

### 3.2.11 Composição monossacarídica

Em 2 mg de amostra foi adicionado 1 mL de TFA (ácido trifluoroacético) 1 M e incubou-se em estufa, à 100 °C, durante 12 h (ALBERSHEIM *et al.*, 1967; GORIN *et al.*, 1996). O conteúdo foi transferido para placas de Petri para que o TFA evaporasse. Após completa evaporação, 1 mL de água destilada foi adicionado ao material seco e o pH foi ajustado a 9 com uma solução de  $\text{Na}_2\text{BH}_4$  (WOLFROM e THOMPSON (1963a).

A acetilação, segundo o método proposto por Wolfrom e Thompson (1963b), foi realizada com ácido acético (pH 3-4) seguido de filtração e então seco em rotavapor. A adição de 4 mL de metanol e secagem em rotavapor foi repetida três vezes, e então 300  $\mu\text{L}$  de piridina e 300  $\mu\text{L}$  de anidrido acético foram adicionados. Após 12 h, adicionou-se 2 mL de clorofórmio e 1 mL de  $\text{CuSO}_4$  a 5 % e o sobrenadante foi retirado com pipeta Pasteur. Lavou-se a amostra com a solução de  $\text{CuSO}_4$  até que ficasse amarelo transparente, filtrou-se em frasco de penicilina e após a solução evaporar os monossacarídeos resultantes foram analisados em cromatógrafo gasoso Varian, modelo 3800, acoplado a espectrômetro de marca Saturn 2000R, com coluna capilar

DB-225 (25 m X 0,25 mm), sendo a temperatura de injeção de 50 °C, com rampa de aquecimento de 40°C min<sup>-1</sup> até atingir a temperatura constante de 220 °C.

### 3.3 Micro-organismo e manutenção

A espécie *Pleurotus sajor-caju*, obtida da Coleção de Culturas de Basidiomicetos do Instituto de Botânica (São Paulo/SP) sob o código CCB 019, foi mantida em meio sólido TDA, composto por 1,0 L de extrato de trigo, 20 g de dextrose e 15 g de ágar, conforme proposto por Furlan *et al.* (1997), sob refrigeração (4 °C) e os repiques feitos a cada três meses.

O extrato de trigo foi obtido mediante a infusão de grãos de trigo, previamente lavados, em água destilada, na proporção 1:2 (m/v). Após 10 minutos de fervura, a mistura foi filtrada e o extrato usado para preparar o meio TDA, o qual foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos.

### 3.4 Meios de cultivo

O meio de cultivo OXI utilizado nos experimentos foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa Processos Biotecnológicos da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE). O meio de cultivo denominado OXI tem como composição 10 g L<sup>-1</sup> de glicose, 5,4 mM de tartarato de amônio, 150 µM de sulfato de cobre, diferentes concentrações de pó de cascas de banana, dissolvidos em água de imersão de folhas secas de bananeira e o pH inicial ajustado em 6,0 por meio da adição de soluções de NaOH 6 N e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 12 N (LIBARDI-JR *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2012).

A água de imersão de folhas secas de bananeira utilizada no meio de cultivo OXI é um resíduo gerado na etapa inicial da produção de corpos frutíferos de *Pleurotus*. Este resíduo foi obtido mediante a imersão de 150 g de folhas secas de bananeira, previamente secas a 60 °C, em 3 L de água. Após 12 h em imersão separou-se as folhas do líquido gerado que foi denominado água de imersão de folhas secas de bananeira. O líquido foi filtrado em papel filtro quantitativo faixa preta e utilizado na composição dos meios de cultivo.

Os meios de cultivo denominado OXI 30, OXI 45 e OXI 60 apresentaram a mesma composição do meio de cultivo OXI, utilizando as concentrações de 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup> de pó de cascas de banana,

respectivamente. As cascas de banana foram secas a 60°C e trituradas até formarem pó.

### **3.5 Condições de cultivo**

#### **3.5.1 Avaliação da produção de lacase em frascos agitados**

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade de produção de enzimas por *P. sajor-caju*, em meio de cultivo OXI 30 e OXI 60, descritos no item 3.4.

Todos os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultivo. Estes foram esterilizados a 121 °C por 20 min, inoculados com dois discos de ágar de 12 mm de diâmetro contendo micélio fúngic de 7 dias e incubados a 30 °C sob agitação recíproca de 110 min<sup>-1</sup>, por 15 dias. Amostras foram retiradas em 7, 9, 12 e 15 dias de cultivo, sendo o volume total de cada frasco considerado uma amostra. Tanto o tempo final quanto os tempos de amostragem foram definidos de acordo com experimentos prévios realizados por Libardi Jr. *et al.* (2011). As amostras foram centrifugadas a 3.000 min<sup>-1</sup> durante 10 min para a separação da biomassa, sendo o sobrenadante congelado para utilização nos procedimentos analíticos posteriores. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **3.5.2 Avaliação da produção de lacase em escala ampliada**

Inicialmente, os parâmetros cinéticos foram avaliados utilizando-se os meios de cultivo OXI 30 (definido no item 3.4) e, posteriormente, o meio OXI 45. O meio de cultivo OXI 60 não foi avaliado nesta escala devido a dificuldades nas condições de operação do cultivo em biorreator. Como a concentração de pó de cascas de banana no meio OXI 60 era muito elevada, a passagem do material pelo sistema de amostragem era obstruída, impossibilitando a retirada da amostra ou provocando a contaminação do cultivo.

Os inóculos utilizados nos ensaios em biorreator foram preparados em frascos Duran de 2 L com 400 mL (ou seja, 10 % do volume de trabalho do biorreator) de meio de cultivo OXI, definido no item 3.4, sem adição de pó de cascas de banana e sulfato de cobre. Para

todos os meios de cultivo o pH inicial foi ajustado em 6,0 com NaOH 6 N ou H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 12 N.

Os frascos Duran foram inoculados com quatro discos de micélio fúngico quando atingiram a extremidade da placa de Petri. Em seguida, foram incubados a 30 °C em agitador B.BRAUN, modelo CERTOMAT U, com agitação recíproca de 110 min<sup>-1</sup>, por sete dias (FURLAN *et al.*, 2008).

Os ensaios foram conduzidos em biorreator de mistura completa, modelo B. BRAUN (modelo BIostat B), com cuba de vidro de capacidade de 5 L e volume de trabalho de 4 L. O pH inicial foi ajustado em 6,0 por meio da adição de soluções de NaOH 6 N ou H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 12 N, sendo controlado por um sensor de pH acoplado ao biorreator. A temperatura foi mantida em 30 °C por meio da circulação de água na camisa do biorreator e monitorada por um sensor de temperatura. A vazão de ar foi mantida em 0,3 vvm e a frequência dos agitadores em 350 min<sup>-1</sup>. Não foi possível obter valores de K<sub>L</sub>a para o meio de cultivo OXI e suas variações devido a presença de pó de cascas de banana. O sistema de agitação foi composto por duas turbinas, com seis pás planas, estando a primeira turbina situada imediatamente acima do anel dispersor de ar. O diâmetro das turbinas é de 63 mm e a distância entre elas de 75 mm.

Os valores de vazão de ar e a velocidade de agitação utilizados neste ensaio foram definidos de acordo com experimentos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa Processos Biotecnológicos da Universidade da Região de Joinville para a produção de compostos bioativos por *Pleurotus* com outros meios de cultivo (ASSIS, 2011; BONATTI-CHAVES *et al.*, 2014).

### 3.5.3 Avaliação da influência da agitação sobre a produção de lacase

Este estudo foi realizado pois os parâmetros que mais afetam o cultivo submerso de fungos filamentosos e, conseqüentemente, a produção de enzimas oxidativas, cuja liberação para o meio de cultivo se dá durante o crescimento apical do fungo (BUSWELL *et al.*, 1996), são o suprimento de oxigênio, a tensão de cisalhamento, a morfologia fúngica e a reologia do meio de cultivo (MARQUEZ-ROCHA *et al.*, 1999; HESS, *et al.*, 2002; MAJEAU, *et al.*, 2010). Portanto, os parâmetros como agitação e taxa de aeração influenciam fortemente a produção enzimática durante o período de crescimento fúngico

(FENICE *et al.*, 2003; BETTIN, 2010; TINOCO-VALÊNCIA *et al.*, 2014).

O estudo da variação da agitação foi realizado por meio de ensaios cinéticos utilizando o meio OXI 45 (descrito no item 3.4), mantendo a vazão de ar em 0,3 vvm e variando a velocidade de agitação em 100 e 500  $\text{min}^{-1}$ . O preparo do inóculo, do biorreator e as condições de cultivo para pH e temperatura estão descritas no item 3.5.2. Os experimentos foram realizados em duplicata.

### **3.6 Caracterização da lacase**

#### **3.6.1 Determinação do pH ótimo e temperatura ótima**

Para determinação do pH ótimo, a reação enzimática foi conduzida em solução tampão McIlvain com valores de pH de 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5, mantendo-se as demais condições previstas no teste de atividade da enzima lacase (item 3.8.2).

Para determinação da temperatura ótima, a reação enzimática foi conduzida em temperaturas de incubação de 20, 30, 40 e 50 °C mantendo-se as demais condições previstas no teste de atividade enzimática (item 3.8.2).

#### **3.6.2 Estabilidade da enzima com o pH e a temperatura**

Para realização dos testes de estabilidade com o pH, o caldo enzimático bruto foi incubado em diferentes intervalos de tempo (2 a 72 h), utilizando-se valores de pH de 3,0, 5,0, e 7,0 em tampão McIlvain e temperatura ambiente, sendo, na sequência realizado o teste da atividade enzimática, em triplicata, nas condições padrões (item 3.8.2).

Para realização dos testes de estabilidade com a temperatura, o caldo enzimático bruto foi incubado por diferentes intervalos de tempo (2 a 72 h), em temperaturas de 20, 30, 40 e 50°C, sendo na sequência realizado o teste da atividade enzimática nas condições padrões do teste (item 3.8.2).

Após o descongelamento das amostras mediu-se a atividade sendo esta considerada a atividade relativa de 100%.

### 3.7 Ensaio de degradação do bisfenol-A

Os ensaios de degradação foram realizados utilizando-se a proporção 0,5:1,5 mL de caldo enzimático bruto ( $282,96 \text{ U L}^{-1}$ ) : bisfenol-A (95% pureza; Sigma-Aldrich), totalizando 2 mL de volume de reação e concentração de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de bisfenol-A. As misturas foram incubadas à temperatura ambiente e as extrações do bisfenol-A remanescente foram realizadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 h. Amostras contendo caldo enzimático bruto completamente inativado, após tratamento térmico a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min, foram avaliadas conforme as misturas acima.

Antes do processo de extração, adicionou-se às amostras uma gota de ácido acético concentrado e agitou-se. Procedeu-se, então, a extração do bisfenol-A utilizando-se éter etílico. Analisou-se no sobrenadante a concentração de bisfenol-A utilizando-se um cromatógrafo gasoso marca Agilent 6890 com detector FID. A coluna HP-5 (5% phenylmethylsiloxane), mantida a  $290 \text{ }^\circ\text{C}$  durante a injeção e depois programada para aquecimento de  $140 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  à  $310 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 10 min, foi utilizada para análise quantitativa. O bisfenol-A foi identificado mediante seu tempo de retenção característico e as concentrações do composto foram calculadas com base na curva de calibração estabelecida com padrão externo de bisfenol-A. Todas análises foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados em termos de valores médios das replicatas.

### 3.8 Métodos analíticos

#### 3.8.1 Concentração de glicose

A concentração de glicose foi medida pelo método Glicose-E (CELM, Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos). Neste método, a glicose é oxidada pela enzima glicose-oxidase (GOD) a ácido glucônico e água oxigenada. Em presença de peroxidase (POD),  $\text{H}_2\text{O}_2$  produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminofenazona (4-AF), dando lugar à formação de um cromógeno vermelho cereja, cuja intensidade da cor é proporcional à concentração de glicose presente na solução em análise (TRINDER, 1969).

As amostras foram diluídas em água deionizada de modo a se obter soluções de glicose com concentração entre 0,1 e  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Em um

volume de 1 mL de reativo GOD-POD, acrescentou-se 1 mL da amostra diluída e incubou-se a 37°C por 20 min. As medições de absorbância foram realizadas a 505 nm em espectrofotômetro (modelo UV-160A, SHIMADZU), tendo como branco uma preparação idêntica, na qual a amostra foi substituída por água. Em paralelo às amostras analisadas, quatro soluções padrões contendo 0,1, 0,5, 0,8 e 1 g L<sup>-1</sup> de glicose, sofreram o mesmo tratamento. Com base nas leituras obtidas com os padrões, foi definida uma equação, por regressão linear, através da qual foram calculadas as concentrações de glicose nas amostras.

### 3.8.2 Quantificação da atividade de lacase

A atividade da enzima lacase foi determinada pelo monitoramento do aumento da absorbância (420 nm), produzida pela oxidação do composto ABTS na concentração de 1,8 mM, utilizado como substrato e coeficiente de extinção molar de 36.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Em um volume de 0,8 mL de ABTS, acrescentou-se 0,1 mL de solução tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) e 0,1 mL do caldo enzimático, todas a uma temperatura de 30 °C. Os cálculos foram realizados a partir da Equação 3.2.

$$\frac{U}{L} = \frac{\Delta \text{abs} \cdot V}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot t} \quad [U L^{-1}] \quad (3.2)$$

Sendo:  $\Delta \text{abs}$ , diferença entre absorbância final e absorbância inicial;

V, volume total da reação (mL);

$\epsilon$ , coeficiente de extinção molar (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);

v, volume de amostra (mL);

d, comprimento do passo (cm);

t, tempo de reação (min).

A atividade de lacase foi expressa em U L<sup>-1</sup> (µmoles produto min<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>) utilizando-se o espectrofotômetro UV-1601PC UV visible – Shimadzu. Uma unidade de atividade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol do substrato por minuto (BUSWELL *et al.*, 1996).

### 3.9 Metodologias utilizadas para os cálculos cinéticos

#### 3.9.1 Fator de conversão de glicose em lacase

O fator de conversão de substrato em lacase foi calculado pela seguinte Equação:

$$Y_{L/S} = \frac{L_m - L_0}{S_0 - S_m} \quad [\text{U g}^{-1}] \quad (3.3)$$

Sendo:  $L_m$ , atividade enzimática máxima de lacase obtida no cultivo ( $\text{U L}^{-1}$ );

$L_0$ , atividade enzimática de lacase no início do processo ( $\text{U L}^{-1}$ ).

$S_0$ , concentração de glicose no início do processo ( $\text{g L}^{-1}$ );

$S_m$ , concentração de glicose no tempo correspondente a atividade enzimática máxima obtida no cultivo ( $L_m$ ) ( $\text{g L}^{-1}$ ).

#### 3.9.2 Produtividade enzimática

A produtividade de lacase foi calculada conforme a Equação 3.4:

$$P = \frac{L_m - L_0}{t_p} \quad [\text{U L}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad (3.4)$$

Sendo:  $t_p$ , tempo de cultivo em que a atividade em lacase é máxima (h).

#### 3.9.3 Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ )

O caldo enzimático bruto obtido dos ensaios em biorreator foi utilizado para o cálculo das constantes cinéticas, bem como para os testes de caracterização enzimática. A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) foram calculadas utilizando ABTS como substrato nas concentrações de 0,1 a 2 mM e as demais condições previstas no teste de atividade da enzima lacase (item 3.8.2) foram mantidas. O programa utilizado para cálculo dos valores aparentes de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foi o OriginPro 8.0 PRO<sup>®</sup>, por meio da linearização da expressão de Michaelis-Menten por meio do método de Lineweaver-Burk.

### **3.10 Construção das curvas cinéticas e análises estatísticas**

Para se avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos resultados utilizou-se o Teste de Tukey, com nível de confiança de 95 %, e o programa Origin 8.0 PRO<sup>®</sup>. As curvas cinéticas obtidas dos ensaios em biorreator foram obtidas por meio do ajuste dos pontos experimentais de cada repetição (experimentos realizados em duplicata) e o “software” para tratamento de dados experimentais de cultivo microbiano (EMERSON), desenvolvido no Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT) por Wagner Bruna e Manuel F. Barral.

O programa Origin 8.0 PRO<sup>®</sup> foi utilizado para graficar as curvas ajustadas juntamente com os pontos experimentais de cada repetição. O Teste Q de Dixon, com nível de confiança de 95 %, foi utilizado nos experimentos de caracterização enzimática e degradação do bisfenol-A (experimentos realizados em triplicata) a fim de avaliar a rejeição de valores desviantes (RORABACHER, 1991).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização química dos resíduos agroindustriais

Um fator muito importante para a produção enzimática e a sua atividade por fungos lignocelulolíticos é a natureza/composição química dos materiais utilizados no meio de cultivo (ELISASHVILI *et al.*, 2008). As Figuras 8 e 9 apresentam a caracterização química para a água de imersão de folhas secas de bananeira e para o pó de cascas de banana, respectivamente, utilizados na formulação do meio de cultivo OXI, para a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju* CCB 019.

Figura 8 - Composição química da água de imersão de folhas secas de bananeira em termos de teor de matéria orgânica (%), carbono (%), nitrogênio total (%), proteína bruta (%), cinzas (%), composição monossacarídica (%), relação carbono/nitrogênio e pH.

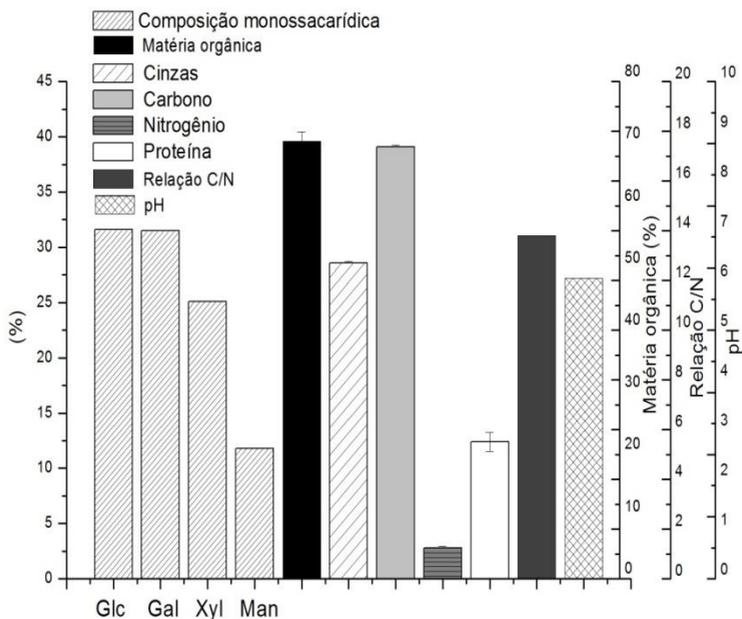
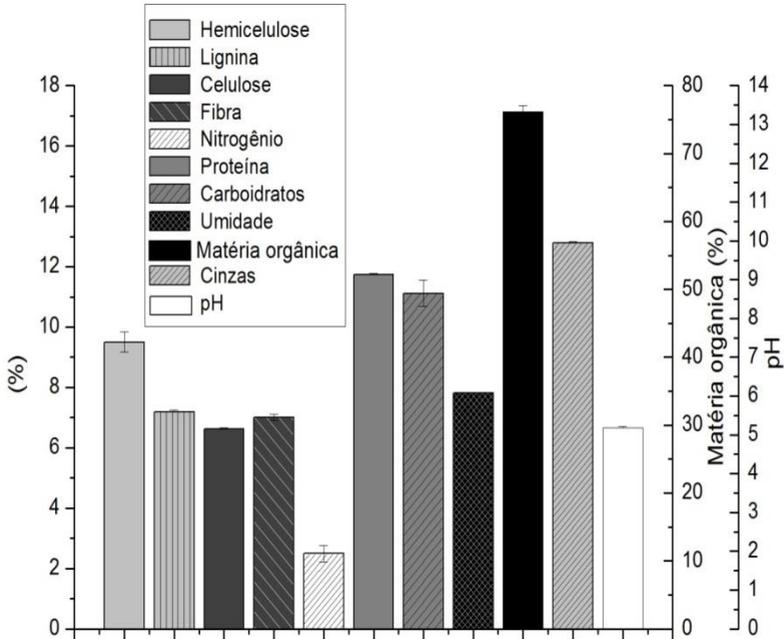


Figura 9 - Composição química das cascas de banana em termos de teor de hemicelulose (%), lignina (%), celulose (%), fibra bruta (%), nitrogênio (%), proteína (%), carboidratos totais (%), umidade (%), matéria orgânica (%), cinzas (%) e pH.



Observa-se nas Figuras 8 e 9 os percentuais médios de matéria orgânica nos dois resíduos estudados. A água de imersão de folhas secas de bananeira apresentou teor de matéria orgânica igual a  $70,4 \pm 0,63$  % e o pó de cascas de banana igual a  $76,17 \pm 0,89$  %, respectivamente. Dividindo-se estes valores pelo fator 1,8, de acordo com Kiehl (1985), obtém-se o teor médio de carbono orgânico nas amostras, sendo estes valores iguais a 39,1 e 42,31 %, para água de imersão de folhas secas de bananeira e pó de cascas de banana, respectivamente. O carbono orgânico é o carbono presente em todos os tecidos vegetais e animais e, consequentemente, nos resíduos/substratos/fertilizantes utilizados para o seu crescimento (SOUZA *et al.*, 1995).

Os fungos necessitam de compostos orgânicos, por serem quimiorganotróficos, como fonte de carbono e energia para o seu

desenvolvimento. Os fungos exigem, de preferência, carboidratos simples como a glicose. Os percentuais de diferentes açúcares na água de imersão de folhas secas de bananeira foram determinados neste trabalho, sendo os maiores percentuais encontrados de glicose (31,6 %) e galactose (31,5 %) (Figura 8). Estes açúcares, liberados pelas folhas secas de bananeira na água, juntamente com a suplementação do meio de cultivo com  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glicose, representam a fonte de carbono solúvel mais facilmente utilizada por *Pleurotus sajor-caju*.

Entretanto, outros açúcares como sacarose, maltose e fontes de carbono mais complexas como amido e celulose podem também ser utilizadas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008), principalmente devido ao complexo enzimático único presente nestes organismos. Devido a este complexo, fungos da podridão branca são eficientes na degradação e utilização de compostos como lignina e hemicelulose, normalmente de difícil degradação para muitos micro-organismos (BONONI e TRUFEM, 1995; ROSADO *et al.*, 2002; CABRERA *et al.*, 2002; DIAS, 2010; AGUIAR e FERRAZ, 2011).

O teor de carboidratos totais determinado para o pó de cascas de banana foi de  $11,11 \pm 0,43 \%$  (Figura 9). Estes compostos são importantes para o crescimento do fungo e, conseqüentemente, para a produção de enzimas. Importante também para o crescimento do fungo, são os percentuais de fibra bruta, lignina, hemicelulose e celulose, compostos definidos como fontes de carbono e também como indutores para a produção de enzimas lignocelulolíticas (MUNOZ *et al.* 1997; ELISASHVILI *et al.*, 2009; LIBARDI-JR *et al.*, 2011; MANAVALAN *et al.*, 2013; JIN e NING, 2013; QUEVEDO-HIDALGO *et al.*, 2015) por fungos. Defini-se fibra bruta como a parte dos carboidratos resistente ao tratamento sucessivo com ácido ou base diluída (SILVA, 1981). O teor de fibra bruta encontrado para o pó de cascas de banana foi de  $7,13 \pm 0,21 \%$  (Figura 9). Os teores de hemicelulose, lignina e celulose para o pó de cascas de banana foram de  $9,49 \pm 0,33$ ,  $7,19 \pm 0,05$  e  $6,63 \pm 0,04 \%$ , respectivamente.

Os percentuais médios de nitrogênio na água de imersão e no pó de cascas de banana foram de  $2,84 \pm 0,25 \%$  e  $2,49 \pm 0,27 \%$ , respectivamente (Figuras 8 e 9). Os fungos, como não são organismos fixadores de nitrogênio necessitam que compostos contendo nitrogênio sejam fornecidos pelo meio de cultivo a fim de propiciar seu desenvolvimento. O nitrogênio pode estar disponível no meio de cultivo tanto na forma inorgânica como orgânica. Os compostos comumente

encontrados em meios de cultivo são sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona de soja (WALKER e WHITE, 2005).

De acordo com Breene (1990), tendo-se determinado o teor de nitrogênio total aplica-se o fator de correção 4,38 para obtenção do teor de proteína bruta das amostras. Os teores médios de proteína bruta encontrados neste trabalho para a água de imersão de folhas secas de bananeira e pó de cascas de banana foram de 12,4 e 11,75 %, respectivamente (Figuras 8 e 9).

A partir da determinação dos teores de carbono orgânico total e nitrogênio total das amostras é possível a determinação da relação carbono/nitrogênio. Neste trabalho obteve-se relação carbono/nitrogênio iguais a 13,8 e 16,9 para água de imersão e pó de cascas de banana, respectivamente.

A determinação de cinzas fornece uma indicação da riqueza da amostra em elementos minerais (BANO e RAJARATHNAM, 1988). Os teores de cinzas na água de imersão de folhas secas de bananeira e pó de cascas de banana foram de  $28,6 \pm 0,56$  e  $12,8 \pm 0,02$  %, respectivamente. Minerais são elementos essenciais à composição de enzimas, vitaminas, proteínas, nucleotídeos, etc. (BARBOSA *et al.*, 2004; FELLOW, 2008, ORLANDELLI, *et al.*, 2012). Sendo assim, ao se utilizar estes resíduos na formulação do meio de cultivo pode-se diminuir gastos com a adição de microelementos ao meio de cultivo.

Carvalho *et al.* (2014) avaliaram a composição mineral (macro e micronutrientes) dos substratos (inicial e residual (pós-colheita)) à base de diferentes combinações de resíduos (folhas secas, pseudocaule e pseudocaule + folhas) de cultivares de bananeira – *Musa spp.*, durante 49 dias de cultivo da linhagem POS 09/100 de *Pleurotus ostreatus*. Os autores verificaram que todos os substratos à base de resíduos dos diferentes cultivares de bananeira apresentaram quantidades satisfatórias de nutrientes para o cultivo de *P. ostreatus*, tanto na fase inicial de cultivo como na final. Com relação aos micronutrientes, a concentração de Na variou de 100 a 200 mg kg<sup>-1</sup>, de Cu de 2 a 6 mg kg<sup>-1</sup>, Fe de 400 a 600 mg kg<sup>-1</sup>, Mn 50 a 100 mg kg<sup>-1</sup> e Zn de 40 a 70 mg kg<sup>-1</sup>. Todos os micronutrientes tiveram sua concentração aumentada no final do cultivo. Os autores atribuem esse acréscimo à decomposição dos componentes orgânicos dos substratos no período de incubação.

Estudos evidenciam o ajuste do pH próximo à neutralidade para a produção de lacases por fungos basidiomicetos (TLECUITL-BERISTAIN *et al.*, 2008; ZUCCA *et al.*, 2011; BETTIN *et al.*, 2011;

MANAVALAN *et al.*, 2013). Os valores de pH encontrados neste trabalho para água de imersão de folhas secas de bananeira estão próximos da neutralidade (em torno de 6,0), dispensando, desta forma, gastos com correção de pH.

Figueiró *et al.* (2011) analisaram a influência da composição química de vários substratos: palha de arroz, palha de feijão, palha de trigo, folha de bananeira, palha de sorgo e sabugo de milho sobre o cultivo de *Pleurotus florida*. De um modo geral, os autores observaram grande variação nos teores de celulose (28,1 a 40,5 %), lignina (4 a 12,4 %), hemicelulose (16,7 a 49,1 %), cinzas (3 a 10,7 %), relação C/N (20,2 a 79,3 %), bem como nos teores nitrogênio (0,6 a 2,1 %), de macro (g kg<sup>-1</sup>) (P - 1,1 a 2,0; K - 7 a 21,2; Ca - 0,6 a 10,1; Mg - 0,3 a 4,1) e micronutrientes (mg kg<sup>-1</sup>) (Fe - 96,4 a 476; Mn - 7,8 a 835,8; Zn - 7,5 a 30,2). *P. florida* foi cultivado com sucesso, especialmente em palha de arroz e palha de feijão. Segundo os autores não foi possível isolar apenas um fator químico responsável pelos melhores resultados de produção e eficiência biológica. O cultivo de *P. florida* foi favorecido em substratos com menor teor de hemicelulose, maior teor de cinzas, relação C/N em torno de 45 (N = 1,0 %), e com maior teor de P, K, Ca, Mg e Mn. Segundo Eira (2004), o valor ideal para a relação C/N está entre 20 a 50/1. O excesso de N mineral ou orgânico, além de exercer um efeito negativo sobre o crescimento micelial, pode inibir a síntese de enzimas que degradam a lignina (KIRK *et al.*, 1978; GRACIOLLI *et al.*, 2010).

Bernardi *et al.* (2013) estudaram o crescimento micelial (cm dia<sup>-1</sup>), massa fresca (g) obtida, a produtividade (%) e a eficiência biológica (%) do cultivo de duas espécies de *Pleurotus*, *P. sajor-caju* (PSC96/03) e *P. ostreatoroseus* (POR01/06), cultivados nos substratos bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante, resíduos da cultura da mamona e palha de arroz. A linhagem *P. sajor-caju* apresentou maior velocidade de crescimento que *P. ostreatoroseus*, os substratos com menor relação C/N (37:1) propiciaram maior vigor micelial, sendo os valores testados de C/N de 162:1 a 37:1. O valor de relação C/N 37:1 encontra-se dentro da faixa sugerida por Eira (2004). O substrato à base de resíduos da cultura da mamona apresentou os maiores valores de eficiência biológica.

Carvalho *et al.* (2012) estudaram a produção de *Pleurotus ostreatus* em folhas secas de bananeira, pseudo-caule de bananeira e folhas secas + pseudo-caule, de quatro espécies de bananeira (*Thap*

*Maeo, Prata Anã, Pelipita e Caipira*). Os substratos compostos somente por folhas secas de bananeira apresentaram os menores valores de eficiência biológica, (*Thap Maeo* – 1.5%, *Pelipita* - 4%, *Caipira* 8.5% e *Prata Anã* – 12 %). Este substrato, folhas secas de bananeira, apresentou também os maiores percentuais de nitrogênio, em relação aos demais substratos, e por conta disso, valores de relação C/N menores (na faixa de 20 a 23/1). Segundo os autores, baseados em estudos realizados por Donini *et al.* (2005), altas concentrações de nitrogênio no meio de cultivo não favorecem a degradação da lignina pelo fungo retardando ou até mesmo inibindo o crescimento micelial.

Siqueira *et al.* (2011) estudaram a produção de *Pleurotus sajor-caju* em engaço de bananeira e grama batatais. O engaço de bananeira foi combinado com outros resíduos (farelo de trigo, capim “Coast-cross”, palha de feijão e resíduo de lixadeira de algodão), com o objetivo de se obter substratos com diferentes concentrações de nitrogênio. Como a grama batatais é relativamente rica em proteína, a mesma foi combinada com outros resíduos (engaço de bananeira, capim “Coast-cross” e palha de feijão), de forma a manter a concentração de nitrogênio em torno de 1,5 % no substrato. O engaço de bananeira e a grama batatais foram mais eficientes na produção de *Pleurotus sajor-caju* quando utilizados puros (eficiência biológica de 74,4 e 74,12 %, respectivamente). Quando combinados com outros resíduos ou gramíneas, os autores observaram queda nos valores de eficiência biológica ou até mesmo ausência de frutificação, indicando influência negativa de alta concentração de nitrogênio sobre o cultivo de *Pleurotus sajor-caju*.

Luz *et al.* (2012) realizaram um estudo sobre a atividade de enzimas oxidativas (lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases) e hidrolíticas (celulases, xilanases e tanases) durante o cultivo de duas variedades de *Pleurotus*, em diferentes resíduos agroindustriais (cascas de café, cascas de eucalipto e serragem de eucalipto), com e sem adição de farelo de arroz (20 %). Os autores observaram formação de corpos frutíferos em todos os substratos, porém maiores valores de eficiência biológica e atividade enzimática foram observados nos cultivos com adição de farelo de arroz. Segundo Kahraman e Gurdal (2002), a produção e a atividade de enzimas lignocelulolíticas por fungos depende da composição do substrato e da relação C/N. De acordo com estes autores, afetam a atividade e a produção de enzimas lignocelulolíticas, a disponibilidade de oxigênio no

meio de cultivo, bem como as concentrações de carbono e nitrogênio, o pH e a temperatura.

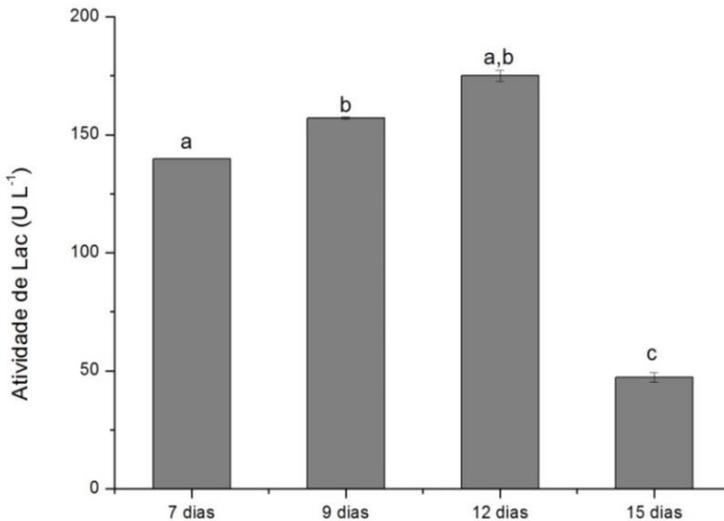
Quevedo-Hidalgo *et al.* (2015) realizaram o cultivo líquido de *Pleurotus ostreatus* em biorreator ( $240 \text{ min}^{-1}$ , 2 vvm e pH 5,6) utilizando resíduos da floricultura, uma importante fonte de renda para muitos agricultores na Colômbia, para produção de enzimas, na ausência e presença dos indutores  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  (7,5 mM). O meio de cultivo foi composto por:  $50 \text{ g L}^{-1}$  de resíduos da floricultura (crisântemos ou rosas – caules e folhas),  $2 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $5 \text{ g L}^{-1}$  de peptona,  $0,075 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $1 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $175 \text{ g L}^{-1}$  de farelo de trigo. Primeiramente os autores caracterizaram os resíduos em termos de celulose (38,4 – 49,6 %), hemicelulose (7,5 – 8,8 %), lignina (9,5 – 17,5 %), N (1,94 – 2 %), Ca (0,63 – 0,78  $\text{mg kg}^{-1}$ ), K (0,88 – 1,78  $\text{mg kg}^{-1}$ ), Mg (0,19 – 0,26  $\text{mg kg}^{-1}$ ), Cu (8,99 – 24,6  $\text{mg kg}^{-1}$ ), Fe (256 – 258  $\text{mg kg}^{-1}$ ), Mn (70,7 – 86,3  $\text{mg kg}^{-1}$ ), Zn (58,8 – 82,3  $\text{mg kg}^{-1}$ ). O substrato que utilizou resíduos de crisântemos e os indutores favoreceu a produção enzimática (atividade de lacase igual a  $4.693,4 \pm 374,9 \text{ U L}^{-1}$ ). A atividade de lacase quando utilizado substrato com resíduos de rosas foi de  $2.640 \pm 142,3 \text{ U L}^{-1}$ . A presença dos indutores aumentou em 4,8 e 6 vezes as atividades de lacase nos substratos com crisântemos e rosas, respectivamente. A presença de lignina nestes resíduos, segundo os autores, apresenta influência positiva sobre a produção de lacase por fungos lignocelulolíticos. Os teores de lignina foram de 17,5 e 14,8% nos resíduos de crisântemos e rosas, respectivamente. Segundo Tinoco *et al.* (2011), a adição de lignina ao meio de cultivo apresenta forte influência positiva sobre a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*. Segundo os mesmos autores, quando cobre é adicionado simultaneamente à lignina ao meio de cultivo, a atividade de lacase aumenta mais do que quando ambos são adicionados separadamente, mostrando o efeito sinérgico entre os indutores e sobre a produção de enzimas. Este efeito também foi observado por Quevedo-Hidalgo *et al.* (2015), em que os conteúdos de lignina e cobre foram maiores nos substratos contendo resíduos de crisântemos, assim como a atividade enzimática, que nos substratos contendo resíduos de rosas.

## 4.2 Produção de lacase por *P. sajor-caju*

### 4.2.1 Produção de lacase em meio OXI 30

Neste estudo foi avaliada a capacidade do fungo *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 em produzir lacase em meio líquido formulado com resíduos agroindustriais. Na Figura 10 estão apresentados os valores médios das atividades de lacase em meio de cultivo OXI 30 (água de imersão, pó de cascas de banana 30 g L<sup>-1</sup>, glicose 10 g L<sup>-1</sup>, tartarato de amônio 5,4 mM, sulfato de cobre 150 µM e pH 6,0).

Figura 10 - Valores médios ± desvio padrão de atividades de lacase (U L<sup>-1</sup>) obtidos com *P. sajor-caju* em meio de cultivo OXI 30. As colunas indicam valores médios de Atividade de Lacase (U L<sup>-1</sup>) e as barras o desvio padrão. Letras iguais significam médias sem diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiança (p<0,05).



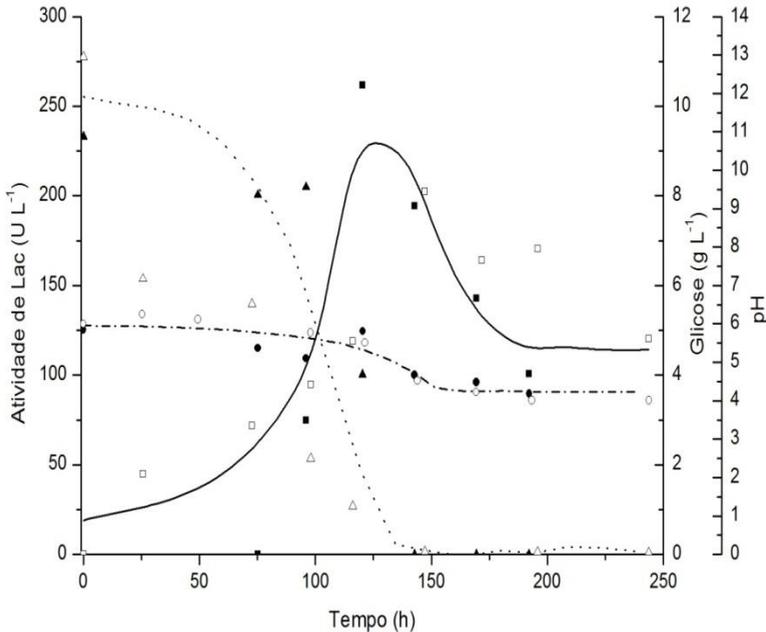
De acordo com a Figura 10, observa-se maior atividade de lacase em 9 dias de cultivo,  $161,02 \pm 0,43$  U L<sup>-1</sup>. O valor de atividade de lacase obtido em 12 dias de cultivo, de acordo com análise estatística, devido ao maior desvio padrão entre os ensaios, é igual aos obtidos nos

dias 7 e 9. Vários artigos reportam o uso de matérias lignocelulósicos na produção de lacase por fungos do gênero *Pleurotus*. Ardon *et al.* (1996) utilizaram extrato de talos de algodão na produção de lacase por *P. pulmonarius* e verificaram atividade máxima igual a  $0,5 \text{ U mL}^{-1}$  ( $500 \text{ U L}^{-1}$ ). Baldrian e Gabriel (2002) ao adicionarem palha de trigo umedecida com  $1 \text{ mM}$  de nitrato de cádmio no cultivo de *P. ostreatus*, obtiveram  $700 \text{ U L}^{-1}$  de atividade enzimática. Elisashvili *et al.* (2009) avaliaram bagaço de uva, maçã e pêssego, cascas de laranja e folhas de *maple*, sob a produção de lacase, por diferentes espécies fúngicas. As atividades máximas, obtidas por *P. ostreatus*, foram 750, 1.040, 1.720, 8.340 e  $520 \text{ U L}^{-1}$ , respectivamente. As cascas de laranja promoveram as maiores atividades de lacase para esta espécie. As cascas de laranja apresentam além de celulose (21 %), hemicelulose (13 %), lignina (2 %) e nitrogênio (1,2 %), teores de açúcares livres e ácidos orgânicos significativos que asseguram o bom crescimento fúngico, bem como compostos aromáticos (flavonas e flavonóis) solúveis em água, os quais são capazes de induzir ou estimular a biossíntese de enzimas ligninolíticas por fungos. Libardi-Jr *et al.* (2011) avaliaram a produção de lacase por *P. ostreatus* em raspas de madeira ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ), pedaços de papel filtro ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) com adição de sulfato de cobre  $150 \text{ }\mu\text{M}$  e pó de cascas de banana ( $40 \text{ g L}^{-1}$ ) com adição de sulfato de cobre  $150 \text{ }\mu\text{M}$ . As atividades máximas obtidas nesses ensaios foram 20,24, 0,84 e  $372,5 \text{ U L}^{-1}$ , respectivamente.

A produção de lacase em meio OXI 30 foi conduzida em escala ampliada para verificar o comportamento geral do cultivo de *P. sajor-caju* com relação à cinética de crescimento em processo descontínuo simples.

Na Figura 11 estão apresentadas os perfis das variações das concentrações de glicose, da atividade de lacase e do valor de pH com o tempo obtidos no cultivo de *Pleurotus sajor-caju* utilizando meio de cultivo OXI 30. A concentração de biomassa não foi acompanhada ao longo do cultivo devido a biomassa encontrar-se aderida ao material sólido, pó de cascas de banana, presente no meio de cultivo.

Figura 11 - Atividade de lacase (linha contínua), concentração de glicose (linha pontilhada) e pH (linha tracejada e pontilhada) em função do tempo (h) no cultivo de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo simples, utilizando meio de cultivo OXI 30. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas do experimento (Atividade de Lac - ■-□-, Glicose -▲-△- e pH -●-○).



A maior atividade de lacase ( $231,18 \text{ U L}^{-1}$ ) foi observada em torno de 125 h de cultivo (Figura 11). Neste tempo, o pH estava próximo a 5,5 e a concentração de glicose em torno de  $0,2 \text{ g L}^{-1}$ . Observa-se ainda, maior inclinação da curva de consumo de glicose no mesmo período de tempo em que se observa maior inclinação da curva de atividade enzimática, podendo-se associar o período de intenso consumo de glicose a um intenso crescimento fúngico e, conseqüentemente, a maior produção enzimática. Comportamento semelhante foi relatado por Hess *et al.* (2002) em estudos com *Trametes multicolor* em biorreator, em que o aumento da atividade enzimática ocorreu juntamente com o consumo da fonte de carbono e aumento da

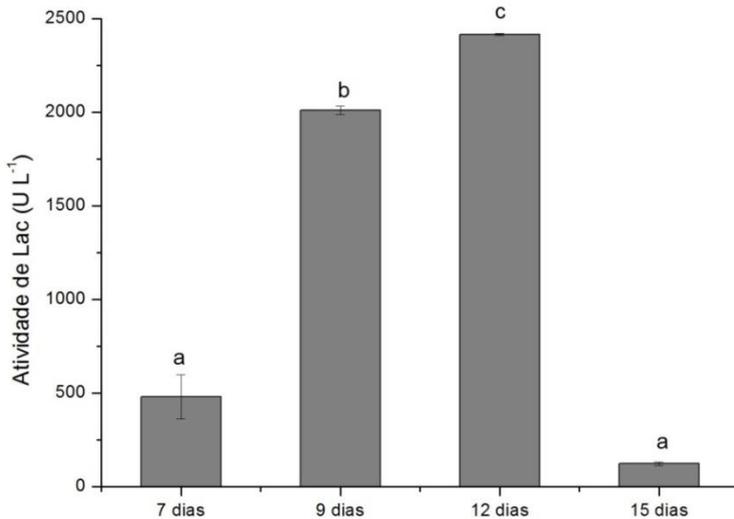
biomassa fúngica. De acordo com a Figura 11, a partir de 161 horas de cultivo o pH tornou-se estável, em torno de 4,2.

Comparando-se os valores de atividade máxima de lacase observados nas Figuras 10 e 11, observa-se aumento estatisticamente significativo. A ampliação de escala, em biorreator, tem por objetivo proporcionar as condições adequadas de temperatura, pH, concentração de substrato e oxigênio dissolvido, para a produção dos metabólitos de interesse. No entanto, pretendia-se obter valores de atividade enzimática maiores, visto que em literatura encontram-se vários trabalhos com atividade superior a reportada neste trabalho (ARDON *et al.*, 1996; BALDRIAN e GABRIEL, 2002; ELISASHVILI *et al.*, 2009; LIBARDI-JR *et al.*, 2012; QUEVEDO-HIDALGO *et al.*, 2015). Desta forma, testou-se, em função do reportado em literatura por Tinoco *et al.* (2011) e Quevedo-Hidalgo *et al.* (2015), os quais concluem em seus trabalhos que a lignina presente em compostos lignocelulósicos diversos atua, juntamente com indutores como  $\text{Cu}^{2+}$ , positivamente sobre a produção de enzimas por fungos celulolíticos, aumentar a concentração de pó de cascas de banana no meio de cultivo OXI de 30 g L<sup>-1</sup> para 60 g L<sup>-1</sup>. Desta forma, avaliar a influência deste resíduo sobre a produção de lacase por *P. sajor-caju*.

#### **4.2.2 Produção de lacase em meio OXI 60 e em meio OXI 45**

Na Figura 12 estão apresentados os valores médios das atividades de lacase em meio de cultivo OXI 60 (água de imersão, pó de cascas de banana 60 g L<sup>-1</sup>, glicose 10 g L<sup>-1</sup>, tartarato de amônio 5,4 mM, 150 µM de sulfato de cobre e pH 6,0) obtidos com *P. sajor-caju* CCB 019.

Figura 12 – Valores médios  $\pm$  desvio padrão de atividades de lacase ( $\text{U L}^{-1}$ ) obtidos com *P. sajor-caju* em meio de cultivo OXI 60. As colunas indicam valores médios de Atividade de Lacase ( $\text{U L}^{-1}$ ) e as barras o desvio padrão. Letras iguais significam médias sem diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiança ( $p < 0,05$ ).



De acordo com a Figura 12, observa-se maior atividade de lacase em 12 dias de cultivo,  $2.416 \pm 4 \text{ U L}^{-1}$ . Esta atividade é superior às atividades máximas reportadas por Libardi-Jr *et al.* (2011) e Libardi-Jr *et al.* (2012) utilizando os fungos *P. ostreatus* e *Phoma* sp., e meios de cultivo semelhantes. Os meios foram formulados com sulfato de cobre  $150 \mu\text{M}$  e pó de cascas de banana  $40 \text{ g L}^{-1}$  dissolvidos em (a) água destilada e em (b) meio Kirk. O valor de atividade de lacase obtido neste trabalho ( $2.416 \pm 4 \text{ U L}^{-1}$ ) foi 6 e 2 vezes superior, respectivamente, aos reportados por Libardi-Jr *et al.* (2011), utilizando *P. ostreatus* cultivado no meio (a) ( $372 \text{ U L}^{-1}$ ) e no meio (b) ( $1.575 \text{ U L}^{-1}$ ).

Comparando-se os valores de atividade de lacase dos experimentos representados nas Figuras 10 e 12, observa-se o aumento desta à medida que se aumenta a concentração de pó de cascas de banana no meio de cultivo, evidenciando, desta forma, a influência positiva sobre a produção de lacase tanto do aumento no valor de

relação C/N, por conta do aporte de material orgânico (42,31 % de carbono orgânico e 2,49 % de nitrogênio amoniacal) quanto do aumento de lignina no meio de cultivo.

O conteúdo de nitrogênio, apesar de normalmente estar presente em menor quantidade em relação ao carbono, também apresenta influência sobre a produção enzimática por fungos. Libardi-Jr *et al.* (2011) quando utilizaram apenas pó de cascas de banana e sulfato de cobre no meio de cultivo, obtiveram valores inferiores aos obtidos utilizando pó de cascas de banana, sulfato de cobre e tartarato de amônio. Outros autores também estudaram a influência da adição de diferentes fontes e concentrações de nitrogênio e carbono ao meio de cultivo sobre a produção de lacases por fungos. Patrick *et al.* (2011) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono (glicose 5 a 40 g L<sup>-1</sup>, celulose 2 a 20 g L<sup>-1</sup> e glicerol 2 a 10 g L<sup>-1</sup>) e diferentes concentrações de nitrogênio (tartarato de amônio 2,7 a 27,1 mM) sobre a produção de enzimas oxidativas por *P. sajor-caju*. A glicose na concentração de 10 g L<sup>-1</sup> e o tartarato de amônio na concentração de 5,4 mM promoveram as maiores atividades de lacase. Para muitas espécies fúngicas, o aumento da atividade enzimática, muitas vezes, inicia após o esgotamento da concentração de nitrogênio, sugerindo uma ativação por limitação. Lacases fúngicas não são inibidas pela adição de nitrogênio ao meio de cultivo, a concentração adequada deste elemento acelera crescimento fúngico, aumentando a concentração de biomassa e melhorando a atividade enzimática (MAJEAU *et al.*, 2010; PATRICK *et al.*, 2011; ABO-STATE *et al.*, 2011).

Os valores de atividade de lacase encontrados no presente trabalho (Figura 12) encontram-se acima de alguns resultados alcançados por outros autores, utilizando também o gênero *Pleurotus*, porém diferentes meios de cultivo (ARDON *et al.*, 1996; BALDRIAN e GABRIEL, 2002; ELISASHVILI *et al.*, 2009; ABO-STATE *et al.*, 2011; LIBARDI-JR *et al.*, 2012; FERNANDEZ-ALEJANDRE *et al.*, 2016). Como pode ser observado na Tabela 2 valores máximos de atividade de lacase provenientes de diferentes espécies de *Pleurotus*, em cultivo submerso, utilizando diferentes meios de cultivo e ABTS como substrato para as quantificações enzimáticas.

Tabela 3 - Valores máximos de atividade enzimática de lacase provenientes de diferentes espécies de *Pleurotus* obtidas por diferentes meios de cultivos, em frascos agitados.

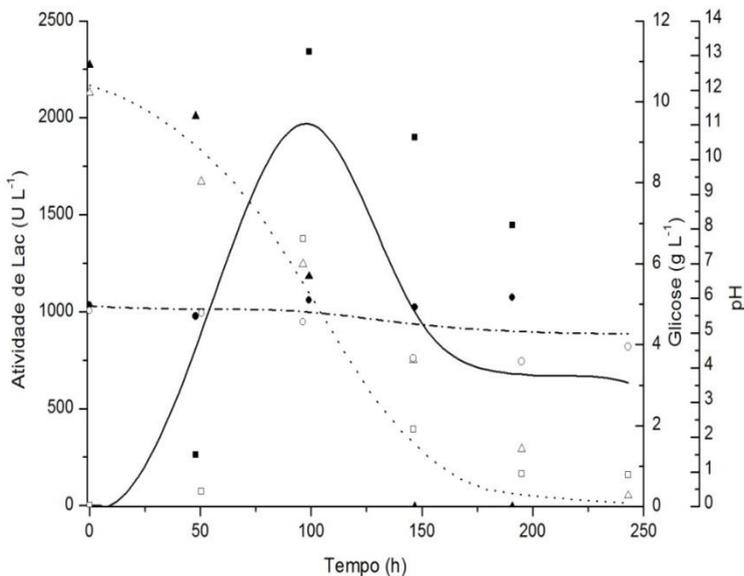
<b>Espécie</b>	<b>Atividade de Lac</b>	<b>Tempo (dias)</b>	<b>Meio de cultivo</b>	<b>Referências</b>
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	0,5 U mL <sup>-1</sup> (500 U L <sup>-1</sup> )	-	CuSO <sub>4</sub> (300 µM);	Abo-State <i>et al.</i> (2011)
	1,3 U mL <sup>-1</sup> (1.300 U L <sup>-1</sup> )	-	CuSO <sub>4</sub> (200 µM);	Abo-State <i>et al.</i> (2011)
	15 U mL <sup>-1</sup> (15.000 U L <sup>-1</sup> )	15	extratos de levedura e malte, CuSO <sub>4</sub> (0,1 mM) e ácido ferúlico (10 mM);	Zucca <i>et al.</i> (2011)
	2,5 U mL <sup>-1</sup> (2.500 U L <sup>-1</sup> )	15	extratos de levedura e malte, CuSO <sub>4</sub> (0,1 mM) e ácido aminobenzóico (10 mM);	Zucca <i>et al.</i> (2011)
	20,2 U L <sup>-1</sup>	14	madeira;	Libardi-Jr <i>et al.</i> (2011)
130 U L <sup>-1</sup>	8	papel filtro;	Libardi-Jr <i>et al.</i> (2011)	
200 U L <sup>-1</sup>	7	meio kirk e madeira;	Libardi-Jr <i>et al.</i> (2011)	
300 U L <sup>-1</sup>	5	meio Kirk e papel filtro;	Libardi-Jr <i>et al.</i> (2011)	
372 U L <sup>-1</sup>	7	cascas de banana e CuSO <sub>4</sub> (150 µM);	Libardi-Jr <i>et al.</i> (2011)	
520 U L <sup>-1</sup>	-	folhas de bordo;	Elisashvili <i>et al.</i> (2009)	
750 U L <sup>-1</sup>	-	bagaço de uva;	Elisashvili <i>et al.</i> (2009)	
0,9 U mL <sup>-1</sup> (900 U L <sup>-1</sup> )		talos de algodão;	Ardon <i>et al.</i> (1996)	
1.040 U L <sup>-1</sup>	-	bagaço de maçã;	Elisashvili <i>et al.</i> (2009)	

	meio Kirk, cascas de banana e CuSO <sub>4</sub> (150 µM);	9	1.575 U L <sup>-1</sup>	Libardi-Jr <i>et al.</i> (2011)
	bagaço de pêssego; CuSO <sub>4</sub> (200 µM);	- 21	1.720 U L <sup>-1</sup> 8 U mL <sup>-1</sup> (1.800 U L <sup>-1</sup> )	Elisashvili <i>et al.</i> (2009) Abo-State <i>et al.</i> (2011)
	cascas de café e uréia;	12	5 U mL <sup>-1</sup> (5.000 U L <sup>-1</sup> )	Silva <i>et al.</i> (2012)
	cascas de laranjas;	-	8.340 U L <sup>-1</sup>	Elisashvili <i>et al.</i> (2009)
	cascas de café e sulfato de amônio;	12	20 U mL <sup>-1</sup> (20.000 U L <sup>-1</sup> )	Silva <i>et al.</i> (2012)
<i>Pleurotus florida</i>	cascas de café e sulfato de amônio;	12	0,25 U mL <sup>-1</sup> (250 U L <sup>-1</sup> )	Silva <i>et al.</i> (2012)
	cascas de café e uréia;	12	4 U mL <sup>-1</sup> (4.000 U L <sup>-1</sup> )	Silva <i>et al.</i> (2012)

Em seguida ao cultivo em frascos agitados, realizou-se o cultivo em biorreator. Contudo, devido a dificuldades de condição de operação do cultivo líquido em biorreator, a concentração de pó de cascas de banana foi diminuída de  $60 \text{ g L}^{-1}$  para  $45 \text{ g L}^{-1}$ .

Na Figura 13 estão apresentados os valores médios de atividade de lacase, concentração de glicose e pH ao longo do cultivo de *P. sajor-caju* em meio de cultivo OXI 45 (água de imersão, pó de cascas de banana  $45 \text{ g L}^{-1}$ , glicose  $10 \text{ g L}^{-1}$ , tartarato de amônio  $5,4 \text{ mM}$ ,  $150 \text{ }\mu\text{M}$  de sulfato de cobre e pH 6,0), em biorreator.

Figura 13 - Atividade de lacase (linha contínua), concentração de glicose (linha pontilhada) e pH (linha tracejada e pontilhada) em função do tempo (h) no cultivo de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo simples, utilizando meio de cultivo OXI 45. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas do experimento (Atividade de Lac -■-□-, Glicose -▲-△-e pH -●-○).



A maior atividade de lacase ( $1.850,73 \text{ U L}^{-1}$ ) observada na Figura 13, foi em torno de 100 h de processo. Neste tempo, a concentração de glicose residual era de aproximadamente  $5,0 \text{ g L}^{-1}$ . O

pH se manteve estável durante todo o processo, em aproximadamente 5,5. Após 170 h de cultivo, nenhum dos parâmetros avaliados sofreu alteração com o tempo.

Os valores de atividade enzimática obtidos neste trabalho (1.850,73 U L<sup>-1</sup>, Figura 13) são similares, estatisticamente, aos obtidos nos ensaios em frascos agitados (2.416 ± 4 U L<sup>-1</sup>, apresentados na Figura 12).

Nos ensaios em biorreator, condições de cultivo como pH, temperatura, velocidade de agitação, aeração, etc. são mais bem controladas. No entanto, algumas vezes, o maior controle das condições de cultivo, como por exemplo, da velocidade de agitação, podem, no caso de cultivos vegetativos fúngicos, ocasionar o cisalhamento do micélio, causando danos à biomassa e, conseqüentemente, diminuindo a síntese enzimática pelo fungo (MARQUEZ-ROCHA *et al.*, 1999; FERNANDEZ-ALEJANDRE *et al.*, 2016).

Hess *et al.* (2002) observaram drástica diminuição da atividade de lacase por *Trametes multicolor* em cultivo conduzido em biorreator em relação a atividade de lacase obtida em frascos agitados. O dano micelial causado pelo cisalhamento, neste caso, seria uma das causas mais prováveis para a explicação deste descréscimo na atividade. A atividade de lacase diminuiu em torno de 11 vezes quando o fungo foi cultivado em biorreator.

Tinovo-Valência *et al.* (2014) avaliaram, por meio de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, os efeitos da adição de cobre (0, 0,25 e 0,5 mM), da potência de agitação (0,9, 3,4 e 5,9 kW m<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>) e da aeração (0,1, 0,3 e 0,5 vvm) sobre a produção de lacase por *P. ostreatus*, em experimentos em biorreator. O maior valor de atividade de lacase (3,78 U mL<sup>-1</sup>-3.780 U L<sup>-1</sup>) foi obtido utilizando-se velocidade de agitação de 0,9 kW m<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>, aeração 0,5 vvm e concentração de sulfato de cobre 0,5 mM. Valores de velocidade de agitação maiores, bem como menores valores de aeração e de concentração de sulfato de cobre levaram a um maior crescimento fúngico, porém menores valores de atividade de lacase (0,73 ± 0,01 U mL<sup>-1</sup> - 730 U L<sup>-1</sup>). Segundo os autores, este aumento na concentração de biomassa se deve provavelmente ao aumento da taxa de transferência de oxigênio e menor diâmetro dos *pellets* observados, reduzindo os problemas difusão de oxigênio intra-partícula. Segundo Couto e Toca-Herrera (2007), diferenças morfológicas, como o tamanho dos *pellets*, resultam também em caldos brutos com diferentes reologias. Quando os níveis de

biomassa são altos, os caldos de cultivo apresentam pseudopalsticidade, o qual diminui a transferência de massa e assim, diminui a produtividade.

Fenice *et al.* (2003) avaliaram diferentes velocidades de agitação (250, 500 e 750  $\text{min}^{-1}$ ) e aeração (0,5, 1 e 1,5 vvm) sobre a produção de lacase por *Panus tigrinus*, em água residual da indústria de azeite de oliva. A atividade máxima (4.600  $\text{U L}^{-1}$ ) foi obtida nos ensaios utilizando aeração e velocidade de agitação iguais a 1 vvm e 250  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente, em 13 dias de cultivo. Os autores utilizaram como substrato para quantificar lacase o 2,6-dimetoxifenol ao invés de ABTS, como neste trabalho.

Com relação a este trabalho, além de se ter conhecimento da influência do maior controle das condições de cultivo, quando trabalha em biorreator, sobre o crescimento fúngico, outro fator que não pode ser esquecido, e pode influenciar a produção de lacase desta etapa em diante, é a diminuição da concentração do pó de cascas de banana de 60 para 45  $\text{g L}^{-1}$ , em função da impossibilidade de operação do biorreator na concentração de pó de cascas de banana mais elevada.

A Tabela 4 mostra os valores dos parâmetros cinéticos atividade máxima, fator de conversão de glicose em lacase e produtividade global, obtidos no tempo correspondente ao maior valor de atividade de lacase observado ao longo do cultivo, utilizando os meios de cultivo OXI 30 e OXI 45.

Tabela 4 - Valores médios  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros cinéticos obtidos do cultivo de *P. sajor-caju* em biorreator utilizando os meios de cultivos OXI 30 e OXI 45.

Parâmetros	Meios de cultivo	
	OXI 30	OXI 45
$\text{Lac}_{\text{máx}}$ ( $\text{U L}^{-1}$ )	231,18 $\pm$ 40,35 <sup>a</sup>	1.850,73 $\pm$ 674,82 <sup>b</sup>
$\text{Y}_{\text{L/S}}$ ( $\text{U L}^{-1} \text{g}^{-1}$ )	33,61 $\pm$ 19,21 <sup>a</sup>	359,60 $\pm$ 13,80 <sup>b</sup>
$\text{P}$ ( $\text{U L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	1,73 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	18,21 $\pm$ 4,06 <sup>b</sup>

Letras iguais, nas linhas, significam médias sem diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiança ( $p < 0,05$ ).

De acordo com análise estatística, os valores de  $\text{Lac}_{\text{máx}}$ , de fator de conversão de glicose em lacase ( $\text{Y}_{\text{L/S}}$ ) e produtividade enzimática (P) obtidos com o meio de cultivo OXI 45 (Tabela 3) foram estatisticamente superiores comparados ao meio de cultivo OXI 30. Mais

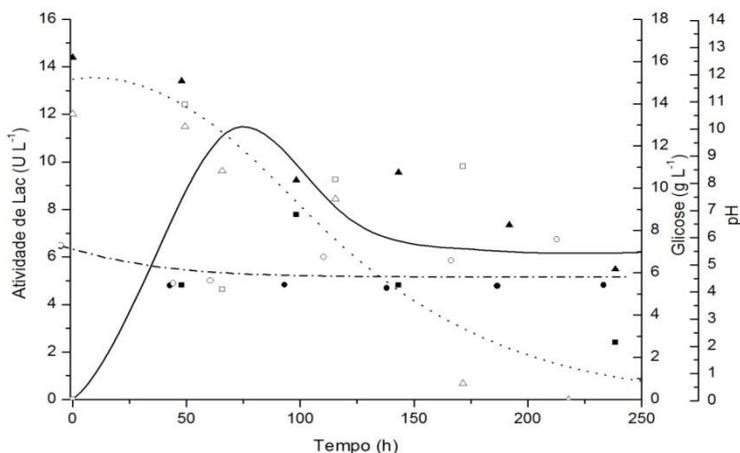
especificamente, em torno de 8 vezes para  $Lac_{m\acute{a}x}$ , e 10,5 vezes superior, para ambos os parâmetros,  $Y_{L/S}$  e P.

Nos experimentos realizados em biorreator descritos até o momento, neste trabalho, utilizou-se velocidade de agitação de  $350\text{ min}^{-1}$ . Assim sendo, na etapa seguinte tendo em vista a importância da agitação na produção de lacase, ou seja, na avaliação da produção de lacase por *P. sajor-caju*, em biorreator, utilizando duas velocidades de agitação ( $100$  e  $500\text{ min}^{-1}$ ), optou-se pelo uso do meio de cultivo OXI 45.

### 4.2.3 – Influência da velocidade de agitação sobre a produção de lacase

Na Figura 14 estão apresentados os valores médios de atividade de lacase, concentração de glicose e pH ao longo do cultivo de *P. sajor-caju* em meio de cultivo OXI 45 em biorreator e velocidade de agitação de  $100\text{ min}^{-1}$ .

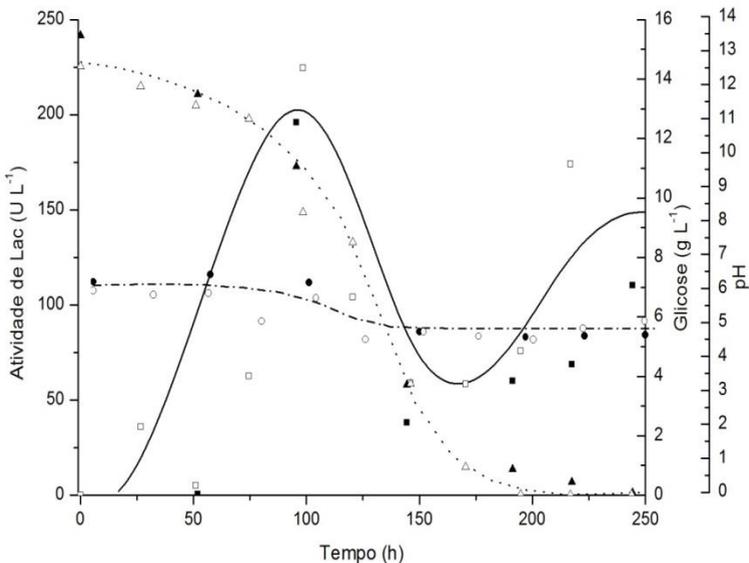
Figura 14 - Atividade de lacase (linha contínua), concentração de glicose (linha pontilhada) e pH (linha tracejada e pontilhada) em função do tempo (h) no cultivo de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo simples, utilizando meio de cultivo OXI 45 e velocidade de agitação igual a  $100\text{ min}^{-1}$ . Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas do experimento (Atividade de Lac - ■-□-, Glicose - ▲-△-e pH - ●-○).



Observa-se na Figura 14, maior atividade de lacase ( $9,26 \text{ U L}^{-1}$ ) em torno de 72 h de processo. A partir deste tempo, ocorre estabilização do pH em torno de 4,5 e observa-se o contínuo consumo de glicose, sendo a concentração de glicose residual, no tempo de 72 horas, de aproximadamente  $11,4 \text{ g L}^{-1}$ . Após aproximadamente 150 h de cultivo, a atividade de lacase e o pH tornam-se constantes.

Na Figura 15 estão apresentados os valores médios de atividade de lacase, concentração de glicose e pH ao longo do cultivo de *P. sajor-caju* em meio de cultivo OXI 45 em biorreator e velocidade de agitação de  $500 \text{ min}^{-1}$ .

Figura 15 - Atividade de lacase (linha contínua), concentração de glicose (linha pontilhada e pontilhada) e pH (linha tracejada e pontilhada) em função do tempo (h) no cultivo de *P. sajor-caju*, em processo descontínuo simples, utilizando meio de cultivo OXI 45 e velocidade de agitação igual a  $500 \text{ min}^{-1}$ . Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas do experimento (Atividade de Lac - ■-□-, Glicose -▲-△-e pH -●-○).



Observa-se na Figura 15, maior atividade de lacase ( $207,2 \text{ U L}^{-1}$ ) em 100 horas de cultivo. O valor observado neste pico é semelhante ao apresentado na Figura 11 (experimento utilizando meio de cultivo OXI 30 e velocidade de agitação  $350 \text{ min}^{-1}$ ). No tempo de 100 horas, o pH estava próximo a 5,5 e a concentração de glicose em torno de  $10 \text{ g L}^{-1}$ . A partir de 130 horas o pH tornou-se estável, em torno de 4,8.

Ao se diminuir a velocidade de agitação de  $350 \text{ min}^{-1}$ , utilizada neste trabalho nos itens 4.2.1 e 4.2.2, para  $100 \text{ min}^{-1}$  esperava-se diminuir os efeitos de cisalhamento sobre o micélio e, com isso, talvez, observar aumento na atividade de lacase por *P. sajor-caju*. Visto que, conforme descrito por Fenice *et al.* (2003) e Tinoco-Valência *et al.* (2014), maiores velocidades de agitação normalmente apresentam influência negativa sobre a produção de enzimas por fungos. Além disso, características morfológicas do fungo também são afetadas por diferentes velocidades de agitação e aeração. Conforme reportado por Marquez-Rocha *et al.* (1999), o tipo de turbina, bem como a velocidade de agitação, influencia enormemente o tamanho do *pellet* e, conseqüentemente, o crescimento fúngico. Os autores avaliaram a morfologia e o crescimento de *P. ostreatus* em biorreator utilizando diferentes tipos de impelidores turbinas. O tipo Rushton provocou redução na velocidade específica de crescimento do fungo em 30 % e redução no diâmetro do pellet de 15% quando a aeração aumentou de 1 para 1,5 vvm. A velocidade de agitação reduziu o diâmetro do pellet de 5,1 para 2,8 mm quando a agitação passou de 200 rpm para 400 rpm. As velocidades específicas de crescimento foram 0,036, 0,020 e  $0,041 \text{ h}^{-1}$  utilizando os impelidores turbinas do tipo Rushton (pás planas), Ribbon (fitas helicoidais) e InterMIG, respectivamente.

Fernandez-Alejandre *et al.* (2016) avaliaram os efeitos do stress hidrodinâmico (avaliado por meio do valor de EDCF – Energy Dissipation/Circulation Function – o qual foi obtido por meio do controle dos valores de potência e torque das turbinas do biorreator e, variando-se a velocidade de agitação) e da concentração de oxigênio dissolvido, sobre o crescimento, a morfologia e a produção de lacase por *P. ostreatus* em um biorreator de 10 litros. Concentrações de oxigênio dissolvido entre 8 e 22 % apresentaram efeito positivo (planejamento fatorial  $3^2$ ) sobre o crescimento fúngico e negativo sobre a produção de lacase. O aumento no valor de EDCF de 1 para  $21 \text{ kW m}^{-3} \text{ s}^{-1}$ , apresentou efeito positivo tanto sobre o crescimento micelial como

sobre a produção de lacase. Esta condição favoreceu a formação de *pellets* menores. Os autores agruparam os *pellets* em três grupos em função do tamanho, diâmetro (grupo A = aproximadamente 1.000  $\mu\text{m}$ ; grupo B = aproximadamente 1.500  $\mu\text{m}$ ; grupo C = maiores que 2.000  $\mu\text{m}$ ) e mediram a atividade de esterase a fim de identificar uma possível limitação difusional nos *pellets*. O grupo A apresentou percentual de atividade metabólica perto de 100% enquanto os grupos B e C em torno de 80%. Com o aumento do tamanho dos *pellets* o percentual de atividade metabólica diminuiu, provavelmente, segundo os autores, devido às células no centro do aglomerado sofrerem algum tipo de limitação nutricional.

Neste trabalho, quando diminuiu-se a velocidade de agitação, menores valores de atividade de lacase foram obtidos ( $\text{Lac}_{\text{máx}} = 9,26 \text{ U L}^{-1}$ , Figura 14). Sugere-se que a diminuição na velocidade de agitação pode ter causado insuficiente distribuição de massa, calor, nutrientes, oxigênio dissolvido no meio de cultivo, etc., o que pode, parcialmente, justificar os baixos valores de atividade de lacase obtidos. O oxigênio em cultivos microbianos e em processos aeróbicos pode causar limitações no meio de cultivo, interferindo positiva ou negativamente tanto no crescimento dos micro-organismos quanto na obtenção de qualquer produto de interesse (BETTIN, 2010).

Quando se aumentou a velocidade de agitação para  $500 \text{ min}^{-1}$ , a atividade de lacase ( $207,2 \text{ U L}^{-1}$ ) foi aproximadamente 22 vezes superior à obtida utilizando velocidade de agitação  $100 \text{ min}^{-1}$  ( $9,26 \text{ U L}^{-1}$ ). Entretanto, quando utilizou-se velocidade de agitação  $350 \text{ min}^{-1}$  a atividade de lacase foi de  $1.850,73 \text{ U L}^{-1}$ , ou seja, 9 e 200 vezes superior as obtidas com velocidades de agitação  $500$  e  $100 \text{ min}^{-1}$ , respectivamente.

A Tabela 5 mostra os valores dos parâmetros cinéticos atividade máxima de lacase ( $\text{Lac}_{\text{máx}} - \text{U L}^{-1}$ ), fator de conversão de glicose em lacase ( $Y_{L/S} - \text{U L}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) e produtividade global ( $P - \text{U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), obtidos no tempo correspondente ao maior valor de atividade de lacase observado ao longo do cultivo, utilizando as velocidades de agitação de 100, 350 e  $500 \text{ min}^{-1}$ .

Tabela 5 – Valores médios  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros cinéticos obtidos do cultivo de *P. sajor-caju* em biorreator utilizando velocidades de agitação 100, 350 e 500  $\text{min}^{-1}$ .

Parâmetros	Velocidade de agitação		
	100 $\text{min}^{-1}$	350 $\text{min}^{-1}$	500 $\text{min}^{-1}$
<b>Lac<sub>máx</sub></b> ( $\text{U L}^{-1}$ )	9,25 $\pm$ 2,18 <sup>a</sup>	1850,73 $\pm$ 674,82 <sup>b</sup>	207,20 $\pm$ 18,61 <sup>c</sup>
<b>Y<sub>LS</sub></b> ( $\text{U L}^{-1} \text{g}^{-1}$ )	2,40 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	359,60 $\pm$ 13,80 <sup>b</sup>	38,26 $\pm$ 3,02 <sup>c</sup>
<b>P</b> ( $\text{U L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	0,14 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	18,21 $\pm$ 4,06 <sup>b</sup>	2,06 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>

Letras iguais, nas linhas, significam médias sem diferença significativa pelo teste de Tukey com 95% de confiança ( $p < 0,05$ ).

Os valores dos parâmetros de atividade máxima de lacase ( $\text{Lac}_{\text{máx}}$ ), fator de conversão de glicose em lacase ( $\text{Y}_{\text{LS}}$ ) e produtividade enzimática (P) (Tabela 4) foram estatisticamente superiores nos cultivos com velocidade de agitação 350  $\text{min}^{-1}$ . Os valores de  $\text{Lac}_{\text{máx}}$ ,  $\text{Y}_{\text{LS}}$  e P foram 200, 150 e 130 vezes superiores, respectivamente, em relação ao cultivo utilizando velocidade de agitação 100  $\text{min}^{-1}$  e 9 vezes, para ambos os parâmetros, em relação ao cultivo utilizando velocidade de agitação 500  $\text{min}^{-1}$ .

O valor de produtividade obtido neste trabalho com a espécie *P. sajor-caju*, utilizando meio de cultivo OXI 45, velocidade de agitação 350  $\text{min}^{-1}$  (18,21  $\text{U L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) foi superior à produtividade (14  $\text{U L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) obtida por Tinoco-Valência *et al.* (2014), bem como superior àquela obtida por Aggelis *et al.* (2003) (0,38  $\text{U L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ). Estes dois autores, avaliaram o potencial de *P. ostreatus* em produzir lacase, em biorreator, utilizando efluente da indústria do beneficiamento do azeite de oliva. Para quantificação da atividade enzimática, no entanto, os autores utilizaram siringaldazina ao invés do utilizado neste trabalho (ABTS). Valores de produtividade superiores aos obtidos neste trabalho também foram encontrados em literatura (experimentos em biorreator), porém nenhum com a espécie *P. sajor-caju*. Hess *et al.* (2002) avaliaram a produção de lacase por *T. multicolor*, em biorreator. Os autores obtiveram produtividade igual a 29  $\text{U L}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Liu *et al.* (2016) avaliaram a produção de lacase por *Pycnoporus* sp. e obtiveram produtividade igual a 0,35  $\text{U mL}^{-1} \text{h}^{-1}$  (350  $\text{U L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ).

Fenice *et al.* (2003) avaliaram a produção de lacase por *Panus tigrinus*, em efluente da indústria do beneficiamento do azeite de oliva, em biorreator de agitação mecânica e obtiveram produtividade de

9,6 U L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, inferior a obtida neste trabalho. Os mesmos autores realizaram o cultivo de *Panus tigrinus* em biorreator *air-lift* e obtiveram produtividade de 20,8 U L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, superior à obtida neste trabalho. Para quantificação da atividade enzimática os autores utilizaram o substrato 2,6-dimetoxifenol (DMP) ao invés de ABTS, utilizado neste trabalho.

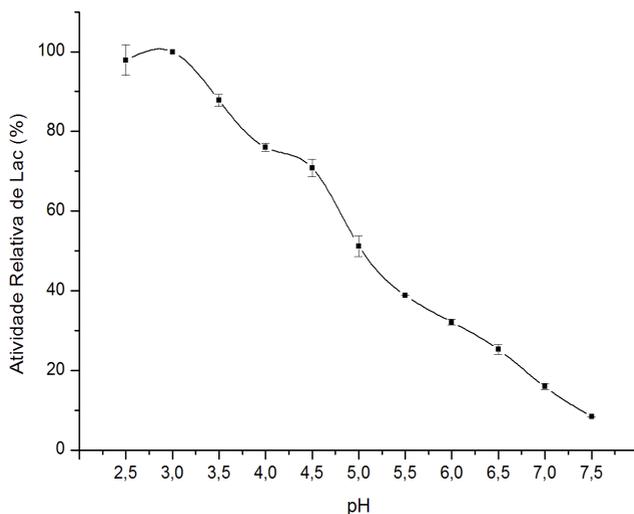
#### 4.4 Caracterização da lacase

Os resultados a seguir são de atividade de lacase proveniente de cultivo submerso de *P. sajor-caju* em meio OXI 45 (45 g L<sup>-1</sup> de pó de cascas de banana) a uma velocidade de agitação de 350 min<sup>-1</sup>.

##### 4.4.1 Determinação do pH ótimo

A Figura 16 apresenta o perfil de atividade de lacase em relação ao pH.

Figura 16 - Atividade relativa de lacase proveniente de *P. sajor-caju* em função do pH. As barras representam o desvio padrão das médias das replicatas.



Os valores de pH ótimo foram 2,5 e 3,0 para lacase proveniente de *P. sajor-caju*, não sendo encontrado diferença estatisticamente significativa entre os valores de atividade nestes pHs. Em pH 4,0 atividade de lacase é diminuída em 30 % em relação ao pH ótimo. Acima de pH 5,0, a diminuição da atividade é superior a 50 %. Comparando com o mesmo gênero fúngico e o mesmo substrato na literatura, a faixa de pH ideal para se trabalhar com esta enzima é restrita entre 2,5 e 4,5, decaindo a atividade em valores superiores a estes valores de pH.

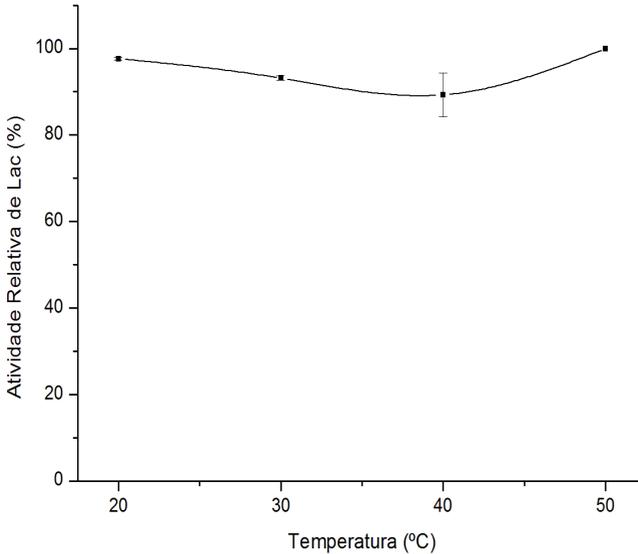
Pakhadnia *et al.* (2009) em estudo sobre a caracterização de lacases provenientes de *P. ostreatus* observaram pH ótimo igual a 3,0. More *et al.* (2011) avaliaram a caracterização fúngica de lacases, obtidas por *Pleurotus* sp. e observaram pH 4,5 como pH ótimo. Valores superiores ao pH 5,0 diminuem drasticamente a atividade de lacase, mais de 50 %, chegando a zero em pH 7,0. Bettin *et al.* (2011) observaram três picos de pH ótimo, 2,4, 3,2 e 4,4, para *P. sajor-caju*, evidenciando a presença de diferentes isoformas de lacase produzidas pelo fungo. Os autores também encontram diminuição da atividade enzimática para valores de pH acima de 5,0. Lidardi-Jr *et al.* (2012) observaram na caracterização de lacase provenientes de *P. ostreatus*, pH ótimo em 4,5. Kumar *et al.* (2012) observaram o valor 4,0 como pH ótimo de lacases provenientes de *P. ostreatus*. Em valores superiores a este pH, a atividade relativa decresce a medida que o pH aumenta, diminuindo a atividade em 70 % em relação ao pH ótimo.

Observa-se, tanto no presente trabalho (Figura 16), como na literatura, que a atividade de lacase é maior em pH ácido, quando utiliza-se ABTS como substrato. Em geral, o pH varia consideravelmente, o que pode ser devido às diferentes isoformas.

#### **4.4.2 Determinação da temperatura ótima**

A Figura 17 apresenta o perfil de atividade de lacase em relação à temperatura.

Figura 17 - Atividade relativa de lacase proveniente de *P. sajor-caju* em relação à temperatura. As barras representam o desvio padrão das médias das replicatas.



Não se observa, na Figura 17, diferenças estatisticamente significativas entre os valores de atividade na faixa de temperatura avaliada. Nas temperaturas de 20, 30, 40 e 50 °C observa-se atividade relativa de 97, 93, 89 e 100 % da sua atividade inicial, respectivamente.

Semelhante a este trabalho, Kumar *et al.* (2012) em estudo da caracterização de lacase produzida por *P. ostreatus* observaram temperatura ótima em 45 °C, em uma faixa de 30 a 70 °C. Na temperatura de 60 °C, a enzima perdeu mais do que 40 % da sua atividade inicial. Valores de temperatura superiores a 70 °C diminuem a atividade relativa em 75 %.

Estes dados diferem de Bettin *et al.* (2011) quando observaram a faixa de temperatura de 15 a 50 °C. A temperatura ótima para lacase foi de 50 °C, proveniente de *P. sajor-caju*. A atividade relativa aumentou de acordo com o aumento da temperatura da solução, na faixa de temperatura testada. More *et al.* (2011) também observaram maior atividade de lacase em temperaturas elevadas, 65 °C, por *Pleurotus sp.*,

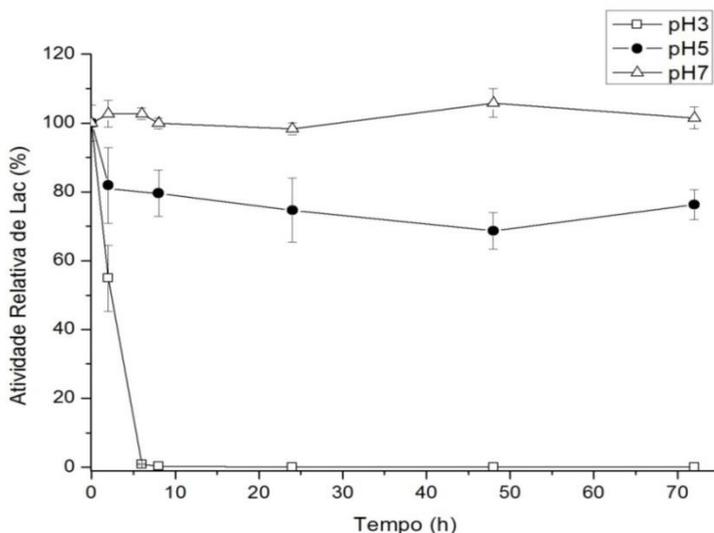
em uma faixa de teste de 25 a 85 °C. Acima de 70 °C observaram decréscimo de aproximadamente 100 % na atividade de lacase.

Outros autores como Vargas e Ramírez (2002), Ramírez *et al.* (2003), Park *et al.* (2015) e Yuan *et al.* (2016) observaram a faixa de temperatura de 30 a 65 °C como ótima para a enzima lacase, utilizando o gênero *Pleurotus* e ABTS como substrato para a quantificação enzimática.

#### 4.4.3 Estabilidade com o pH

A Figura 18 apresenta o perfil de estabilidade da lacase com o tempo, em três valores de pH, em temperatura ambiente. Este experimento teve como objetivo constatar por quanto tempo a enzima permanece ativa em diferentes valores de pH.

Figura 18 - Cinética da estabilidade da lacase, proveniente de *P. sajor-caju*, em três valores de pH. As barras representam o desvio padrão das médias.



Observa-se na Figura 18 maior estabilidade da enzima nos valores de pH 5 e 7. Em pH 7 a atividade enzimática se mantém estável por todo o tempo de incubação e em pH 5, a atividade decresce em 72 h de incubação, apenas, 23,7 % em relação a atividade inicial. Em pH 3,0, (pH ótimo, conforme apresentado na Figura 16) a enzima perde 100 % de sua atividade em 8 h de incubação.

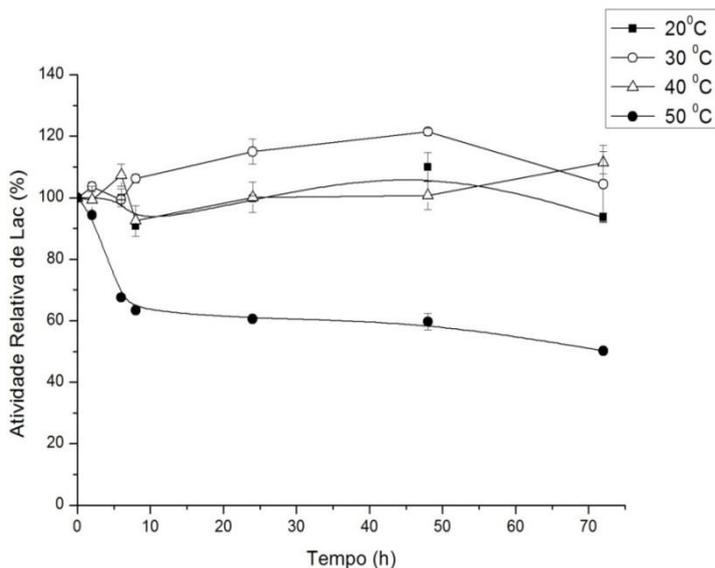
Comportamento semelhante a este trabalho foi observado por Kumar *et al.* (2012). Estes autores avaliaram o pH ótimo e a estabilidade com o pH de lacases obtidas do cultivo de *P. ostreatus*, em uma faixa de pH de 4,5 a 8,0, durante 300 horas. O pH 4,0 foi observado como pH ótimo para esta enzima e o decaimento na atividade enzimática foi em pH ácido, pH 4,5. O pH 6,0 foi o pH que se mostrou mais favorável, com atividade em torno de 97 %, até 50 h de incubação. A alta atividade relativa em pH neutro e pH ótimo em pH ácido, sugere-se, segundo os autores, novas aplicações para enzimas purificadas. Na faixa testada pelos autores, a faixa de estabilidade da enzima é ampla, pH 4 a pH 8, evidenciando que a enzima é adequada para aplicações que requerem longos tempos de exposição.

Libardi-Jr. *et al.* (2012) estudaram a estabilidade de lacase proveniente do cultivo de *P. ostreatus* em diferentes valores de pH. Em pH 6,0 observaram cerca de 40 % da atividade inicial, em 24 h de incubação. Após este período, em 72 h, a atividade relativa foi inferior a 30 %. Em pH 8,0, em 4 h de incubação, menos de 5 % de atividade relativa foi observada. Valores inferiores a este pH (6,0) também apresentaram baixa atividade relativa, como também observado neste trabalho. Em pH 3,0 os autores observaram apenas 0,65 % da atividade inicial, em 8 h de incubação.

#### **4.4.4 Estabilidade com a temperatura**

A Figura 19 apresenta o perfil de estabilidade da lacase, com o tempo, em diferentes valores de temperatura. Este experimento teve como objetivo constatar por quanto tempo a enzima permanece ativa em diferentes temperaturas.

Figura 19 - Cinética da estabilidade da enzima lacase, proveniente do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio de cultivo OXI 45, em diferentes valores de temperatura.



De acordo com a Figura 19, observa-se maior estabilidade na faixa de 20 a 40°C, mantendo-se a enzima estável nas 72 h de incubação. Na maior temperatura avaliada, 50 °C, a atividade diminuiu 37% em relação a sua atividade inicial, em 8 horas de incubação, e 50 % em 72 h.

Bettin *et al.* (2011) estudaram a estabilidade com a temperatura de lacase, por *P. sajor-caju*, utilizando três tampões e uma faixa de 20 a 60 °C. de temperatura. Estes autores também observaram maior estabilidade da enzima em temperaturas brandas, 20 e 30 °C, em tampão McIlvain, pH 3,2. Quando avaliaram o tampão acetato de sódio, pH 5,0, a estabilidade foi claramente menor, nestas temperaturas, permanecendo apenas 25 e 20 %, em 20 e 30 °C, respectivamente. Em temperatura de 50 e 60°C, a enzima foi inativada em 5 horas de incubação, em todos os tampões testados. Libardi-Jr. *et al.* (2012) avaliaram a estabilidade térmica da lacase, por *P. ostreatus*, nas condições de 4 a 50 °C, no mesmo tempo de incubação deste trabalho (até 72 h), e observaram, uma rápida perda na atividade nas primeiras duas horas de incubação, na temperatura de 50 °C. Em 8 horas de incubação e na temperatura de

28 °C, a atividade foi reduzida para 40 % da atividade inicial. Após este período, a atividade continua decaindo, e foi reduzida para menos de 20 % da atividade inicial, em 72 h. Neste mesmo período e na temperatura mais alta avaliada, a enzima já tinha sido inativada.

Kumar *et al.* (2012) observaram comportamento semelhante a este trabalho, em estudos com *P. ostreatus* numa faixa de 25 a 50 °C, por 18 h de incubação. A maior estabilidade (100%) foi observada em 25 °C durante todo o tempo de incubação (18 h). Na temperatura de 37 e 45 °C, o decaimento de 50 % da atividade ocorre em 14 e 8 h, respectivamente. Temperaturas mais elevadas, como as temperaturas de 50 e 60 °C, o decaimento de 100 % da atividade ocorre em 4 h e 2 h, respectivamente.

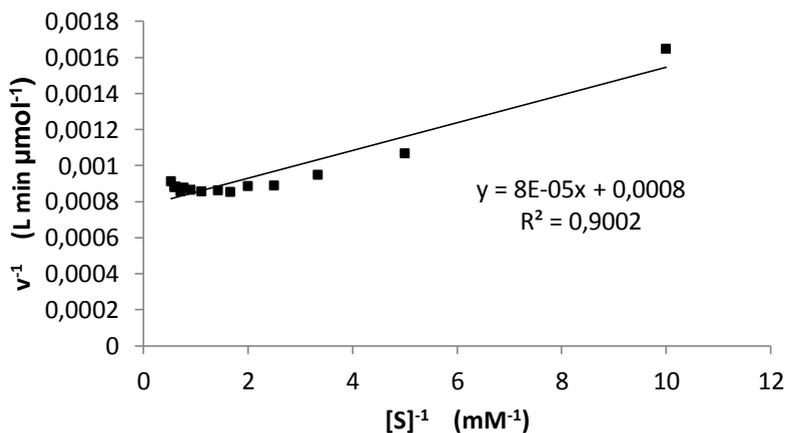
Zucca *et al.* (2011) avaliaram a caracterização de lacase por *P. sajor-caju* durante 8 h de incubação, em uma faixa de 30 a 70 °C. A temperatura de 30 °C foi observada como temperatura ótima de reação durante 8 h de incubação, permanecendo com 97 % da sua atividade inicial. Em temperaturas de 40 e de 50 °C, após 8h de incubação, 60 % da atividade inicial manteve - se presente, enquanto que a atividade a 60 °C apenas 40 % manteve-se ativa durante o tempo total de incubação. A temperatura de 70 °C, após 1 h de incubação, a enzima foi completamente inativada.

Desta forma, o comportamento da enzima lacase proveniente do cultivo de *P. sajor-caju*, frente à estabilidade térmica apresenta fácil aplicação do caldo enzimático bruto em operações que necessitem de temperatura ambiente.

#### **4.5 Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima de reação ( $V_{máx}$ )**

A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima de reação ( $V_{máx}$ ) foram determinadas utilizando ABTS como substrato (Figura 20).

Figura 20 - Determinação de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  da lacsase obtida do cultivo de *P. sajor-caju*, em meio OXI 45.



Na Tabela 6 são apresentadas a constante de Michaelis-Menten e a velocidade máxima de reação obtidos neste trabalho e da literatura obtidas por outros fungos do gênero *Pleurotus*, sendo possível observar afinidade da enzima estudada pelo substrato ABTS, devido ao valor de  $K_m$ . Embora vários compostos testados sejam oxidados pela enzima lacsase, o substrato ABTS apresenta boa afinidade enzima-substrato, segundo Yuan *et al.* (2016). Estes autores avaliaram a especificidade de 12 substratos em 3 isoformas de lacase obtidas por *Pleurotus nebrodensis*. O substrato ABTS promoveu maior afinidade entre as isoformas de lacase testadas, seguido de siringaldazina e catecol.

Tabela 6 – Constantes cinéticas de lacases produzidas por fungos do gênero *Pleurotus*, utilizando diferentes substratos.

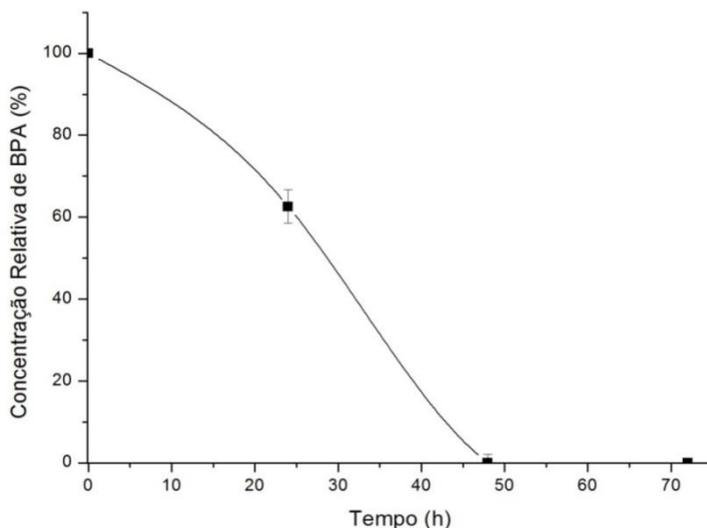
<b>Espécie</b>	<b>Substrato</b>	<b>K<sub>m</sub></b>	<b>V<sub>máx</sub></b>	<b>Referência</b>
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	DMP	35 µM	-	Sahay <i>et al.</i> (2008)
	Catecol	216 µM	-	Sahay <i>et al.</i> (2008)
	m-Cresol	380 µM	-	Sahay <i>et al.</i> (2008)
	Siringaldazina	260 µM	-	Sahay <i>et al.</i> (2008)
	Ácido pirogálico	370 µM	-	Sahay <i>et al.</i> (2008)
	ABTS	0,607 mM	0,018 mM min <sup>-1</sup>	Bettin (2010)
	ABTS	3,78 mM	1.111,1 µM min <sup>-1</sup>	Melo (2015)
<b><i>P. sajor-caju</i> CCB 019</b>	<b>ABTS</b>	<b>0,1 mM</b>	<b>1,25 mM min<sup>-1</sup></b>	<b>Resultados obtidos no presente trabalho</b>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	ABTS	216 µM	-	Libardi-Jr <i>et al.</i> (2012)
	DMP	66 µM	-	Libardi-Jr <i>et al.</i> (2012)
	Siringaldazina	34 µM	-	Libardi-Jr <i>et al.</i> (2012)
	Guaiacol	336 µM	-	Libardi-Jr <i>et al.</i> (2012)
	ABTS	0,13 mM	-	Kumar <i>et al.</i> (2012)
	Guaiacol	0,69 mM	-	Kumar <i>et al.</i> (2012)
Siringaldazina	0,051 mM	-	Kumar <i>et al.</i> (2012)	
<i>Pleurotus</i> sp.	ABTS	0,25 mM	0,33 µmol min <sup>-1</sup>	More <i>et al.</i> (2008)
	DMP	0,038 mM	20 µmol min <sup>-1</sup>	More <i>et al.</i> (2008)
<i>P. nebrodensis</i>	ABTS	0,16 mM	-	Yuan <i>et al.</i> (2016)

Os resultados relatados na literatura apresentam variações nos valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ , dependendo da espécie em estudo e o substrato utilizado para a quantificação enzimática. Observam-se ainda variações de 0,1 a 3,78 mM e 0,0003 a 1,25 mM min<sup>-1</sup> nos valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ , respectivamente, quando comparados a algumas linhagens de *Pleurotus* e o mesmo substrato utilizado na quantificação enzimática. Essas variações podem ser consequência da presença de inibidores competitivos no caldo enzimático, como indutores adicionados ao meio (BETTIN, 2010).

#### 4.6 Degradação do bisfenol-A

A Figura 21 apresenta os percentuais de degradação de bisfenol-A pelo caldo bruto contendo lacase proveniente de *P. sajor-caju*, durante 72 h de incubação. A atividade de lacase no caldo enzimático bruto era de 282,96 U L<sup>-1</sup> e a solução de bisfenol-A numa concentração de 500 mg L<sup>-1</sup>, equivalente a 2,19 mM.

Figura 21 - Percentual de degradação de bisfenol-A pelo caldo bruto contendo lacase proveniente de *P. sajor-caju*.



Observa-se na Figura 21 uma degradação de bisfenol-A de aproximadamente 40 % após 24 h de incubação e 100 % de degradação após 48 h. O caldo enzimático bruto inativado foi avaliado na mesma concentração de BPA das amostras e não apresentou nenhum percentual de degradação em todos os tempos testados, comprovando o envolvimento da enzima no processo de degradação do BPA.

Outros autores também observaram degradação de compostos interferentes endócrinos em lacases fúngicas. Cajthaml *et al.* (2009) estudaram a capacidade de degradação de bisfenol-A ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), nonilfenol ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $17\alpha$ -etinilestradiol ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) e triclosan ( $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) por oito linhagens fúngicas ligninolíticas (*Irpex lacteus*, *Bjerkandera adusta*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete magnoliae*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Dichomitus squalens*). Os resultados mostraram que, sob as condições testadas, os fungos foram capazes de degradar os compostos interferentes endócrinos dentro de 14 dias de reação, com exceção de *B. adusta* e *P. chrysosporium* no caso triclosan e de bisfenol-A, respectivamente. As espécies *I. lacteus*, *P. ostreatus* e *P. cinnabarinus* degradaram 100% de bisfenol-A ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) e  $17\alpha$ -etinilestradiol em 3 dias de reação.

Libardi-Jr *et al.* (2012) estudaram a capacidade do caldo enzimático bruto (com  $0,5 \text{ U mL}^{-1}$  de atividade de lacase) de *P. ostreatus* e *Phoma* sp. em degradar bisfenol-A,  $17\alpha$ -etilestradiol e t-nonilfenol, na concentração inicial de  $250 \mu\text{M}$ . O estudo mostrou que bisfenol-A e  $17\alpha$ -etilestradiol foram totalmente degradados em 24 h de incubação com o caldo proveniente do cultivo de *P. ostreatus* e totalmente degradado em 48 h de incubação com o caldo enzimático de *Phoma* sp. A concentração de nonilfenol foi reduzida a 90,4 % após 72 h de incubação com o caldo enzimático concentrado de *P. ostreatus*. No entanto, o caldo bruto de lacase proveniente de *Phoma* sp. não degradou o composto em 72 h de incubação.

Loffredo *et al.* (2012) estudaram a capacidade de degradação do bisfenol-A ( $46 \text{ mg L}^{-1}$ ) por três fungos lignocelulolíticos *Trametes versicolor*, *Stereum hirsutum* e *Pleurotus ostreatus*. A presença de cada fungo, no geral, diminuiu a concentração do bisfenol-A, sendo que 38% da concentração de bisfenol-A foi degradado, em 23 dias, por *Pleurotus ostreatus* e *Stereum hirsutum*, e 35% por *Trametes versicolor*, em 7 dias de incubação.

Chang e Chang (2014) avaliaram a degradação de bisfenol-A,

bisfenol-F, nonilfenol e tetrabromobisfenol-A por lacases produzidas por *P. eryngii*, na concentração inicial de 20 mg L<sup>-1</sup>. Em 24 h de incubação, 95,5 % da concentração de bisfenol-A foi degradada. Os outros compostos, bisfenol-F, nonilfenol e tetrabromobisfenol-A, foram degradados pelo caldo enzimático bruto em 96,1; 93,7 e 92,3 %, respectivamente, também em 24 h de incubação.

A concentração inicial de bisfenol-A (500 mg L<sup>-1</sup>) estudada neste trabalho foi maior comparada aos autores acima citados e teve 100 % de degradação em 48 h de incubação.



## 5. CONCLUSÕES

O meio de cultivo OXI, formulado com resíduos da bananicultura (água de imersão de folhas secas de bananeira e pó de cascas de banana), mostrou-se adequado para a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju*, sendo os maiores valores de atividade encontrados nos testes em frascos agitados, quando utilizou-se concentração de pó de cascas de banana de  $60 \text{ g L}^{-1}$  ao invés de  $30 \text{ g L}^{-1}$  (2.416 e  $161 \text{ U L}^{-1}$ , respectivamente).

Os resíduos utilizados apresentaram concentração de carbono orgânico total e nitrogênio iguais a 39,1 e 2,84 % para água de imersão de folhas secas de bananeira 42,31 e 2,49 % para pó de cascas de banana. Assim, a relação C:N encontrada para água de imersão foi de 13,8 e para pó de cascas de banana 16,9. Os percentuais de lignina, hemicelulose e celulose para o resíduo pó de cascas de banana foram de 7,19, 9,49 e 6,63 %. Os percentuais de cinzas, ou seja, concentração em minerais, foram de 28,6 e 12,8 % para água de imersão e pó de cascas de banana, respectivamente.

Quanto aos cultivos em biorreator, não foi possível manter a concentração de pó de cascas de banana em  $60 \text{ g L}^{-1}$ . Contudo, ainda que reduzindo-se esta concentração de 60 para  $45 \text{ g L}^{-1}$ , esta em relação ao cultivo utilizando  $30 \text{ g L}^{-1}$  de pó de cascas de banana, apresentou atividade 8 vezes superior. Obteve-se atividade de lacase por *Pleurotus sajor-caju*, em cultivo em biorreator, em meio OXI 45 e velocidade de agitação  $350 \text{ min}^{-1}$ , igual a  $1.850,7 \text{ U L}^{-1}$ .

Os valores de atividade máxima encontrados utilizando-se velocidade de agitação  $100$  e  $500 \text{ min}^{-1}$  foram 9,2 e  $207,2 \text{ U L}^{-1}$ , respectivamente. Estes valores são 200 e 9 vezes inferiores aos obtidos utilizando-se velocidade de  $350 \text{ min}^{-1}$ .

Com relação aos testes de caracterização enzimática, observou-se valores de pH ótimos para lacase de *Pleurotus sajor-caju* iguais a 2,5 e 3,0. Quanto a temperatura ótima, não foi possível observar um valor ideal. O percentual de atividade relativa manteve-se próximo a 100%, não sendo observado diferenças estatisticamente significativas, entre os valores avaliados, 20, 30, 40 a  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Observou-se maior estabilidade da enzima nos valores de pH 5 e 7, sendo a atividade relativa superior a 75 % e próxima a 100 %, até 72 h de incubação, para os pHs 5 e 7, respectivamente. A atividade manteve-se estável por 72 h na faixa de temperatura de 20 a  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . A  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  observa-se diminuição da atividade

em 8 h de incubação de aproximadamente 40 %. Desta forma, pode-se sugerir, a princípio, a manutenção do caldo enzimático bruto contendo a enzima lacase proveniente do cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em temperatura ambiente e pH neutro. Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  encontrados neste trabalho para a enzima produzida foram iguais a 0,1 mM e  $1,25 \text{ mM min}^{-1}$ , respectivamente.

O ensaio de degradação do composto interferente endócrino bisfenol-A mostrou que o caldo enzimático bruto de *Pleurotus sajor-caju* degradou 100 % do composto bisfenol-A ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) após 48 h de incubação.

## 6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuidade de pesquisas relacionadas à produção, caracterização e aplicação das lacases obtidas, em cultivo submerso, por *Pleurotus sajor-caju* CCB 019, sugere-se:

- verificar a influência do uso de diferentes tipos de impelidores e de diferentes sistemas de cultivo, a fim de se obter maiores produtividades de lacase;
- purificar, caracterizar e verificar a presença de isoformas de lacase obtidas nos cultivos em biorreator;
- estudar o tempo de estocagem da enzima, bem como a adição de estabilizantes ao caldo enzimático para posterior aplicação em diferentes processos industriais;
- avaliar a capacidade do caldo enzimático na degradação de bisfenol-A e outros interferentes endócrinos como, por exemplo, t-nonilfenol, 17 $\alpha$ -etinilestradiol e triclosan, utilizando menor concentração da enzima, avaliando ainda as condições de incubação das soluções de bisfenol-A com o caldo enzimático como temperatura e pH sobre o percentual de degradação, e estudar a capacidade do caldo enzimático na degradação do bisfenol-A presente em resíduos sólidos.



## 7. REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) . **Official methods of analysis**. 100 ed. Arlington, 1984.

ABDULLAH, N.; ISMAIL, R.; JOHARI, N. M. K.; ANNUAR, M.S.M. Production of liquid spawn of an edible grey oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel by submerged fermentation and sporophore yield on rubber wood sawdust. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 65–69, 2013.

ABO-STATE, M. A. M.; KHATAB, O.; NASAR, A. A.; MAHMOUD, B. Factors affecting laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. **World Applied Sciences Journal**, v. 14, p. 1607-1619, 2011.

AGGELIS, G.; ICONOMOU, D.; CHRISTOU, M.; BOKAS, D.; KOTZAILIAS, S.; CHRISTOU, G.; TSAGOU, V.; PAPANIKOLAOU, S. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. **Water Research**, v. 37, p. 3897–3904, 2003.

AGUIAR, F.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.

AKDOGAN, H. A.; PAZARLIOGLU, N.K. Fluorene biodegradation by *P. ostreatus* — Part I: Biodegradation by free cells. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 834–839, 2011.

ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D.; KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. **Carbohydrate Research**, v.5, p.340-345, 1967.

ARDON, O.; KEREM, Z.; HADAR, Y. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. **Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 201-207, 1996.

ARMAS A. T.; CUATECONTZI-CUAUTLE, E.; FERNÁNDEZ, F. J.; ESTRADA-TORRES, A.; MONTIEL-GONZÁLEZ, A. M. Temporal profiles of intra- and extracellular laccase isoenzymes from *Pleurotus ostreatus* produced in submerged and solid-state cultures. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 1069-1077, 2016.

ASGHER, M.; ASLAM, B.; IQBAL, H. M. N. Novel catalytic and effluent decolorization functionalities of sol-gel immobilized *Pleurotus ostreatus* IBL-02 manganese peroxidase produced from bio-processing of wheat straw. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 34, p. 1756-1761, 2013.

ASSIS, I. S. **Síntese e avaliação *in vivo* de substâncias bioativas de *Pleurotus sajor-caju***. 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) – Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente, UNIVILLE, Joinville.

BALAN, K.; SATHISHKUMAR, P.; PALVANNAN, T. **Decolorization of malachite green by laccase: Optimization by response surface methodology**. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, v. 43, p. 776–782, 2012.

BALDRIAN, P., GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, p. 69-74, 2002.

BALDRIAN, P. Fungal laccases occurrence and properties. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 30, p. 215–242, 2006.

BALTIERRA-TREJO, E., MARQUEZ-BENAVIDES, L., SANCHEZ-Y, A.N.Z, JUAN M. Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase. **Journal of Microbiological Methods**, 2015.

BANO, Z. A., RAJARATHNAM, S. *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, preservation, ad role and human food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 27, n. 2, p. 87-158, 1988.

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D.T.; PIGGATO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos Production and Applications of Fungal Exopolysaccharides. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

BARBOSA, C.R., CÂNDIDO, E.J., SILVA, J.B.A. Caracterização dos compostos inibidores do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada utilizado para produção biotecnológica de xilitol. *In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ*, São Paulo, 2005.

BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Evaluation of growth and production of *Pleurotus sp.* in sterilized substrates. *Arq. Inst. Biol.*, v.80, n.3, p. 318-324, 2013.

BETTIN, F. 2010. **Cinética de crescimento e produção de lacases do fungo *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 (Fr.) Singer em processo submerso em biorreator com agitação mecânica.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, UCS, Caxias do Sul.

BETTIN, F.; ROSA, L. R.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T. A.; MALVESSI, E.; 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, p. 758–764, 2011.

BETTIN, F.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T. A.; SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. Additive effects of CuSO<sub>4</sub> and aromatic compounds on laccase production by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 using sucrose as a carbon source. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 31, Nº. 02, p. 335-346, 2014.

BISARIA, R.; MADAN, M. Mushrooms: potential protein source from cellulosic residues. *Enzyme Microbiology Technology*, v.5, p.251-259, 1983.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** Rio de Janeiro: Interciência; 2008, 506 p.

BONATTI, M., KARNOPP, P., SOARES, H.M., FURLAN, S.A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, v. 88, p. 425-428, 2004.

BONATTI-CHAVES M., LIBARDI JUNIOR N., BORGES G., WISBECK E., GERN R., FURLAN S., FURIGO JUNIOR A. Production of bioactive substances in fed-batch and semi-continuous culture by *Pleurotus ostreatus*. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 307-312, 2014.

BONONI, V.L.R., TRUFEM, S.F.B. **Cogumelos comestíveis**. 1 ed. São Paulo: Ícone; 1995, 206p.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biociologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher Ltda, v. 1, 2001.

BRENE, W.M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal Food Protection**, v.53, n.10, p.883-894, 1990.

BURNS, P.J. **Characterization of an extracellular polysaccharide from *Pleurotus florida***. Ph.D. Thesis - University of Westminster, London, 1994.

BUSWELL, J. A.; CA, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 1, p. 81-87, 1996.

CABRERA, G. M.; Roberti, M. J.; Wright, J. E.; Seldes, A. M. Cryptoporic and isocryptoporic acids from the fungal cultures of *Polyporus arcularius* and *P. ciliatus*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 189–193, 2002.

CAJTHAML, T.; KRESINOVÁ, Z.; SVOBODOVÁ, K.; MÖDER, M. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. **Chemosphere**, v. 75, p. 745–750, 2009.

CARABAJAL, M.; LEVIN, L.; ALBERTÓ, E.; LECHNER, B. Effect of co-cultivation of two *Pleurotus* species on lignocellulolytic enzyme production and mushroom fructification. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v, 66, p. 71-76, 2012.

CARVALHO, C. S. M.; AGUIAR, L. V. B.; SALES-CAMPOS, C.; MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N. Applicability of the use of waste from different banana cultivars for the cultivation of the oyster mushroom. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 819-826, 2012.

CARVALHO, C. S. M.; SALES-CAMPOS, C.; AGUIAR, L. V.B.; MINHONI, M. T. A, ANDRADE, M. C. N. Mineral composition of substrates based on banana waste during the *Pleurotus ostreatus* cultivation. **Arq. Inst. Biol.**, v.81, n.3, p. 272-281, 2014.

CAVAZZONI, V., ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelia edible mushrooms. **Ital. J. Food Sci.**, n.1, p.9-15, 1992.

CHANG, B.; CHANG, Y. Biodegradation of toxic chemicals by *Pleurotus eryngii* in submerged fermentation and solid-state fermentation. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Article in press, p. 1-7, 2014.

COUTO, R. S.; TOCA-HERRERA, J. L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 558–569, 2007.

CUI, J.; CHISTI, Y. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 109-122, 2003.

DARWISH, G. A. M. A.; BAKR, A. A.; ABDALLAH, M. M. F. Nutritional value upgrading of maize stalk by using *Pleurotus ostreatus* and *Saccharomyces cerevisiae* in solid state fermentation. **Annals of Agricultural Science**, v.57, p. 47–51, 2012.

DEVI, K. S. P.; ROY, B.; PATRA, P.; SAHOO, B. Characterization and lectin microarray of an immunomodulatory heteroglucan from *Pleurotus ostreatus* mycelia. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 857– 865, 2013.

DIAS, E. S.; KOSHIKUMO, E. M. S.; SCHWAN, R; S.; DA SILVA, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciênc. agrotec.**, v. 27, n.6, p. 1363-1369, 2003.

DIAS, E. S. Mushroom cultivation in brazil: challenges and potential for growth. **Ciênc. agrotec.**, v. 34, n. 4, p. 795-803, 2010.

EIRA, A. F. **Fungos comestíveis**. In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J .L. Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EducS, 2004.

EL-BATAL, A. I.; ELKENAWY, N. M.; YASSIN, A. S.; AMIN, A. M. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. **Biotechnology Reports**, v. 5, p. 31–39, 2015.

ELISASHVILI, V.; PENNINGKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v. 99, p.457–462, 2008.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot *Basidiomycetes*. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 37–42, 2009.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; AGATHOS, S. N. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot *Basidiomycetes* isolated from the forests of Georgia. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 25, p. 331–339, 2009.

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 Science**, Article in press, 2016.

EPAGRI/CEPA. Banana: Panorama nacional e estadual. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br>> Acesso em 3 de agosto de 2015.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. de. **FUNGOS: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul, RS: EDUCS, 2004.

FACCHINI, J.M.; ALVES, E. P.; AGUILER, C.; GERN, R. M. M.; SILVEIRA, M. L. L.; WISBECK, E.; FURLAN, S.A. Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 72–77, 2014.

FELLOWS, P. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008, 602 p.

FENICE, M.; SERMANNI, G. G.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mil wastewater-based media. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 77- 85, 2003.

FERNÁNDEZ-ALEJANDRE, K. I.; FLORES, N.; TINOCO-VALENCIA, R.; CARO, C.; FLORES, C.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. Diffusional and transcriptional mechanisms involved in laccases production by *Pleurotus ostreatus* CP50. **Journal of Biotechnology**, v. 223, p. 42–49, 2016.

FERNÁNDEZ-FUEYO, E.; CASTANERA, R.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; LÓPEZ-LUCENDO, M. F.; RAMÍREZ, L.; PISABARRO, A. G.; MARTÍNEZ, A. T. Ligninolytic peroxidase gene expression by *Pleurotus ostreatus*: Differential regulation in lignocellulose medium and effect of temperature and pH. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 150 - 161, 2014.

FIGUEIRÓ, G. G., GRACIOLLI, L. A. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciênc. Agrotec.**, v. 35, n.5, p. 924-930, 2011.

FREEDONIA GROUP INCORPORATED (2016) **World Enzymes**. Acesso em 18 de abril de 2016. Disponível em: <http://www.freedoniagroup.com/industry-study/2824/world-enzymes.htm>

FURLAN, S. A.; VIRMOND, L. J.; MIERS, D.; BONATTI, M.; GERN, R. M. M., JONAS, R. Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol.13, p. 689-692, 1997.

FURLAN, S. A.; GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; BONATTI, M.; SILVEIRA, M. L. L.; SILVA, H. H. Possibilities of "*Pleurotus*" applications in food, health and environmental technologies. In: KOUTINAS, A.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. **Current topics on Bioprocesses in Food Industry**. Nova Delhi: Asiatech, p. 482-495, 2008.

GARZILLO, A., COLAO, M. C., BUONOCORE, V., OLIVA, R., FALCIGNO, L., SAVIANO, M., SANTORO, A., ZAPPALA, R., BONOMO, R., BIANCO, C., GIARDINA, P., PALMIERI, G., SANNIA, G. Structural and Kinetic Characterization of Native Laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, p. 192 - 201, 2001.

GOMEZ, M.; GARRALON, G.; PLAZA, F.; VÍLCHEZ, R. HONTORIA, E.; GOMEZ, M. A. Rejection of endocrine disrupting compounds (bisphenol A, bisphenol F and triethyleneglycol dimethacrylate) by membrane technologies. **Deslination**, v. 212, p. 79-9, 2007.

GORIN, P.A.J.; TEIXEIRA, A.Z.A.; TRAVASSOS, L.R.; LABOURIAU, M.L.S.; IACOMINI, M. Characterization of carbohydrate components of na unusual hydrogel formed by seed coats of *Magonia pubescens* (Tingui). **Carbohydrate Research**, 282, 325-333, 1996.

GRACIOLLI, L. A.; CAETANO, C. P. S.; LEONEL, M.; AGUIAR, E. B. Cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus florida* em ramas de

mandioca. **Revista Raízes e Amidos Tropicais, Botucatu**, v.6, p. 26-39, 2010.

GUPTA, A.; SHARMA, S.; SAHA, S.; WALIA, S. Yield and nutritional content of *Pleurotus sajor caju* on wheat straw supplemented with raw and detoxified mahua cake. **Food Chemistry**, v. 141, p.4231–4239, 2013.

HADIBARATA, T.; KRISTANTI, R. A. Potential of a white-rot fungus *Pleurotus eryngii* F032 for degradation and transformation of Fluorene. **Fungal biology**, v. 118, p. 222-227, 2014.

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*. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 98-100, p. 229-241, 2002.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O. E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LUCKING, R.; THORSTEN LUMBSCH, H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; MCLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M. J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; STALPERS, J. A.; VILGALYS, R.; AIME, M. C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G. L.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; DAI, Y.; GAMS, W.; GEISER, D. M.; GRIFFITH, G. W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R. A.; HYDE, K. D.; IRONSIDE, J.E.; KOLJALG, U.; KURTZMAN, P.C.; LARSSON, K.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, E.; REEB, V.; ROGERS, J. D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHUBLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W. A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M. M.; WINKA, K.; YAO, Y.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, p. 509-547, 2007.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454–466, 2002.

INPI, Instituto Nacional de Propriedade Industrial Disponível em <<http://www.inpi.gov.br>>. Acesso em 8 de jan 2016.

JANUSZ, G.; KUCHARZYK, K. H.; PAWLIK, A.; STASZCZAK, M.; PASZCZYNSKI, A. J. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 1– 12, 2013.

JIANG, X.; CAO, L.; ZHANG, R.; YAN, L.; MAO, Y.; YANG, Y. Effects of nitrogen addition and litter properties on litterdecomposition and enzyme activities of individual fungi. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p. 108–115, 2014.

JIN, X.; NING, Y. Laccase production optimization by response surface methodology with *Aspergillus fumigatus* AF1 in unique inexpensive medium and decolorization of different dyes with the crude enzyme or fungal pellets. **Journal of Hazardous Materials**, v. 262, p.870– 877, 2013.

KAHRAMAN, S.S.; GURDAL, I.H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. **Bioresour. Technol.**, v. 82, p. 215-217, 2002.

KIEHL, J. E. **Fertilizantes orgânicos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1985, 492p.

KIRK, T.; YANG, H.; KEYSER, P. The chemistry and physiology of the fungal degradation of lignina. **Developments in Industrial Microbiology**, Arlington, v.19, p.51-61, 1978.

KNEZEVIC, A.; MILOVANOVIC, I.; STAJIC, M.; LONCAR, N.; BRCESKI, I.; VUKOJEVIC, J.; CILERDZI, J. Lignin degradation by selected fungal species. **Bioresource Technology**, v. 138, p.117–123, 2013.

KOUTROTSIOS, G.; MOUNTZOURIS, K. C.; CHATZIPAVLIDIS, I.; ZERVAKIS, G. I. Bioconversion of lignocellulosic residues by *Agrocybe cylindracea* and *Pleurotus ostreatus* mushroom fungi – Assessment of their effect on the final product and spent substrate properties. **Food Chemistry**, v. 161, p.127–135, 2014.

KUMAR, V. V.; SATHYASELVABALA, V.; PREMKUMAR, M. P.; VIDYADEVI, T.; SIVANESAN, S. Biochemical characterization of three phase partitioned laccase and its application in decolorization and degradation of synthetic dyes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, p. 63– 72, 2012.

KUROSE, T.; SAITO, Y.; KIMATA, K.; NAKAGAWA, Y.; YANO, A.; ITO, K.; KAWARASAKI, Y. Secretory expression of *Lentinula edodes* intracellular laccase by yeast high-cell density system: Sub-milligram production of difficult-to-express secretory protein. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 6, p. 659-663, 2014.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX. M.; 1917. **Princípios de Bioquímica**, Savier, 2000, 839p.

LEI, YANG. All Galleris, 2014. Disponível na Internet: <http://www.pbase.com/chinham/image/59787166>. Acessado em 26 de fevereiro 2014

LI, X.; WU, Y.; LIN, X.; ZHANG, J.; ZENG, J. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil microcosms amended with mushroom cultivation substrate. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 47, p. 191-197, 2012.

LIBARDI JUNIOR, L.; CORREA, M.; BONATTI-CHAVES, M.; GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; SCHLOSSER, D.; FURLAN, S. A. Production and Applications of *Pleurotus* laccase. **Advances in Bioprocess in Food Industry**, v. 4, p. 36-61, 2011.

LIBARDI JUNIOR, N.; GERN, R. M. M.; FURLAN, S. A.; SCHLOSSER, D. Laccase production by the aquatic ascomycete "*Phoma*" sp. UHH 5-1-03 and the white rot basidiomycete "*Pleurotus ostreatus*" DSM 1833 during submerged cultivation on banana peels and

enzyme applicability for the removal of endocrine-disrupting chemicals. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, in press, 2012.

LIU, L.; LIN, Z.; ZHENG, T.; LIN, L.; C.; ZHENG.;LIN, Z.; WANG, S. WANG, Z. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. **Enzyme and Microbial Technology**, v.44, p. 426–433, 2009.

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.

LIU, Y.; MEIB, H.; SUA,Y.; FANA, H.; CHENC, C.; TSAIA, Y. Inhibitory effects of *Pleurotus tuber-regium* mycelia and bioactive constituents on LPS-treated RAW 264.7 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 662-670, 2014.

LOFFREDO, E.; TRAVERSA, A.; SENESI, N. Biodecontamination of water from bisphenol A using ligninolytic fungi and the modulation role of humic acids. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.79, p. 288–293, 2012.

LOMASCOLO, A.; RECORD, E.; HERPOE, I.; GIMBERT, I.; DELATTRE, M.; ROBERT, J. L.; GEORIS, J.; DAUVRIN, T.; SIGOILLOT, J. C.; ASTHER, M. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. **Journal of Applied Microbiology**,v. 94, p. 618–624, 2003.

LUZ, J. M. R.; NUNES, M. D.; PAES, S. A.; TORRES, D. P.; SILVA, M. C. S.; KASUYA, M. C. M. Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1508-1515, 2012.

MADAN, M., VASUDEVAN, P., SHARMA, S. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on different agro-wastes. **Biological Wastes**, v.22, p.241-250, 1987.

MAJEAU, J.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2331–2350, 2010.

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.

MARIGA, A. M.; PEI, F.; YANG, W.; ZHAO, L.; SHAO, Y.; MUGAMBI, D. K.; HU, Q. Immuno potentiation of *Pleurotus eryngii* (DC. Ex Fr.) Quel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p. 604–614, 2014.

MARQUEZ-ROCHA, F. J.; GUILL'EM, G. K.; S'ANCHEZ, J. O.; V'AZQUEZ-DUHALT, R. Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 29–32, 1999.

MAZIERO, R., CAVAZZONI, V., BONONI, V.L.R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 77-84, 1999.

MELO, M. P.; RAMPINELLI, J. R.; BONATTI-CHAVES, M.; WISBECK, E.; FURIGO-JUNIOR, A.; FURLAN, S.A. Influência das concentrações de  $\text{CuSO}_4$  e casca de banana sobre a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*. **Anais do X Seminário Brasileiro de Tecnologia enzimática – ENZITEC**, Blumenau-SC, 2012.

MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 1365-1391, 2015.

MICHALOWICZ, J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 738-758, 2014.

MIGLIORE, L.; FIORI, M.; SPADONI, A.; GALLI, E. Biodegradation of oxytetracycline by *Pleurotus ostreatus* mycelium: a mycoremediation technique. **Journal of Hazardous Materials**, v. 215–216, p. 227–232, 2012.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p.426-428, 1959.

MIZUNO T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 9-29, 1999.

MIZUNO, M. Anti-tumor polysaccharides from mushrooms during storage. **BioFactors**, n. 12, p. 275-281, 2000.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia *Enzimática*. **Revista Processos Químicos**. Jan/jun, 2009.

MORE, S. S.; RENUKA, P. S.; PRUTHVI, K.; SWETHA, M.; MALINI, S.; VEENA, S. M. Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus sp.* **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

MUNOZ, C.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, A.T.; MARTÍNEZ, M.J. Induction and Characterization of Laccase in the Lignolytic Fungus *Pleurotus eryngii*. **Current Microbiology**, v. 34, p. 1-5, 1997.

OOI, V.E.C., LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Current Medicinal Chemistry**, n.7, p.715-729, 2000.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Sabios: Rev. Saúde e Biol.**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Cost analysis in laccase production. **Journal of Environmental Management**, v. 92, p. 2907-2912, 2011.

PAKHADNIA, Y. G.; MALINOUSKI, N. I.; LAPKO, A.G. Purification and Characteristics of an Enzyme with Both Bilirubin Oxidase and Laccase Activities from Mycelium of the Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 74, n. 9, p. 1027-1034, 2009.

PAPADOPOULOU, K.; KALAGONA, I. M.; PHILIPPOUSSIS, A.; RIGAS, F. Optimization of fungal decolorization of azo and anthraquinone dyes via Box-Behnken design. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 77, p. 31-38, 2013.

PAPASPYRIDIS, L. M., ALIGIANNIS, N., CHRISTAKOPOULOS, P., SKALTSOUNIS, A. L., FOKIALAKIS, N. Production of bioactive metabolites with pharmaceutical and nutraceutical interest by submerged fermentation of “*Pleurotus ostreatus*” in a batch stirred tank bioreactor. **Procedia – Food Science**, v. 1, p. 1746-1756, 2011.

PARENTI, A.; MUGUERZA, E.; IROZ, A. R.; OMARINI, A.; CONDE, E.; ALFARO, M.; CASTANERA, R.; SANTOYO, F.; RAMÍREZ, L.; PISABARRO, A. G. Induction of laccase activity in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts. **Bioresource Technology**, v. 133, p.142–149, 2013.

PARK, M.; KIM, M.; KIM, S.; HÁ, B.; RO, H. Differential Expression of laccase genes in *Pleurotus ostreatus* and biochemical characterization of laccase isozymes produced in *Pichia pastoris*. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 280-287, 2015.

PATRICK, F.; MTUI, G.; MSHANDETE, A. M.; KIVAISI, A. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.º. 50, p. 10166-10177, 2011.

PELCZAR, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. v. II, 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 517p, 1996.

PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G. As principais oxirredutases de uso industrial. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R.

**Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, p.412, cap. 10, 2004.

PISCITELLI, A.; VECCHIO, C. D.; FARACO, V.; GIARDINA, P.; MACELLARO, MIELE, G.A.; PEZZELLA, C.; SANNIA, G. Fungal laccases: Versatile tools for lignocellulose transformation. **C. R. Biologies**, v. 334, p.789–794, 2011.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos.** Santa Cruz do Sul: EDUNISC, v. 2, 2002.

QUEVEDO-HIDALGO, B.; NARVÁEZ-RINCÓN, P. C.; PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M.; VELÁSQUEZ-LOZANO, M. E. Production of lignocellulolytic enzymes from floriculture residues using *Pleurotus ostreatus*. **Univ. Sci.**, v. 20, n. 1, p. 117-127, 2015.

RAJARATHNAM, S., SHASHIREKA, M.N., BANO, Z. Biopotentialities of the Basidiomacromycetes. **Advances in Applied Microbiology**, v. 37, p. 233-361, 1992.

RAMÍREZ, N. E.; VARGAS, M. C.; ARIZA, J. C.; MARTÍNEZ, C. Caracterización de La lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. V, n. 2, 2003.

RAVEN, P. H., *et al.* **Biologia Vegetal.** 6ª ed. Rio Janeiro: Editora Guanabara KOOGAN, 2001.

REDDY, G.V., RAVINDRA BABU, P., KOMARAI AH, P., ROY, K.R.R.M., KOTHARI, I.L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic anzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, v.38, n.10, p.1457-1462, 2003.

RORABACHER, D. B. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dixon's "Q" parameter and related subrange ratios at the 95% confidence level. **Anal. Chem.**, v. 63, p. 139-146, 1991.

ROSADO, F.R., CARBONERO, E.R., KEMMELMEIER, C., TISCHER, C.A., GORIN, P.A.J., IACOMINI, M. A partially 3-O-methylated (1 4)-linked -D-galactan and -D-mannan from *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 261-265, 2002.

ROSADO, F.R.; GERMANO, S.; CARBONERO, E.R.; COSTA, S.M.; IACOMINI, M.; KEMMELMEIER, C. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida (Jack.: Fr.) Kummer. **Journal Basic Microbiology**, vol. 43, p.230–237, 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.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1981, 166p.

SILVA, J. J. da; SANTANA, T. T.; OLIVEIRA, A. C. C.; ALMEIDA, P. H. de; SOUZA, S. G. H. de; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. do. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com casca de café. **Arq. Ciênc. Vet. Zool**, v. 15, nº. 2, p. 191-196, 2012.

SILVEIRA, M. L. L.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L. Development of an alternative technology for the oyster mushroom production using liquid inoculum. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, n. 4, p. 858-862, 2008.

SILVEIRA, M.L.L.; WISBECK, E.; SMIDERLE, F.R.; MORAIS, C.P.; BORATO, D.G.; BAGGIO, C.H.; RUTHES, A.C.; CIPRIANI, T.R.; SASSAKI G.L.; FURLAN, S.A.; IACOMINI, M. Structural characterization and anti-inflammatory activity of a linear  $\beta$ -D-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 588-596, 2014.

SIQUEIRA FG; MARTOS ET; SILVA R; DIAS ES. 2011. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on banana stalk and Bahia grass based substrates. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 199-204, 2011.

SINGH, R.; AHLAWAT, O. P.; RAJOR, A. Identification of the potential of microbial combinations obtained from spent mushroom cultivation substrates for use in textile effluent decolorization. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 217–225, 2012.

SOUZA, J. S. I., PEIXOTO, A. M., TOLEDO, F. F. **Enciclopédia agrícola brasileira**: AB (Vol. 1). Edusp., 1995.

STAJIC, M.; Persky, L.; Friesem, D.; Hadar, Y.; Wasser, s. p.; Nevo, e.; Vukojević, J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 65–73, 2006.

STURION, G.L. **Utilização da folha de bananeira como substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis (*Pleurotus spp.*)**. 1994. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 147p.

THOMAS, G.V., PRABHU, S.R., REENY, M.Z., BOPAIAH, B.M. Evaluation of lignocellulosic biomass from coconut palm as substrate for cultivation of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 879-882, 1998.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, p.19-26, 1994.

TINOCO R, ACEVEDO A, GALINDO E, SERRANO-CARREÑO L. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, 2011.

TINOCO-VALÊNCIA, R.; GÓMEZ-CRUZ, C.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. Toward an understanding of the effects of agitation and aeration on growth and laccases production by *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biotechnology**, v. 177, p. 67–73, 2014.

TLECUITL-BERISTAIN, S.; SANCHEZ, C.; LOERA, O.; ROBSON, G. D.; DÍAZ-GODÍNEZ, G. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. **Mycological Research**, V. 112, p. 1080-1084, 2008.

TRABULSI, L. R; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRINDER, R.. Instruções para a determinação enzimática de glicose pelo método Glicose-E In: CELM – Cia Equipadora de Laboratórios Modernos, São Paulo., **Ann. Clin. Biochem**, 1969.

UGIORO, O.; Kadiri, M.; Idrisu, M.; Fadimu, O.Y.; Okolie, P. I. Studies on Phytochemical Screening and Enzyme Activities of Composted and Uncomposted *Pleurotus pulmonarius* at various Fruit bodies and Substrate Stages. **Direct Research Journal of Agriculture and Food Science**, v.1, p.1-5, 2013.

USPTO - UNITED STATES PATENT OFFICE. Disponível em: <[http:// www.uspto.gov](http://www.uspto.gov)>. Acesso em 8 de jan 2016.

UKAWA, Y., ITO, H., HISAMATSU, M. Antitumor effects of (1→3)-β-D-glucan and (1→6)-β-D-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakesimeji (*Lyophyllum decastes* Sing.). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 1, p. 98-104, 2000.

VARGAS, M. C.; RAMÍREZ, N. B. Phenol oxidation of petrol. refinery wastewater catalyzed by laccase. **Ciencia, Tecnología y Futuro**,v. 2, n. 3, 2002.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. In: KAVANAGH, KEVIN. Fungi: biology and applications. **England: John Wiley & Sons Ltd**, 2005.

WANG, F.; MA, A.; GUO, C.; ZHUANG, G.; LIU, C. Ultrasound-intensified laccase production from *Trametes versicolor*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 118–124, 2013.

WISBECK, E., ROBERT, A.P., FURLAN, S.A. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 3, n.2, p. 07-10, 2002.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R.L.; WOLFROM, M.L. (eds.). **Methods Carbohydrate Chemistry**. New York, v.2, 65-68, 1963a.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R.L.; WOLFROM, M.L. (eds.). **Methods Carbohydrate Chemistry**. New York, v.2, 65-68, 1963b.

YANG, Z.; XUB, J.; FU, Q.; FU, X.; SHU, T.; BIC, Y.; SONG, B. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal câncer. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 615– 620, 2013.

YUAN, X.; TIAN, G.; ZHAO, Y.; ZHAO, L.; WANG, H.; T. B. Ng. biochemical characteristics of three laccase isoforms from the basidiomycete *Pleurotus nebrodensis*. **Molecules**, v. 13, p. 203, 2016.

ZADRAZIL, F., KURTZMAN, J.R.H. The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics. In: **Tropical Mushrooms**. Hong Kong, The Chinese Univ. Press. 493p, p. 277-278, 1984.

ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WNAG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.4-19, 2007.

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, p. 216–222, 2011.