

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 19/12/2026.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS

MESTRADO PROFISSIONAL

LUCAS CAMPOS ALVES

**AVALIAÇÃO DA OBTENÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO
RICO EM OXIRREDUTASES POR EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO
DE SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS**

ARARAQUARA - SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

LUCAS CAMPOS ALVES

AVALIAÇÃO DA OBTENÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO
RICO EM OXIRREDUTASE POR EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO
DE SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Masarin

COORIENTADOR: Prof. Dr. Álvaro Baptista Neto

ARARAQUARA - SP

2024

A474a Alves, Lucas Campos.
Avaliação da obtenção de preparado enzimático rico em oxirredutase por extração sólido-líquido de subprodutos industriais / Lucas Campo Alves. – Araraquara, 2024.
55 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de concentração: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Fernando Masarin.
Coorientador: Álvaro de Baptista Neto.

1. Subproduto de cogumelos comestíveis (SCC). 2. Enzimas oxirredutases. 3. Lacase. 4. Manganês peroxidase. 5. Lignina Peroxidase. 6. Ultrafiltração. I. Masarin, Fernando, orient. II. Baptista Neto, Álvaro de, coorient. III. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030170P0
Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da obtenção de preparado enzimático rico em oxirredutases por extração sólido-líquido de subprodutos industriais

AUTOR: LUCAS CAMPOS ALVES

ORIENTADOR: FERNANDO MASARIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas Unesp

Prof. Dr. JULIÁN PAUL MARTÍNEZ GALAN (Participação Virtual)

Escuela de Nutrición y Dietética / Universidad de Antioquia (UdeA)

Prof. Dr. ELIAS DE SOUZA MONTEIRO FILHO (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química do Câmpus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 19 de dezembro de 2024

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O desenvolvimento de um processo eficiente para a obtenção de extrato enzimático a partir do substrato de cogumelos comestíveis constitui em inovação tecnológica com aplicação nos setores de polpa celulósica, tratamento de efluentes, dentre outros. A valorização desta tecnologia impulsionará o desenvolvimento da bioeconomia em regiões produtoras de cogumelos com oportunidades de negócios e empregos.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The development of an efficient process for obtaining enzymatic extract from the substrate of edible mushrooms constitutes a technological innovation with applications in the sectors of cellulose pulp, effluent treatment, among others. The valorization of this technology will boost the development of the bioeconomy in mushroom-producing regions with business and employment opportunities.

AGRADECIMENTOS

Em especial ao meu Deus, por ensinar o caminho a andar. E a Larissa e Celine pelo amor, dedicação e inspiração, com quem compartilho o mérito desta conquista, “é por vocês!”.

Aos Professores Dr. Fernando Masarin e Dr. Alvaro Baptista Neto, pela orientação e paciência.

Aos meus pais, irmãs e professores, agradeço o amparo e apoio. São pessoas que passaram por minha vida e que auxiliaram na construção do meu ser, agradeço a todos por fazerem parte da minha história.

Aos amigos e mentores, Prof. Dr. Fernando Afonso Silva e Dr. Bruno Alencar Pereira sem os quais o caminho teria sido mais árduo, por sempre estarem dispostos a me ouvir e oferecer uma visão crítica e incentivadora, definitivamente, a eles devo muito do meu aprendizado e entusiasmo.

À KHEMI LABORATORIO, pelo apoio financeiro, industrial e laboratorial.

RESUMO

O presente estudo avaliou a obtenção de extrato rico em atividades enzimática de oxiredutases, enzimas capazes de oxidar compostos aromáticos/fenólicos, como por exemplo a lignina e seus derivados (compostos presentes em materiais lignocelulósicos). Os extratos obtidos apresentaram atividade de três enzimas oxiredutases lacase (Lac), manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP). Após foi ultrafiltrado o caldo bruto obtendo um extrato enzimático com atividades enzimáticas concentradas. Mostraram-se promissores para extração e obtenção de lacase (Lac), manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP), portanto, apresenta potencial para a formulação de preparado enzimático. No entanto, são necessários estudos mais detalhados para que sejam obtidas condições ótimas de extração das enzimas, com a variação do método purificação por ultrafiltração. Por fim, com estes estudos será possível avaliar se o produto terá uma aceitação no mercado.

Palavras-chave: Enzimas Oxiredutases; Lacase; Manganês Peroxidase; Lignina Peroxidase; Ultrafiltração.

ABSTRACT

This study evaluated the production of an extract rich in enzymatic activities of oxidoreductases, enzymes capable of oxidizing aromatic/phenolic compounds, such as lignin and its derivatives (compounds present in lignocellulosic materials). The extracts obtained showed activity of three oxidoreductase enzymes: laccase (Lac), manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP). The crude broth was then ultrafiltered, obtaining an enzymatic extract with concentrated enzymatic activities. They showed promise for extraction and production of laccase (Lac), manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP), and therefore have potential for the formulation of an enzymatic preparation. However, more detailed studies are needed to obtain optimal conditions for enzyme extraction, with variations in the ultrafiltration purification method. Finally, these studies will allow evaluating whether the product will be accepted in the market.

Keywords: Oxidoreductase Enzymes; Laccase; Manganese Peroxidase; Lignin Peroxidase; Ultrafiltration.

1. INTRODUÇÃO

O mercado mundial de produtos à base de enzimas é um segmento que está em constante crescimento devido ao aumento do consumo destas nos processos industriais. Segundo dados publicados pela Fior Market Research (2019), o mercado global de enzimas deve crescer de US\$ 8,2 bilhões em 2018 para US\$ 13,8 bilhões até 2026. O setor industrial do Brasil apresenta aplicação ainda reduzida de preparados enzimáticos em comparação com outros países, sendo principalmente um importador de enzimas.

Em 2012, o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC, 2012) publicou um relatório sobre a biotecnologia no Brasil, no qual relata que as importações dos preparados enzimáticos chegaram a US\$ 119 milhões e as exportações a US\$ 52 milhões no ano de 2011 (MDIC, 2012). Todavia existe grande importância em obter-se tais moléculas, já que o setor de papel e celulose gera grande quantidade de compostos químicos (incluindo compostos intensamente coloridos), dos quais vários são considerados tóxicos. Esses compostos são formados na etapa de branqueamento de polpa, como por exemplo, os organoclorados (clorofenóis, cloroalifáticos etc).

Destacam-se os estudos da aplicação da enzima lacase (Lac) (EC 1.10.3.2) no setor de papel e celulose. A enzima em questão é uma oxirredutase multinuclear; utiliza o oxigênio como receptor de elétrons, oxidando compostos fenólicos, aromáticos e aminas, produzindo água ao final da reação (Litthauer et al., 2007). Portanto, o uso de Lac no branqueamento de polpa de celulose não gera resíduos tóxicos ao meio ambiente, sendo seu uso, considerado uma alternativa ecológica e sustentável visando a diminuição de compostos químicos organoclorados utilizados atualmente (Sharma et al., 2014).

As enzimas para serem aplicadas em processo de branqueamento de polpa de celulose devem apresentar termo resistência (ser estável a temperaturas $>60^{\circ}\text{C}$), capacidade de atuar em diferentes faixas de pH, bem como, apresentar estabilidade térmica e ao pH por no mínimo 4 horas (Singh, 2009).

Dentro do âmbito do conceito apresentado e considerando à importância de novas tecnologias para a busca por melhorias no processo de papel e celulose, este trabalho propõe avaliar a viabilidade técnica de obtenção de enzimas oxirredutases, bem como avaliar o potencial de aplicabilidade do preparado enzimático obtido no setor da indústria, como por exemplo no setor de papel e celulose, resultando na contribuição da ampliação da oferta deste produto no mercado interno, favorecendo o desenvolvimento e autonomia tecnológica nacional.

6 CONCLUSÃO

- Ambos os SCC obtidos dos principais fungos filamentosos comerciais mostraram-se promissores para extração e obtenção de enzimas oxirredutases (lacase, MnP e LiP);
- Os tempos de cultivo em que resultou as melhores atividades enzimáticas, ficaram compreendidos nas três primeiras semanas, o que viabiliza à aplicação comercial do extrato enzimático obtido;
- O processo de purificação de uma amostra selecionada mostrou-se eficiente, aumentando em média 20 vezes a atividade das enzimas oxirredutases;
- O pH ótimo da atividade de LiP e Lac foi de 5, enquanto da MnP foi de 3;
- A temperatura ótima de atividade das enzimas Lac, MnP e LiP foram de 50 °C, 60 °C e 40 °C, respectivamente;
- Os estudos preliminares de estabilidade ao pH mostram que durante a incubação de 1 h as enzimas Lac, MnP e LiP foram estáveis em seus pHs ótimos de atividade;
- Os estudos preliminares de estabilidade térmica mostram que durante a incubação de 1 h as enzimas Lac, MnP foram estáveis até 60°C;
- Os estudos mostram que há potencial para a formulação de um extrato enzimático rico em atividades de oxirredutases;
- Foi constatado um processo eficiente de extração e recuperação de oxirredutases oriundas de SCC com características que tornam estas enzimas, uma importante ferramenta a ser utilizada em diversos processos biotecnológicos.
- Entretanto, são necessários estudos mais detalhados para que sejam obtidas condições ótimas de extração de enzimas oxirredutases de SCC, além de aplicar um método eficiente de refino/purificação, como por exemplo à ultrafiltração.
- Estudos de estabilidade a temperatura com diferentes tempos de incubação devem ser realizados com as oxirredutases para a determinação dos parâmetros de estabilidade térmica (energia de ativação e tempo de meio vida das enzimas);
- Por fim, os resultados referentes obtidos neste trabalho são animadores e nos estimulam a realizar futuros estudos visando produção em maior escala, passo importante para avaliar a viabilidade econômica e tecnológica deste processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLAWAT, O. P. *et al.* Influence of pH, temperature and cultural media on decolorization of synthetic dyes through spent substrate of different mushrooms. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 12, p. 1068–1074, 2009.
- ALEXOPOULOS, C. J. *et al.* Removal of emerging contaminants using spent mushroom compost. **Science of the Total Environment**, v. 4, p. 922–933, 1996.
- ASGHER, M. *et al.* Purification and characterization of manganese peroxidases from native and mutant *Trametes versicolor* IBL-04. **Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis**, v. 37, n. 4, p. 561–570, 2016.
- BROWN, S.H. *et al.* Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 834–841, 1996.
- CHOWDHARY, P. **Ligninolytic Enzymes: An Introduction and Applications in the Food Industry**. [S.l.]: Elsevier, 2019.
- COPELAND, Robert A. **Enzimas: uma introdução prática à estrutura, mecanismo e análise de dados**. John Wiley & Filhos, 2023.
- COUTO, S. R. *et al.* Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnology advances**, n. 5, p. 500–513, 2006.
- CREDENDIO, P. A. **AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM COGUMELOS COMESTÍVEIS**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, Araraquara, 2010.
- DAS, Arijit. *et al.* Production, characterization and Congo red dye decolourizing efficiency of a laccase from *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 cultivated on co-substrates of paddy straw and corn husk. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 281–288, 2016.
- DOOLEY, D. M. *et al.* Spectroscopic studies of *Rhus vernicifera* and *Polyporus versicolor* laccase. Electronic structures of the copper sites. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, n. 17, p. 5038–5046, 1979.
- ELLILÄ, S. Development of a low - cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. **Biotechnology for Biofuels**, n. 10, 2017.
- ESPOSITO, E. *et al.* Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. **Caxias do Sul: EDUCS**, 2004.
- FALADE, A. O. *et al.* Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **Microbiology Open**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2017.
- FEBRIANTO, j. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent : A summary of recent studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. v. 162, p. 616–645, 2009.
- FEITOSA, I. C. Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa. 2009. 147 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - **Universidade Tiradentes**, Aracaju, 2009.
- FERREIRA, L. F. R. *et al.* Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor- caju*

utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and environmental safety**, n. 1, p. 132–137, 2011.

FONSECA, M. I. *et al.* Preliminary studies of new strains of *Trametes* sp. from Argentina for laccase production ability. **brazilian journal of microbiology**, p. 287–297, 2016.

GE, X. Co-digestão anaeróbica em estado sólido de substrato de cogumelo exausto com aparas de jardim e palha de trigo para produção de biogás. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 468–474, 2014.

GIANFREDA, L. *et al.* Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, v. 3, n. 1, p. 1–26, 1999.

GIARDINA, P. *et al.* Laccases: a never-ending story. **Cellular and molecular life sciences**, v. 67, n. 3, p. 369–385, 2010.

GOLD, M. H. *et al.* Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot: Basidiomycete *Phanerochate chrysosporium*. **Washington: American Chemical Society**, p. 127–140, 1989.

HALABURGI, V. M. *et al.* Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. **Process biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1146–1152, 2011.

HAMMEL, K. E. *et al.* Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Current Opinion in Plant Biology**, n. 11, p. 349–355, 2008.

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

HÖLKER, U. *et al.* Biotechnological advantages of laboratory-scale solid- state fermentation with fungi. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 64, p. 175–186, 2004.

KAPICH, A. *et al.* Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v. 461, p. 115–119, 1999.

KERSTEN, P. J. *et al.* Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. **The Biochemical journal**, v. 268, n. 2, p. 475–480, 1990.

KIRK, T. K. *et al.* Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white- rot fungi. [S.l.]: John Wiley & Sons, 1998.

LEE, S. *et al.* Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 21, p. 6180–6193, 2002.

LITTHAUER, D. *et al.* Purification and kinetics of a thermostable lacase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC108). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, 2007.

LIU, L. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 426–433, 2009.

LIU, X. *et al.* Cathodic catalysts in bioelectrochemical systems for energy recovery from wastewater. **Chemical Society Reviews**, v. 22, p. 7718–7745, 2014.

MACIEL, M. J. *et al.* Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**, n. 6, p. 1–13, 2010.

- MADHAVI, V. *et al.* Laccase: properties and applications. **BioResources**, v. 4, n. 4, p. 1694- 1717, 2009.
- MAHER, M. J. *et al.* Managing spent mushroom compost. In: VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. (Ed.). **Science and cultivation of edible fungi**. Rotterdam: Balkema, 2000.
- MARQUES, E. L. S. *et al.* Spent mushroom compost as a substrate for the production of lettuce seedlings. **Journal of agricultural science**, v. 6, n. 7, 2014.
- MAYOLO, K. *et al.* Recovery of laccase from the residual compost of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, n. 4, p. 435–439, 2009.
- MESSERSCHMIDT, A. *et al.* X-ray structures and mechanistic implications of three functional derivatives of ascorbate oxidase from Zucchini: Reduced, peroxide and azide forms. **J. Mol. Biol.**, v. 230, p. 997–1014, 1992.
- MOHD, F. H. *et al.* Environmentally sustainable applications of agro-based spent mushroom substrate (SMS): an overview. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 102, p. 253–263, 2018.
- MOREIRA, M.T. *et al.* 1998. Strategies for the continuous production of lignolytic enzymes in fixed and fluidized bed bioreactors. **Journal of Biotechnology**. v. 66, p.27-39, 1998.
- MURTHY, M. V. R. *et al.* Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 38, p. 99–147, 1993.
- NAZARENO, G. G. *et al.* Utilização de matéria orgânica para o controle de nematoides das galhas em alface sob cultivo protegido. **Bioscience Journal**, v.26, p.579-590, 2010.
- NILADEVI, K. N. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues**. [S.l.]: Springer, 2009.
- PAREDES, C. *et al.* Effects of spent mushroom substrates and inorganic fertilizer on the characteristics of a calcareous clayey-loam soil and lettuce production. **Soil Use and Management**, v. 32, n. 4, p. 487-494, 2010.
- PERMINOVA, Irina V. *et al.* (ed.). **Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice**. Netherlands: Springer, 2002.
- POINTING, S. B. *et al.* Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, v. 12, p. 134–144, 2000.
- RAJAGOPALU, D. *et al.* Recovery of laccase from processed *Herichium erinaceus* (Bull.: Fr) Pers. fruiting bodies in aqueous two-phase system. **Journal of bioscience and bioengineering**, p. 301–306, 2016.
- RATANAPONGLEKA, K. Partitioning behavior of laccase from *Lentinus polychrous* Lev in aqueous two phase systems. Songklanakarin **Journal of Science & Technology**, n. 1, 2012.
- RENGANATHAN, V. *et al.* Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry**, n. 7, p. 1626–1631, 1986.
- RIBAS, L. C. C. *et al.* Use of spent mushroom substrates from *Agaricus subrufescens* (syn. A. blazei, A. brasiliensis) and *Lentinula edodes* productions in the enrichment of a soil-based potting media for lettuce (*Lactuca sativa*) cultivation: Growth promotion and soil bioremediation. **Bioresource technology**, v. 100, n. 20, p. 4750–4757, 2009.

- RIBEIRO, L. G. **Introdução à tecnologia têxtil**. Rio de Janeiro: CETIQT/SENAI, 1984.
- ROYSE, D. J. *et al.* Current overview of mushroom production in the world. **Edible and medicinal mushrooms: technology and applications**. p. 5–13, 2017.
- SAITO, T. *et al.* Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. **Enzyme and microbial technology**, v. 33, n. 4, p. 520–526, 2003.
- SANCHEZ, J. E. *et al.* Edible mushroom production in the Americas. **In: 9th International conference on mushroom biology and mushroom products**. Shanghai, China. 2018. p. 2-11.
- SCHMIDT, B. *et al.* Lignin peroxidases are oligomannose type glycoproteins. **Journal of biotechnology**, v. 13, n. 2–3, p. 223–228, 1990.
- SHARMA, A. *et al.* Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents: a pilot scale study. **Bioresource technology**, v. 169, p. 96–102, 2014.
- SINGH, R. *et al.* Screening of mycelia and spent substrate of edible mushroom species for their dyes decolorization potential. **Mushroom Research**, v. 22, n. 2, p. 115–124, 2013.
- SOCOL, C. R. *et al.* Overview of solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 205-218, 2003.
- STURION, G. L. **Utilização da folha da bananeira como substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis (Pleurotus spp.)**. 1994. 147 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
- CHIU, S. W. *et al.* Spent oyster mushroom substrate performs better than many mushroom mycelia in removing the biocide pentachlorophenol. **Mycological Research**, v. 102, n. 12, p. 1553-1562, 1998.
- TAN, Y. *et al.* Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 613-617, 1997.7.
- VALASKOLÁ, V. *et al.* Estimulation of bound and free fractions of lignocellulose- degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 119-124, 2006.
- VALLI, K. *et al.* Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. **Biochemistry**, v. 29, n. 37, p. 8535–8539, 1990.
- VINIEGRA, G. *et al.* Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical engineering journal**, v. 13, n. 2–3, p. 157–167, 2003.
- VISWANATH, B. *et al.* Fungal laccases and their applications in bioremediation. **Enzyme research**, v. 2014, p. 163242, 2014.
- WANG, Y. *et al.* Application of water-miscible alcohol-based aqueous two-phase systems for extraction of dyes. **Separation science and technology**, v. 46, n. 8, p. 1283–1288, 2011.
- WARIISHI, H. *et al.* Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. **Biochemistry**, n. 14, p. 5365–5370, 1988.

WOLFENDEN, R. S. *et al.* Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one- electron transfer reactions: Pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulphonate). **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 02, p. 805–812, 1982.

WONG, D. W. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p. 174–209, 2009.

YADAV, M. *et al.* Applications of ligninolytic enzymes to pollutants, wastewater, dyes, soil, coal, paper and polymers. **Environmental chemistry letters**, v. 13, n. 3, p. 309–318, 2015.

YAROLOPOV, A. I. Laccase: Properties, Catalytic Mechanism, and Applicability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, p. 257–280, 1994.

YEHIA, R. S. Aflatoxin detoxification by manganese peroxidase purified from *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 1, p. 127–133, 2014.

ZHANG, R. *et al.* Use of spent mushroom substrate as growing media for tomato and cucumber seedlings. **Pedosphere**, v. 22, n. 3, p. 333- 342, 2012.

ZISOPOULOS, R. *et al.* Uma avaliação de eficiência de recursos da cadeia produtiva de cogumelos industriais: a influência da variabilidade dos dados. **J Clean Prod**, v. 126, p. 394–408, 2016.