



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Câmpus Apucarana e Londrina



SERGIO LUIS MENDEZ HOYOS

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
PRODUTORAS DE LACASE

LONDRINA

2019

SERGIO LUIS MENDEZ HOYOS

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
PRODUTORAS DE LACASE

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental, do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Luciana Furlaneto-Maia

Co-orientadora Prof^a. Dr^a. Juliana Feijó

LONDRINA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

H868i Hoyos, Sergio Luis Mendez
Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de lacase / Sergio Luis Mendez Hoyos. – Londrina: [s.n.], 2019.
31 p. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Luciana Furlaneto-Maia
Coorientador: Prof.^a Dr.^a Juliana Feijó
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2019.
Bibliografia: f. 27-31

1. Lacase. 2. Bactérias. 3. Térmitas. I. Furlaneto-Maia, Luciana, orient.
II. Feijó, Juliana, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
IV. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. V. Título.

CDD: 628



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Câmpus Apucarana e Londrina



TERMO DE APROVAÇÃO
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
LACASE

por

SERGIO LUIS MENDEZ HOYOS

Dissertação de Mestrado apresentada no dia 30 de Maio de 2019, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Câmpus Apucarana e Londrina, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A mestranda foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após avaliação da Dissertação, a Banca Examinadora considerou a Dissertação aprovada. O presente termo assinado ficará depositado na Coordenação do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental – PPGEA.

Prof^ª. Dr^ª. Luciana Furlaneto-Maia – Orientadora
(UTFPR – Câmpus Londrina)

Prof^ª. Dr^ª. Maria Ines Rezende – Membro titular
(Universidade Estadual de Londrina)

Prof^ª. Dr^ª. Ana Cláudia Ueda – Membro titular
(UTFPR – Câmpus Apucarana)

Prof. Dr. Alesandro Bail

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

"A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso". Portaria nº 0345, de 15 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os professores do curso de mestrado em Engenharia Ambiental, em particular à profa Dra Luciana Furlaneto Maia pela orientação.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR Câmpus Apucarana/Londrina pela oportunidade de estar concluindo o processo para obtenção do título de mestre em Engenharia Ambiental.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro.

MENDEZ HOYOS, Sergio Luis. **Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de lacase**. 2019. 40 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná. 2018.

RESUMO

Lacases são enzimas que desempenham papel fundamental em diversos processos de oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos. Diversos trabalhos relatam que plantas, fungos e procariontes são produtores de lacases. Contudo, lacases produzidas por procariontes tem se destacado pela utilização industrial. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias produtoras de lacases. Foram isoladas bactérias de cupins, presentes em madeira em decomposição, em meio de cultura ágar nutriente contendo lignina kraft. Foram selecionadas 6 isolados CA, A3, A5, A6, A7 e A8, que foram cultivados em caldo nutriente acrescido guaiacol. A atividade de lacase foi observada no sobrenadante do cultivo, utilizando ABTS e guaiacol nos pH 5, 6.2 e 7. Os valores enzimáticos obtidos foram mínimo de 123 e máximo de 168 U.mL⁻¹. Os isolados foram genotipicamente identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. O substrato guaiacol apresentou melhores resultados em todos os pH testados. Os resultados preliminares indicaram que os isolados testados são promissores para a produção de lacases e em ação em diferentes pHs de atividade.

Palavras-chave: guaiacol, lignina peroxidase, cupim.

MENDEZ HOYOS, Sergio Luis. **Isolation and characterization of bacteria producing laccase**. 2019. 40. Dissertation (Masters Degree in Environmental Engineering) - Federal Technological University of Paraná, Londrina, Paraná. 2018.

ABSTRACT

Laccases are enzymes that play a fundamental role in several oxidation processes of phenolic and non-phenolic compounds. Several works report that plants, fungi and prokaryotes are producers of laccases. However, laccases produced by prokaryotes have been noted for industrial use. The objective of this work was to isolate and characterize bacteria producing laccases. Termite bacteria, present in decomposing wood, were isolated from nutrient agar culture medium containing kraft lignin. Six CA, A3, A5, A6, A7 and A8 isolates were selected and cultured in nutrient broth plus guaiacol. Laccase activity was observed in the culture supernatant using ABTS and guaiacol at pH 5, 6.2 and 7. The enzymatic values obtained were minimum of 123 and maximum of 168 U.mL⁻¹. The isolates were genotypically identified as belonging to the genera *Bacillus* and *Pseudomonas*. The guaiacol substrate showed better results in all pH tested. Preliminary results indicated that the isolates tested are promising for the production of laccases and in action at different pHs of activity.

Key words: guaiacol, lignin peroxidase, termite

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVO	
2.1 OBJETIVO GERAL.....	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
3 REFERENCIAL TEÓRICO	8
3.1 LACASES.....	8
3.2 APLICAÇÕES DE LACASE.....	9
3.3 PRODUÇÃO E MODO DE AÇÃO DA LACASE.....	11
3.4 LACASE BACTERIANA.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
6 REFERENCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

As lacases (benzenodiol: oxigênio oxidoredutases, CE 1.10.3.2) são enzimas fenoloxidase contendo cobre que usam o O₂ comoceptor de elétrons e tem ganhado notoriedade devido ao seu baixo custo introduzindo O₂ como oxidante primário e a possibilidade de controle da reatividade pelo aumento ou extinção da pressão parcial do O₂ em condições de processo (HILDÉN et al., 2009) apresentando uso potencial em uma ampla variedade de áreas da indústria, tais como, indústrias alimentícias, papel e celulose e têxteis, pois estão envolvidas na degradação de lignina (COUTO; HERRERA, 2006).

Inicialmente caracterizada em uma planta pertencente à família *Anacardiaceae* denominada *Rhus vernicifera* (laca-do-Japão) (HÜTTERMANN et al., 2001) comumente empregada na síntese de verniz.

Estas enzimas são comuns entre plantas, fungos e bactérias, e têm várias funções biológicas, tais como degradação de polímeros complexos (lignina, ácido húmico), lignificação, desintoxicação, patogenicidade, morfogênese, esporulação, polimerização de melanina e esporos de resistência (STRONG; CLAUS, 2011) e tem sido extensivamente explorados para a aplicação em processos industriais devido a seu alto potencial redox (DU et al. 2015; WANG; ZHAO, 2016).

As lacases de fungos são as mais extensamente estudadas. No entanto, a baixa produção de lacase e também a sua aplicabilidade somente sob condição de reação mesofílica e ácida são obstáculos para a aplicação industrial das lacases haja visto que a maioria das operações industriais realizadas ocorrem em temperatura e pH mais alto, e a lacase fúngica geralmente não apresenta ação nessas condições (DU et al. 2015; WANG; ZHAO, 2016).

A fim de mitigar estas dificuldades tem se buscado lacases com potencial aplicação em processos industriais e no ano de 1993 foi isolada a primeira lacase bacteriana, conhecida como *Azospirillum lipoferum* obtida da rizosfera de arroz (GIVAUDAN et al., 1993).

Quando comparadas com a lacase fúngica as lacases bacterianas apresentam características vantajosas do ponto de vista industrial e de custo-benefício, haja visto que a lacase bacteriana apresenta atividade em uma ampla especificidade de substrato, ampla gama de temperatura, pH, estabilidade contra vários agentes inibidores (GUAN et al. 2015), e produção de enzimas em um curto

período (PRINS et al.,2015). A lacase bacteriana também é útil em aplicações como bio-branqueamento, descoloração e degradação de papel e celulose de corantes têxteis / desenvolvimento de efluentes e biossensores (MATHEWS et al. 2016).

A produção de lacase já foi relatada em bactérias que pertencem a diferentes gêneros, tais como as classificadas como bactérias Gram-negativas, por exemplo, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Delfia*, *Proteobacterium* e *Alteromonas* (NEIFAR et al. 2016; DEVASIA; NAIR, 2016; DHIMAN; SHIRKOT, 2015; MONGKOLTHANARUK et al. 2012; SINGH et al. 2010; SOLANO et al. 1997) e principalmente em Gram-positivas como, por exemplo, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Azospirillum*, *Lisinibacillus* e *Aquisalibacillus* (MUTHUKUMARASAMY et al. 2015; NARAYANAN et al. 2015; DHIMAN; SHIRKOT 2015; SONDHI et al. 2014; VERMA; SHIRKOT 2014; DEMISSIE; KUMAR, 2014; MARGOT et al. 2013; LU et al. 2012; WANG et al. 2011; DIAMANTIDIS et al. 2000; REZAEI et al. 2017).

Os estudos supracitados demonstram que as lacases bacterianas são promissoras ferramentas biológicas com grande variabilidade de aplicações baseadas em química verde, como no tratamento de efluentes e bio-remediação. Assim, as lacases bacterianas ganharam ao longo das ultimas décadas maior relevância devidos as suas características e amplas áreas de aplicação. Neste contexto, se faz necessário o desenvolvimento de estudos que se dediquem a isolar bactérias e avaliar o potencial de produção de lacase por bactérias lacases.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de produção de lacase por bactérias isolados de cupim.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar bactérias com potencial de produção de lacase;
- Identificar genotipicamente os isolados produtores de lacase;
- Quantificar a atividade enzimática dos isolados bacterianos;
- Avaliar a ação da lacase sobre diversos pH de reação; e

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 LACASES

As lacases (benzenodiol: oxigênio oxidoreduases; CE 1.10.3.2) pertencem a uma superfamília diversificada de multi cobre oxidases (MCOs) (HOEGGER et al. 2005) compreendem um grupo de enzimas oxidoreduase que apresentam a habilidade de oxidar a uma ampla gama de compostos fenólicos e não-fenólicos convertendo a molécula de oxigênio em água na redução concomitante de quatro elétrons (HAKULINEN; ROUVINEN, 2015). Estes elétrons livres catalisam a oxidação de diferentes compostos aromáticos e não aromáticos bem como aminas contendo anel fenólico com vários grupos funcionais, como metoxi, amino, diamino e hidroxindóis e alguns outros compostos metálicos $[\text{Mo}(\text{CN})_8]^{4-}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ e $[\text{Os}(\text{CN})_6]^{4-}$ (THURSTON, 1994; CHANDRA; CHOWDHARY, 2015; REZAEI et al., 2017).

Com massa molar aproximada de 50 a 130 kDa estas enzimas são glicoproteínas que apresentam em sua composição 10 a 30% de carboidratos (glicose, manose, galactose e arabinose) (YAROLOV et al., 1994) que são fundamentais para a estabilidade conformacional da estrutura globular (BALDRIAN, 2006), e conferem termoestabilidade a enzima que é um dos pré-requisitos gerais para ela possa ser aplicada em processos industriais (HILDÉN et al., 2009).

Geralmente, o sítio ativo das lacases possui quatro íons cobre, determinantes na atividade catalítica da enzima, sendo classificados como: tipo 1 cobre (T1Cu), tipo 2 cobre (T2Cu) e tipo 3 cobre (T3Cu) (Figura 1). O tipo 1 cobre é o aceptor primário dos elétrons durante a catálise, possuindo uma coordenação trigonal com duas histidinas e 1 cisteína. Este cobre confere a coloração azulada, típica de proteínas multi cobre (BALDRIAN, 2006).

Considerada uma enzima ubíqua estudos já identificaram essa enzima sendo produzida por diversos organismos como insetos, plantas e inclusive por microrganismos procariotos (bactérias) e eucariotos (fungos) (COUTO et al., 2006; WANG; ZHAO, 2016).

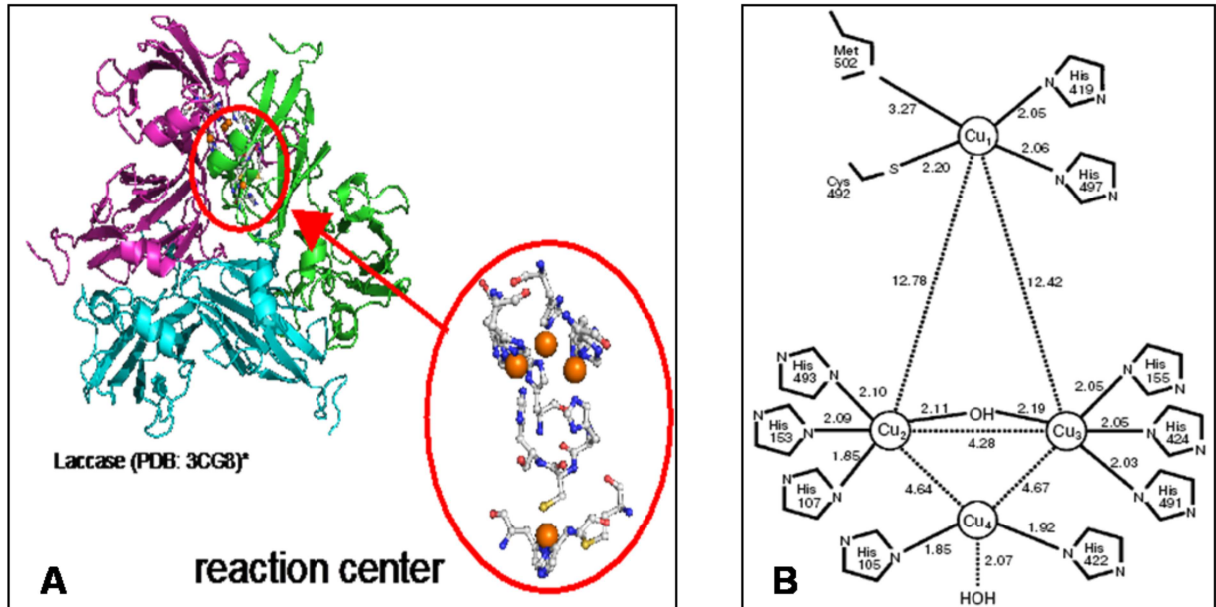


Figura 1 – (A) Representação esquemática do centro ativo da lacase, com identificação dos quatro átomos de cobre (Cu1, Cu2, Cu3 e Cu4) (círculos laranja); (B) distribuição dos íons cobre na molécula e ligação aos aminoácidos.

Fonte: Kunamneni et al., 2008.

3.2 APLICAÇÕES DE LACASE

A lacase é uma enzima amplamente estudada nas últimas décadas no que diz respeito à sua potencial aplicação na indústria e biotecnologia (ARORA; SHARMA, 2010). Algumas dessas aplicações estão sumarizadas na Figura 2.

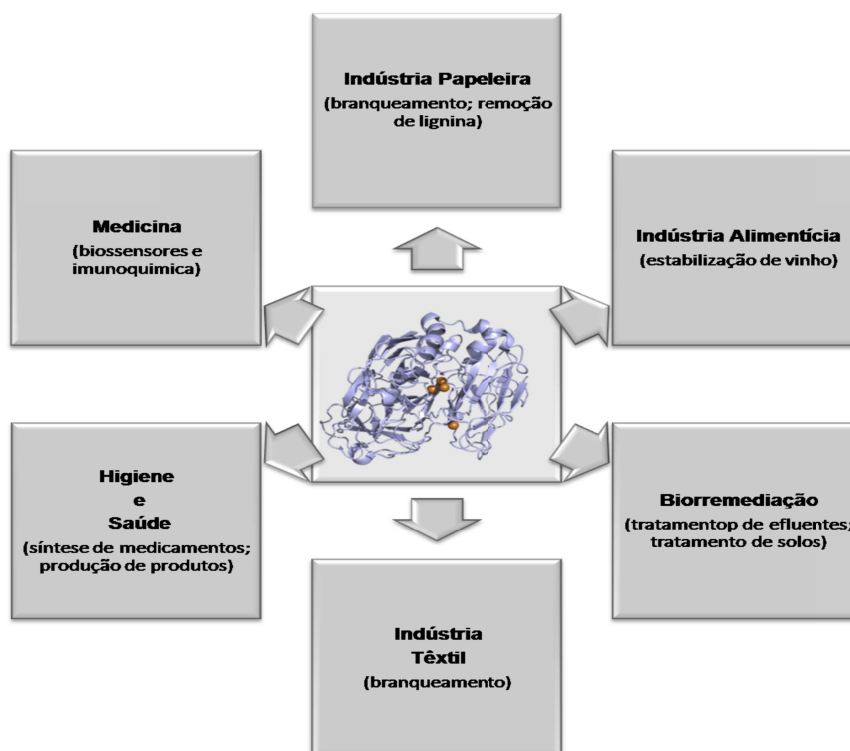


Figura 2 – Áreas de aplicação da enzima lacase.

Fonte: o próprio autor.

Uma das áreas onde a lacase é amplamente utilizada é a indústria têxtil ainda (ARORA; SHARMA, 2010) e isto se deve ao seu potencial de oxidação, sendo aplicada no melhoramento do branqueamento do algodão e também na conversão de alguns precursores de corantes, de forma a promover um tingimento mais eficaz (RODRÍGUEZ et al., 1999; GONÇALVES et al., 2014), e em detergentes para a lavagem da roupa (MARYAN et al., 2013). A escolha do método biológico em detrimento de processos químicos e/ou físicos promove uma redução no tempo, na energia e na quantidade de água necessários para o processo, tornando-se assim uma melhor alternativa em termos ambientais (ARORA; SHARMA, 2010).

Dado o seu caráter lignolítico, a lacase é utilizada no processo de fabricação de papel, pois para que a celulose existente na madeira seja processada, há necessidade da remoção de lignina residual e de alguns compostos fenólicos, promovendo a obtenção de uma pasta mais branca e com melhores propriedades mecânicas (VALLS et al., 2009).

Na indústria alimentícia, a lacase melhora as propriedades organolépticas de alguns alimentos como suco de frutas, cerveja e vinho promovendo a oxidação de

compostos fenólicos indesejáveis, responsáveis pelo escurecimento e pela turbidez (MINUSSI et al., 2007).

Na área de engenharia ambiental, a lacase tem sido estudada e aplicada em processos de biorremediação do solo contaminado com Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs), bem como no tratamento de efluentes onde estão presentes diversas substâncias tóxicas, por exemplo, clorofenóis, dimetoxifenóis e nitrofenóis. As propriedades catalíticas da lacase degradam estes compostos que são uma importante fonte de contaminação no solo e efluentes e sua degradação é de grande importância para o meio ambiente (DURÁN; ESPOSITO, 2000; MAYER et al., 2002).

Na indústria farmacêutica a lacase é utilizada na síntese de fármacos, como anestésicos, anti-inflamatórios, antibióticos e sedativos, entre outros (ARORA; SHARMA, 2010). Na cosmetologia tem sido empregado em preparações cosméticas e dermatológicas contendo proteínas e na produção de tintas para cabelo (GOLZ-BERNER et al., 2004).

3.3 PRODUÇÃO E MODO DE AÇÃO DA LACASE

A produção de lacase é influenciada por diversos fatores ou a combinação destes, dentre eles podemos citar aeração; agitação ou não durante a produção da enzima que pode induzir ou reprimir a produção de lacase, composição do meio de crescimento, pH, razão carbono/nitrogênio, temperatura e tempo de cultivo (POINTING et al., 2000; IKEHATA et al., 2004).

Como as aplicações biotecnológicas requerem grande quantidade de enzima, para melhorar a produção de lacase, diversos indutores podem ser utilizados. Contudo, não há um único indutor para todos os tipos de microrganismos. A utilização de cobre como indutor tem sido explorada, apresentando resultados satisfatórios (IYER; CHATTOO, 2003).

Do ponto de vista fisiológico, as lacases fúngicas estão envolvidas em processos de morfogênese, degradação de lignina, patogênese, destoxificação e formação de pigmentos (MOROZOVA et al., 2007). Na degradação de lignina, as lacases atuam em sinergia com outras enzimas, ou na remoção de compostos tóxicos formados durante o processo de degradação mediado por outras enzimas (BALDRIAN, 2006).

Várias bactérias são conhecidas por produzir lacase extracelularmente, no entanto, algumas bactérias são incapazes de exteriorizar lacase (CHAUHAN et al., 2012). Diversos resíduos agrícolas como pó de serra, casca de banana e farelo de arroz foi utilizado como um substrato para produção de lacase, devido ao seu baixo custo e acessibilidade. Diferentes açúcares monoméricos constitutivamente produzem lacase, mas quando os níveis dessas fontes de carbono diminuem, a síntese de lacase pode ser reforçada por lignina e compostos fenólicos presentes em resíduos agrícolas (MUTHUKUMARASAMY et al., 2015).

As lacases atuam na oxidação dos compostos contendo o anel de benzeno, em que o oxigênio é o último receptor de elétrons. Os polifenóis são oxidado por um grupo de enzimas com atividades de oxidase, incluindo: catecol oxidase (EC 1.10.3.1); lacases (EC 1.10.3.2); e cresolase (EC 1.18.14.1) (MATHEWS et al., 2016). Entretanto, essas enzimas também podem degradar estruturas aromáticas não fenólicas por meio da oxidação de alguns mediadores sintéticos como o hidroxibenzotriazol (HBT) (GONÇALVES, 2010; SHEIKHI et al., 2012) ou mesmo naturais como derivados do ácido benzoico e íons Mn^{2+} (CHANDRA; CHOWDHARY, 2015).

O efeito catalítico da lacase é insuficiente para atuar em muitos substratos. Quando mediadores são acoplados às reações com lacase a capacidade oxidativa aumenta. Portanto, o uso de mediadores torna possível a oxidação de diversos materiais, atuando em locais onde a enzima não atuaria devido ao seu tamanho. Assim devido a inespecificidade por substratos, o sistema lacase-mediador pode oxidar um maior leque de estruturas aromáticas (KUNAMNENI et al., 2008).

O sistema baseia-se, numa primeira fase, na oxidação do mediador pela lacase, envolvendo a perda de um único elétron. Consequentemente verifica-se a formação de um radical livre instável que vai promover a transferência de elétrons para um substrato que, neste caso, pode ser não fenólico. Desta forma, ocorre uma oxidação indireta do composto pela lacase (KUNAMNENI et al., 2008).

Dentre os mediadores incluem substratos artificiais como ABTS (2,2-azino-di-[3-etilbenzo-tiazolina- sulfonato]) e HBT (hidroxibenzotriazol), metabolitos fúngicos e compostos derivados da lignina (CALL et al., 1997. A oxidação de compostos orgânicos pelo sistema lacase/mediador depende de diversos fatores como: tipo de mediador, substrato alvo, tipo de sistema tampão e pH da reação (BOURBONNAIS et al., 1997).

Os experimentos precursores foram realizados com o tratamento de uma suspensão de lignina com lacases na presença do ABTS. Nessas condições, foi demonstrado que a lignina sofria despolimerização significativa, enquanto que na ausência do mediador ela repolimerizava. Esse mediador inicialmente utilizado é um composto nitrogenado frequentemente usado em ensaios de determinação da atividade de lacase *in vitro*. No entanto, trata-se de um composto tóxico e de custo incompatível com os processos tecnológicos de branqueamento de celulose (CALL et al., 1997; ROCHEFORT; BOURBONNAIS, 2004).

Embora existam diversas aplicações para a lacase, a sua utilização industrial tem vindo a ser condicionada pela fraca estabilidade que esta apresenta comparativamente aos catalisadores químicos, bem como pela dificuldade na sua recuperação dos meios reacionais com posterior reutilização ou utilização em reatores contínuos (ARORA; SHARMA, 2010).

Há uma busca intensa por mediadores alternativos, que aliem eficiência na degradação e baixo custo, além de nível mínimo de toxicidade. Na busca desses mediadores surgiu o HBT, que se mostrou bastante eficiente para os processos de deslignificação, embora ainda apresentasse custo elevado (BOURBONNAIS et al., 1997).

Além disso, nas últimas décadas tem-se buscado alternativas para a produção de lacases, haja visto que o tipo de produção mais estudada e empregada são as lacases produzidas por fungos são laboriosas, insuficientes para suprir a demanda e atuam em condições inapropriadas para a aplicação em processos industriais (WANG; ZHAO, 2016). Em contrapartida, estudos demonstram que as lacases produzidas por bactérias atendem as necessidades da indústria sendo uma opção mais vantajosa (GUAN et al., 2015. PRINS et al., 2015).

3.4 LACASE BACTERIANA

As lacases podem ser produzidas por diferentes gêneros bacterianos, a exemplo dos descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Exemplos de bactérias produtoras de lacase.

	Gênero bacteriano	Referência
Gram-positiva	<i>Bacillus, Geobacillus, Streptomyces, Rhodococcus, Staphylococcus, Azospirillum, Lisinibacillus e Aquisalibacillus</i>	Muthukumarasamy et al., 2015; Sondhi et al., 2014; Verma; Shirkot 2014; Demissie; Kumar 2014; Margot et al., 2013; Lu et al., 2012; Diamantidis et al., 2000; Rezaei et al., 2017
Gram-negativa	<i>Pseudomonas, Enterobacter, Delfia, Proteobacterium e Alteromonas</i>	Neifar et al., 2016; Devasia; Nair 2016; Dhiman; Shirkot 2015; Mongkolthananaruk et al., 2012; Singh et al., 2010

Fonte: o próprio autor.

A literatura mostra que a lacase de origem bacteriana atuam em ampla faixa de temperatura (30-85° C), pH (3,0-9,0) e elevada tolerância a altas concentrações de NaCl (> 1M), o que a torna vantajosa em comparação à ação de lacases fúngicas (SONDHI et al., 2014; MONGKOLTHANARUK et al., 2012; DEVASIA; NAIR 2016, MUTHUKUMARASAMY et al., 2015).

Estudos demonstram que as lacases bacterianas podem ser intracelulares e extracelulares, sendo que na maioria das bactérias estudadas a lacase é intracelulares, o que torna sua obtenção uma vez que haverá a necessidade de ruptura da célula para a exteriorização da enzima, aumentando os custos de produção (SHARMA et al., 2007). No entanto, estudos empregando isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces*, tais como *S. psammoticus* MTCC 7334 (NILADEVI et al., 2008), *S. cyaneus* CECT 3335 (ARIAS et al., 2003), *S. ipomoea* CECT 3341 (MOLINA-GUIJARRO et al., 2009) e *S. griseus* NBRC 13350 (ENDO et al., 2002) produzem lacases extracelulares.

As informações a respeito do efeito de diferentes solventes orgânicos na atividade de lacase ainda são limitadas. Lu et al. (2012) mostrou que metanol, etanol, acetona, acetonitrila e DMSO podem promover a atividade da lacase em *Bacillus licheniformis*. Da mesma forma, a presença de solventes orgânicos, éter de petróleo, xileno, éter, acetona, clorofórmio e acetato de etilo, afetam negativamente a atividade de lacase de *Bacillus subtilis* (LU et al., 2012).

Ainda, alguns metais e detergentes afetam rendimento distintamente a lacase em várias bactérias. Na maior parte dos casos, metais inorgânicos, como Mg², Hg² e

Zn² alterando a conformação da proteína, inibindo a atividade a um nível muito alto (MUTHUKUMARASAMY et al. 2015; SONDHY et al. 2014). Contrário a isso, minerais inorgânicos em grandes quantidades (5 mM), tais como Ca², Cu², Ni², Co² e Mn² são geralmente conhecidos por acelerar a atividade de lacase em um nível notável, modificando o estado físico do substrato que diretamente aumenta a taxa de reação (MUTHUKUMARASAMY et al., 2015; SONDHY et al., 2014; MONGKOLTHANARUK et al., 2012).

Detergentes aniônicos e catiônicos, como SDS e CTAB também afetam positivamente a atividade enzimática, enquanto os detergentes sem carga, como Tween-80 e Tween-20, não altera a atividade (DALFARD et al., 2006; SONDHY et al., 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e metodologias utilizados nessa dissertação estão descritos na sessão Resultado e Discussão que contempla o artigo científico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho estão apresentados em língua inglesa e na forma de artigo científico.

SCREENING OF POTENT EXTRACELLULAR LACCASE PRODUCING BACTERIA ISOLATED FROM ADULT TERMITE

Abstract

Laccase is one of the important enzymes in terms of applicability and versatility in industries, and your use at commercial scale is hindered by factors like high enzyme cost, low activity and/or stability under given conditions. This study was carried out with aim of screening for extracellular laccase producing bacteria. Six (6) laccase positive strains were isolated from termite and namely CA, A3, A5, A6, A7 and A8. The strains *Bacillus* A7, A8 and CA was identified and designated as *Bacillus* sp, and A3, A5 and A6 as *Pseudomonas* sp, by analysis of 16S rRNA sequences. The laccase production was optimized at 37°C, pH 6, and 0.5 mM guaiacol, at an agitation rate of 180 rpm. Laccase activity was determined by measuring the oxidation of guaiacol and ABTS. Guaiacol was the better substrate for quantification of laccase, at pH 5 and 6.2. The strain A5 showed values ranging of minimum 123 and maximum 168 U.mL⁻¹ of extracellular laccase. Bacteria from termite can produce extracelular laccase with ativity at differents pH.

Keywords: Guaiacol, kraft lignin, extracelular laccase

Introduction

Laccases are enzymes common among plants, fungi and bacteria, and have several biological functions, such as degradation of complex polymers (lignin, humic acid), lignification, detoxification (MOROZOVA et al., 2007; STRONG; CLAUS, 2011), and has been extensively exploited for biotechnological applications such as biobleaching, xenobiotics bioremediation, decolorization of textile dyes, biosensors, food industry, and plastic degradation (DU et al., 2015; WANG; ZHAO, 2016; Shraddha et al. 2011).

The production of laccase by bacteria has been reported in several genera, being Gram-negative *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Delfia*, *Proteobacterium* and *Alteromonas* (NEIFAR et al., 2016; DEVASIA; NAIR, 2016; DHIMAN; SHIRKOT, 2015; MONGKOLTHANARUK et al. 2012; SINGH et al. 2010), and mainly in Gram-positive, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Azospirillum*, *Lysinibacillus* and *Aquisalibacillus* (MUTHUKUMARASAMY et al. 2015; NARAYANAN et al. 2015; DHIMAN; SHIRKOT 2015; SONDHI et al. 2014; VERMA; SHIRKOT 2014; DEMISSIE; KUMAR, 2014; MARGOT et al. 2013; LU et al. 2012; WANG et al. 2011; DIAMANTIDIS et al. 2000; REZAEI et al. 2017).

Still, the use of bacterial laccases could not be exploited on industrial scale as most of the reported laccases in bacteria are intracellular or spore bound, which makes their production and purification in large quantity extremely difficult. However, analysis of several bacterial genomes showed that there are 76 % of putative laccase genes that carry the signal sequences, which could enable them to be secreted outside the cell (Ausec et al. 2011).

The majority of industrial operations have been carried out in extreme conditions, i.e. high temperature and pH and high salt concentration. So, bacterial laccases have several properties that are not characteristics of fungal laccases such as stability at high temperature (30-85°C), high pH (3.0-9.0) and tolerance to high concentrations of NaCl (> 1M) (Singh et al. 2007, Martins et al. 2002; Miyazaki 2005; Ruijssenaars and Hartmans 2004; SONDHI et al., 2014, MONGKOLTHANARUK et al., 2012; DEVASIA, NAIR 2016, MUTHUKUMARASAMY et al., 2015).

In the last decade, bacterial laccases have gained higher concentration for their potential in biodegrading environmentally significant phenolic pollutants (Held, 2005; Hilden, 2009). However, till now only a few bacterial acid stable laccase have been isolated and characterized.

The goal of this research was to isolate novel lignin-degrading bacteria present in wood-eating insects, and screened based on their ABTS and guaiacol oxidizing activity.

Material and Methods

Termite collection

Adult termite insects (Termitidae Family) were collected from decaying wood in the north region of Paraná State. Ten adults termites were surface sterilized in 70% ethanol and then washed in sterile distilled water. The insects were aseptically massed in 10mM phosphate buffer with the help of sterile micro pestle (Vasanthakumar et al., 2006).

Isolation and identification of bacterial isolates

The disrupted insect debris (extract) obtained was serially diluted and spread plated on Nutrient Agar (NA) medium (Himedia) containing CuSO_4 (0,2mM), 1% de tween 20 and 1% lignin kraft. Plates were incubated at 37°C for 48hrs. The bacterial isolates were identified using morphological and through 16S rDNA technique. The individual colonies were assessed in terms of nature, shape, pigmentation, and gram reaction.

Plate assay screening of laccase producing bacteria

Laccase-production ability of the termite bacteria was tested. The test was conducted on NA agar containing CuSO_4 (0,2mM), 1% de tween 20 and 2 mM of Guaiacol, at pH 6. Plates were incubated at 37°C for 24 hours. Laccase-producing isolates were examined for colony color change (SHEIKHI et al., 2012).

Total DNA extraction

The bacterial DNA was extracted using the boiling technique (YOST; NATTRESS, 2000). Bacteria exhibiting color change in plate assay screening (both pH) were inoculated into 3mL of BHI and incubated at 37°C for 18 hours under stirring. After growth, the samples were centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes, and the medium discarded. To the cell pellet was added 100 μL sterile deionized water and the samples were kept at 100 ° C for 30 minutes, followed by ice bath for 3 minutes. The

samples were again centrifuged at 12,000 rpm for 20 minutes, and 50 µl of the supernatant containing the DNA was collected.

16S rDNA analysis

Universal primer F27 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') and R1492 (5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3') was used for 16S rDNA PCR. The PCR reaction conditions consisted of an initial denaturation step at 94°C for 10 min, and 30 cycles of denaturation at 94°C for 1min, annealing at 45°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min, and a final extension cycle at 72°C for 10 min. The amplified fragment (was analysed by direct sequencing of the PCR products.

The generated sequences were compared with sequences available in GenBank by using the BLASTn program (Basic Local Alignment Search Tools) (<http://www.ncbi.nih.gov>).

Enzymatic Assay

The selected colonies were previously cultured in NA broth containing 2 mM of guaiacol, and the pH was adjusted to 6. The cultures were incubated at 37°C on a rotary shaker at 180 rpm. Then, the bacterial cultures were centrifuged (9,000 rpm) for 20 min at 4°C, and the supernatant was collected and sterilized on cellulose ester membrane of 0.22 µm (millipore), and was used as a "crude extracellular enzyme" (CEE) (SHEIKHI et al., 2012). Catalase 1000 U.mL⁻¹ (Sigma-Aldrich) was added to the assay solution and incubated for 1 h at 37°C to remove the possible effect of H₂O₂ produced by bacteria (MACHADO et al., 2006).

Laccase Activity Assay and Effect of pH

Laccase activity assay was performed by monitoring the oxidation of guaiacol and 2, 29-azino bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate] (ABTS). Two hundred microliters of CEE was taken and mixed with 800 µl of 1% guaiacol or ABTS in 0.1 M sodium acetate buffer or sodium citrate buffer at pH 5, 6.2 and 7 (Xiao et al., 2004). The oxidation of guaiacol and ABTS were determined by monitoring the increase in absorbance at 520 and 420 nm, respectively. One unit of a laccase activity was described as the required amount of enzyme to oxidize 1 µmol of guaiacol (ε:48,000

M⁻¹cm⁻¹) or ABTS (ϵ :36,000 M⁻¹cm⁻¹)/min absorbance using spectrophotometer (LEONOWICZ e GRZYWNOWICZ, 1981; NADAROGLU, E. TASGIN 2013).

Results

A total of 15 different colonies were isolated in a first step from termite. Then, the isolate namely CA, A3, A5, A6, A7 and A8 were screened on nutrient agar medium containing 0.5 mM guaiacol, developing brown colour colonies (Figure 1) indicating potential production of laccase. Others characteristics were colonial morphology, borders and texture. When submitted to Gram staining, 11 isolates were bacilli and 4 cocci-shaped form, which were predominantly classified as Gram positive (table 1). These were selected for further evaluations of laccase production in liquid medium.

The morphological characteristics of this strain according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology and the comparative analysis of 16S rDNA sequence showed that the isolates were close to the members of *Bacillus* (A7, A8 and CA), *Pseudomonas* (A3, A5 and A6) genus, at 48% and 60% identity, respectively. However, the genotypic analysis was not enough for identify at the species level.



Figure 1 Screening of isolated strains on nutrient agar medium containing 2 mM of guaiacol. Highlight the coloration of the bacterial colony (whitish to brownish).

Table 1 – Characteristics, Gram staining and growth pH of bacterial isolate from adult termite.

Code strain	Gram staining	colony color	Growth pH	
			5.5	7.0
A1	Cocci Gram negative	white		
A2		white		
C1	Cocci Gram positive	white		
C2		white		
A4	Bacilli Gram negative	white		
A5		whitish	+	+
A3		brownnish	-	+
A6		brownnish	+	+
A7	Bacilli Gram positive	yellowish	+	+
A8		brownnish	-	+
A9		white		
C3		white		
CA		yellowish	+	+
CB		white		
CC		white		

In order to find the optimum pH of the laccase, the activity was measured for each substrate in the pHs range of 5, 6.2 and 7.

The enzyme measurement was performed on CEE and was expressed in U.mL⁻¹ (Figure 2). We observed that the best substrate for quantification of laccase was guaiacol, for all the isolates and pH tested. With ABTS, the best results were obtained at pH 5 and 6.2. The production of laccase was isolated-pH-dependent, that is, no isolate tested showed production prominence. However, the results are quite promising, with values ranging of minimum 123 and maximum 168 U.mL⁻¹ (A5 isolate at pH 6.2) when using guaiacol substrate.

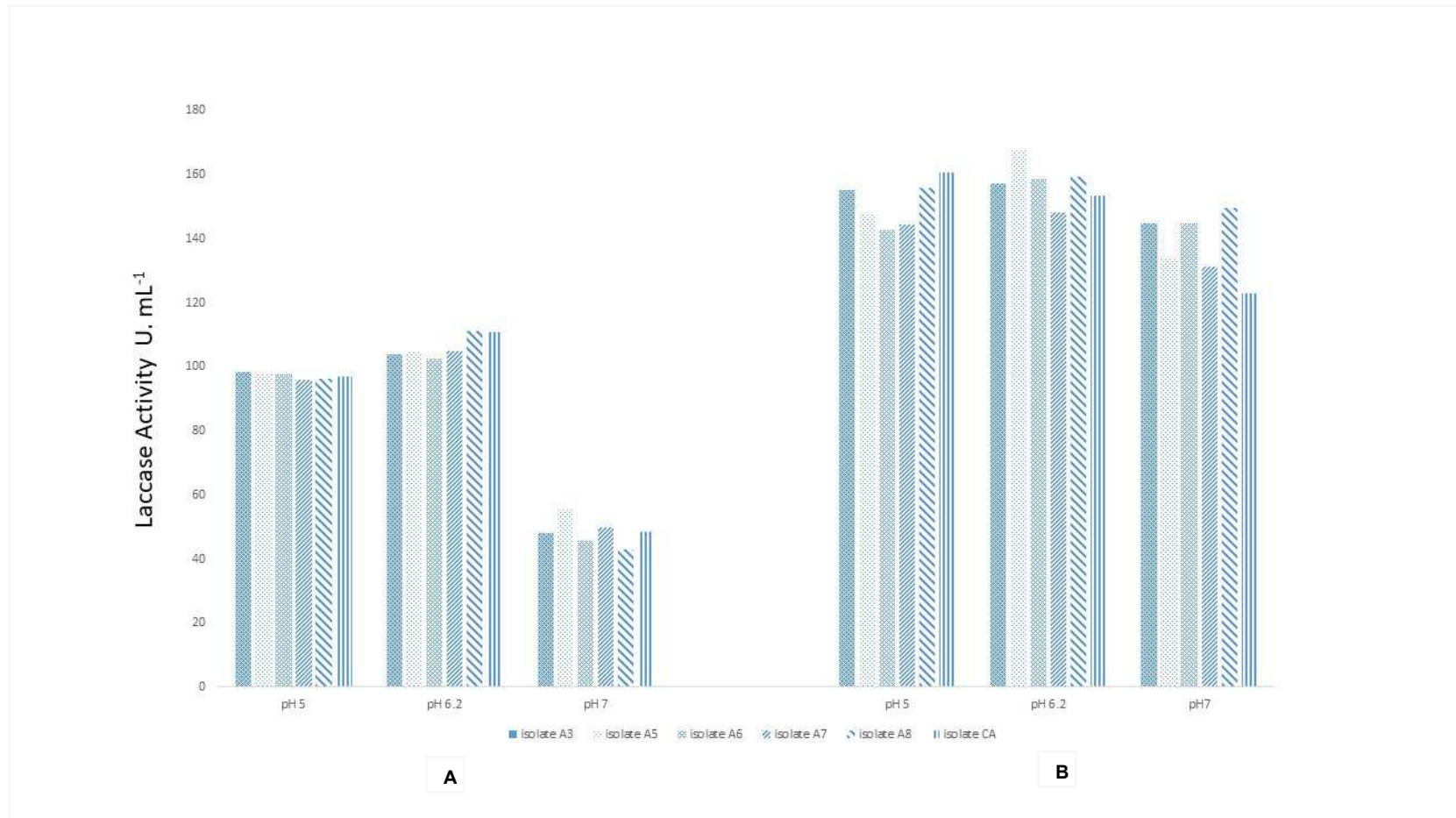


Figure 2 – Effect of pH on the laccase activity of isolated bacterial from termite. Laccase activity was measured in U.mL⁻¹, using ABTS substrate (A) and guaiacol (B) at pH 5.0, 6.2 and 7.

Discussion

In this study we isolated *Bacillus* and *Pseudomonas* from termite, and that presented potential production of laccase. Although the % similarity of the comparative analysis of sequences deposited in the genbank has been low, these genera are well described as laccase producers. Several authors demonstrated the genera *Bacillus* (Elisangela et al 2009; Lončar et al 2014; Jia et al., 2014; Mishra and Srivastava, 2016; Narayanan and Murugan, 2014) and *Pseudomonas* (Peter and Vandana, 2014; McMahon et al. 2006; Chauhan and Jha, 2018) as ligninolytic enzymes producer.

It was used the NA medium culture supplemented with CuSO_4 (0.2mM) and 1% tween 20 and guaiacol, that was more appropriate for screening and assaying laccase activity by bacteria analysed in this study. Gene expression of laccase has been reported to be regulated mainly by Cu^2 , but other metal ions such as Mn^2 and Fe^2 have also been recognized as potent inducers of laccase (Gonzalez et al. 2013).

Some authors reported that bacterial laccases so far are either intracellular or a component of bacterial spore coat protein (Sharma et al. 2007; Ausec et al. 2011). However, in the present study, all isolates analysed were found to produce an extracellular laccase, since we used CEE in the experiments, as reported by Singh et al. (2007).

Although the ABTS method is more sensitive than, these results were in accord with some literatures (Robles et al., 2000), our results clearly showed that the laccase activity assayed by the guaiacol substrate was higher than the ABTS. This is in disagreement with the results reported by Liers et al. (2007) for a purified laccase from the Ascomycete and Li et al. (2008) for laccase from the Basidiomycete, but agreement with Sheikhi et al (2012) with *B. subtilis* laccase. Probably because the first authors related fungal laccase.

The isolates of *Bacillus* sp and *Pseudomonas* sp from termite showed high laccase activity in both substrates analyzed; however, we find difficulties in comparing these data with the literature, since many studies use several units of measurement for laccase activity. It is worth mentioning that production and activity of laccases is affected by many factors such as medium pH, composition, time, temperature, and carbon and nitrogen ratio (Lorenzo et al., 2002).

In our study, we analyzed laccase activity in U.mL^{-1} in guaiacol-containing medium as an inducer, with value score of 123 to 168 U.mL^{-1} , which was consistent

with the studies carried out by Muthukumarasamy et al. (2015) presented values of up to 230 U.mL⁻¹ of laccase from *B. subtilis*. However, these authors used agroindustrial residues as substrate. Already, Sheikhi et al (2012) reported the activity of *B. subtilis* laccase of 2.28 U / L (ABTS) and 1.6 U / L (guaiacol).

Bacterial laccase of *Bacillus* genus was first reported by Claus and Filip (1997). Since, then, more bacterial laccases have been found, showing laccase-like activity towards the oxidizing substrates ABTS and guaiacol (Sheikhi et al., 2012). Rajeswari and Bhuvaneshwari (2016) also reported high laccase production by isolates of *Bacillus* sp isolated from the environment. In addition, several kraft lignin-degrading *Bacillus* sp. have been isolated (Bandounas et al., 2011; Chandra et al., 2007).

Besides being extracellular, other properties of enzymes like stability at several pH values are required for it to be exploited on industrial scale. Moreover, the laccase from all isolate showed minimal activity in acidic range over alkaline pH range. Sondhi et al (2015) reported an extracellular active alkali-stable laccase from *Bacillus tequilensis*.

The pH strongly affects the enzymatic reactions and is sensitive to hydrogen ion concentration present in the medium across the cell membrane. The optimum pH for production of laccase by *Trametes* and *Rhizoctonia* fungi was found to be 7.0 (Murugesan et al. (2007). But in the present study, pH 5 and 6.2 was found to be the optimum pH for the growth and extracellular laccase production by *Bacillus* sp and *Pseudomonas* sp, oxidizing substrates ABTS and guaiacol substrats.

Francis and Tebo (2001) demonstrated that CumA gene, encoding for a multicopper oxidase, was expressed in a variety of *Pseudomonas* strains.

The laccase produced by *Bacillus* sp and *Pseudomonas* sp isolate is extracellular, acidstable, and can be produced economically in large quantities. Also, can be a useful candidate for application in pulp biobleaching.

Conclusion

During the present study, we have isolated six lignina kraft-degrading bacteria from adult termite, on the basis of their laccase activities on ABTS and guaiacol assays. The *Bacillus* and *Pseudomonas* genus were predominant, and produced laccase in several pH. However, the production of laccase was isolated-pH-dependent.

Therefore, the laccase from these isolates strain can be used efficiently in bioremediation of industrial effluents and wastewater treatment.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação Araucária/Governo do Paraná – Brazil and UTFPR-Londrina-Parana. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. Sergio Luiz Mendes Hoyos was fellowship holder of CAPES-Brazil.

6 REFERENCIAS

- ARIAS, M.E.; ARENAS, M.; RODRÍGUEZ, J.; SOLIVERI, J.; BALL A.S.; HERNÁNDEZ, M. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1953-1958, 2003.
- ARORA, D.S.; SHARMA, R.K. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1760-1788, 2010.
- BALDRIAN, Petr. Fungal laccases—occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G.; FREIERMUTH, B.; BODIE, E.; BORNEMAN, S. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4627-4632, 1997.
- CALL, H. P.; MÜCKE, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2-3, p. 163-202, 1997.
- CHANDRA, R.; CHOWDHARY, P. Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 17, n. 2, p. 326-342, 2015.
- CHAUHAN, P.S.; PURI, N.; SHARMA, P.; GUPTA, N. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1817-1830, 2012.
- COUTO, S.R.; HERRERA, J.L.T. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 500-513, 2006.
- DALFARD, A.B.; KHAJEH, K.; SOUDI, M.R.; NADERI-MANESH, H.; RANJBAR, B.; SAJEDI, R.H. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 7, p. 1409-1416, 2006.
- DEMISSIE, A.G.; KUMAR, A. Isolation of novel bacteria isolate from soil for production of extra-cellular laccase enzyme. **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering**, v. 4, p.404–407, 2014.
- DEVASIA, S.; NAIR, A.J. Screening of potent laccase producing organisms based on the oxidation pattern of different phenolic substrates. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 127-137, 2016.
- DEVEREUX, R.; WILLIS, S.G. Amplification of ribosomal RNA sequences. In: **Molecular Microbial Ecology Manual**. Springer, Dordrecht, 1995. p. 277-287.

DHIMAN, K.; SHIRKOT, P. Bioprospecting and molecular characterization of laccase producing bacteria from paper mills of Himachal Pradesh. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 85, n. 4, p. 1095-1103, 2015.

DIAMANTIDIS, G.; EFFOSSE, A.; POTIER, P.; BALLY, R. Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 919-927, 2000.

DU, W.; SUN, C.; LIANG, J.; HAN, Y.; YU, J.; LIANG, Z. Improvement of laccase production and its characterization by mutagenesis. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 101-108, 2015.

DURÁN, NELSON.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: environmental**, v. 28, n. 2, p. 83-99, 2000.

ENDO, K.; HOSONO, K.; BEPPU, T.; UEDA, K. A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. **Microbiology**, v. 148, n. 6, p. 1767-1776, 2002.

GIVAUDAN, A.; EFFOSSE, A.; FAURE, D.; POTIER, P.; BOUILLANT, M.L.; BALLY, R. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 108, n. 2, p. 205-210, 1993.

GOLZ-BERNER, K.; WALZEL, B.; ZASTROW, L.; DOUCET, O. Cosmetic and dermatological preparation containing copper-binding proteins for skin lightening. **International Patent Applications WO2004017931**, v. 4, n. 04, 2004.

GONÇALVES, Aline Zorzetto Lopes. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal**. 2010. 117 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2010.

GONÇALVES, I.; HERRERO-YNIESTA, V.; ARCE, I. P.; CASTAÑEDA, M. E.; CAVACO-PAULO, A.; SILVA, C. Ultrasonic pilot-scale reactor for enzymatic bleaching of cotton fabrics. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 4, p. 1535-1543, 2014.

GUAN, Z.B.; SHUI, Y.; SONG, C.M.; ZHANG, N.; CAI, Y.J.; LIAO X.R. Efficient secretory production of CotA-laccase and its application in the decolorization and detoxification of industrial textile wastewater. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 12, p. 9515-9523, 2015.

HAKULINEN, N.; ROUVINEN, J. Three-dimensional structures of laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 857-868, 2015.

HILDÉN, K.; HAKALA, T.K.; LUNDELL, TAINA. Thermotolerant and thermostable laccases. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 8, p. 1117, 2009.

HOEGGER, P.J.; KILARU, S.; JAMES, T.Y.; THACKER, J.R.; KÜES, U. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. **The FEBS Journal**, v. 273, n. 10, p. 2308-2326, 2006.

HÜTTERMANN, A.; MAI, C.; KHARAZIPOUR, A. Modification of lignin for the production of new compounded materials. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 4, p. 387-394, 2001.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I.D.; SMITH, D.W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 3, n. 1, p. 1-19, 2004.

IYER, GOPAL.; CHATTOO, B.B. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, n. 1, p. 121-126, 2003.

KUNAMNENI, A.; PLOU, F.J.; BALLESTEROS, A.; ALCALDE, M. Laccases and their applications: a patent review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 10-24, 2008.

LU, L.; ZHAO, M.; WANG, NY.; ZHAO, LY.; DU, MH.; LI, TL.; LI, D.B. Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* LS04. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 35-40, 2012.

MACHADO, K.M. G.; MATHEUS, D.R. Potential of a ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus* during growth on solid substrate for the biodegradation of organic pollutants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 468-473, 2006.

MARGOT, J.; BENNATI-GRANIER, C.; MAILLARD, J.; BLÁNQUEZ, P.; BARRY, D. A.; HOLLIGER, C. Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 63, 2013.

MARYAN, A.S.; MONTAZER, M. A cleaner production of denim garment using one step treatment with amylase/cellulase/laccase. **Journal of Cleaner Production**, v. 57, p. 320-326, 2013.

MATHEWS, S.L.; SMITHSON, C.E.; GRUNDEN, A.M. Purification and characterization of a recombinant laccase-like multi-copper oxidase from *Paenibacillus glucanolyticus* SLM1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 5, p. 1335-1345, 2016.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MINUSSI, R.C.; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; ROTILIO, D.; PASTORE, G.M.; DURÁN, N. Phenols removal in musts: strategy for wine stabilization by laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 3-4, p. 102-107, 2007.

- MONGKOLTHANARUK, W.; TONGBOPIT, S.; BHOONOBTONG, A. Independent behavior of bacterial laccases to inducers and metal ions during production and activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 39, p. 9391-9398, 2012.
- MOROZOVA, O.V.; SHUMAKOVICH, G.P.; GORBACHEVA, M.A.; SHLEEV, S. V.; YAROLOV, A.I. "Blue" Laccases. **Biochemistry**, v. 72, p. 1136 – 1150, 2007.
- MUTHUKUMARASAMY, N.P.; JACKSON, B.; RAJ, J.A.; SEVANAN, M. Production of extracellular laccase from *Bacillus subtilis* MTCC 2414 using agroresidues as a potential substrate. **Biochemistry Research International**, v. 2015, 2015.
- NARAYANAN, P.M.; MURUGAN, S.; EVA, A.S.; DEVINA, S.U.; KALIDASS, S. Application of immobilized laccase from *Bacillus subtilis* MTCC 2414 on decolourization of synthetic dyes. **Research Journal of Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 421, 2015.
- NEIFAR, M.; CHOUCANE, H.; MAHJoubi, M.; JAOUANI, A.; CHERIF, A. *Pseudomonas extremorientalis* BU118: a new salt-tolerant laccase-secreting bacterium with biotechnological potential in textile azo dye decolourization. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 107, 2016.
- NILADEVI, K.N.; JACOB, N.; PREMA, P. Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 6, p. 654-660, 2008.
- POINTING, S. B.; JONES, E.B.G.; VRIJMOED, L.L.P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, p. 139-144, 2000.
- PRINS, A.L.; KLEINSMIDT, N.; KHAN, B.; KIRBY, T.; KUDANGA, J.; VOLLMER, J.; PLEISS, S.; BURTON, M.; LE, R.H. The effect of mutations near the T1 copper site on the biochemical characteristics of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 68, p. 23-32, 2015.
- REZAEI, S.; SHAHVERDI, A.R.; FARAMARZI, M.A. Isolation, one-step affinity purification, and characterization of a polyextremotolerant laccase from the halophilic bacterium *Aquisalibacillus elongatus* and its application in the delignification of sugar beet pulp. **Bioresource technology**, v. 230, p. 67-75, 2017.
- ROCHEFORT, D.; LEECH, D.; BOURBONNAIS, R. Electron transfer mediator systems for bleaching of paper pulp. **Green Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 14-24, 2004.
- RODRIGUEZ, E.; PICKARD, M.A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Current Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 27-32, 1999.
- SHARMA, P.; GOEL, R.; CAPALASH, N. Bacterial laccases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 823-832, 2007.
- SHEIKHI, F.; ROAYAEI, A.M.; ENAYATIZAMIR, N.; RODRIGUEZ-COUTO, S. The determination of assay for laccase of *Bacillus subtilis* WPI with two classes of

chemical compounds as substrates. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 701-707, 2012.

SINGH, G.; BHALLA, A.; CAPALASH, N.; SHARMA, P. Characterization of immobilized laccase from *c-proteobacterium* JB: approach towards the development of biosensor for the detection of phenolic compounds. **Indian Journal Science & Technology**, v.3, p.48–53, 2010.

SOARES, G.M.B.; AMORIM, M.T.P.; HRDINA, R.; FERREIRA, M.C. Studies on the biotransformation of novel disazo dyes by laccase. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 6, p. 581-587, 2002.

SOLANO, F.; GARCIA, E.; PEREZ, D.; SANCHEZ-AMAT, A. Isolation and Characterization of Strain MMB-1 (CECT 4803), a Novel Melanogenic Marine Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3499-3506, 1997.

SONDHI, S.; SHARMA, P.; SAINI, S.; PURI, N.; GUPTA, N. Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkali-stable, metal tolerant laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. **PloS One**, v. 9, n. 5, p. e96951, 2014.

STRONG, P.J.; CLAUS, H. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 373-434, 2011.

THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, n. 1, p. 19-26, 1994.

VALLS, C.; RONCERO, M. B. Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 6, p. 2032-2039, 2009.

VERMA, A.; SHIRKOT, P. Purification and characterization of thermostable laccase from thermophilic *Geobacillus thermocatenulatus* MS5 and its applications in removal of textile dyes. **Scholars Academic Journal of Biosciences**, v. 2, n. 8, p. 479-485, 2014.

WANG, T.N.; ZHAO, M. A simple strategy for extracellular production of CotA laccase in *Escherichia coli* and decolorization of simulated textile effluent by recombinant laccase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 685-696, 2017.

WANG, T.N.; ZHAO, M. A simple strategy for extracellular production of CotA laccase in *Escherichia coli* and decolorization of simulated textile effluent by recombinant laccase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 685-696, 2017.

YAROLOPOV, A.I.; SKOROBOGAT'KO, O.V.; VARTANOV, S.S.; VARFOLOMEYEV, S.D. Laccase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 257-280, 1994.