

Produksi dan karakterisasi lakase *Omphalina* sp.

Production and characterization of Omphalina sp. laccase

SISWANTO¹⁾, SUHARYANTO¹⁾ & Rossy FITRIA²⁾

¹⁾Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

²⁾Departemen Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Indonesia, Depok, Indonesia

Summary

Omphalina sp. a white-rot fungi (WRF) originated from oil palm plantation has ability to degrade empty fruit bunches of oil palm (EFBOP) so that it is expected to produce laccase with high activity. The ability of Omphalina sp. to produce laccase enzyme on liquid fermentation will be studied. The enzyme will also be partially purified and characterized. The research result showed that the highest enzyme activity (1.162 U/mL) was obtained using glucose malt yeast (GMY) medium at room temperature for four days. The addition of 2,5-xylidine as an inducer produced laccase earlier i.e two days, but the activity of laccase was less active after prolonged incubation compared to that of control. The laccase produced on medium containing 2% EFBOP reached optimum activity as much as 0.38 U/mL after 10th days of incubation. Partial purification of laccase on Sephacryl S-200 HR column resulted 58.23% of yield recovery with twice purity than before. The optimum pH of laccase was 4.5. Laccase activity was stable even after heated on 50°C for 30 minutes, but then decreased when heated until 60°C. The laccase has K_M and V_{max} as much as 0.15 mM and 0.56 U/mL respectively.

[Keywords: White-rot fungi, *Omphalina* sp., laccase activity, submerged fermentation]

Ringkasan

Omphalina sp., adalah fungi pelapuk putih (FPP) hasil isolasi dari kebun kelapa sawit yang diketahui mampu mendegradasi tandan kosong kelapa sawit (TKKS) dengan cepat sehingga diharapkan mampu menghasilkan lakase dengan aktivitas tinggi. Kemampuan *Omphalina* sp. menghasilkan enzim lakase pada fermentasi cair akan dipelajari. Selain itu, lakase yang dihasilkan akan dimurnikan secara parsial serta dilakukan karakterisasi pH, suhu, dan konsentrasi substrat optimum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Omphalina* sp. menghasilkan lakase dengan aktivitas tertinggi (1,162 U/mL) pada medium *glucose malt yeast* (GMY) yang diinkubasikan pada suhu ruang selama empat hari. Penambahan 2,5-xilidin sebagai induser mempercepat produksi lakase lebih awal yaitu dalam waktu dua hari, namun aktivitasnya masih lebih rendah dibandingkan dengan kontrol pada inkubasi lebih lanjut. Lakase dari *Omphalina* sp. juga dapat diproduksi pada medium yang mengandung 2% TKKS dan aktivitasnya mencapai 0,38 U/mL yang diinkubasi dalam suhu ruang selama 10 hari. Pemurnian parsial pada kolom Sephacryl S-200 HR menghasilkan rendemen sebesar 58,23% dengan kemurnian dua kalinya. Aktivitas lakase optimum pada pH 4,5 dan tetap stabil setelah pemanasan selama 30 menit pada suhu ruang hingga 50°C dan menurun tajam pada suhu 60°C. Lakase *Omphalina* sp. menghasilkan nilai K_M dan V_{maks} masing-masing sebesar 0,15 mM dan 0,56 U/mL.

Pendahuluan

Fungi pelapuk putih (FPP) dari kelas Basidiomycetes, *Omphalina* sp. diketahui memiliki kemampuan dalam mendegradasi lignin. Kemampuan tersebut disebabkan oleh multi enzim ligninolitik ekstraseluler yang dihasilkan FPP (Kirk & Chang, 1990; Basuki, 1994). Sekresi enzim tersebut akan membantu penetrasi hifa FPP ke dalam komponen-komponen kayu, mendegradasi lignin secara sempurna menjadi CO₂ dan H₂O sehingga membentuk rongga-rongga kayu dan meninggalkan warna putih dari selulosa (Cullen & Kersten, 1992).

Salah satu multi enzim ekstraseluler yang bertanggung jawab dalam permulaan proses depolimerisasi lignin yaitu enzim ligninolitik yang terdiri atas enzim lignin peroksidase (Li-P), mangan peroksidase (Mn-P), dan lakase (Lac) (Kirk & Farrel 1987). Lakase memiliki kemampuan mendegradasi beberapa polutan yang bersifat persisten terhadap lingkungan seperti senyawa-senyawa aromatik golongan klorida, hidrokarbon heterosiklik aromatik, zat warna dan polimer sintetik (Bumpus *et al.*, 1985). Kemampuan FPP dalam proses pendegradasian tersebut diperkirakan berhubungan dengan tingginya aktivitas oksidatif enzim ligninolitik dan sifat kurang spesifiknya terhadap suatu substrat (Ohkuma *et al.*, 2001). Oleh karena itu, FPP penghasil lakase sangat bermanfaat tidak hanya bagi proses industri seperti *biopulping* dan *biobleaching* tetapi juga bagi proses bioremediasi.

Enzim ligninolitik yang dihasilkan oleh FPP bergantung kepada jenisnya, contohnya fungi *Phanerochaete crhyso-sporium* hanya menghasilkan enzim Li-P dan Mn-P seperti yang dilaporkan oleh Dosoretz *et al.* (1990). *Omphalina* sp.

diketahui mampu mendelignifikasi material lignoselulosa dari tandan kosong kelapa sawit (TKKS), sehingga diharapkan dapat dijadikan alternatif penghasil enzim ligninolitik ekstraselular yang cukup potensial (Suharyanto & Siswanto, 2003).

Kondisi kultur, komposisi medium dan induser mempengaruhi produksi enzim. Menurut Pickard *et al.* (1999) 2,5-xilidin diketahui sangat efisien digunakan sebagai induser dalam produksi enzim lakase pada FPP. Akan tetapi, 2,5-xilidin bersifat toksik dan mencemari lingkungan. Selain 2,5-xilidin, veratril alkohol dan MnSO₄ juga dapat berfungsi sebagai induser enzim lakase (Eggert *et al.*, 1996; Pickard *et al.*, 1999). Medium konvensional yakni *glucose malt yeast extract* (GMY) dilaporkan dapat menghasilkan pertumbuhan FPP dengan baik akan tetapi enzim ligninolitik yang dihasilkan rendah (Mester *et al.* 1996). Medium alami yang murah seperti TKKS yang tersedia melimpah sebagai limbah padat pabrik minyak kelapa sawit dapat dijadikan alternatif sebagai medium produksi enzim ligninolitik.

Karakterisasi enzim juga perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruh berbagai kondisi terhadap laju reaksi diantaranya suhu, pH dan konsentrasi substrat untuk peningkatan aktivitas dan rendemen enzim. Penelitian bertujuan untuk menetapkan potensi produksi lakase *Omphalina* sp. pada medium cair sintetik (GMY) dan alami (TKKS) serta pemurnian parsial dan karakterisasinya. *Omphalina* sp. yang digunakan merupakan FPP asli Indonesia yang diisolasi dari pangkal batang pohon kelapa sawit yang telah melapuk di Kebun Kertajaya PTPN VIII, Banten.

Bahan dan Metode

Penyiapan inokulum

Isolat *Omphalina* sp. A1 untuk produksi lakase berasal dari koleksi kultur Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI) dipelihara dalam *potato dextrose agar* (PDA) miring, dan disubkultur setiap 3-4 minggu. FPP dikulturkan pada medium PDA dalam cawan Petri selama tujuh hari, kemudian empat potongan agar dan miselia masing-masing dengan luas $\pm 1 \text{ cm}^2$ diinokulasikan ke dalam medium GMY 50 mL. Kultur diinkubasikan pada suhu ruang sambil diguncang di atas *shaker* pada kecepatan 150 rpm selama empat hari. Kultur miselium tersebut setelah dihomogenkan dengan vortex, selanjutnya digunakan untuk sumber inokulum.

Produksi enzim

Inokulum sebanyak 10% (v/v) ditambahkan pada medium fermentasi GMY + MnSO_4 0,2 mM + veratril alkohol 0,1 mM, dan GMY + 2,5-xilidin (0,1 mM). Kultur kemudian diinkubasikan pada suhu ruang sambil diguncang dengan kecepatan 150 rpm selama 10 hari. Selain dengan medium sintetik, produksi enzim juga dilakukan menggunakan medium alami yaitu TKKS. TKKS dikeringkan, dihancurkan dengan blender lalu disaring dengan saringan 50 mesh sehingga dihasilkan serbuk halus. Sebanyak 2 dan 5% (b/v) serbuk TKKS dalam 60 mM bufer Na-fosfat pH 6 digunakan sebagai medium fermentasi.

Sampel kultur disentrifugasi dengan kecepatan 3.300 g, suhu 4°C selama 20 menit. Filtrat kultur yang dihasilkan merupakan ekstrak enzim kasar dan

selanjutnya ditentukan aktivitas enzim lakasenya. Aktivitas Lakase ditetapkan menurut Perez & Jeffries (1992). Bufer asetat pH 5 dengan konsentrasi 0,5 M sebanyak 0,5 mL dan 1 mM 2,2'-azino-bis (3-etilbenzthiazolin-6-asam sulfonat) (ABTS) sebanyak 0,1 mL dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian dimasukkan filtrat enzim uji sebanyak 0,4 mL. Volume total dengan campuran 1 mL diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit selanjutnya dikocok dan absorbansinya dibaca pada spektrofotometer pada λ 540 nm. Satu unit aktivitas lakase didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk mengoksidasi 1 nmol ABTS per menit. Kadar protein ($\mu\text{g/mL}$) diukur dengan metode Lowry *et al.* (1951) dengan bovin serum albumin (BSA) sebagai standar.

Pemurnian parsial

Filtrat kultur *Omphalina* sp. yang ditumbuhkan pada medium TKKS 2%, pada suhu ruang selama 15 hari digunakan untuk pemurnian parsial enzim. Filtrat kultur disentrifugasi 4.000 g pada suhu 4°C selama 15 menit untuk memisahkan substrat TKKS dari suspensi miselium. Filtrat jernih pada kondisi tersebut memiliki aktivitas lakase 0,39 U/mL. Ekstrak enzim kasar dipekatkan dengan cara presipitasi menggunakan aseton dingin dengan perbandingan 2:1. Presipitat dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 12.000, suhu 4°C selama 15 menit. Endapan dilarutkan dengan 0,5 M bufer asetat pH 5 kemudian dilewatkan ke dalam kolom berisi Sephacryl S-200 HR dan dielusi dengan 0,5 M bufer asetat pH 5 dengan laju alir 2 mL/menit, setiap 2 mL fraksi yang terbentuk dianalisis aktivitas enzim dan kadar proteinnya.

Karakterisasi lakase

Fraksi-fraksi dengan aktivitas tertinggi (fraksi 19-23) digabungkan untuk karakterisasi suhu, pH dan konsentrasi substrat optimum. Variasi suhu meliputi suhu kamar, 37, 45, 50 dan 60°C selama 30 menit. Variasi pH yakni 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 dan 7,0. Sedangkan variasi konsentrasi substrat yakni 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 dan 2 mM. Parameter kinetika reaksi ditentukan dengan menginkubasikan enzim dengan variasi substrat tersebut dalam bufer asetat pH 5,0, suhu 37°C. Angka konstanta Michaelis ditetapkan dari persamaan Lineweaver-Burk (1934).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

Keterangan:

V_0 = kecepatan awal;

K_M = konstanta Michaelis-Menten;

V_{\max} = kecepatan maksimum;

S = konsentrasi substrat

Hasil dan Pembahasan

Produksi enzim

Hasil penelitian menunjukkan bahwa miselium *Omphalina* sp. tumbuh dengan baik pada medium GMY (Gambar 1) dan aktif menghasilkan lakase setelah diinkubasikan selama empat hari yaitu mencapai 1,162 U/mL (Gambar 2). Inkubasi selanjutnya yaitu sampai dengan 10 hari menyebabkan aktivitas lakase sedikit menurun. Penambahan bahan induser mempercepat produksi lakase lebih dini yaitu pada hari kedua setelah inkubasi. Hal



Gambar 1. Pertumbuhan miselium *Omphalina* sp. setelah enam hari di dalam medium GMY.

Figure 1. Growth of *Omphalina* sp. mycelia on GMY media after six days.

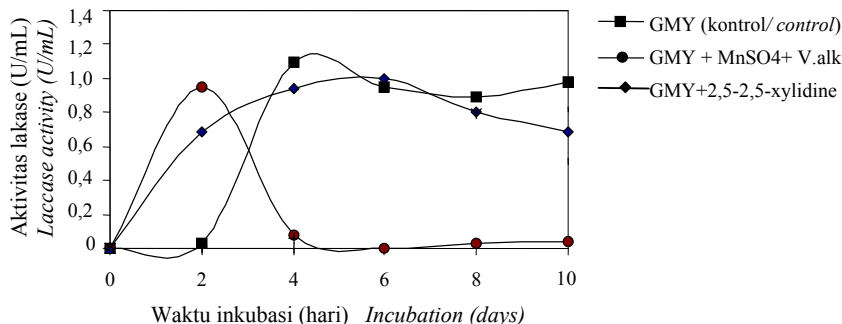
tersebut kemungkinan terjadi karena konsentrasi induser cukup untuk mengaktifkan produksi lakase. Namun, peningkatan aktivitas lakase pada inkubasi selanjutnya masih di bawah aktivitas lakase kontrol. Penambahan induser veratril alkohol + $MnSO_4$ bahkan menyebabkan aktivitas lakase turun drastis (48,36 %). Induser 2,5-xilidin telah banyak digunakan karena kemampuannya yang relatif efektif menginduksi aktivitas lakase di antaranya pada *Pleurotus erygii* (Muñoz *et al.*, 1997) dan *Pycroporus cinnabarius* (Eggert *et al.*, 1996). Menurut Xavier *et al.* (2007), 2,5 xilidin pada *Trametes versicolor* menekan metabolisme glukosa, karena xilidin merupakan senyawa cincin aromatik yang bersifat xenobiotik, sehingga memicu aktivitas enzim oksidase untuk mendegradasi senyawa tersebut. Penurunan kembali aktivitas lakase belum diketahui penyebabnya secara pasti, tetapi diduga konsentrasi xilidin tidak cukup untuk menginduksi lebih lanjut. Akan tetapi penambahan 2,5-xilidin pada percobaan ini ke dalam medium kultur *Omphalina* sp. menghasilkan aktivitas lakase yang masih

Produksi dan karakterisasi lakase Omphalina sp.

rendah dibandingkan dengan kultur *Omphalina sp.* kontrol. Penghambatan aktivitas lakase tersebut belum diketahui dengan pasti. Walaupun demikian, konsentrasi penambahan tersebut perlu dioptimasi.

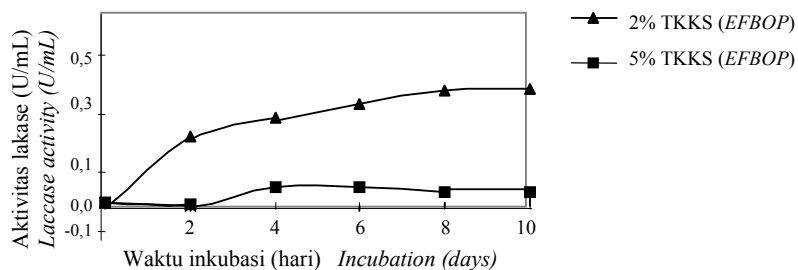
Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada medium 5% TKKS, aktivitas lakase *Omphalina sp.* sangat rendah dibandingkan dengan medium 2% TKKS (Gambar 3). Aktivitas lakase maksimum pada 5%

TKKS hanya sebesar 0,06 U/mL sedangkan pada medium 2% TKKS maksimum sebesar 0,39 U/mL pada inkubasi selama delapan hari atau sekitar enam kalinya. Aktivitas lakase pada medium TKKS lebih rendah dibanding dengan aktivitas lakase yang diperoleh dengan medium sintetik GMY. Hal ini dapat dipahami, karena nutrisi dalam GMY lebih kaya daripada nutrisi dalam TKKS.



Gambar 2. Kurva produksi lakase *Omphalina sp.* dalam medium cair GMY dengan dan tanpa penambahan induser yang diinkubasikan pada suhu ruang selama 10 hari.

Figure 2. Production curve of *Omphalina sp.* laccase on liquid media of GMY with and no inducer addition incubated at room temperature for 10 days.



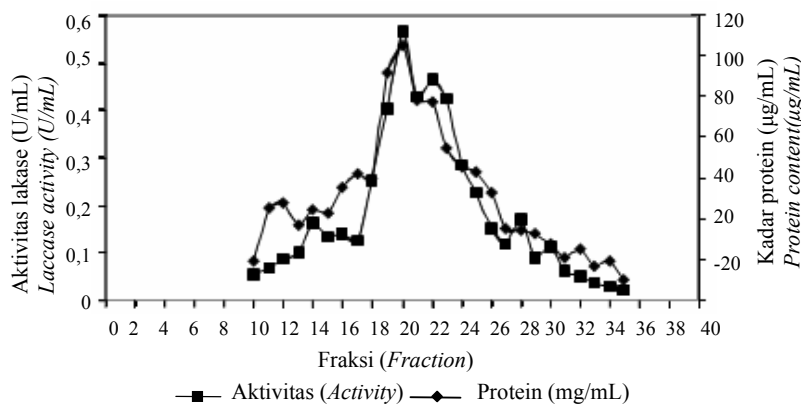
Gambar 3. Kurva produksi lakase pada medium cair 2 dan 5% TKKS.

Figure 3. Laccase production curve on liquid media of 2 and 5% EFBOP.

Pemurnian parsial

Hasil pemurnian menunjukkan bahwa aktivitas lakase tertinggi terdapat pada fraksi 19 sampai 23 (Gambar 4). Aktivitas lakase dari filtrat kultur yang semula 0,39 U/mL meningkat menjadi 0,42-0,53 U/mL pada fraksi 19-23 dan kemudi-

an menurun kembali pada fraksi 24-36. Hal ini berarti fraksi-fraksi 19-23 mengandung subunit molekul lakase. Kualitas hasil pemurnian ditunjukkan pada peningkatan aktivitas spesifik yang mencapai hampir dua kali lipat (Tabel 1). Perolehan kembali (*yield recovery*) didapat sebesar 58,23% dengan kemurnian dua kalinya.



Gambar 4. Aktivitas dan kadar protein lakase *Omphalina* sp. dari hasil pemurnian parsial dengan Sephacryl S-200.

Figure 4. Laccase activity and protein percentage of *Omphalina* sp. from partial purification with Sephacryl S-200.

Tabel 1. Pemurnian parsial lakase *Omphalina* sp.

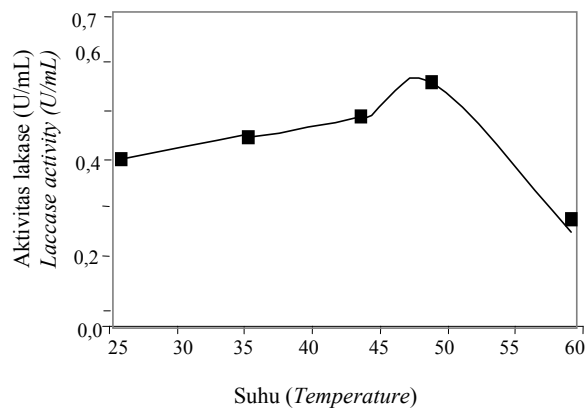
Table 1. Partial purification of *Omphalina* sp. laccase

Tahapan (Steps)	Volume (mL)	Aktivitas total Total activity (U)	Protein total Total protein (mg)	Aktivitas spesifik Specific activity (U/mg)	Rendemen Recovery yield (%)	Kemurnian (kali) Purity (times)
Ekstrak kasar Crude extract	40	15,8	5,46	2,89	100	1,0
Eluat Sephacryl S-200 HR (no.19-23)	20	9,2	1,64	5,61	58,23	2,0

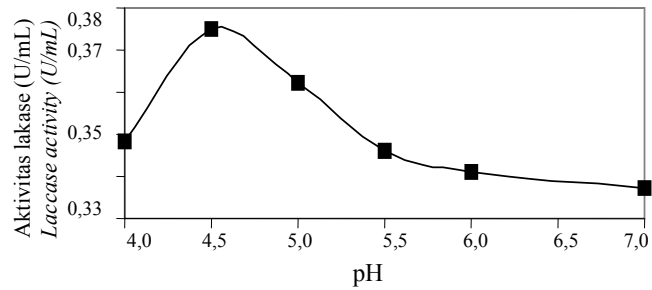
Karakterisasi Lakase

Karakterisasi lakase dilakukan dengan menggunakan filtrat enzim yang berasal dari fraksi 19-23. Hasil percobaan terlihat bahwa aktivitas lakase meningkat setelah pemanasan selama 30 menit pada suhu kamar hingga 50°C, selanjutnya menurun tajam pada suhu 60°C (Gambar 5). Aktivitas optimum terdapat pada suhu 50°C. Pengamatan pH optimal aktivitas lakase pada kisaran pH 4-7 dalam 0,5 M bufer natrium fosfat pada suhu 37°C menunjukkan bahwa *Omphalina sp.* menghasilkan aktivitas lakase dengan pH optimum 4,5 (Gambar 6). Munoz *et al.* (1997) juga melaporkan bahwa aktivitas lakase *P. eryngii* optimum pada suhu 65° C dan pH 4,5.

Pengaruh konsentrasi substrat ABTS terhadap aktivitas lakase menunjukkan bahwa aktivitas lakase meningkat dari konsentrasi substrat 0,1 mM hingga 0,5 mM (Gambar 7). Pada konsentrasi substrat yang tinggi yakni 1,5 dan 2 mM, aktivitasnya relatif konstan. Hubungan persamaan Lineweaver-Burk (Gambar 8) dengan konsentrasi substrat ABTS menghasilkan harga V_{maks} sebesar 0,56 U/mL dengan harga K_M sebesar 0,15 mM. Dari hasil tersebut diketahui bahwa dengan 0,1 mM sudah dapat menghasilkan aktivitas lakase. Prasad *et al.* (2005) juga melaporkan bahwa lakase *P. ostreatus* aktif pada substrat ABTS berkonsentrasi rendah.

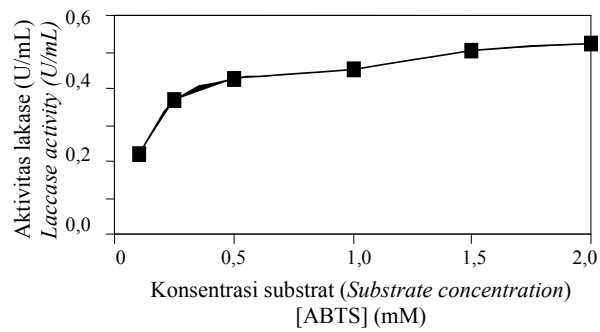


Gambar 5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas lakase pada pH 5,0, konsentrasi substrat 1 mM.
Figure 5. Effect of temperature on laccase activity at pH 5.0, substrate concentration 1 mM.



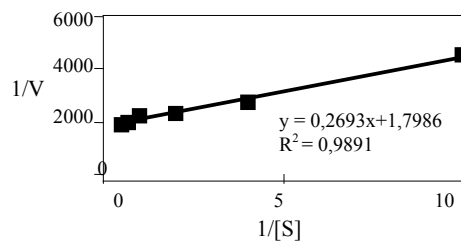
Gambar 6. Pengaruh pH terhadap aktivitas lakase pada suhu 37 °C, konsentrasi substrat 1mM.

Figure 6. Effect of pH on laccase activity at temperature 37 °C, substrate concentration 1 mM.



Gambar 7. Pengaruh konsentrasi substrat ABTS terhadap aktivitas lakase pada pH 5,0, suhu 37 °C.

Figure 7. Effect of ABTS substrate concentration on laccase activity at pH 5.0, temperature 37 °C



Gambar 8. Korelasi antara 1/S dan 1/V dalam persamaan Lineweaver-Burk.

Figure 8. Correlation between 1/S and 1/V on Lineweaver-Burk equation.

Kesimpulan

Produksi lakase *Omphalina* sp. tertinggi diperoleh pada medium *glucose malt yeast* (GMY) sebesar 1,162 U/mL pada inkubasi hari keempat. TKKS 2% dapat digunakan untuk substrat *Omphalina* sp. dalam produksi lakase dengan aktivitas sebesar 0,385 U/mL pada inkubasi hari ke-10. Pemurnian parsial di dalam kolom Sephacryl S-200 HR menghasilkan *recovery* enzim lakase sebesar 58,23% dengan kemurnian meningkat dua kalinya. Aktifitas lakase optimum pada suhu 50°C dan pH 4,5. Pengaruh variasi konsentrasi substrat ABTS terhadap aktivitas lakase menghasilkan harga K_M sebesar 0,15 mM dengan V_{maks} sebesar 0,56 U/mL.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai dengan dana DIPA APBN 2005 Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia.

Daftar Pustaka

- Basuki, T. (1994). Biopulping, Biobleaching dan Biodegradasi limbah Industri pulp dan kertas oleh Fungi Basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. Laporan Penelitian. Bandung, PAU, ITB.
- Bumpus, J.A., M. Tien, D. Wright & S.D. Aust (1985). Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*, **228** (4706), 1434-1436.
- Cullen, D. & P.J. Kersten (1996). *Enzymology and Molecular Biology of Lignin Degradation. The Mycota III Biochemistry and Molecular Biology Brambl/Marzluf (Eds.)*. Berlin, Springer-Verlag. p. 295-306.
- Dosoretz, C.G, A.H.C. Chen & H.E. Grethlein (1990). Effect of environmental condition on extracellular protease activity in ligninolytic cultures *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 395-400.
- Eggert, C., U. Temp & K.E. Eriksson (1996). The Ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1151-1158.
- Kirk, T.K & R.L. Farrel (1987). Enzymatic "combustion" the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.*, **41**, 465-565.
- Kirk, T. K. & H. M. Chang (1990). *Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture*. New York, Butterworth-Heinemann.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* **193**, 265-75.
- Lineweaver, H. & D. Burk (1934). The determination of enzyme dissociation constants". *Jour. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658-666
- Mester, T., M. Pena & J.A. Field (1996). Nutrient regulation of extracellular peroxidases in the white rot fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 778-784.
- Muñoz, C., F. Guillén, A.T. Martínez & Martínez (1997). Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Cur. Microbiol.*, **34**, 1-5.
- Ohkuma, M., Y. Maeda, T. Johjima & T. Kudo (2001). Lignin degradation and roles of white rot fungi: Study on an efficient symbiotic system in fungus-growing

- termites and its application to bioremediation. *RIKEN Rev. Foc. Ecomolec. Sci. Res.*, **42**, 39-42.
- Perez, J. & Jeffries T.N. (1992). Mineralization of $^{14}\text{CO}_2$ ringlabeled synthetic lignin correlates with the production of lignin peroxidase, not manganese or laccase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1806-1812.
- Pickard, M.A., H. Vandetrol., R. Ramon & R. Vazquez-Duhalt (1999). High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. *Can. J. Microbiol.*, **45**, 627-631.
- Prasad, K., S.V. Mohan, Y.V. Bhaskar, S.V. Ramanaiah, V.L. Babu, B.R. Pati & P.N. Sarma (2005). Laccase production using *pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. *J. Microbiol.*, **43**(3), 301-307.
- Suharyanto & Siswanto (2003). Produksi enzim ligninolitik dari fungi pelapuk putih untuk biodegradasi dan biotransformasi tandan kosong kelapa sawit. *Laporan Akhir Penelitian Tahun 2003*, APBN/ADB 1526-INO. Bogor, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia. 65p.
- Xavier, A.M.R.B., A.P.M. Tavares, R. Ferreira, & F. Amado (2007). *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Elec. J. Biotech.*, **10** (3), 444-451.