UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Guilherme de Paula Pretto

Prospecção De Atividade Ligninolítica Nos Fungos Filamentosos Schizophyllum commune e Perenniporia medulla-panis e Caracterização De Lacases.

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

São José do Rio Preto

2023

Guilherme de Paula Pretto

Prospecção de atividade ligninolítica nos fungos *Schizophyllum commune* e *Perenniporia medulla-panis* e caracterização de lacases.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao:Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Câmpus de São José do Rio Preto. Financiadora: CAPES Código 001

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Coorientador Profª Drª. Eleni Gomes

São José do Rio Preto

2023

P942p

pretto, Guilherme de Paula

Prospecção De Atividade Ligninolítica Nos Fungos Filamentosos Schizophyllum commune e Perenniporia medulla-panis e Caracterização De Lacases. / Guilherme de Paula pretto. -- , 2023

79 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto,

Orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Coorientadora: Eleni Gomes

1. Lignina. 2. Lacase. 3. Biorrefinaria. 4. Corantes sintéticos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e CiênciasExatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Guilherme de Paula Pretto

Prospecção de atividade ligninolítica nos fungos filamentosos S*chizophyllum commune* e *Perenniporia medulla-panis* e caracterização de lacases.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós- Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES Código 001

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP - São José do Rio Preto/SP
Prof. Dr. Marcio Jose Tiera (Participação Virtual)
UNESP - São José do Rio Preto/SP
Pós-Doutorando Gabriel Zazeri
UNICAMP-Universidade Estadual de Campinas
Pós-doutorando Gustavo Metzker
UNESP - São José do Rio Preto/SP

São José do Rio Preto
4 de outubro de 2023

Dedico este trabalho a um garoto no interior de São Paulo que um dia ousou sonhar em ser cientista

Aos meus pais responsáveis pela realização o meu sonho de ser pesquisador, sendo minha família meu porto seguro onipresente em minha vida, agradeço. A minha mãe Regina agradeço pelos memes enviados, assim como as marmitas de purê e carne de porco pelas quais podia sentir o gosto de casa, ao meu pai Marcos agradeço pelos deliciosos cafés que me mantinham acordado no laboratório e a ambos agradeço pelo imenso amor e carinho.

Agradeço a todos os meus amigos que foram capazes de me alegrar, me divertir e me consolar em todos os momentos que me foi necessário.

Ao meu orientador que esteve e esta sempre presente desde conversas descontraídas na copa do laboratório até durante experimentos sempre armado de conhecimentos e experiencias valiosíssimas, muito obrigado por ter aceitado ser meu orientador.

Agradeço a Prof. Dr. Eleni Gomes, minha coorientadora e professora que forneceu os equipamentos e espaço necessário para a realização de muitos experimentos.

Agradeço pelo IBILCE que muitas vezes me foi uma segunda casa extremamente acolhedora onde cultivei ótimas lembranças.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço imensamente o privilegio de me tornar um pesquisador financiado.

Agradeço todos os membros da banca examinadora por aceitarem este convite

Resumo

As mudanças climáticas impulsionadas pelo aquecimento global devido à queima de recursos fósseis não renováveis impulsionam a necessidade de reduzir a emissão global de gases responsáveis pelo efeito estufa. A biomassa vegetal se destaca por conta da sua abundância, renovação e pela capacidade de ser utilizada de forma semelhante aos compostos fósseis na produção de polímeros e compostos de alto valor agregado. Graças à expressiva atividade agrícola brasileira possuímos uma abundância em biomassa vegetal para a experimentação e desenvolvimentos de novas técnicas. Dentro dos diversos processamentos aos quais o material lignocelulósico pode ser submetido, temos como destaque a prospecção biológica, que consiste no uso de enzimas para degradar a lignina e outros compostos da parede celular vegetal. Dentre as enzimas, possuímos como um dos principais exemplares as Lacases, que são amplamente descritas em diversos grupos de microrganismos como bactérias e fungos. No presente trabalho foram utilizados os fungos filamentosos *Schizophyllum commune* e *Perenniporia medulla-panis* para testar a sua capacidade de degradação da lignina, que foi notavel no cultivo submerso do fungo *Perenniporia medulla-panis*. O extrato bruto dos fungos obtido dos cultivos foi purificado em etapas de exclusão molecular em uma resina de Sephadex G-75 e troca iônica em uma coluna com Q-Sepharose, Feita a purificação, as características da lacase obtidas somento do fungo *Schizophyllum commune* foram estabelecidas tanto quanto seu pH ótimo, cinética, interação com diferentes substratos, temperatura ótima e termo estabilidade onde foram estabelecidas características mesofilicas para a lacase isolada quanto sua temperatura ótima em 50°C, pH ótimo de 4,0 para o substrato ABTS e 5,5 para o guaiacol, sendo capaz de manter sua atividade em temperaturas de 50°C por 2 horas. A pesquisa mostrou que tanto o extrato enzimático quanto a lacase purificada do fungo S commune têm potencial para degradar os corantes verde malaquita que apresentou uma redução de até 36,2% na redução de seu pico de absorbancia, 26,4% vermelho congo, e Brilliant Blue R 14% e G 26,2% nos experimentos com a lacase purificada.

Palavras-chave: Lignina. Lacase. Biorrefinaria. Corantes sintéticos

Abstract

Climate change driven by global warming due to the burning of non-renewable fossil resources drives the need to reduce global greenhouse gas emissions. Plant biomass stands out due to its abundance, renewal and ability to be used in a similar way to fossil compounds in the production of polymers and compounds with high added value. Thanks to the significant Brazilian agricultural activity, we have an abundance of plant biomass for experimentation and development of new techniques. Among the various processes to which lignocellulosic material can be subjected, we highlight biological prospecting, which consists of the use of enzymes to degrade lignin and other compounds from the plant cell wall. Among the enzymes, one of the main examples is Lacases, which are widely described in different groups of microorganisms such as bacteria and fungi. In the present work, the filamentous fungi Schizophyllum commune and Perenniporia medulla-panis were used to test their ability to degrade lignin, which was notable in the submerged cultivation of the fungus Perenniporia medulla-panis. The crude extract of the fungi obtained from the cultures was purified in steps of molecular exclusion on a Sephadex G-75 resin and ion exchange on a column with Q-Sepharose. After purification, the characteristics of the laccase obtained only from the fungus Schizophyllum commune were established as far as its optimum pH, kinetics, interaction with different substrates, optimum temperature and thermostability where mesophilic characteristics were established for the isolated laccase as well as its optimum temperature at 50°C, optimum pH of 4.0 for the ABTS substrate and 5.5 for guaiacol, being able to maintain its activity at temperatures of 50°C for 2 hours. The research showed that both the enzymatic extract and the purified laccase from the S commune fungus have the potential to degrade malachite green dyes, which presented a reduction of up to 36.2% in the reduction of their absorbance peak, 26.4% congo red, and Brilliant Blue R 14% and G 26.2% in experiments with purified laccase.

Keywords: Lignin. Laccase. Biorefinery. Synthetic dyes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura e composição de células vegetais

Figura 2- Molécula de lignina e suas principais ligações C-C (vermelho) e C-O (azul)

Figura 3- Fluxograma resumido do Plano de Trabalho para a execução do projeto

Figura 4- Espectros de absorção das amostras coletadas durante a fermentação do licor por *Perenniporia medulla-panis*

Figura 5- Espectros de absorção das amostras coletadas durante a fermentação do licor por *Schizophyllum commune*(as retas organizadas de forma X.Y onde X é tempo da coleta e Y representa uma das replicas)

Figura 6- Espectros de absorção das amostras coletadas durante o controle abiótico

Figura 7- Monitoramento do pH da fermentação submersa em licor

Figura 8- Determinação da atividade de lacase em função do pH nas duas espécies.

Figura 9- Determinação da atividade de lacase do *S. commune* em pH 1,5 ao longo de 20 dias.

Figura 10- Determinação da atividade do *P. medulla-panis* em pH 1,5 ao longo de 20 dias. Figura 11- Crescimento do cultivo do fungo S. commune erlenmeyer completamente tomado pelo micélio

Figura 12- Comparação dos caldos da fermentação em estado semi-solido em farelo de trigo onde a cima temos o resultado do cultivo do P. medulla-panis nos béqueres de vidro, no béquer de plástico o controle do cultivo abiótico e na parte de inferior temos o caldo resultante do cultivo do fungo S. commune

Figura 13- Resultado visível das diferenças dos ensaios de atividade para lacases no extrato bruto. Temos à esquerda as reações do extrato do fungo S. commune e à direita os do fungo P. medulla-panis

Figura 14- Gráfico representando a atividade das lacases do extrato bruto de S. commune em diversos valores de pH usando ABTS como substrato.

Figura 15- Gráfico representando a atividade das lacases do extrato bruto de S. commune em diversos valores de temperatura usando ABTS como substrato.

Figura 16- Gráfico representando a atividade das lacases do extrato bruto de S. commune em diversos valores de pH usando guaiacol como substrato
Figura 17- Perfil de atividade após a cromatografia de filtração em gel da lacase de S. commune
Figura 18- Perfil cromatografico da gel flitração do extrato bruto preciptado
Figura 19- Perfil de atividade após cromatografia de troca iônica da lacase de *S. Commune*
Figura 20. Perfil da cromatografia de troca iônica da lacase de S. commune
Figura 21- Zimograma comparando as lacases presentes no extrato e após o processo de purificação
Figura 22- Gráfico representando a atividade da lacase purificada de *S. commune* em diversos valores de pH usando ABTS como substrato
Figura 23- Gráfico representando a atividade da lacase purificada de *S. commune* em diversos valores de pH usando guaiacol como substrato
Figura 24- Gráfico comparativo das atividades da lacase purificada S. commune em diversos valores de pH em guaiacol e ABTS
Figura 25- Gráfico representando a atividade da lacase purificada de *S. commune* em diversos valores de temperatura e tempos de exposição no ABTS
Figura 26- Gráfico representando a atividade relativa da lacase purificada de S. commune em diversos valores de temperatura e tempos de exposição no ABTS
Figura 27- Gráfico representando a atividade da lacase purificada de S. commune em diversas concentrações de guaiacol.
Figura 28- Gráfico representando o tempo de incubação da lacase purificada de S. commune
usando ABTS como substrato
Figura 29- Gráfico representando a cinética de Michaellis-Menten da lacase purificada de S. commune utilizando ABTS como substrato
Figura 30- Aplicação da lacase de S.commune em licor em pH
Figura 31- Aplicação da lacase de S.commune em licor pH 5
Figura 32- Aplicação da lacase de S.commune em licor pH 7
Figura 33- Perfil de absorbância do vermelho congo em pH 3 após aplicação do extrato bruto de *S. commune* por 24 hrs o círculo indica o pico a 497nm

Figura 34- Perfil de absorbância do corante Verde malaquita em pH 3 após aplicação do extrato bruto de *S. commune* por 24 hrs o círculo representa o pico de absorbância a 614nm
Figura 35- perfil de absorbância do corante Vermelho congo em pH 5,5 após aplicação do extrato bruto de *S. commune* por 24 hrs o círculo indica o pico a 497nmFigura 36- perfil de absorbância do corante verde malaquita em pH 5,5 após aplicação do extrato bruto de *S. commune* por 24 hrs o círculo representa o pico de absorbância a 614nm
Quadro 1- Fungos filamentosos capazes de produzir lacase
Quadro 2-Meio mineral adicionado na preparação do meio de cultura para incubação[1] Formula 1-Formula para o cálculo das atividades expresso em μmol min^{-1} mg^{-1}

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tabela de purificação da lacase de *S. commune*

Tabela 2- Resultado da degradação do corante vermelho congo pela lacase purificada de *S. commune* em 48 hrs

Tabela 3- Resultado da degradação do corante verde malaquita pela lacase purificada de *S. commune* em 48 h

Tabela 4- Resultado da degradação dos corantes *Brilliant blue G e R* pela lacase purificada de *S. commune* em 48 h

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Atm- atmosfera

×*g* – Expressão da Força Centrífuga Relativa, em relação à gravidade (1 *g*).

ABTS- Sal diamônio de 2,2'-Azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]

Cys- cisteína

g- grama

hr-hora

His- histidina

L- litro

M- molar

mg-miligrama

min-minuto

mL-mililitro

mM- milimolar

nm- nanômetro

PUF- Espuma de poliuretano porosa (*Porous polyurethane foam*)

rpm- rotações por minuto

V- volt

LISTA DE SÍMBOLOS

μ- micro

U- unidade enzimática

ε- coeficiente de absorção molar

°C- graus Celsius

Sumário

1 INTRODUÇÃO 18

1.1 Sustentabilidade no desenvolvimento econômico e de novos produtos 19

1.2Lignina 19

1.3Degradação da Lignina 21

1.4Lacases fúngicas 23

2 OBJETIVOS 25

3 MATERIAIS E METODOLOGIAS 26

3.1 Seleção dos Microrganismos 26

3.1 Pré tratamento 28

3.1.1 Padronização do bagaço-de-cana 28

3.1.2 Hidrólise Alcalina 28

3.3Incubação dos microrganismos 28

3.4Tratamento dos dados 29

3.5 Caracterização enzimática da lacase no licor 30

3.6 Monitoramento do pH 30

3.7 Cultivo semissólido no Farelo de trigo 30

3.8 Determinação dos parâmetros enzimáticos das lacases do extrato bruto do cultivo no farelo de trigo com ABTS 31

3.9 Determinação dos parâmetros enzimáticos das lacases do extrato bruto do cultivo no farelo de trigo com ABTS 32

3.10 Purificação da Lacase 32

3.11 Determinação do pH ótimo e temperatura ótima da lacase 33

3.12 Determinação do tempo de incubação da lacase do fungo *Schizophyllum commune* 34

3.13 Determinação da cinética enzimática da lacase 34

3.14 Determinação da termoestabilidade da lacase 35

3.15 Descrição do comportamento da lacase em guaiacol 35

3.16 Zimograma 36

3.17 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford 36

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 38

4.1 Resultados da fermentação utilizando o licor como meio nutritivo 38

4.2 Resultados do monitoramento do pH do meio de cultura e atividade enzimática da lacase 40

4.3Resultado do cultivo semi-sólido em farelo de trigo 45

4.4 Caracteristicas das lacases no extrato bruto de S. commune 47

4.5 Purificação 51

4.6 Zimograma 55

4.7 Aplicações 64

5 CONCLUSÕES 72

6 REFERÊNCIAS 73

1 INTRODUÇÃO

O crescimento econômico moderno tem sido sustendado sobre fontes não sustentáveis de energia como petróleo, gás natural e carvão mineral. Estima-se que essas fontes representa 80% de toda a matriz energética mundial e sua exploração e uso difundido causa impactos ambientais severos no planeta, como derramamento de petróleo, poluição da atmosfera e principalmente a liberação de gases de efeito estufa (BARBIR.; VEZIROĞLU; PLASS, 1990; ARMAROLI; BALZANI, 2011).

Devido à natureza não renovável desses recursos e o fato das alterações climáticas serem cada vez mais evidentes, a busca de alternativas sustentáveis para a substituição desses compostos fósseis e a utilização da biomassa vegetal com essa finalidade tem se mostrado promissora e em ascensão nos últimos anos (ZAKZESKI, 2010; BUGG; RAHMANPOUR, 2015). O Brasil possui uma safra de cana de açúcar para 2022 estimada em 74,68 toneladas por hectare sendo essa quantidade quase que exclusivamente direcionada para a produção de biocombustíveis (CONAB,2021), sendo o bagaço-de-cana também um dos mais abundantes resíduos lignocelulósicos produzidos no país (MOREIRA, 2013).

A intensiva atividade agrícola no Brasil é responsável pela geração de milhões de toneladas em subprodutos sólidos de origem vegetal (ABIB, 2011; BRASIL, 2011). A problemática relacionada a essa intensa atividade se deve à falta de aproveitamento ou exploração desses subprodutos, os quais sem uso viável acabam sendo descartados muitas vezes de maneira incorreta podendo gerar grandes impactos ambientais e impedindo uma geração maior de renda e otimização de recursos. Esses materiais são caracterizados como biomassas lignocelulósicas e, dentro de um conceito de Biorrefinaria, podem ser reaproveitados para a produção de diversos compostos de alto valor agregado como enzimas, corantes, ácidos orgânicos, compostos aromáticos, etc., ao invés de serem descartados na natureza (KAPOOR; PANWAR; KAIRA, 2016).

A conversão desses subprodutos agrícolas em produtos beneficiados de interesse explica grande parte do interesse em tornar viável economicamente o processamento de biomassa vegetal, assim como o desenvolvimento de formas não convencionais de produção de

compostos de interesse econômico e da energia renovável (DUMON et al., 2012; QING et al., 2013).

Enunciado do problemado

1.1 Sustentabilidade no desenvolvimento econômico e de novos produtos

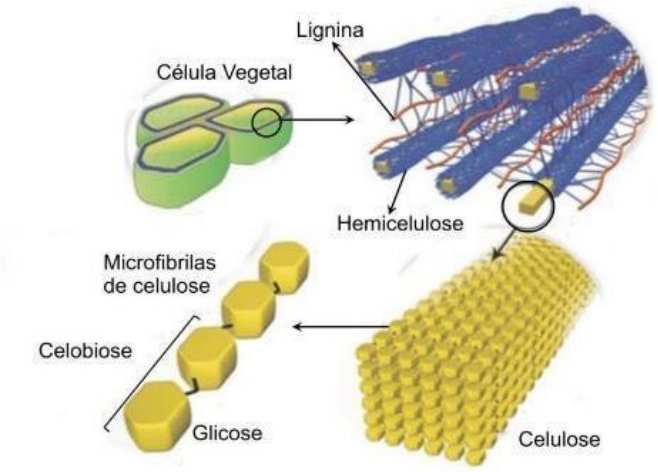
Dados recentes revelam que a liberação de subprodutos tóxicos da combustão de combustíveis fósseis gera um prejuízo econômico global de cerca de 8 bilhões de dólares por dia representando 3,3% 1 Enunciado do problemado PIB global e é responsável por mais de 4 milhões de mortes prematuras todos os anos decorrentes tanto da inalação desses compostos até por prejuízos ambientais (FARROW; MILLER; MYLLYVIRTA, 2020).

O investimento em produtos, processos e empresas sustentáveis vem crescendo, com estimativa, em 2019, da ordem de US$ 31 trilhões no mundo todo. Isso destaca a necessidade das empresas se adaptarem a novas necessidades e compromissos com o meio ambiente, sendo cada vez mais requisitadas políticas de ESG (*Enviromental, Social and Corporate Governance*) para que novos investimentos sejam obtidos por fundos globais (GREGORIO, 2020).

1.2 Lignina

A lignina, a hemicelulose e a celulose estão presentes na composição de algumas células em vegetais superiores, existindo no lenho de plantas de grande porte e nos tecidos condutores nas plantas em geral. O primeiro composto é considerado o polímero fenólico natural mais abundante no mundo com produção de cerca de 50 milhões de toneladas anuais (DEMUNER et al., 2019) (Figura 1). O conjunto é responsável por garantir a resistência mecânica, química e biológica dessas células vegetais (GARCIA et al., 2007).

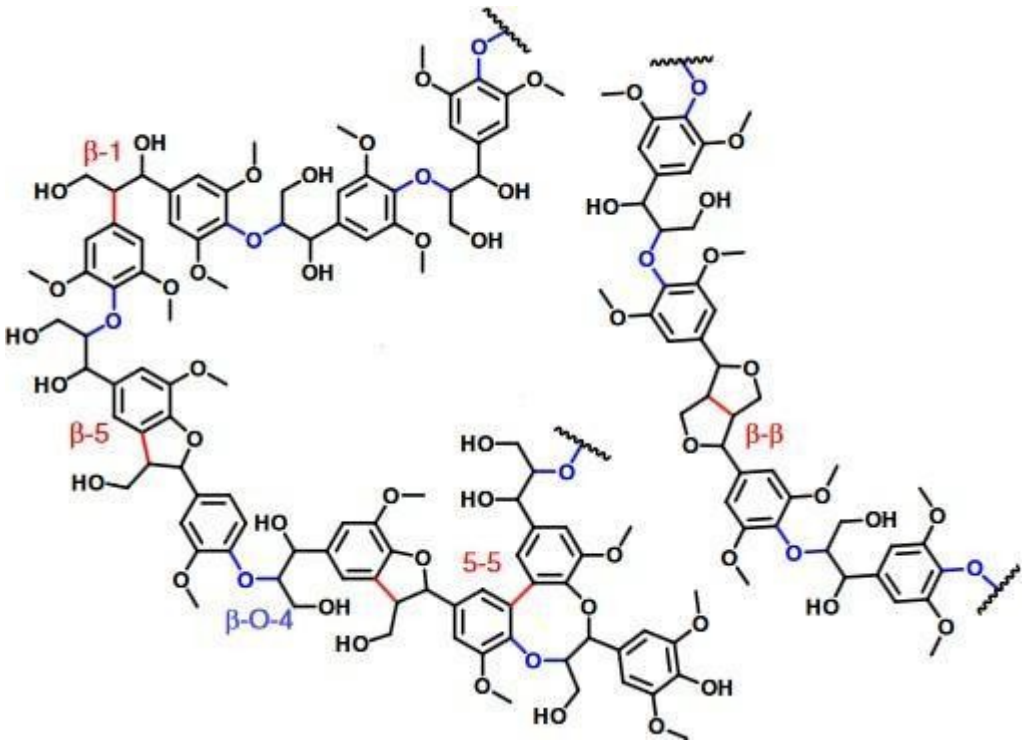
Figura 1*:* Estrutura e composição de células vegetais



Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2012.

Apesar da biomassa vegetal ser muitas vezes considerada como tendo uma composição uniforme, pode haver uma diversidade considerável na sua composição. Primeiramente, as diferentes espécies de plantas têm diferenças nas proporções de celulose, hemicelulose e lignina, e ainda, diferenças nos tipos de hemiceluloses e/ou lignina presentes. Além dessas diferenças entre as espécies, a composição média de uma única espécie pode conter proporções diferentes entre os componentes da parede, e às vezes diferenças qualitativas em seus componentes (PAULY; KEEGSTRA, 2010). A composição química da parede celular também varia em função de diversos outros fatores, incluindo as condições ambientais durante o crescimento (FARINAS et al., 2010). A lignina é composta majoritariamente por ligações químicas com alta estabilidade termodinâmica, tais como C-C (β-5, 5-5, β-1, e β-β) e C-O (β-O-4), sendo as ligações do tipo éter as mais abundantes (45-60%) (Figura 2) contribuindo para o seu caráter recalcitrante (MARINOV et al., 2018, ANDERSON et al., 2019).

Figura 2: Propsota estrutural de lignina e suas principais ligações C-C (vermelho) e C-O (azul)



Fonte: Adaptado de ANDERSON et al., 2019.

A lignina é uma macromolécula amorfa com estrutura tridimensional e ramificada, hidrofóbica, e, portanto, insolúvel, sendo classificada como polifenol, tendo como suas subunidades fenilpropano derivados de álcoois hidroxicinamílicos: cumarílico, coniferílico e sinapílico (OLIVEIRA, 2015).

1.3 Degradação da Lignina

Devido à heterogeneidade das suas ligações químicas a lignina não pode ser metabolizada por enzimas hidrolíticas, diferenciando-se dos demais compostos da matéria vegetal. Exige uma ação sinérgica e bem orquestrada de diversas classes de enzimas (ABDEL-HAMID; SOLBIATI; CANN, 2013)

O processo de degradação da lignina pode seguir por diversas vias metabólicas resultando na quebra das ligações. Em uma dessas vias, a degradação da lignina consiste na despolimerização e no rompimento dos anéis aromáticos presentes na sua forma polimerizada.

Primeiramente, as ligações β-O-4 são oxidadas em compostos derivados de arilgliceróis. Após isso, os anéis aromáticos são clivados, seguem a via do β-cetoadipato e se acoplam às ligações β-O-4 que foram oxidadas formando estruturas cíclicas de carbonato (JAVAID et al., 2018). De modo geral, as reações enzimáticas atuam na quebra das ligações estáveis C-C e C-O por meio da oxidação seletiva do C-α do álcool benzílico a uma cetona, ativando as ligações β-O-4, liberando os monômeros fenólicos (RAMINI et al., 2013).

Com isso, podemos observar que a degradação da lignina consiste em um processo complexo, não só pelas etapas múltiplas de clivagem, mas também pela grande quantidade de subprodutos que acabam se formando pela diversidade de vias metabólicas (ASINA, 2016). O êxito na decomposição da lignina só pode ser atingido pela associação da atividade de múltiplas enzimas, por conta da complexidade, da heterogeneidade do material e pela diversidade de ligações químicas presentes em sua estrutura (BUGG; RAHMANPOUR, 2015).

As enzimas microbianas que estão envolvidas na degradação da lignina são divididas em dois grupos: enzimas modificadoras de lignina (LME) e as auxiliares de degradação de lignina (LDA). As LME são produzidas por diversos microrganismos e são classificadas majoritariamente em Lacases e Peroxidases.

Já as LDA são classificadas principalmente em Glioxal Oxidases, Glicose Desidrogenases, Aril Alcool Oxidases, Piranose-2 Oxidases, entre outras (JANUSZ et al., 2017). As lacases são o grupo mais diverso e estudado das enzimas oxidases contendo cobre (IBRAHIM et al., 2011), sendo consideradas como catalisadores sustentáveis devido ao fato de utilizarem o gás oxigênio como cofator principal e gerar água como subproduto (ASINA, 2016). Além disso, os métodos biológicos de prospecção vêm ganhando espaço devido às suas vantagens com relação aos métodos químicos convencionais (SINDHU et al., 2016).

A degradação da lignina produz uma vasta gama de bioprodutos, dependendo da espécie de microrganismos e dos parâmetros utilizados, sendo os principais produtos já constatados: lipídeos, biopoliésteres (PHA), ácido cis-cis mucônico, vanilina, caprolactam, bioconservantes (p-hidroxibenzoico), ácido adípico, entre outros (XU et al., 2019).

A utilização de bactérias dos gêneros *Pseudomonas, Rhodococci, Acinetobacter* e *Sphingomonas* mostrou um potencial promissor na degradação do material lignocelulósico em bioplásticos, biocombustíveis e biofertilizantes (XU et al., 2018), enquanto têm sido reportados resultados promissores com a utilização de microrganismos fúngicos na degradação da lignina (JANUSZ et al., 2017; MARINOVI et al., 2018; JAVAID et al., 2018). Os táxons fúngicos que possuem esta capacidade de degradação da lignina são agrupados nos filos Ascomycota e Basidiomycota, sendo conhecidos como fungos da podridão branca, podridão parda e/ou

podridão mole, de acordo com as propriedades da madeira que é degradada e as características do material lignocelulósico derivado (SIGOILLOT et. al., 2012).

Os fungos possuem mecanismos que fazem com que eles cresçam melhor em ambientes contendo compostos de alta massa molecular por conta da liberação de enzimas extracelulares, além de possuírem uma estrutura celular que permite que as células sobrevivam caso haja liberação de algum subproduto tóxico (LAILI et al., 2018)

Durante o processo de degradação sinérgica de lignina, os microrganismos crescem juntos no mesmo substrato, agindo em um processo conhecido como "partição de nicho", fazendo com que o metabolismo das espécies presentes se complete sem uma sobreposição que iniba competitivamente outros processos enzimáticos, maximizando o processo degradativo (TOLALPA;SALLES;VANELSAS,2017).

1.4 Lacases fúngicas

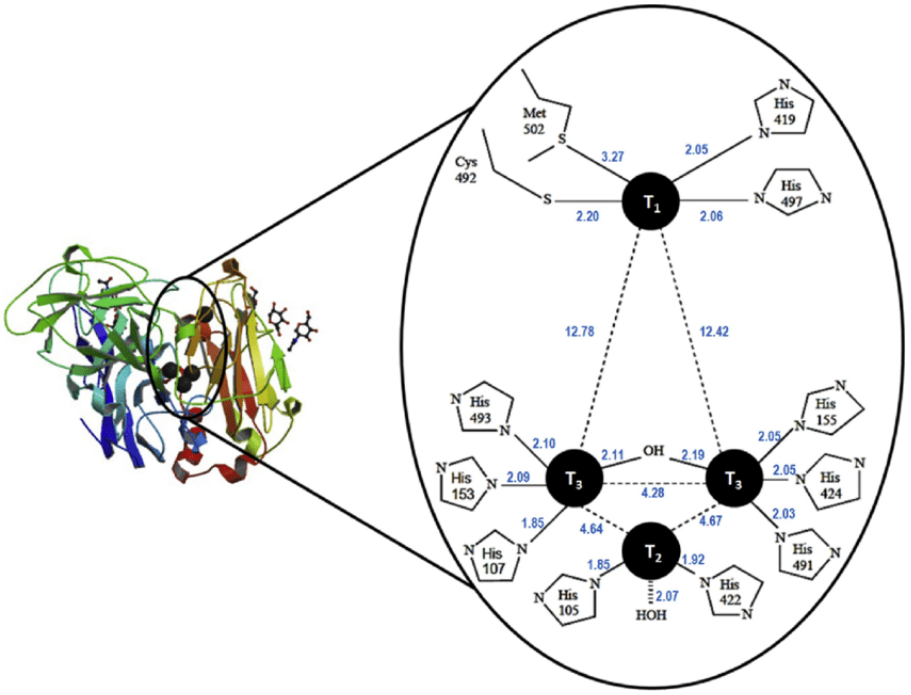
Os fungos da podridão branca são comumente conhecidos pela alta taxa de secreção enzimática incluindo as chamadas MCOs (em inglês *Multicopper oxidases*) que podem atuar em uma vasta gama de substratos especialmente as lacases, podendo atuar em diversos processos ecológicos e também industriais (KIRTZEL et al., 2017). Graças a essa atividade oxidativa catalítica das enzimas compostos fenólicos podem ser polimerizados, despolimerizados e transformados podendo atuar de forma anabólica e catabólica no metabolismo dos microrganismos e também como defesa a esses compostos muitas vezes tóxicos(KIRTZEL et al., 2017).

As lacases são capazes de catalisar uma reação de oxidação de um elétron de seus substratos concomitantemente com a redução de uma molécula de oxigênio em agua. Graças a sua natureza inespecífica quanto a substratos as lacases podem oxidar até mesmo compostos inorgânicos, diaminas aromáticas, polifenóis e poliaminas conferindo às ladcases potencial para utilização em processos biorremediadores de agrodefensivos, HAPs e em processos nas indústrias de papel por exemplo (KIRTZEL et al., 2017) .

Lacases (EC 1.10.3.2) fúngicas são glicoproteínas monoméricas ou oligoméricas com quatro átomos de cobre em seu sitio catalítico (por monômero) e se diferenciam das demais enzimas lignolíticas pela ausência da necessidade da presença de cofatores e em sua maioria quando são secretadas possuem grande estabilidade possuindo grandes vantagens em aplicações ambientais como tratamento de efluentes contaminados com metais pesados, corantes, agrodefensivos e até medicamentos (TOKER; EVLAT; KOÇYİĞİT, 2021). Mas

graças a essa natureza inespecífica das lacases, essas enzimas se tornam difíceis de se diferenciar por meio de seus substratos. No sitio ativo da lacase os átomos de cobre são dispostos em uma estrutura de três domínios ou sítios principais, e esses sítios de ligação com o átomo de cobre podem ser diferenciados de acordo com sua ressonância paramagnética eletrônica (RPE), sendo assim obtemos 3 tipos de ligação diferentes, as de tipo 1 com uma forte absorbância a 600nm responsável pelo cobre que existe de forma oxidada dando a cor característica das lacases, o tipo 2 onde o átomo de cobre não possui cor e possui uma fraca absorbância em comparação ao tipo um e o tipo 3 onde dois átomos de cobre estão pareados de forma antiferromagnética não sendo detectado pela RPE. As regiões tipo 2 e 3 são estruturalmente próximas formando um aglomerado trinuclear que está envolvido nas reações (KIRTZEL et al., 2017). A reação ocorre de maneira que o cobre de tipo 1 funciona como aceptor primário de elétrons, elétrons esses que através da via Cys-His serão conduzidos para a região trinucleada (onde estão os cobres de tipo 2 e 3) onde será feita a redução do oxigênio em água (KIRTZEL et al., 2017).

Figura 3: Proposta estrutural de uma lacase fungica tipica



Fonte: Adaptado de Dwivedi et al., 2011; Enguita et al., 2003

2 OBJETIVOS

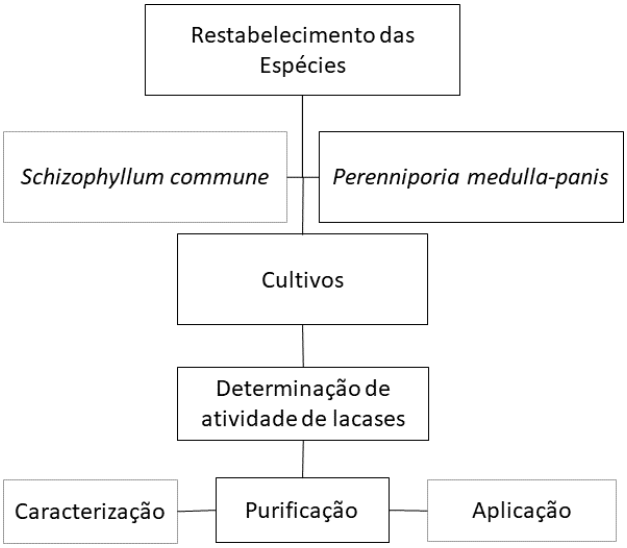
Objetivos gerais: Em virtude do potencial de obter substâncias químicas de elevado valor agregado a partir da degradação da lignina, este projeto teve por objetivo geral efetuar a triagem de duas espécies de fungos apontados em trabalho prévio (SEIXAS, 2003) como capazes de apresentar maior atividade enzimática para a enzima lacase (EC 1.10.3.2). As espécies utilizadas neste projeto foram: *Schizophyllum commune* e *Perenniporia medulla-panis*. Os objetivos específicos incluem:

- A análise da degradação de lignina pré-tratada,
- Isolar a(s) lacase(s) do fungo que apresentar(em) a maior atividade
- Caracterizar seus parâmetros bioquímicos e compará-los com outros estudos.
- Analisar o potencial biorremediador da lacase isolada sobre corantes sintéticos.

3 MATERIAIS E METODOLOGIAS

As atividades realizadas para a elaboração deste Projeto estão descritas de forma resumida no fluxograma do Plano de Trabalho (Figura 3).

Figura 3: Fluxograma resumido do Plano de Trabalho para a execução do projeto



Fonte: Autoria própria

3.1 Seleção dos Microrganismos

Os microrganismos utilizados e acima mencionados estavam armazenados em óleo mineral a 4ºC. Para sua reativação, foram incubados em meio líquido (0,5% de glicose; 0,5% peptona; 0,2% de extrato de levedura). Após seu crescimento, foram inoculados em meio de aveia (Av.D.A- 4g de farinha de aveia; 4g de Dextrose; 5g de ágar; 200 mL de água destilada) e em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) em placas de Petri, sendo os meios de cultura e os recipientes utilizados para portar os microrganismos previamente autoclavados a 121ºC por 20 minutos.

Procedimentos de repique de manutenção foram realizados com o mesmo meio de crescimento, sendo todos os inóculos realizados mantidos a 28º C.

O quadro 1 indica as espécies armazenadas pela Dra. Solange Xavier dos Santos, que apresentaram produção da enzima lacase no seu trabalho de Doutorado, e eram as opções a serem eventualmente utilizadas para o presente projeto, sendo escolhidas as duas espécies antes mencionadas.

Quadro 1: Fungos filamentosos capazes de produzir lacase

Posição	Código	Espécie
1º	SXS 169	*Coriolopsis byrsina*
2º	SXS 385	*Schizophyllum commune*
3º	SXS 23	*Coriolopsis byrsina*
4º	SXS 306	*Pycnoporus sanguineus*
5º	SXS 159	*Psilocybe subcoprophila*
6º	SXS 358	*Perenniporia medulla-panis*
7º	SXS 139	*Phlebia sp.*
8º	SXS 112	*Coriolopsis byrsina*
9º	SXS 16	*Coriolopsis byrsina*
10º	SXS 21	*Coriolopsis byrsina*

Fonte: Adaptado de Xavier-Santos 2003

3.1 Pré tratamento

3.1.1 Padronização do bagaço-de-cana

O bagaço-de-cana foi lavado cinco vezes em água corrente com o intuito de remover os açúcares residuais derivados da moagem e posteriormente seco em temperatura ambiente por aproximadamente três dias ou até secagem total do material. Após isso, o bagaço-de-cana foi passado em um conjunto de peneiras para padronização do tamanho das partículas: superior a 1,41 mm de comprimento e menor que 2,83 mm (DOS SANTOS et al., 2021).

3.1.2 Hidrólise Alcalina

O bagaço-de-cana devidamente padronizado e seco foi então submetido a um processo de hidrólise alcalina para extração do licor, que possui majoritariamente lignina e hemicelulose. O processo consiste em adicionar bagaço-de-cana e uma solução de hidróxido de sódio 0,5 M em uma proporção de 1:10 (1g de bagaço-de-cana para 10g de NaOH 0,5 M). A mistura foi submetida a uma temperatura de 120°C e 1 atm por 1 hora em autoclave. Após esse período, a mistura foi filtrada a vácuo para obtenção do licor alcalino, cujo pH foi ajustado para valores próximos de 6,0 com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5 M com o intuito de aproximar ao valor do pH ótimo das enzimas lignocelulósicas (IDRIS et al., 2019).

3.3 Incubação dos microrganismos

Após um período de 7 dias em meio sólido (PDA), fragmentos de micélio de 1 cm de diâmetro foram transferidos para novas placas de Petri (um fragmento por placa) contendo um meio sólido confeccionado a partir de 5% de licor, 5% de meio mineral e 3% de ágar. Esse processo foi feito para que os fungos possam se adaptar às condições adversas impostas pela fermentação submersa no licor. A seguir, as placas foram incubadas por um período suficiente para que o crescimento do micélio do fungo fosse suficiente para a próxima etapa.

Na sequência 2 fragmentos de micélio de 1 cm de diâmetro cada foram inseridos em Erlenmeyers sob fermentação submersa em estado líquido em meio contendo 5% de licor e 1% de meio mineral, cuja composição é mostrada no Quadro 2. A fermentação ocorreu em triplicata durante 20 dias e foram coletadas alíquotas de 10 mL a cada 48 horas.

A porção sobrenadante foi então submetida a centrifugação e filtração, sendo posteriormente analisada para a caracterização e quantificação dos compostos formados após o período de incubação, além da avaliação da eficiência da degradação da lignina por Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível na faixa de comprimentos de onda entre 200-600nm. (ZHU et al., 2017).

Quadro 2: Meio mineral adicionado na preparação do meio de cultura para incubação[1]

Função principal	Composto	Concentração ($g.L^{-1}$)
Macronutrientes	$CaCl_2$	0,058
	KCl	0,025
	NH_4Cl	0,017
	$MgCl_2$	0,011
	NaH_2PO_4	0,037
-	Micronutrientes	1 $mg.L^{-1}$
Fonte de Carbono e Energia	Glicose	1,8
Tampão Fosfato	Na_2HPO_4	4,0
	NaH_2PO_4	0,46
	$Ca(OH)_2$	0,1
	$Na_2S.9H_2O$	0,05

Fonte: (Adaptado de WIEGNANT; LETTINGA, 1985 apud DANIEL, 2014)

3.4 Tratamento dos dados

Os dados foram coletados do software padrão dos equipamentos e os valores obtidos foram processados por avaliações quantitativas para os diferentes experimentos. A análise exploratória e tratamento dos dados foram realizados em planilhas e gráficos dos softwares Origin (OriginLab Corporation, EUA) e Excel (Microsoft Corporation, EUA). Os experimentos

foram realizados em triplicatas, e os valores apresentados contêm a média aritmética e desvio padrão referentes aos valores obtidos.

3.5 Caracterização enzimática da lacase no licor

A atividade enzimática da lacase foi determinada pela adaptação metodologia descrita por Xavier Santos et al. (2003) e compreende a oxidação de ABTS (2,2-azino-bis-etilbentiazolina) pela enzima. Nesta metodologia, a 100 µL de extrato enzimático se adiciona 900µL de tampão 0,1M de pH de 1,5 a 6,0 e 800 µL de solução de ABTS (0,03% m/v). A seguir aquece-se a 37°C a 10 min, em triplicata em banho maria. Após a determinação do pH ótimo para cada espécie de fungo foi realizada a mesma reação para todas as alíquotas coletadas dessa vez utilizando apenas o pH ótimo para determinação do tempo de maior atividade. A leitura de absorbância foi feita no comprimento de onda de 420 nm em cubeta de 1 mL em Espectrofotômetro Thermo Scientific: Evolution 201 (BUSWELL; CAI; CHANG, 1995; MENEZES et al., 2010):

A velocidade inicial da reação (V_o) foi calculada em µmol min^{-1} mg^{-1} para cada concentração, analisando em primeiro lugar a linearidade da liberação do produto em função do tempo, para determinação do tempo de incubação. A constante de Michaelis K_m e a velocidade máxima da reação V_{max} foram calculadas no programa QtiPlot versão 0.9.9.11 (©Ion Vasilief 2004–2017) para Linux, através do ajuste não linear de parâmetros, usando como referência a equação de Michaelis-Menten (MICHAELIS; MENTEN, 1913).

3.6 Monitoramento do pH

O pH de alíquotas de 10 mL do meio de cultura foi monitorado utilizando-se de um medidor de pH (Digimed DM22) com eletrodo Sensoglass Sc09.

3.7 Cultivo semissólido no Farelo de trigo

Também foi realizado o cultivo das espécies em farelo de trigo como descrito por Xavier Santos et al. (2003) no intuito de se obter um maior rendimento enzimático. O cultivo estendeu-se por 28 dias em triplicadas de cada espécie e triplicata do controle e foi feito de maneira onde cada Erlenmeyer de 250 ml possuía 5 gramas do farelo de trigo e 10ml de sulfato de amônia 1% e sulfato de magnésio 0,01% m/v.

No final do período de cultivo foi adicionado a cada Erlenmeyer 40 ml de água ultrapura, então os frascos foram submetidos a uma agitação de 180 rpm por 60 min para que se houvesse a solubilização das enzimas presentes, e então a solução obtida foi filtrada com filtro de pano, centrifugada a 17.884 ×*g* por 50 min em uma centrifuga CINTRA CR3 e dividida em tubos eppendorf de 2 mL.

3.8 Determinação dos parâmetros enzimáticos das lacases do extrato bruto do cultivo no farelo de trigo com ABTS

Foram determinados os parâmetros de pH ótimo e temperatura ótima das lacases presentes no extrato de forma que 10 µL do extrato bruto obtido de cada espécie foi adicionado a 190 µL do substrato ABTS (0,05M) solubilizado com tampões de pH 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 4,5; 5; 5,5 e 6 e então submetidas a uma temperatura de 50 °C por 10 minutos em um termociclador (Gene explorer GE912), após esse período a reação foi interrompida com a adição de 5 µL de uma solução 1:1 de água e ácido tricloroacético (adaptado de KUMAR et al,. 2015, INÁCIO et al., 2013).

Os parâmetros de temperatura ótima foram realizados utilizando dos 10 µL do extrato de cada espécie juntamente com os 190 µL de substrato solubilizado com tampão acetato 0,1M pH 4, utilizou-se das temperaturas de:20, 30, 40, 50 e 60°C. As reações foram realizadas em um termociclador por 10 min e foram paradas utilizando 5 µL da solução 1:1 de água e ácido tricloroacético (adaptado de KUMAR et al., 2015, INÁCIO et al., 2013).

Todos os controles foram realizados utilizando 190 µL solução do substrato e 10 µL de água ultrapura ao invés do extrato bruto

Após as reações, foi pipetado 200 µL de cada reação e diluídos em 800 µL de água ultra pura para a análise de espectrofotometria a 420 nm utilizando o coeficiente de extinção molar do ABTS, 36 mM^{-1} cm^{-1} (MAGALHÃES et al., 2020). Vale ressaltar nos casos nos quais a absorbância era superior a 1,0 foi feita mais uma diluição até que o valor aferido pelo espectrofotômetro fosse inferior a aquele valor. Então os valores obtidos foram inseridos na formula 1 para a quantificação da reação enzimática.

Equação 1: Cálculo das atividades expresso em μmol min^{-1}

$$\left[\frac{\left(\frac{dA}{dT}\right)}{\varepsilon}\right] * Vf * \left(\frac{vT}{vS}\right) * 1000$$

Legenda: dA é o valor da absorbância, dT o tempo da reação, *ε* é o coeficiente de extinção molar, Vf é o volume final do ensaio, vT o volume total de amostra e vS é o valor da alíquota do ensaio (EISENTHAL, DANSON et al., 1992)

3.9 Determinação dos parâmetros enzimáticos das lacases do extrato bruto do cultivo no farelo de trigo com ABTS

Foram determinados os parâmetros de pH ótimo e temperatura ótima das lacases presentes no extrato de forma que 10 μL do extrato bruto obtido de cada espécie foi adicionado a 190 μL do substrato guaiacol (0,5 mM) solubilizado com tampões de pH 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7 e 7,5 e então submetidas a uma temperatura de 40°C por 30 minutos em um termociclador. Após esse período a reação foi parada com a adição de 5 μL de uma solução 1:1 de água e ácido tricloroacético (adaptado de HU et al., 2015, INÁCIO et al., 2013).

Todos os controles foram realizados utilizando 190 μL solução do substrato e 10 μL de água ultrapura ao invés do extrato bruto.

Após as reações, foi pipetado 200 μL de cada reação e diluídos em 800 μL de água ultrapura para o ensaio enzimático conforme antes descrito. É importante ressaltar que, conforme será mostrado em Resultados e Discussão, os ensaios de atividade do fungo *Perenniporia medulla-panis* apontaram valores muito baixos de atividade, que não justificariam investir na sua purificação. Por essa razão, os procedimentos de purificação e caracterização bioquímica descritos a seguir se referem à lacase de *Schizophylum commune*.

3.10 Purificação da Lacase

A purificação ocorreu em 2 principais etapas, a primeira consistiu da precipitação por salting-out utilizando o sal sulfato de amônio do extrato bruto obtido do cultivo sólido em farelo de trigo que após descongelado foi centrifugado a 17.884 ×*g* por 25 min onde o precipitado foi descartado e então houve a adição do sulfato de amônio partindo de uma concentração de inicial de 0% para 75% (adaptado de LITTHAUER et al. 1995). Após a solubilização do sal no extrato

este foi mantido a uma temperatura entre 2-4°C por 40 min e então centrifugado a 17.884 ×*g* por 45min, descartando o sobrenadante.

O material de dois tubos eppendorf com precipitado foi suspenso em 1.500 µL de tampão acetato 0,1 M pH 5,5 contendo NaCl 0,15 M e aplicado em uma coluna preenchida com a resina Sephadex G-75 para uma cromatografia de exclusão molecular previamente equilibrada com o mesmo tampão. O processo, executado em um cromatógrafo FPLC Biologic System (Bio-Rad) foi repetido várias vezes, pois o loop do cromatógrafo era de 1 mL e, pelas dimensões da resina, não era recomendável exceder esse volume, que correspondia a quase 1 % do volume disponível. O líquido eluente da resina foi coletado em frações eluidas de 1,5 mL. A presença de atividade para lacase de cada alíquota foi determinada utilizando o ensaio enzimático previamente descrito no pH ótimo da lacase.

Na segunda fase da purificação que envolveu o processo de cromatografia por troca iônica em uma coluna Q-Sepharose de 5 mL acoplada a um sistema Äkta Purifier 10, foram aplicadas todas as frações de maior atividade do passo anterior de purificação, utilizou-se do tampão Tris para que o pH da solução fosse ajustado para 6,5 e então foi aferida e ajustada utilizando água ultrapura a condutividade da solução para que os dois parâmetros fossem parecidos com o tampão inicial (A) utilizado para equilibrar a coluna. Foi aplicado então todo o resultante do processo na coluna equilibrada com tampão fosfato 0,1M pH 6,5 (tampão A), o processo de troca iônica ocorreu utilizando-se de outro tampão (B) com maior condutividade (tampão fosfato pH 6,5 0,1M contendo NaCl 0,5M) variando as concentrações entre os tampões A e B de 100% A e 0% B até 0% A e 100% B ao longo de 140 ml. Foram obtidas frações eluidas em 1,5ml. A presença de atividade para lacase de cada alíquota foi determinada conforme antes descrito.

3.11 Determinação do pH ótimo e temperatura ótima da lacase

Foram determinados os parâmetros de pH ótimo e temperatura ótima da lacase de forma que 10 µL da enzima pura obtido da troca iônica a 190 µL do substrato ABTS (0,5 M) solubilizado com tampões de pH 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 4,5; 5; 5,5 e 6 e então submetidas a uma temperatura de 50 °C por 10 minutos em um termociclador. Após esse período a reação foi parada com a adição de 5 µL de uma solução 1:1 de água e ácido tricloroacético.

Todos os controles foram realizados utilizando 190 µL solução do substrato e 10 µL de água ultrapura ao invés da enzima pura.

Os parâmetros de temperatura ótima foram realizados utilizando dos 10 µL da lacase pura juntamente com os 190 µL de substrato solubilizado com tampão acetato 0,1M pH 4, utilizou-se das temperaturas de:20, 30, 40, 50 e 60°C. As reações foram realizadas em um termociclador por 10 min e foram interrompidas utilizando 5 µL de uma solução 1:1 de água e ácido tricloroacético.

Após as reações, foi pipetado 200 µL de cada reação e diluídos em 800 µL de água ultrapura para que pudesse ser feito o ensaio enzimático.

3.12 Determinação do tempo de incubação da lacase do fungo *Schizophyllum commune*

Utilizando 10 µL da enzima pura e 190 µL de ABTS 0,5M dissolvido em tampão acetato pH 4, um ensaio foi realizado variando-se o tempo entre 1 e 10 minutos onde cada sequência de triplicata da reação foi parada a cada minuto com a solução 1:1 de ácido tricloroacético. Após as reações, foi-se pipetado 200 µL de cada reação e diluídos em 800 µL de água ultrapura para que pudesse ser feita a análise de espectrofotometria de absorbância a 420 nm e quantificada.

3.13 Determinação da cinética enzimática da lacase

Utilizando 10 µL da enzima pura e 190 µL do substrato ABTS diluído em tampão acetato 0,1M pH 4,0 em concentrações de: 0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,4; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 20 e 40 mM. As reações foram realizadas em um termociclador com base nos resultados do experimento de tempo de incubação, sendo interrompidas pelo procedimento antes descrito e submetidas a ensaio enzimático.

As reações foram feitas em triplicata com um controle correspondente a cada concentração de substrato feito com 190uL do substrato mais 10uL de água ultrapura

A velocidade inicial da reação (V_O) foi calculada em µmol min^{-1} mg^{-1} para cada concentração, analisando em primeiro lugar a linearidade da liberação do produto em função do tempo, para determinação do tempo de incubação. A constante de Michaelis K_m e a velocidade máxima da reação V_{max} foram calculadas conforme antes descrito.

3.14 Determinação da termoestabilidade da lacase

A termoestabilidade foi quantificada incubando 200 µL da enzima purificada a 30, 40, 50 e 60°C por 1, 10, 30, 60 e 120 minutos, então foi levada ao refrigerador a uma temperatura de 4°C por 20 min para que apenas as modificações conformacionais irreversíveis fossem aferidas por uma reação enzimática utilizando 10 µL da enzima purificada incubada juntamente com os 190 µL de substrato (ABTS 0,5M) solubilizado com tampão acetato 0,1M pH 4 a uma temperatura de 50°C por 10 min, a reação foi finalizada com a adição de 5 µL de uma solução 1:1 de água e ácido tricloroacético. Após essa etapa, foi pipetado 200 µl de cada reação e diluídos em 800 µL de água ultra pura para o ensaio enzimático. Os ensaios foram realizados em triplicata e o controle foi feito utilizando-se água ultrapura ao invés da enzima incubada (adaptado de RIEDI 2019).

3.15 Descrição do comportamento da lacase em guaiacol

Para este ensaio utilizou-se de uma solução de guaiacol 0,05mM diluído em tampões de pH:1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 5,5; 6; 6,5; 7 e 7,5. Dez µL da enzima pura foram adicionados a 190 µL do substrato de cada pH e levadas ao termociclador a 40 °C por 30 min. Após esse período as reações foram paradas utilizando 5 µL de uma solução 1:1 de ácido tricloroacético e 200 µ L de cada solução foram pipetados e misturados a 800 µL de água ultrapura e levados para análise por espectrofotometria por absorbância em um comprimento de onda de 470 nm. Com os valores obtidos foram quantificados e convertidos em atividade enzimática utilizando o coeficiente de extinção molar do guaiacol de 2,8 mM^{-1} cm^{-1} (NAKANO; ASADA, 1981).

Também foi verificada a capacidade inibitória do guaiacol. Variou-se as concentrações de; 0,05; 0,01; 0,4; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 20; 40; 80; 100; 120 e 200 mM guaiacol diluído em um tampão citrato 0,1M pH 5,5.O ensaio também foi realizado com 10 µL da enzima e 190 µL dos substratos a 40 °C por 30 min . A adição da solução 1:1 de ácido tricloroacético pararam as reações. Então cada ensaio foi coletado e adicionado 800 µL de água ultrapura e submetidos as analises conforme descrito no item anterior. Cada experimento ocorreu em triplicata com um grupo controle para cada concentração de substrato e para cada pH utilizado onde foi adicionado 10 µL de água ultrapura substituindo a enzima pura.

3.16 Zimograma

O número de lacases presentes no extrato e após a purificação foi analisado por zimograma após eletroforese não desnaturante. O procedimento foi realizado em um equipamento Biorad powerpac Universal. Nesse equipamento um gel separador de poliacrilamida de 7% e um gel de empilhamento de 5% contendo canaletas às quais foram aplicados 20 µL das amostras da enzima purificada e do extrato bruto preparadas em proporções 1:1 de enzima para tampão de amostra foram submetidos a uma voltagem de 120V por 2 horas. Após a corrida o gel foi rapidamente lavado com água ultrapura e imerso em tampão citrato 0,1 M pH 4,0 por 15 min. Com o tampão descartado é então adicionado uma outra solução tampão citrato 0,1M pH 4,0 com 1 mM de ABTS. O gel era mantido na solução com o substrato até o surgimento de faixas azul- esverdeadas (adaptado de MÁRQUEZ 2015).

3.17 Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

Foram separadas 30µL das amostras do extrato bruto, do que foi aplicado na coluna da filtração em gel, do resultado dessa cromatografia e ao final da troca iônica, esses 30 µL foram adicionados a 1,5mL do reagente Bradford por 5 minutos. O controle foi realizado adicionando 30 µL de agua ultrapura ao invés das amostras enzimáticas, o espectrofotômetro foi devidamente zerado com uma solução de 30 µL de agua e 1,5 mL de Bradford a 595nm, absorbância essa que também foi utilizada na determinação dos valores do experimento.

3.18 Degradação de corantes pelo extrato do cultivo semi-sólido de *Schizophyllum commune*

Para a determinação do potencial inicial do fungo em degradar corantes foram selecionados os corantes com presença de anéis aromáticos em sua estrutura molecular sendo eles: verde malaquita, vermelho congo, azul de bromofenol e Brilliant Blue R e G. Foram preparadas soluções com 0,001% dos corantes dissolvidos em água ultra pura (p/v) . No ensaio utilizou-se 1,1mL da solução corante que foi adicionada a um tubo de ensaio de vidro juntamente a 800 µL de tampão acetado 0,1M pH 4 e 100 µL do extrato bruto do fungo obtido do cultivo semi-sólido

Os ensaios de 2mL froam feitos em triplicata onde, no controle, agua ultra pura foi adicionada no lugar do extrato bruto. Então foram mantidos em agitação a 100 RPM para que houvesse oxigenação da solução. Foram realizados ensaios de 24 h onde após esse período foi realizado por meio de um espectrofotômetro Thermo scientific: Evolution 201 as absorbâncias na faixa de 200 até 800nm e observadas as alterações no perfil analisado (adaptado de ASGHER et al., 2008)..

3.19 Degradação de corantes pela lacase de *Schizophyllum commune*

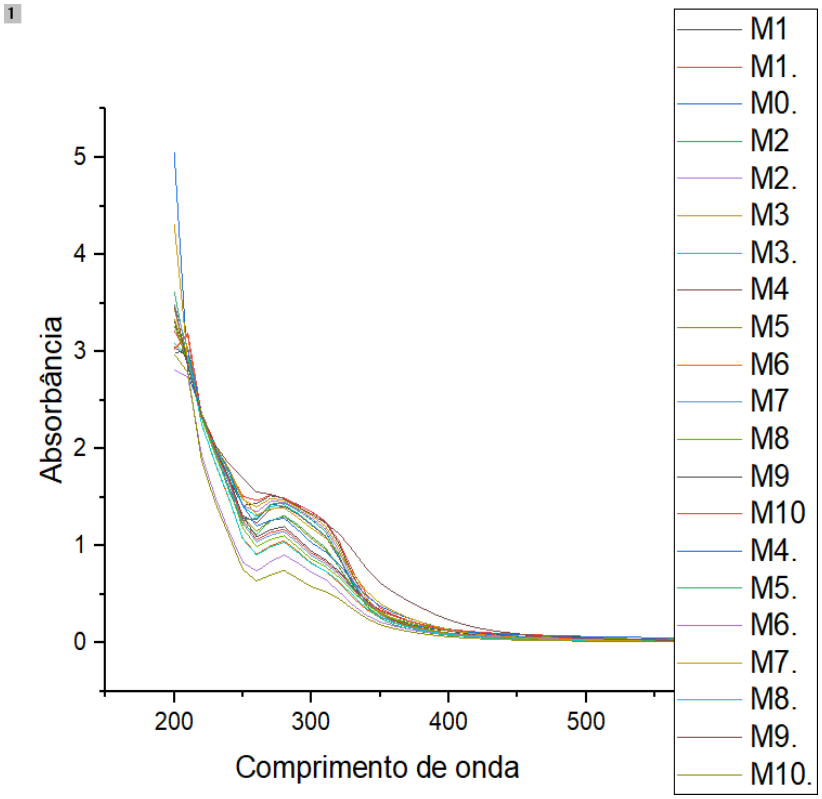
Para analisar o potencial da lacase purificada foi realizado um ensaio com os corantes em uma microplaca contendo 10 µL da enzima, 110 µL da solução corante e 80 µL de tampão de pH 3, 4 e 5 sendo realizados em triplicatas para cada valor de pH com um controle respectivo a cada pH e a cada corante onde agua ultrapura foi adicionada no lugar dos 10 µL de enzima e foram mantidos todos em agitação a 100 RPM em temperatura ambiente por 48 h dentro de uma caixa de isopor forrada com algodão umedecido para que as taxas de evaporação sejam as menores possíveis.As análises foram realizadas em um espectrofotômetro Thermo Scientific: Evolution 201 e as medidas de absorbância foram registradas em 614nm para o corante verde malaquita, 497nm para o vermelho congo e 595nm para os corantes Brilliant Blue G e R. Os resultados foram expressos em porcentagem considerando a média das absorbâncias das triplicatas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados da fermentação utilizando o licor como meio nutritivo

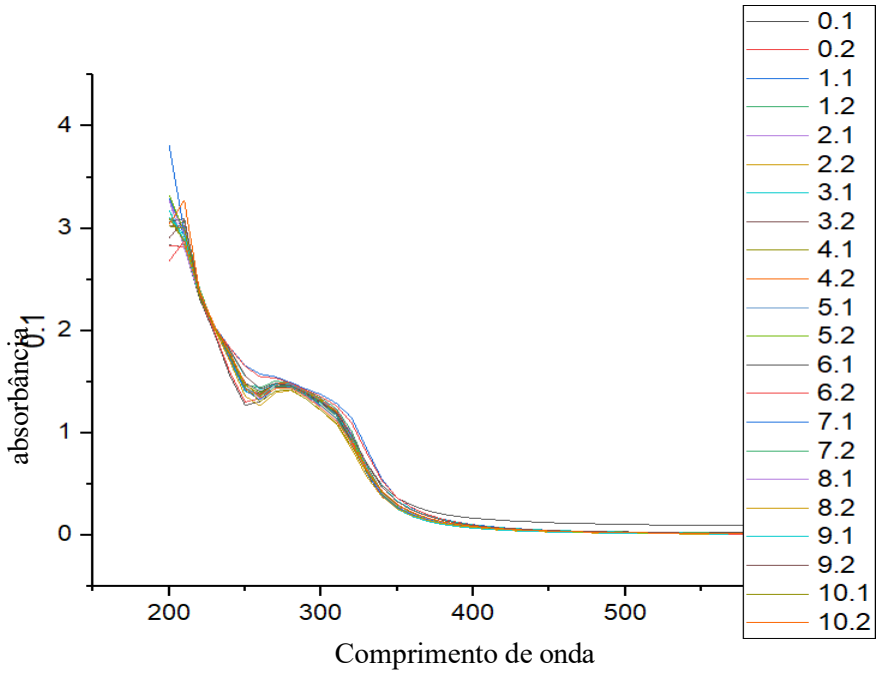
A degradação de lignina pelos fungos filamentosos em fermentação submersa contendo licor, representados por meio dos Espectros de UV-Vis na faixa de 200 – 400 nm é mostrada nas Figuras 4 e 5.

Figura 4: Espectros de absorção das amostras coletadas durante a fermentação do licor por *Perenniporia medulla-panis*



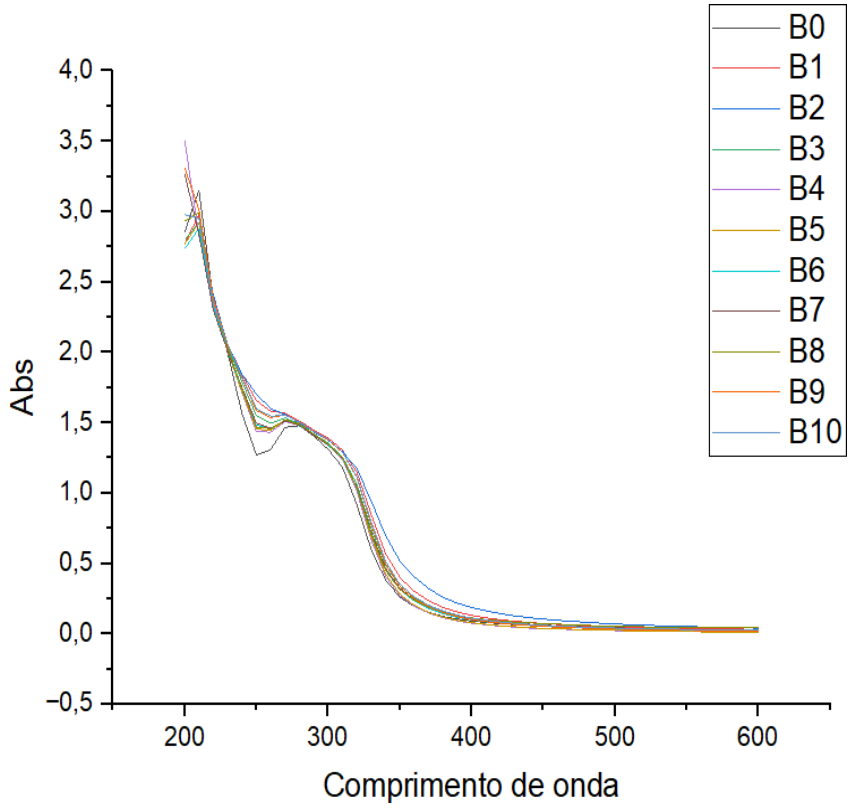
Fonte: Autoria própria.

Figura 5: Espectros de absorção das amostras coletadas durante a fermentação do licor por *Schizophyllum commune (as retas organizadas de forma X.Y onde X é tempo da coleta e Y representa uma das réplicas)*



Fonte: Autoria própria.

Figura 6: Espectros de absorção das amostras coletadas durante o controle abiótico



Fonte: Autoria própria

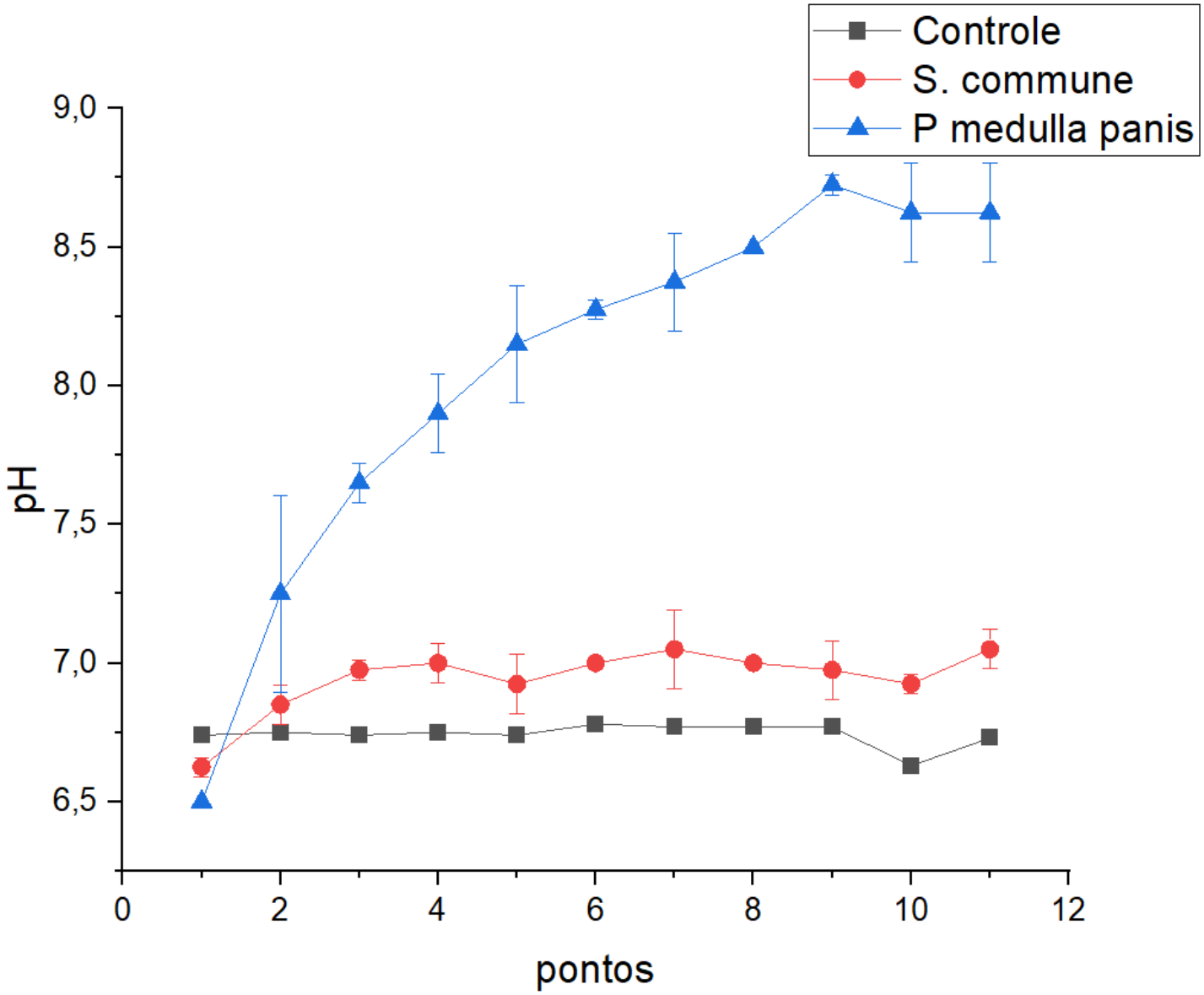
Cada linha apresentada no gráfico representa o ponto de coleta de uma das réplicas do experimento(exemplo: M1 representa a primeira coleta do fungo *M. medulla-panis* e a linha M1. representa a replica desde ponto).Como pode-se observar, houve uma alteração expressiva no perfil dos espectros de varredura na presença do fungo *Perenniporia medulla-panis*, sugerindo a degradação enzimática do substrato de lignina enquanto no gráfico apresentado de *Schizophyllum commune* indica um baixíssimo uso do substrato principal do meio pelo organismo se assemelhando muito com os dados obtidos do controle abiótico, contrariando a tabela proposta por Xavier Santos (2003).

A diferença entre os espectros observados na Figura 4 e 5, sugere não só que as espécies utilizadas produzem diferentes coquetéis enzimáticos mas também indica que existe um processo diferente de regulação e secreção dos mesmos, mesmo que o objetivo entre eles seja a degradação do substrato para produção de energia. A absorbância na região de 280 nm é obtida pela presença de grupos cromóforos, tais como ligações C=C conjugadas, anéis aromáticos e grupos fenólicos altamente densos (KOCH et al., 2003). Um alto grau de conjugação das estruturas aromáticas resulta na estabilização das ligações π-π^*, fazendo com que amplie o pico da banda de absorção na região de 280 nm (FACKLER; THYGESEN, 2013). Na fermentação, a diminuição da absorbância nesta região, destaca o processo enzimático de degradação da lignina pelos microrganismos (IDRIS et al., 2019). Além disso, pode-se observar a manutenção dos perfis de absorção nas amostras controle. Assim, uma diminuição do pico de absorção em 280 nm é um indício importante de que o teor de lignina nas amostras diminuiu durante a fermentação.

4.2 Resultados do monitoramento do pH do meio de cultura e atividade enzimática da lacase

O pH do meio de cultura inoculado e do controle abiótico foi monitorado e os resultados são mostrados nas figuras 6 e 7.

Figura 7: Monitoramento do pH da fermentação submersa em licor



Fonte:autoria propria

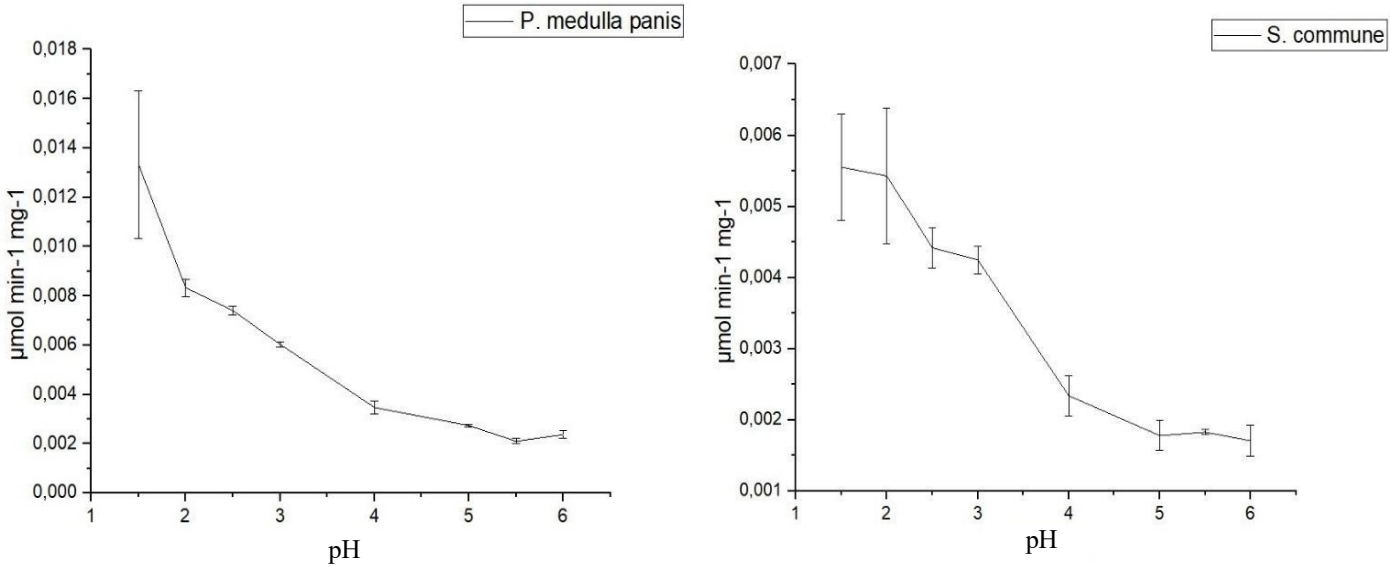
No Gráfico, o controle abiótico (figura 7) pode se observar uma baixa variação no pH do meio de cultura, indicando pouca ou nenhuma atividade das oxirredutases responsáveis pela degradação da lignina, o que ja era de se esperar ja que no controle abiotico não existem microrganismos secretando essas substâncias.

Na Figura 7 podemos observar que houve uma alcalinização do pH do meio entre o ponto inicial e o terceiro no período das primeiras 72 horas de fermentação, indicando a presença de atividade de oxirredutases como a lacase responsáveis pela degradação da lignina em ambas as espécies.

Podemos observar tambem uma significativa alcalinização do meio da especie *P medulla-panis* indicando uma alta atividade catabólica da lignina pelas enzimas do fungo, mas, é importante lembrar que as oxirredutases do arsenal lignolítico podem não só degradar a lignina, mas também realizar outras funções metabólicas como a desestruturação da macromolécula da lignina, oxidação de fenólicos livres, e de outros compostos aromáticos que podem estrar presentes no meio de cultura e não necessariamente fazem parte da estrutura macromolecular da lignina.

No que diz respeito à atividade enzimática da lacase, foi determinado o pH ótimo da enzima em ambas as espécies (figura 8 A e B).

Figura 8: Determinação da atividade de lacase em função do pH nas duas espécies.

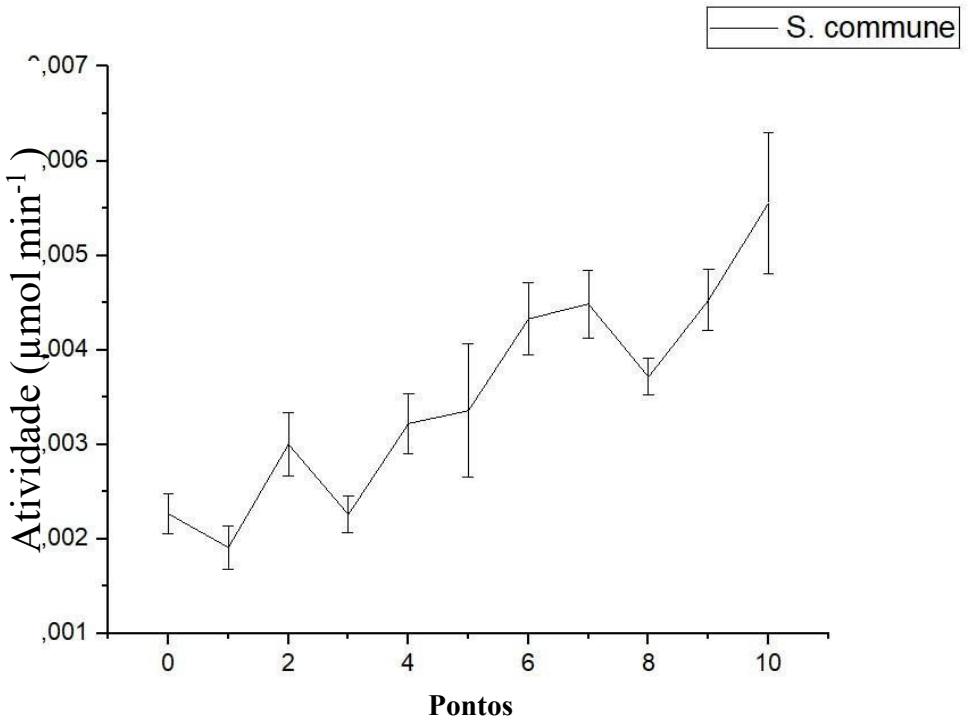


Fonte: Autoria própria.

Com os gráficos podemos inferir que as lacases de ambos os fungos possuem um funcionamento ótimo em um pH extremamente ácido (1,5 para o *P. medulla-panis* e entre 1,5 e 2 para o *S. commune*). A elevada atividade em solução ácida é uma característica conhecida e já descrita das lacases (ASGHER et al., 2016; IRSHAD; ASGHER, 2011; KIRTZEL et al., 2017; KOLOMYTSEVA et al., 2017), o que se mostra um problema para o presente trabalho, pois existe uma alcalinização do meio onde as enzimas são secretadas prejudicando em geral a degradação da lignina.

Apesar dessa inibição enzimática pela alcalinização do meio, a atividade da lacase se mostrou superior no final do experimento aos 20 dias de fermentação submersa para o fungo *S. commune* como indicado na figura 9.

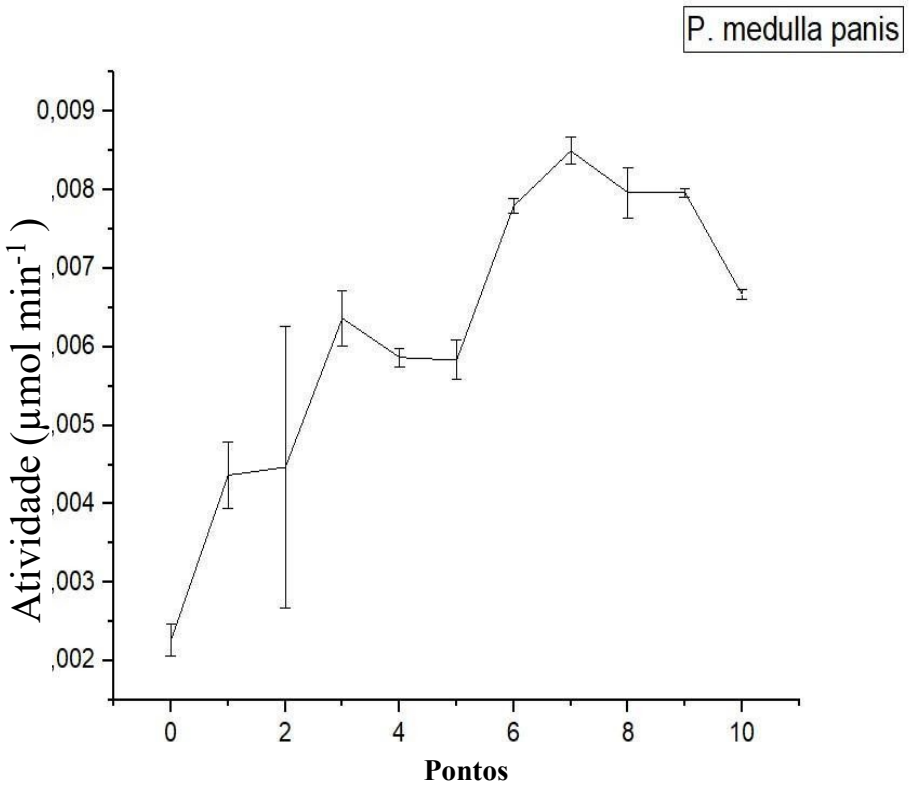
Figura 9: Determinação da atividade de lacase do *S. commune* em pH 1,5 ao longo de 20 dias.



Fonte: Autoria própria

Enquanto o fungo *P. medulla-panis* apresentou uma atividade superior no sétimo dia de fermentação além de demonstrar um valor de atividade superior ao *S. commune* podendo indicar um maior potencial secretor graças a sua forma de crescimento segmentado em meio líquido aumentando a superfície de contato do meio com suas hifas apicais secretoras, enquanto o *S. commune* que apresenta um crescimento em meio líquido mais denso e unificado não teria tal vantagem

Figura 10: Determinação da atividade do *P. medulla-panis* em pH 1,5 ao longo de 20 dias usando substrato ABTS.



Fonte: Autoria própria

4.3 Resultado do cultivo semi-sólido em farelo de trigo

O cultivo semi-sólido em farelo de trigo proposto por Xavier Santos et al. (2003) se provou extremamente eficiente no que diz respeito ao crescimento do micélio do fungo *S. commune* que ao final do processo de 28 dias já possuía um micélio bem estabelecido e começou a produzir seus corpos de frutificação característicos.

Figura 11: Crescimento do cultivo do fungo *S. commune* erlenmeyer completamente tomado pelo micélio



Fonte: Autoria própria

No fungo mostrado nas imagens acima os resultados foram condizentes com aqueles propostos por Xavier Santos et al. (2003). O fungo *S. commune* apresentou um ótimo crescimento no substrato e produziu as lacases que puderam ser purificadas e aplicadas nesse estudo. No entanto o fungo *P. medulla-panis* não apresentou o crescimento esperado nas condições aplicadas, não se observou o crescimento do micélio nem a produção de lacases.

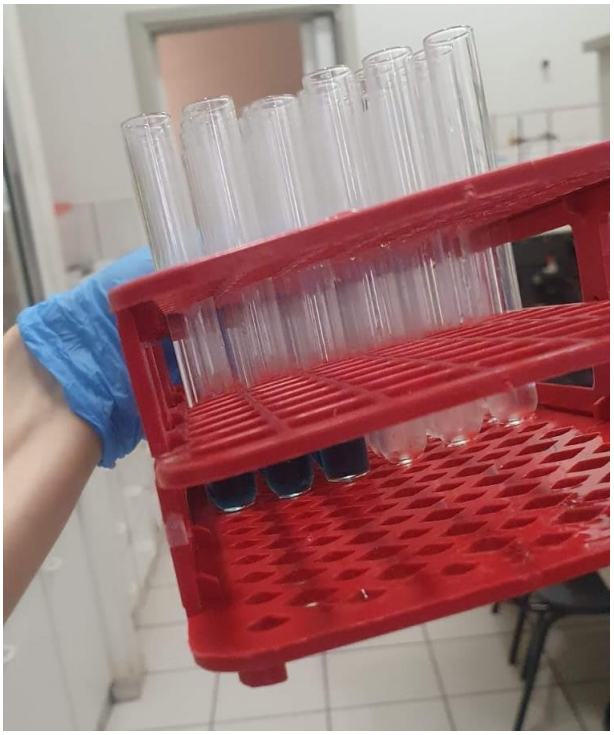
igura 12: Comparação dos caldos da fermentação em estado semi-solido em farelo de trigo onde a cima temos o resultado do cultivo do *P. medulla-panis* nos béqueres de vidro, no béquer de plástico o controle do cultivo abiótico e na parte de inferior temos o caldo resultante do cultivo do fungo *S. commune*.



Fonte: Autoria própria

Podemos notar uma nítida diferença na coloração e turbidez do extrato entre as espécies, podendo ser um indicativo do sucesso do processo de cultivo dos fungos. Na literatura existem diferentes métodos de cultivo no intuito de otimizar a produção de lacases com diferentes resíduos agroindustriais como no trabalho de IRSHAD; ASGHER, (2011) que utilizaram o cultivo solido em talos de bananeira e KUMAR; NAIK; SRIDHAR, 2015) que realizaram uma fermentação submersa com o micélio do fungo *S. commune* foi imobilizado em cubos de PUF (*Porous polyurethane foam*) obtendo bons resultados apesar da natureza do cultivo submerso não ser a ideal para cultivos de fungos filamentosos que são adaptados evolutivamente a substratos sólidos.

Figura 13: Resultado visível das diferenças dos ensaios de atividade para lacases no extrato bruto. Temos à esquerda as reações do extrato do fungo *S. commune* e à direita os do fungo *P. medulla-panis*

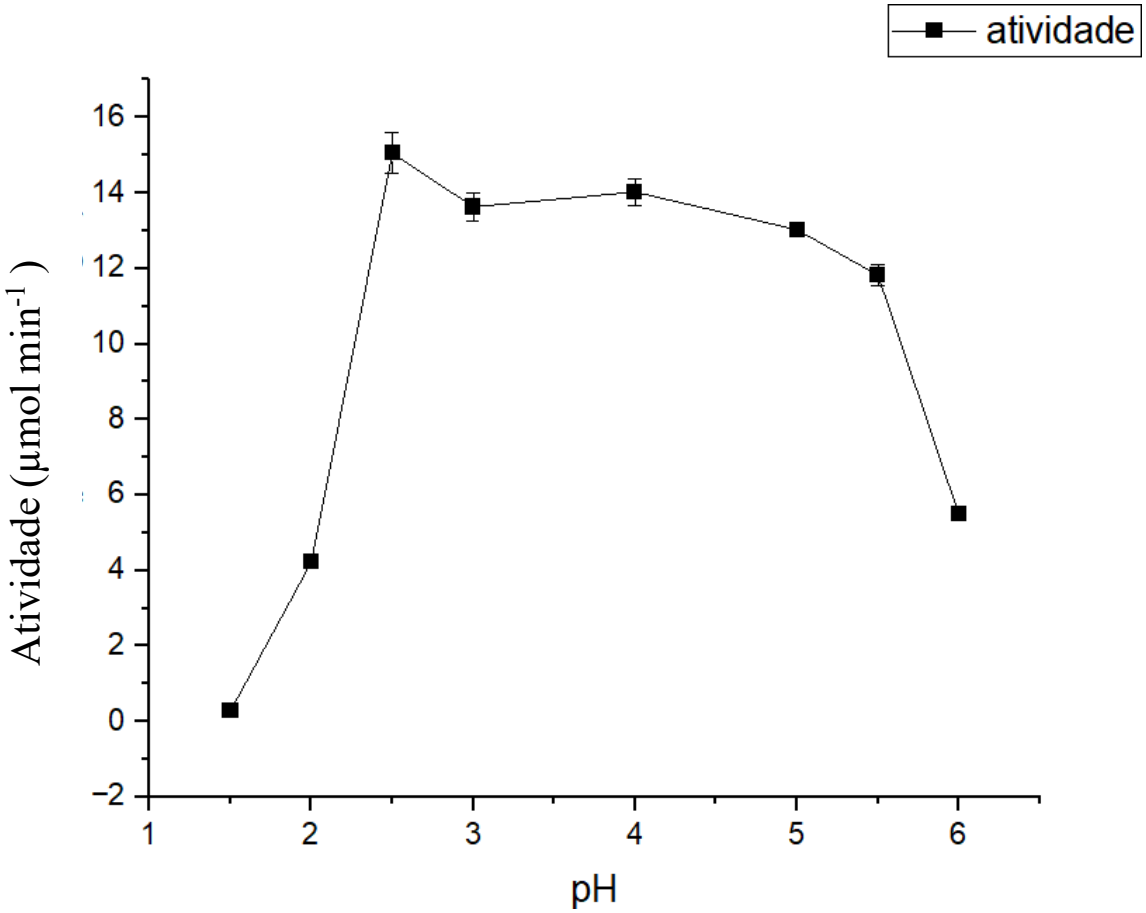


Fonte: Autoria própria

4.4 Caracteristicas das lacases no extrato bruto de *S. commune*

Os experimentos mostraram que o potencial das lacases no extrato bruto em oxidar tanto o ABTS quanto o guaiacol foi significativo. Muitas das reações precisaram de inúmeras diluições para que pudéssemos aferir o valor da absorbância, chegando em alguns casos a diluições de 100x nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60°C quando combinadas com os tampões de pH 3, 4 e 5, surgindo então as primeiras indicações para quais seriam as características das enzimas secretadas, lacases acidófilas e funcionais em temperaturas encontradas no hábitat onde o fungo foi encontrado (Mirassol-SP) podendo ser de certa forma descrita como uma lacase fúngica clássica como descritas em KIRTZEL et al. (2017).

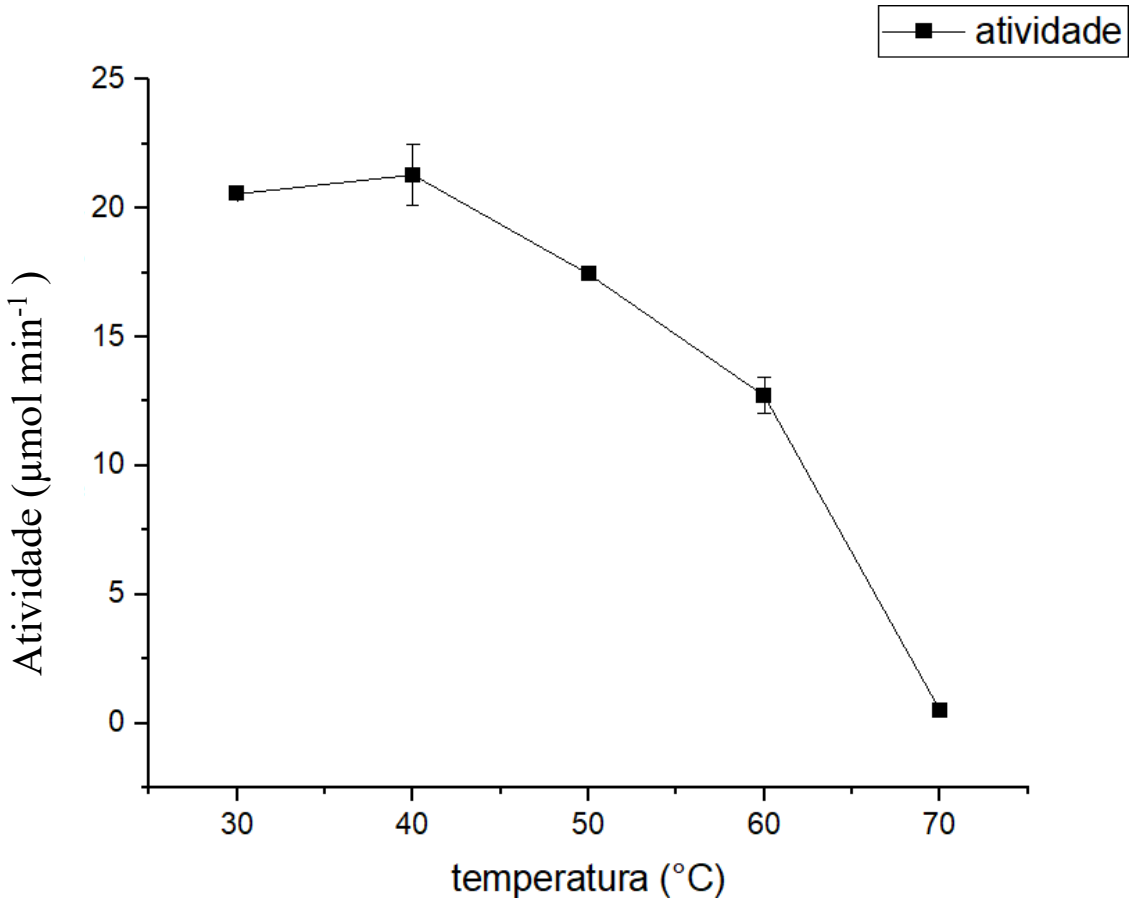
Figura 14: Gráfico representando a atividade das lacases do extrato bruto de *S. commune* em diversos valores de pH usando ABTS como substrato.



Fonte: Autoria própria

Na imagem 14 podemos observar que as lacases presentes no extrato apresentam uma atividade considerável nos pHs de valores 2,5; 3; 4 com a queda de atividade ocorrendo após o pH 5,5. Foi constatada uma maior atividade em pH 2,5 em relação aos demais.O comportamento da lacase descrita é típico atuando otimamente de pH de valores ácidos (<7). O trabalho de ASGHER et al., 2016 que cultivou a mesma espécie de fungo em palha de arroz, obteve valores semelhantes quanto ao pH do extrato geral obtido do cultivo com valores maiores entre o pH de 3 e 5 demonstrando uma queda a partir do pH 6.

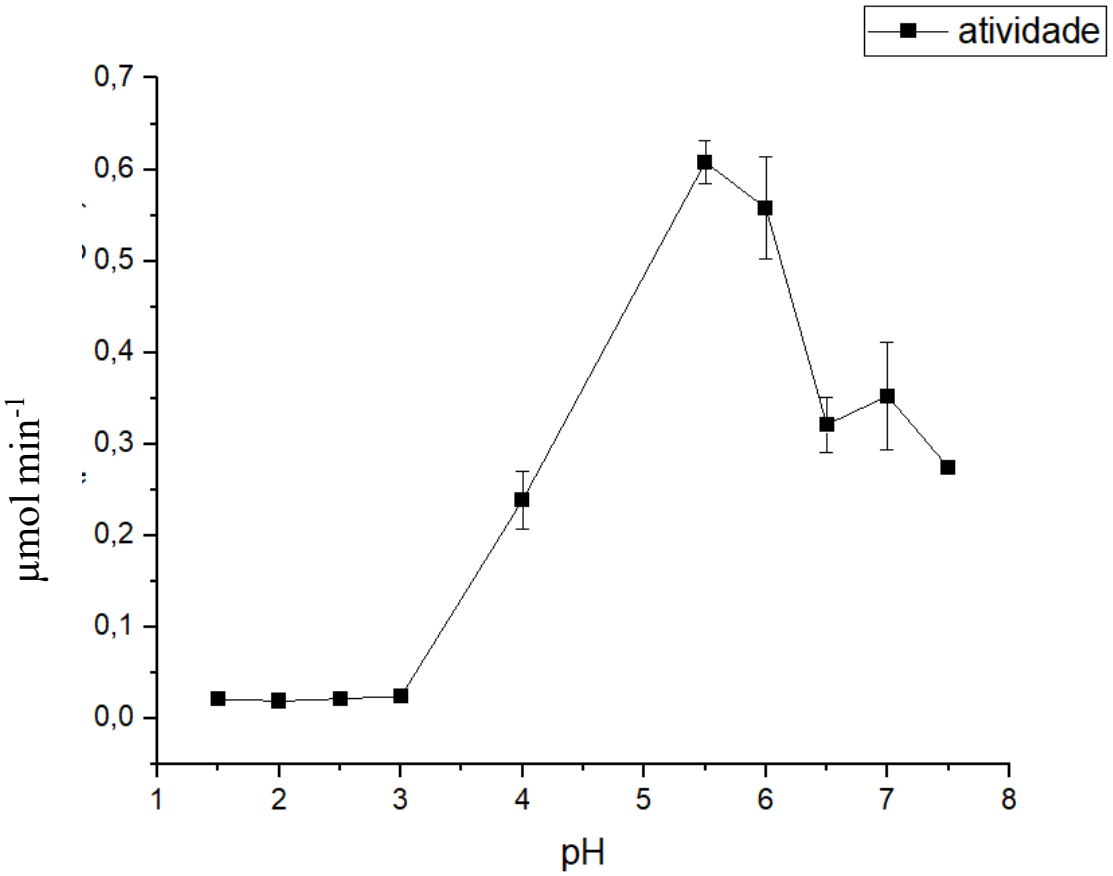
Figura 15: Gráfico representando a atividade das lacases do extrato bruto de *S. commune* em diversos valores de temperatura usando ABTS como substrato.



Fonte: Autoria própria

Pode-se observar que na faixa de 30 a 40°C a atividade permaneceu constante e apresentou uma queda evidente para de 50°C; essa característica mesofílica das lacases presentes no extrato pode estar correlacionado com o fungo estudado, o fungo *S. commune* é capaz de ocupar diversos nichos desde a matéria em decomposição em uma floresta tropical até mesmo o subsolo marinho, mas ele é classificado como mesofilico por TENKANEN; SIIKA-AHO, (2000) o que pode explicar essa característica no panorama geral das lacases.

Figura 16: Gráfico representando a atividade das lacases do extrato bruto de *S. commune* em diversos valores de pH usando guaiacol como substrato.



Fonte: Autoria própria

Na figura 16 podemos observar o efeito do pH sobre a atividade das lacases presentes no extrato bruto, porém com um diferente substrato, o guaiacol. É notável a diferença no comportamento da enzima com um pico de atividade no pH 5,5 mantendo uma atividade em valores superiores aqueles mostrados com o substrato ABTS também é observado a ausência de atividade em valores inferiores ao valor de pH 4, confirmando que o pH ótimo da enzima não é dependente apenas da estrutura e conformação das enzimas, mas também do substrato oxidado, que pode possuir diferentes potenciais de oxidação/redução em diferentes pH assim como as lacases poderiam ter diferentes potenciais de oxidação/redução em diferentes pH. O trabalho de XU, 1997 descreve os efeitos do potencial redutor no perfil da atividades de lacases fúngicas em relação ao pH onde é demonstrado que existe sim uma diferença entre os potenciais redutores de diferentes lacases e de diferentes substratos conforme um gradiente de pH, onde

pode se observar o aumento do potencial redutor da lacase de *Rhizoctonia solani* (isoforma 4) conforme se aumentava o pH

4.5 Purificação

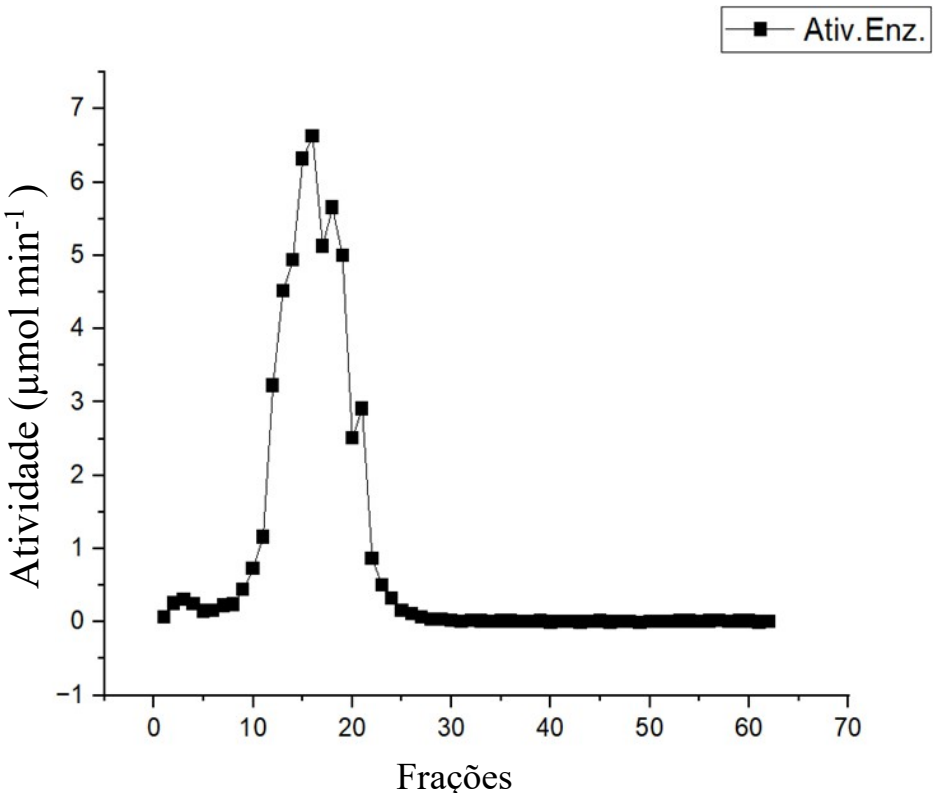
Tabela 1: Tabela de purificação da lacase de *S. commune*

	Volu-me (mL)	Proteína (mg/mL)	Prot. Total (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade total (U)	Atividade especifica (U/mg)	Rendimen-to (%)	Grau de Purificação
Extrato	48,0	0,50	24,01	120,89	5.803,16	241,63	100,0	1,0
Precipita-ção	18,0	0,99	17,90	453,71	8.166,90	456,08	140,7	1,9
Filtração em Gel	15,0	0,05	0,72	77,09	1.156,37	1.600,61	19,9	6,6
Troca iônica	6,0	0,02	0,10	182,51	1.095,09	11.032,98	18,9	45,7

Autoria: Autoria própria

Comparando com o trabalho de KUMAR; NAIK; SRIDHAR, 2015 que utilizou de outros métodos de purificação para a lacases de *S. commune*, o presente trabalho obteve um maior rendimento na purificação, que pode ser atribuído por exemplo nas diferentes colunas de exclusão molecular onde KUMAR; NAIK; SRIDHAR, 2015 utilizou de uma coluna Sephadex G-50 enquanto o presente trabalho utilizou de uma G-75 combinada com uma troca iônica em Q-Sepharose.

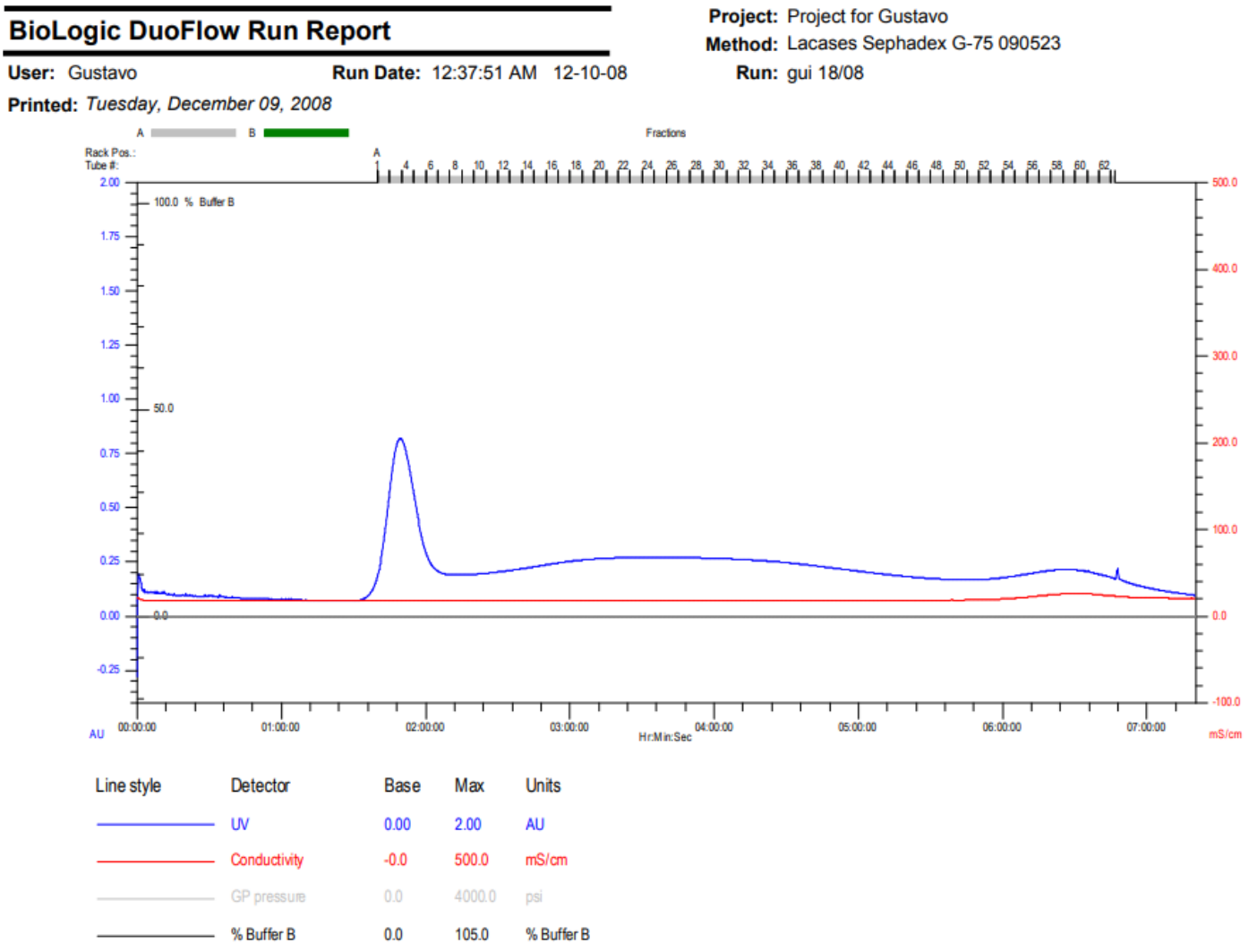
Figura 17. Perfil de atividade após a cromatografia de filtração em gel da lacase de *S. commune*



Fonte: autoria própria

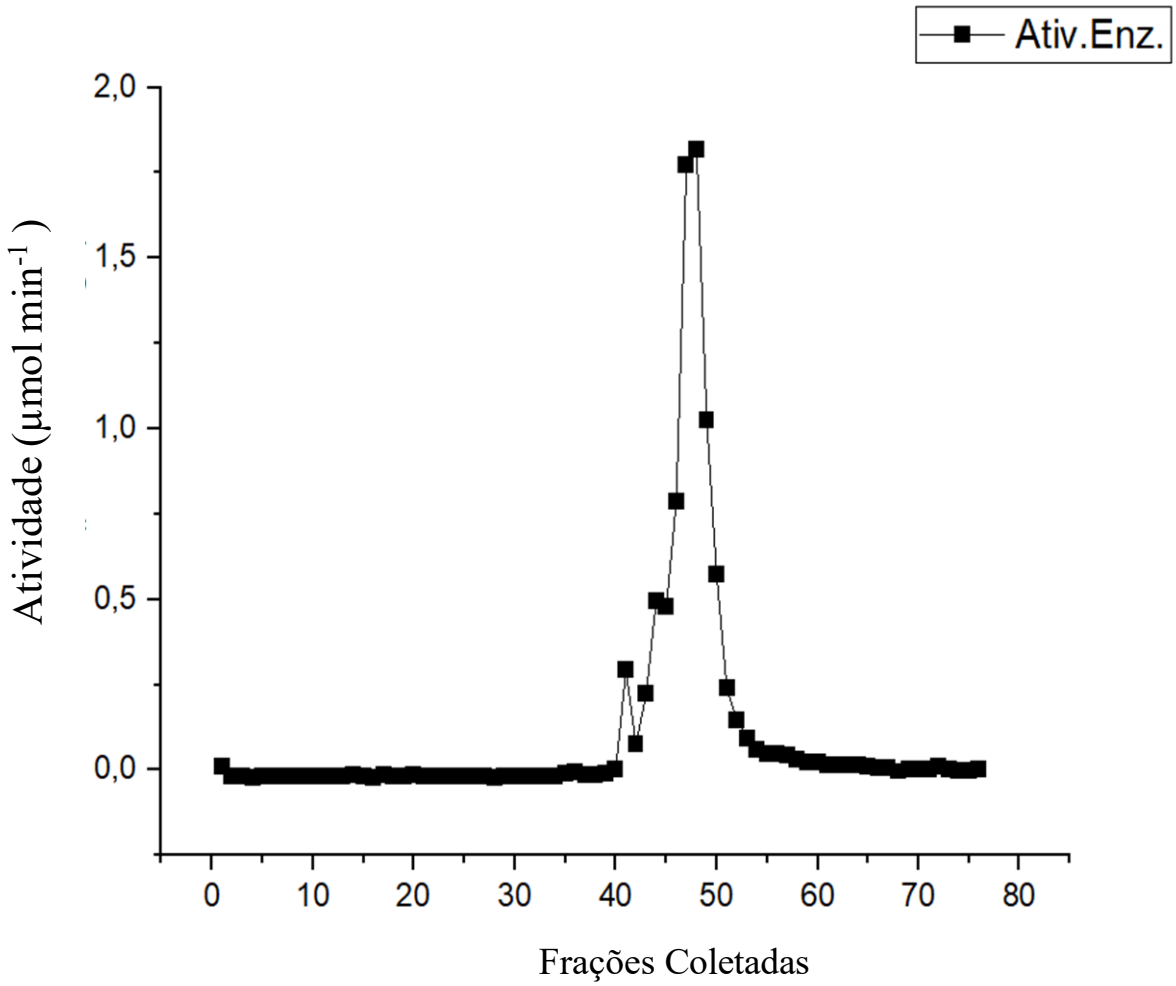
É notado também um perfil diferente na cromatografia de gel filtração, a lacase foi eluida majoritariamente nas frações de 48 a 61mL(incluindo a fração de 1 a 30 mL que não foram coletados por ser o volume morto).

Figura 18:Perfil cromatografico da gel flitração do extrato bruto preciptado



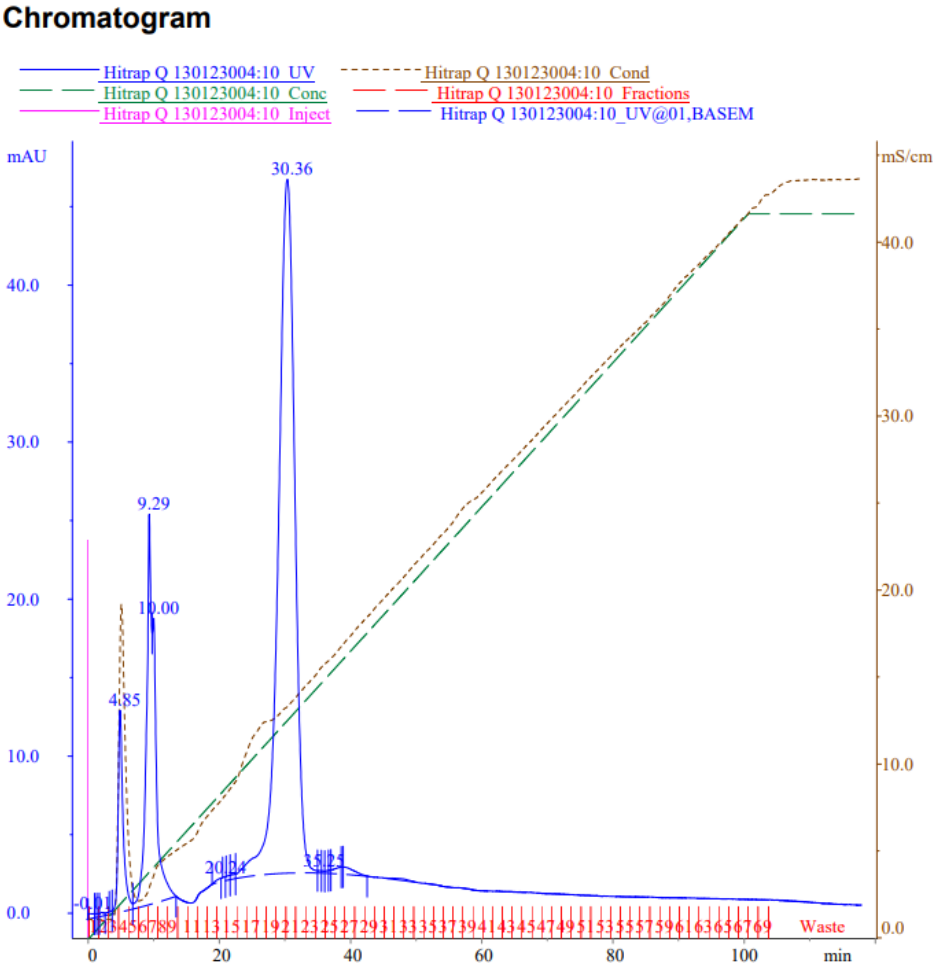
Fonte: autoria própria

Figura 19. Perfil de atividade após cromatografia de troca iônica da lacase de *S. commune*



Fonte: Autoria própria

Figura 20. Perfil da cromatografia de troca iônica da lacase de *S. commune*



Fonte: Autoria própria

Após a troca iônica obtivemos uma única isoforma da lacase demonstrada no zimograma, a troca iônica foi responsável por concentrar a lacase em poucos pontos eluidos entre 74 e 88,5mL (incluindo os 15mL iniciais descartados), estes que foram coletados e misturados, mantidos sobre refrigeração a 4°C, pois a enzima apresentou uma característica que perdia sua atividade caso congelada.

4.6 Zimograma

O zimograma foi uma das partes mais desafiadoras de se executar do trabalho, a adaptação de métodos para realidade do laboratório foi essencial e o desenvolvimento de estratégias como utilizar o tampão da corrida do zimograma gelado, e realizar a corrida dentro da geladeira foram definitivos para que a lacase permanecesse ativa até o fim da corrida.

Figura 21: Zimograma comparando as lacases presentes no extrato e após o processo de purificação



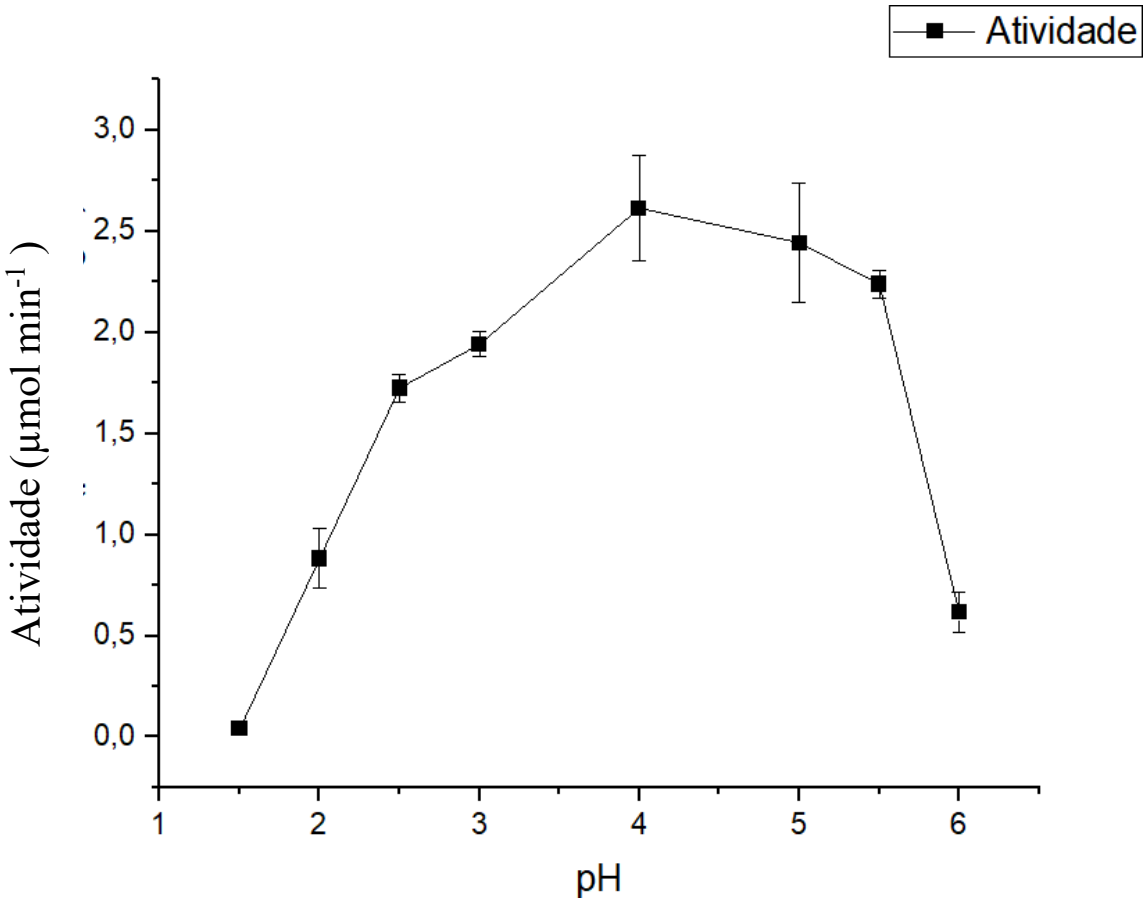
Fonte: Autoria própria

Pode se observar no extrato a presença de uma lacase com atividade intensa e o que poderiam ser lacases com menor atividade logo após essa banda, na porção inferior, enquanto no material purificado fica aparente apenas uma banda correspondente à de maior atividade no extrato, sugerindo que o método de purificação escolhido foi eficiente em isolar a lacase para o estudo.

4.5 Caracterização da lacase de *S. commune* purificada

A lacase do fungo apresentou pH ótimo de valor 4 (figura 23) quando o ensaio foi realizado com o substrato ABTS, apresentando faixas diferentes dos ensaios realizados com o guaiacol que apresentou seu pH ótimo como uma faixa entre os pHs de 5 a 7 com um pico mais notável em pH 5, podendo estar relacionado com o fato de o guaiacol ser encontrada no ambiente do fungo que pode ter passado por pressões evolutivas que levaram essas lacases a uma adaptação de forma que seja capaz de oxidar moléculas naturais em uma abrangência maior de pHs em decorrência a alterações ambientais que podem estar sujeitos.

Figura 22: Gráfico representando a atividade da lacase purificada de *S. commune* em diversos valores de pH usando ABTS como substrato.

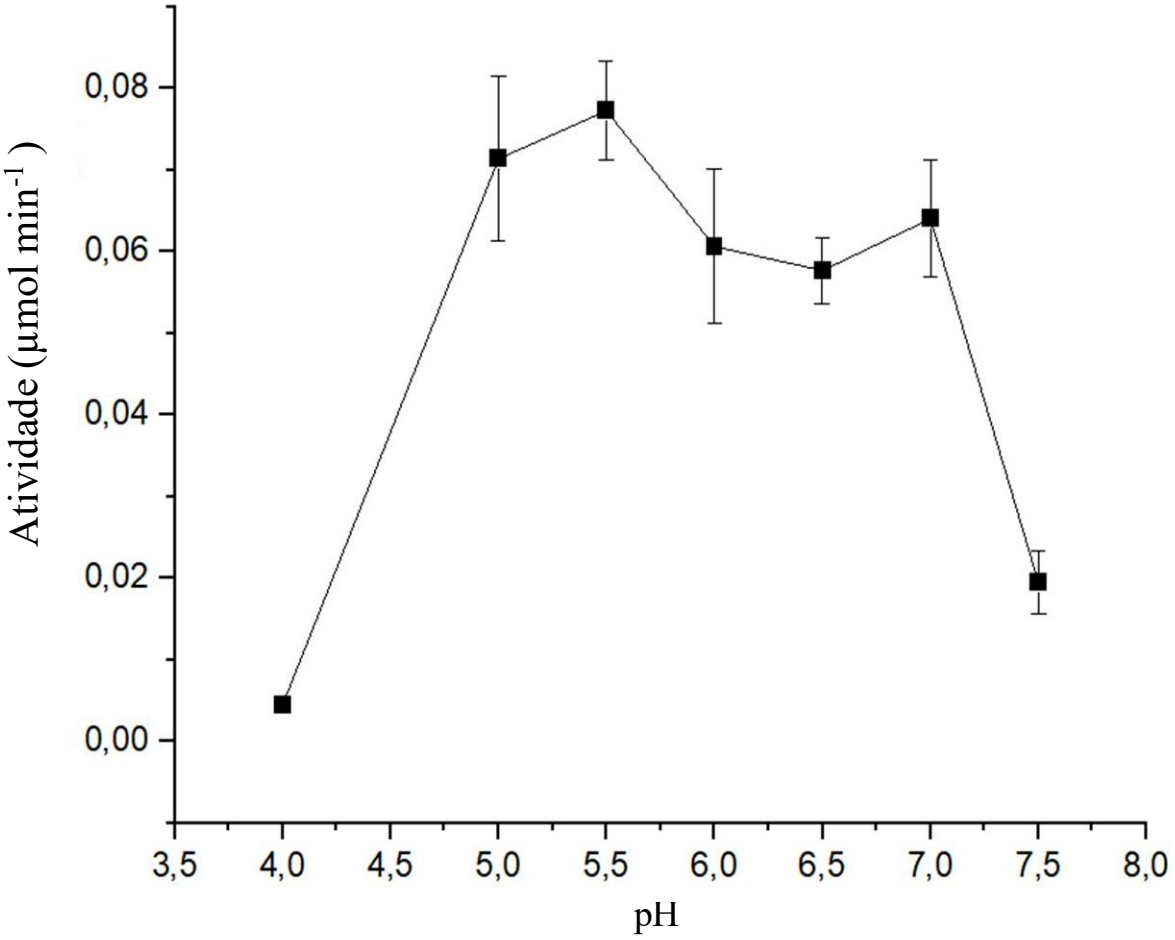


Fonte: Autoria própria

No trabalho de KOLOMYTSEVA et al., 2017 são descritas várias lacases puras dos fungos *Lentinus strigosus*, *Pholiota highlandensis*, *Polyporus arcularius* e *Steccherinum ochraceum* e seus comportamentos em relação ao pH e ao substrato reforçando a variabilidade do pH ótimo das lacases em relação ao substrato. Vale ressaltar que o pH ótimo da enzima

purificada foi diferente daquele encontrado no extrato bruto tanto para o ABTS quanto para o guaiacol, sendo o valor observado no experimento com a lacase isolada mais confiável pois substâncias presentes no extrato e outras proteínas contaminantes podem possuir um efeito tamponante por exemplo

Figura 23: Gráfico representando a atividade da lacase purificada de *S. commune* em diversos valores de pH usando guaiacol como substrato.

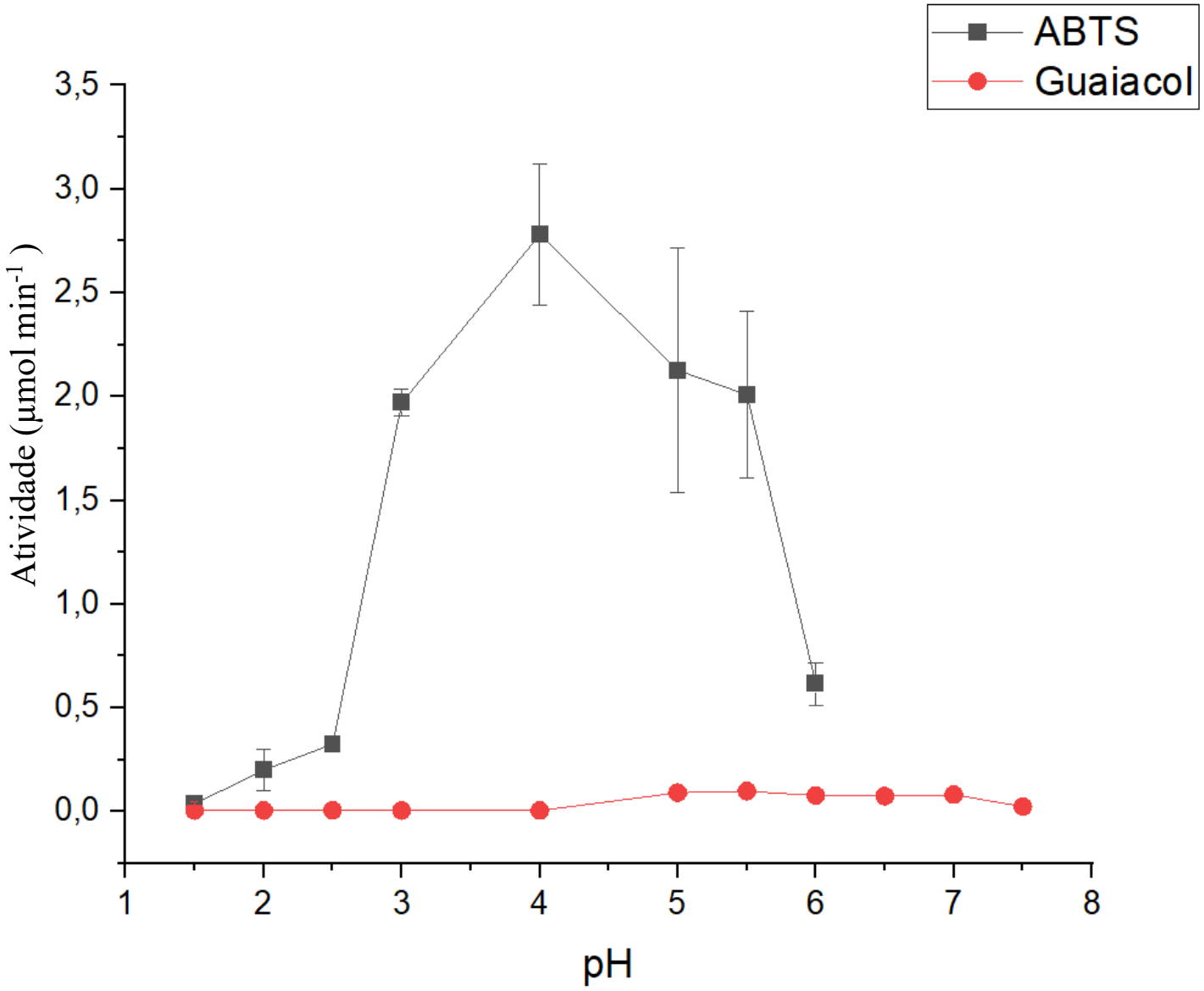


Fonte: Autoria própria

Quanto à temperatura ótima os ensaios mostraram altas taxas de reação entre as temperaturas de 30, 40, 50 e 60°C com um pico maior na temperatura de 50°C. O fungo *S. commune* possui uma abrangência ecológica imensa então temos lacases extremamente diferentes dentro da mesma espécie o trabalho de KUMAR; NAIK; SRIDHAR, 2015 descreve uma lacase do fungo de mesma espécie utilizando o ABTS como substrato e obtendo valores

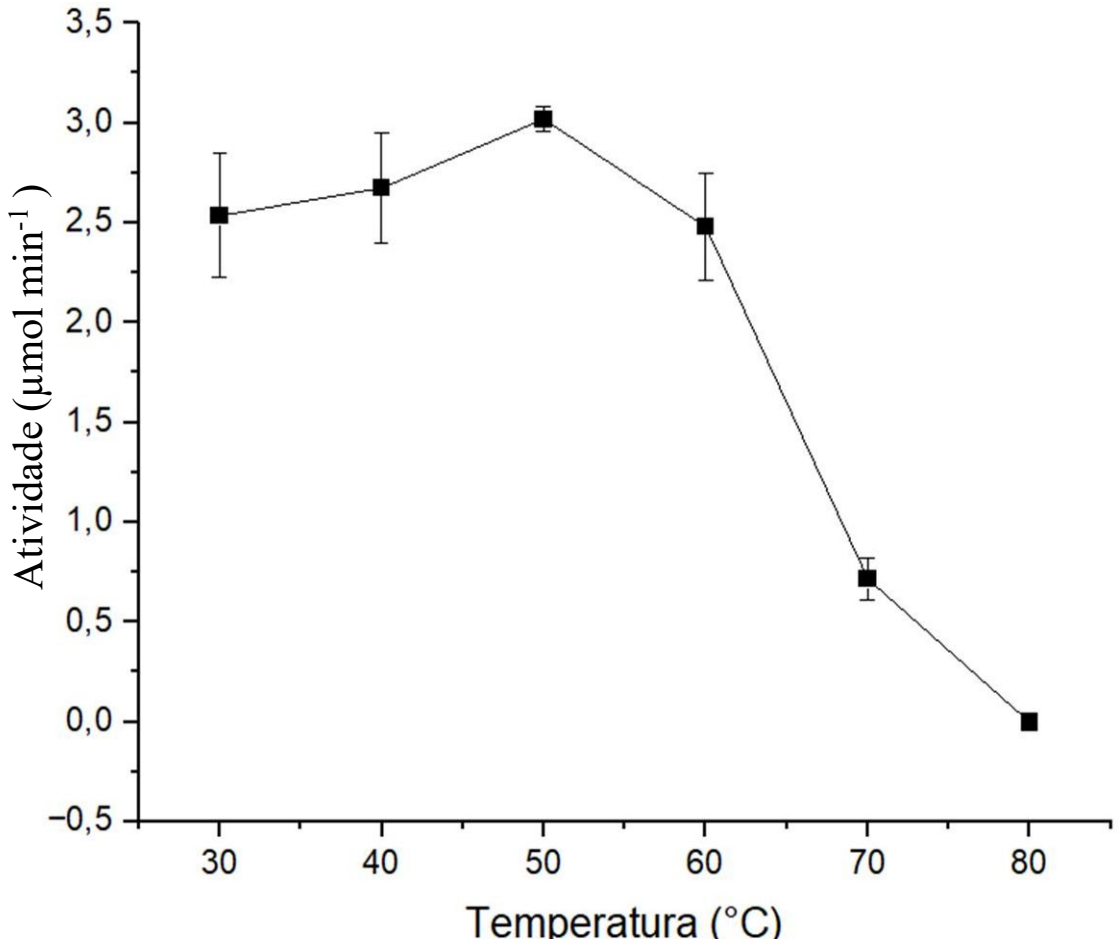
muito semelhantes ao encontrado no ensaio no quesito pH onde se descreve uma lacase com pH ótimo de 4,46 porém com temperatura ótima inferior, de 30°C.

Figura 24: Gráfico comparativo das atividades da lacase purificada *S. commune* em diversos valores de pH em guaiacol e ABTS



Fonte: Autoria própria

Figura 25: Gráfico representando a atividade da lacase purificada de *S. commune* em diversos valores de temperatura no ABTS

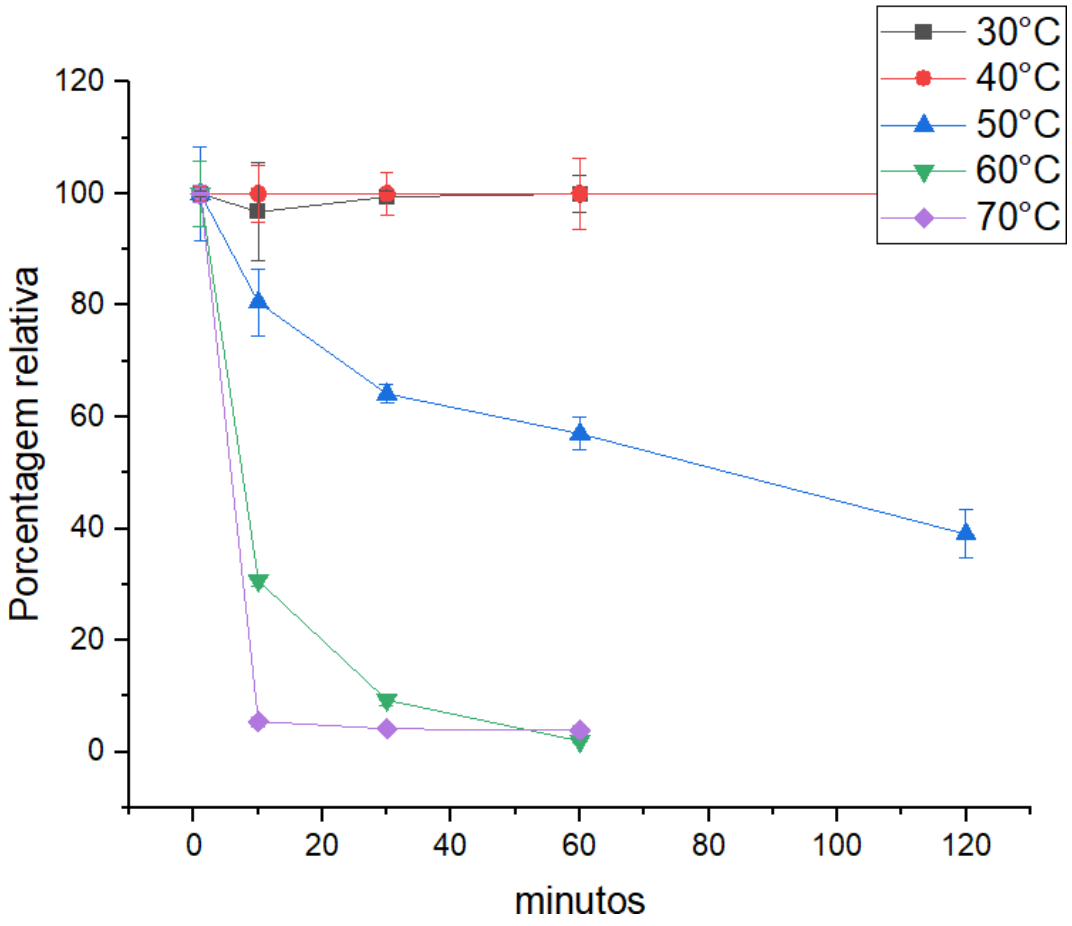


Fonte: Autoria própria

No que diz respeito à termoestabilidade o trabalho de KUMAR; NAIK; SRIDHAR, 2015 descreve uma enzima de *S. commune* mais termoestável do que a observada nesse presente trabalho onde se obteve atividades em exposições de 120 min em temperaturas de até 80°C enquanto a do presente trabalho perdia sua atividade em exposições menores de 30 min a 70°C porém foi capaz de manter uma atividade em temperaturas de 40°C por 120min e em 50°C ao

final do experimento obtivemos 39% da atividade em relação a enzima não exposta demonstrando que 50°C já seria suficiente para desnaturar a lacase purificada.

Figura 26: Gráfico representando a atividade relativa da lacase purificada de *S. commune* em diversos valores de temperatura e tempos de exposição no ABTS

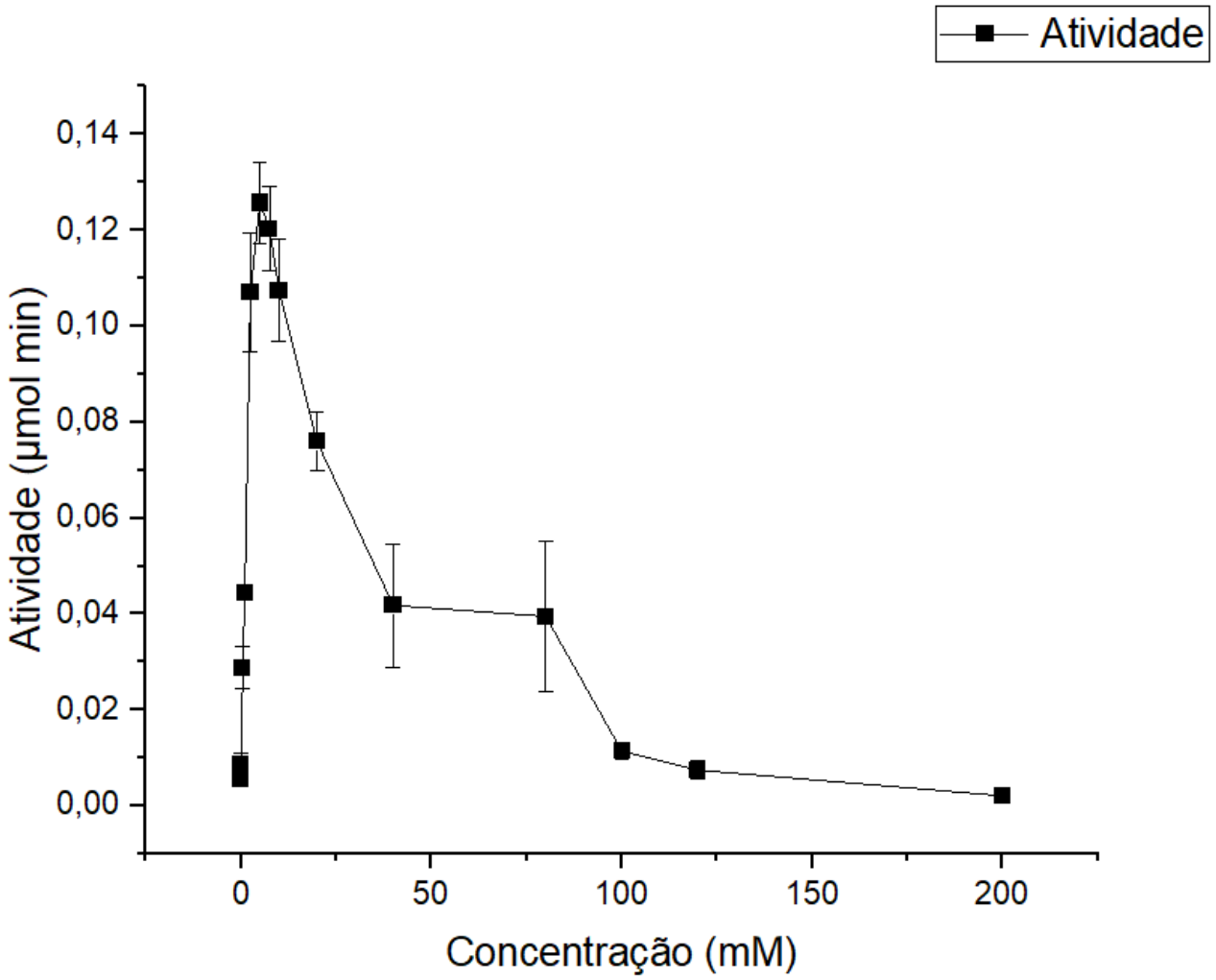


Fonte: Autoria própria

Foi observado também que o composto guaiacol pode funcionar de duas maneiras na lacase estudada, a primeira, em concentrações baixas entre 5-7,5 mM o composto funciona como substrato sendo oxidado normalmente pela enzima, porém conforme se aumenta a concentração o guaiacol começa a inibir a enzima que na concentração de 200mM não apresentou atividade, sendo assim mais uma diferença entre o substrato ABTS mais comumente utilizado na literatura. O trabalho de KOKKONEN et al., 2020 descreve a inibição de uma enzima

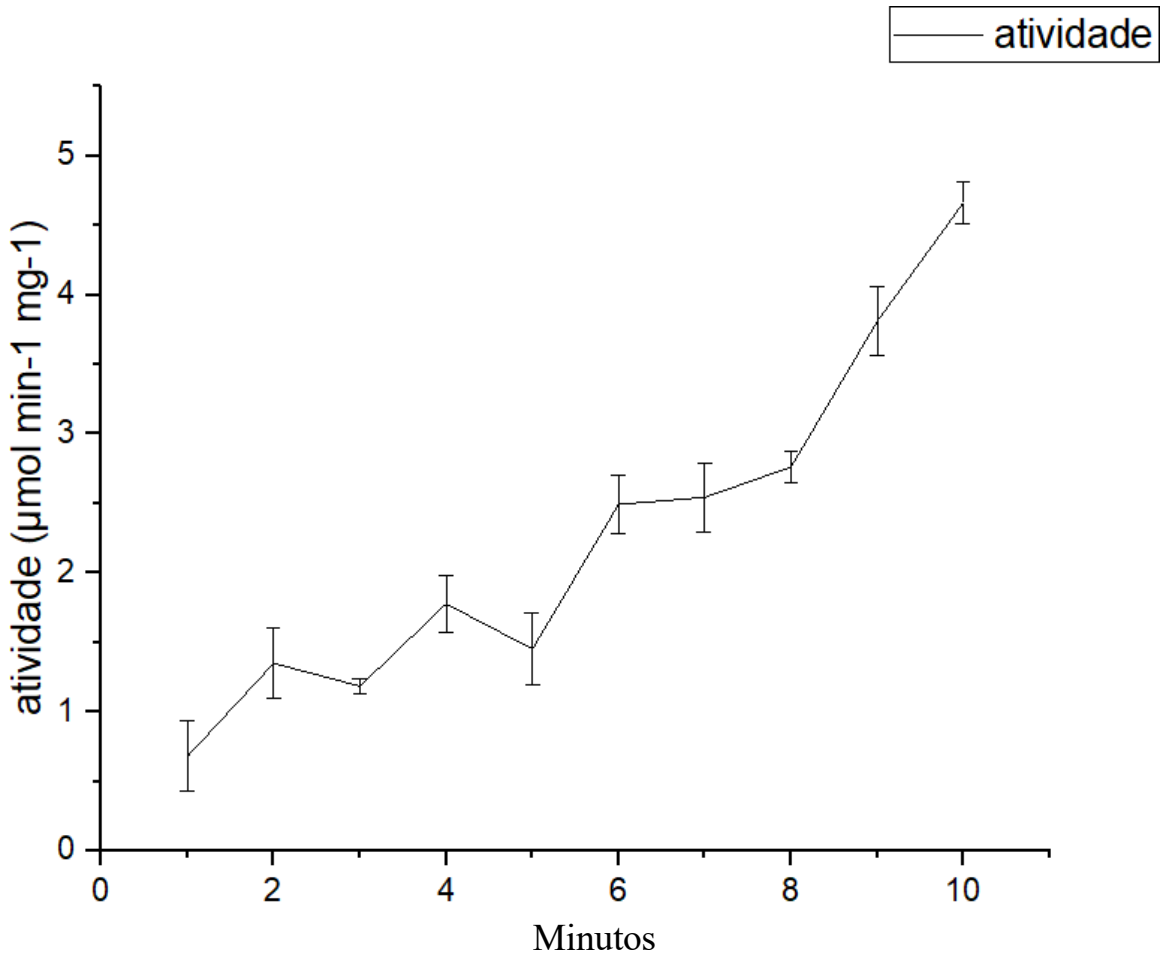
haloalcano dehalogenase pelo próprio substrato sendo o desvio mais comum dos parâmetros da curva cinética de Michaelis–Menten estimando-se que possa ocorrer em até 25% das enzimas.

Figura 27: Gráfico representando a atividade da lacase purificada de *S. commune* em diversas concentrações de guaiacol.



Fonte: Autoria própria

Figura 28: Gráfico representando o tempo de incubação da lacase purificada de *S. commune* usando ABTS como substrato.

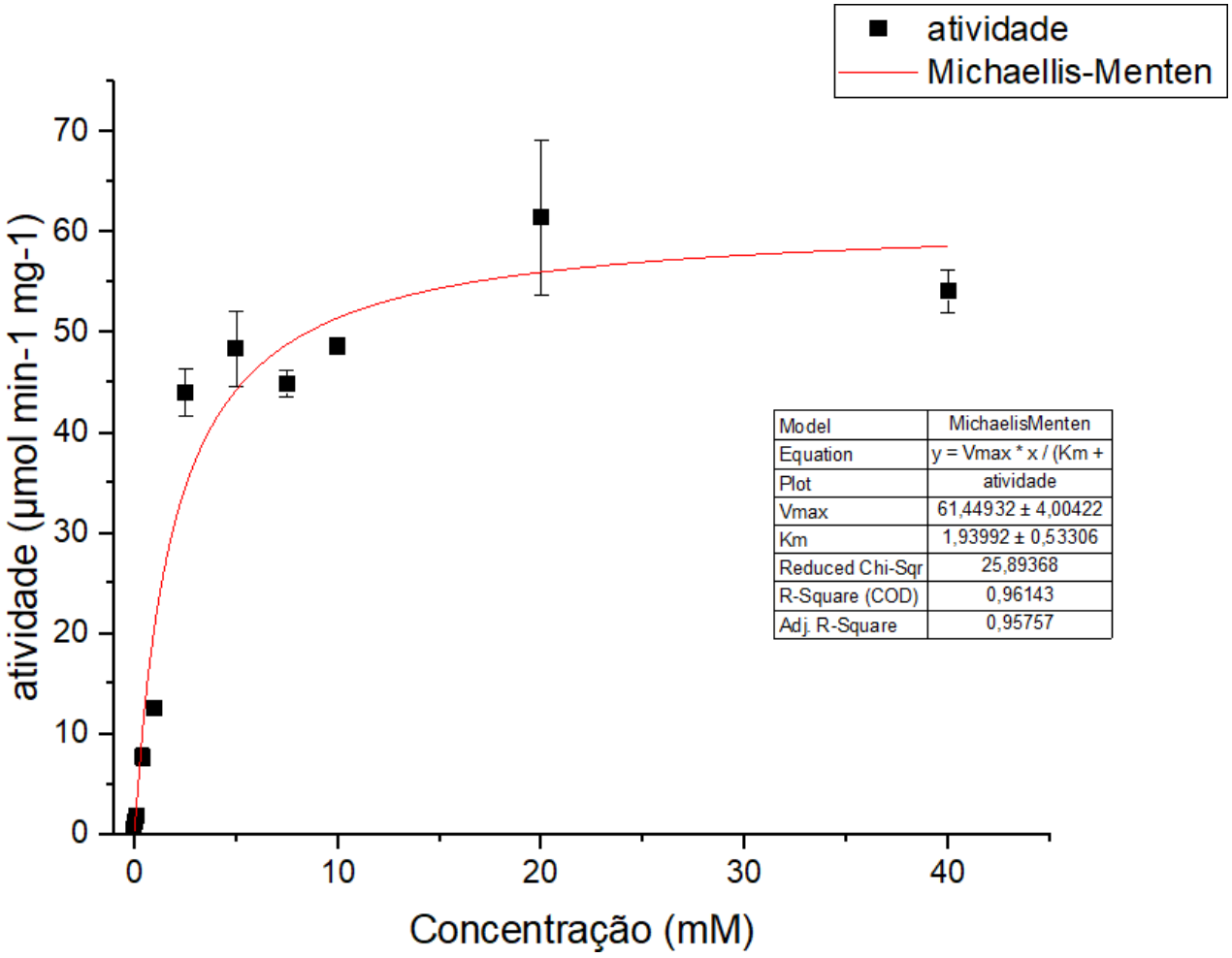


Fonte: Autoria própria

Na figura 28 observa-se o comportamento de incubação enzimática possuindo a liberação do substrato em conjunto de 2 min de reação, o tempo escolhido de 10 min para o ensaio da cinética e demais reações se deve ao fato do grande número de reações concomitantes do experimento, um tempo mais longo foi escolhido para que fosse possível uma melhor execução dos ensaios.

Para a cinética foi primeiro determinado o tempo de incubação que apresentou uma maior atividade aos 10 minutos de reação que se tornou o tempo padrão para a cinética que apresentou os parâmetros mostrados na figura 29 onde se dividiu os valores pela concentração da enzima e obtivemos os valores da atividade especifica.

Figura 29: Gráfico representando a cinética de Michaellis-Menten da lacase purificada de *S. commune* utilizando ABTS como substrato



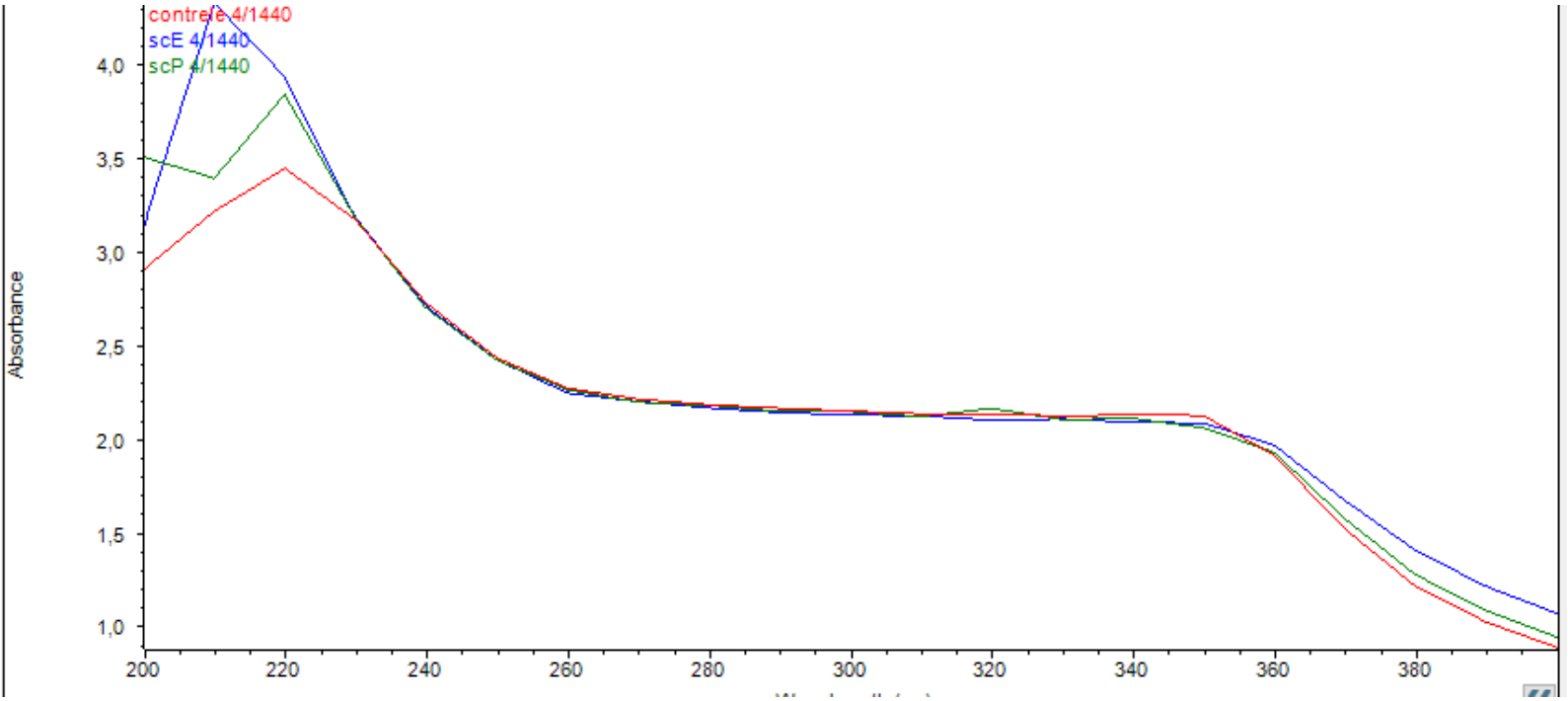
Fonte: Autoria própria

O programa nos mostrou que o K_m da enzima estaria em uma concentração de 1,9 (±0,53) Mm sendo uma concentração superior àquela mostrada no trabalho de KUMAR; NAIK; SRIDHAR, (2015) que descreve a lacase de *S. commune* como tendo K_m 0.75 mM e V_{max} de 109.89 µmoles mg^{-1} min^{-1} sendo a lacase do presente trabalho possui menos afinidade ao substrato ABTS e apresenta uma V_{max} inferior.

4.7 Aplicações

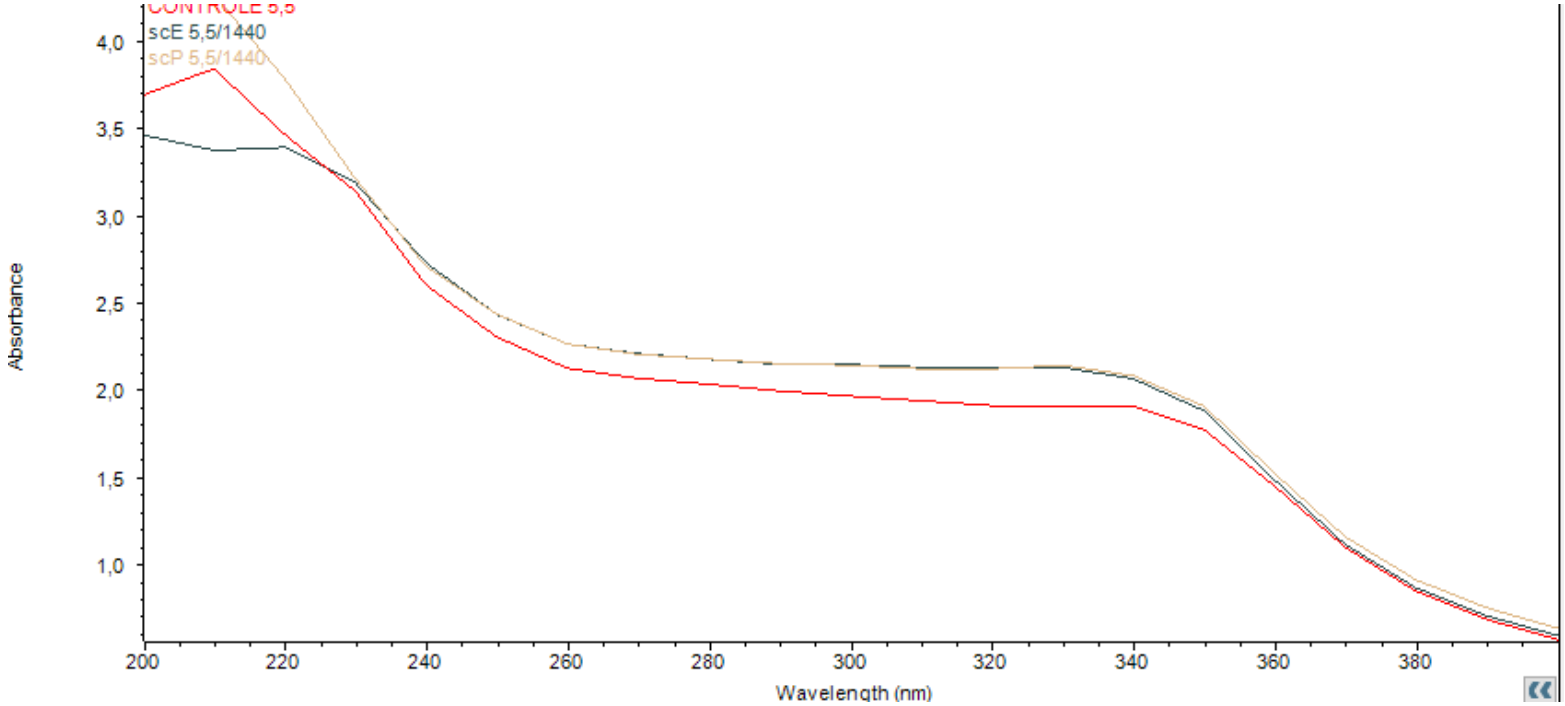
De início as aplicações tiveram foco no licor,

Figura 30: Aplicação da lacase de *S.commune* em licor em pH 4



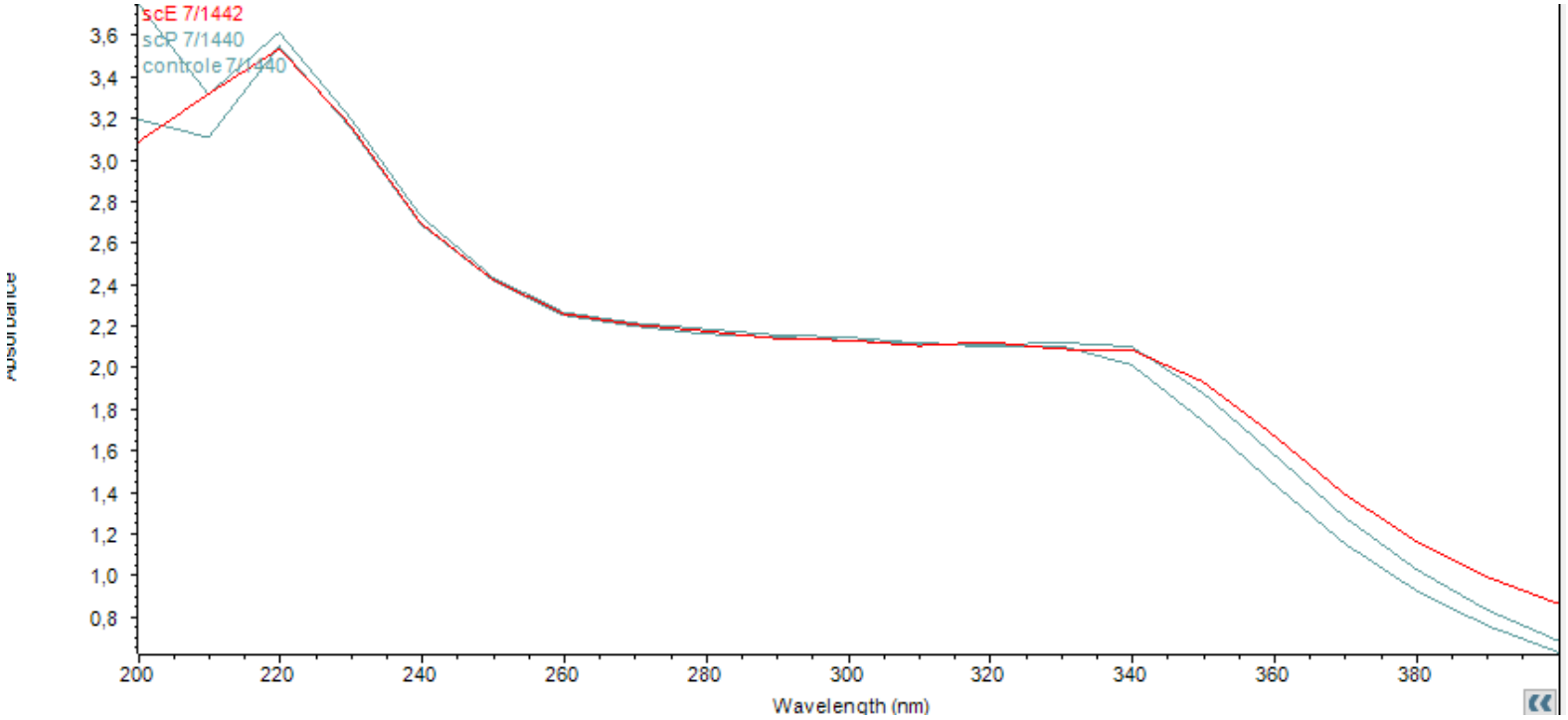
Fonte: Autoria própria

Figura 31: Aplicação da lacase de *S.commune* em licor em pH 5,5



Fonte: Autoria própria

Figura 32: Aplicação da lacase de *S.commune* em licor em pH 7

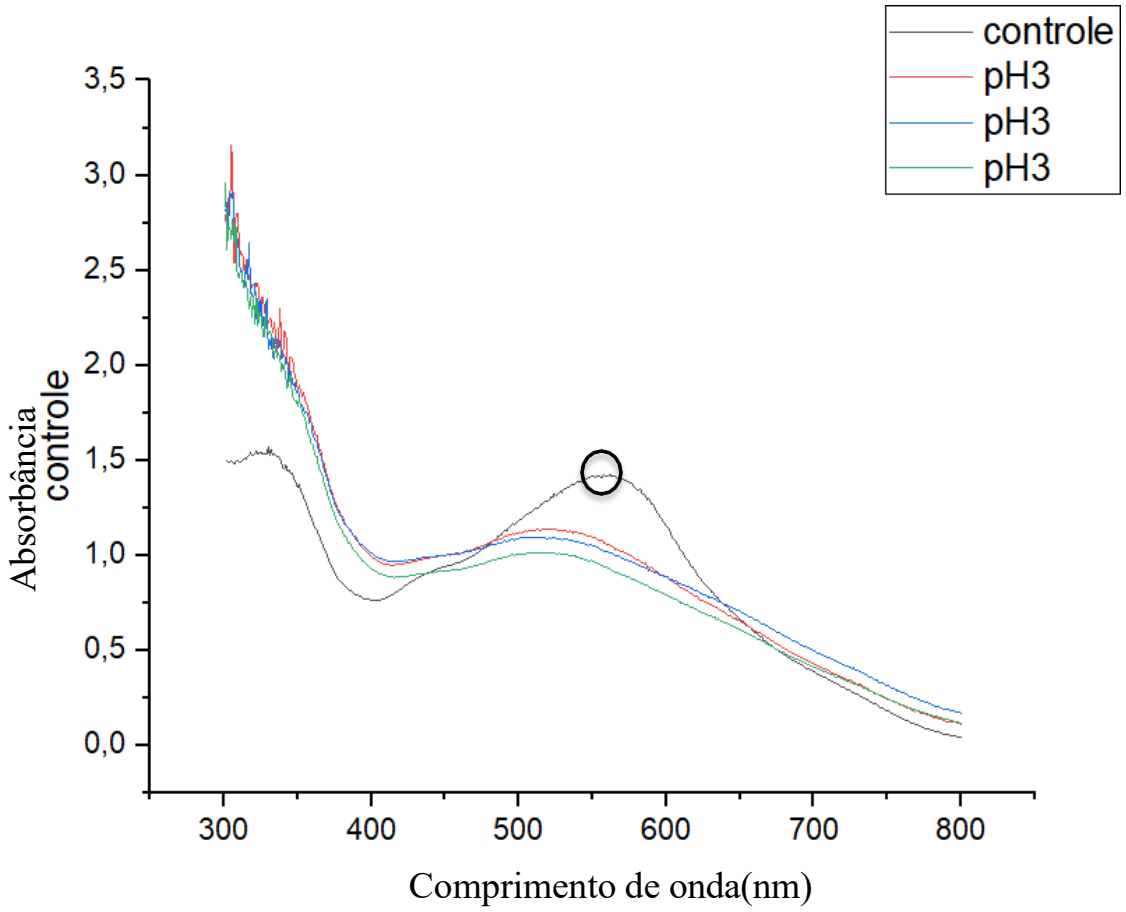


Fonte: Autoria própria

Nas figuras **29, 30 e 31** podemos observar as alterações nas curvas de absorbância do licor e não houve mudanças significativas entre os entre os ensaios, os parâmetros de absorbância seguem inalterados em relação ao controle, muito disso pode se dever a característica recalcitrante do licor, mas também o experimento foi realizado à temperatura ambiente e apenas 3 valores de pH. A alteração nesses parâmetros poderia gerar resultados diferentes daqueles apresentados no presente trabalho.

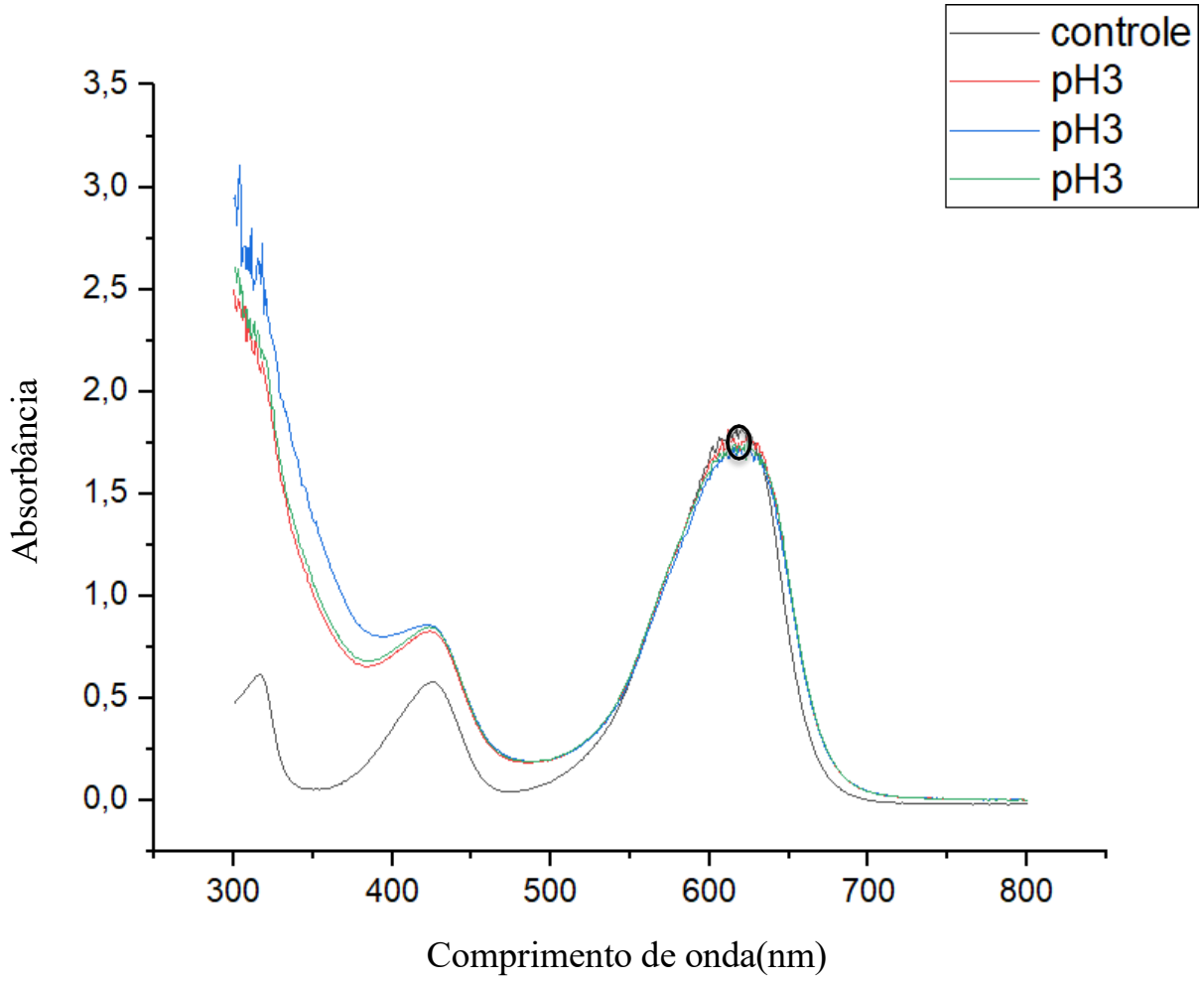
Quando o extrato foi aplicado nos corantes, obtivemos resultados positivos na degradação dos corantes vermelho congo em pH 3, verde malaquita e azul de bromofenol em pH 5,5 novamente reforçando a ideia que enzimas com múltiplos substratos funcionam de maneira distinta em diferentes pH.

Figura 33: Perfil de absorbância **do** vermelho congo em pH 3 após aplicação do extrato bruto de *S. commune* por 24 hrs o círculo indica o pico a ~575nm.



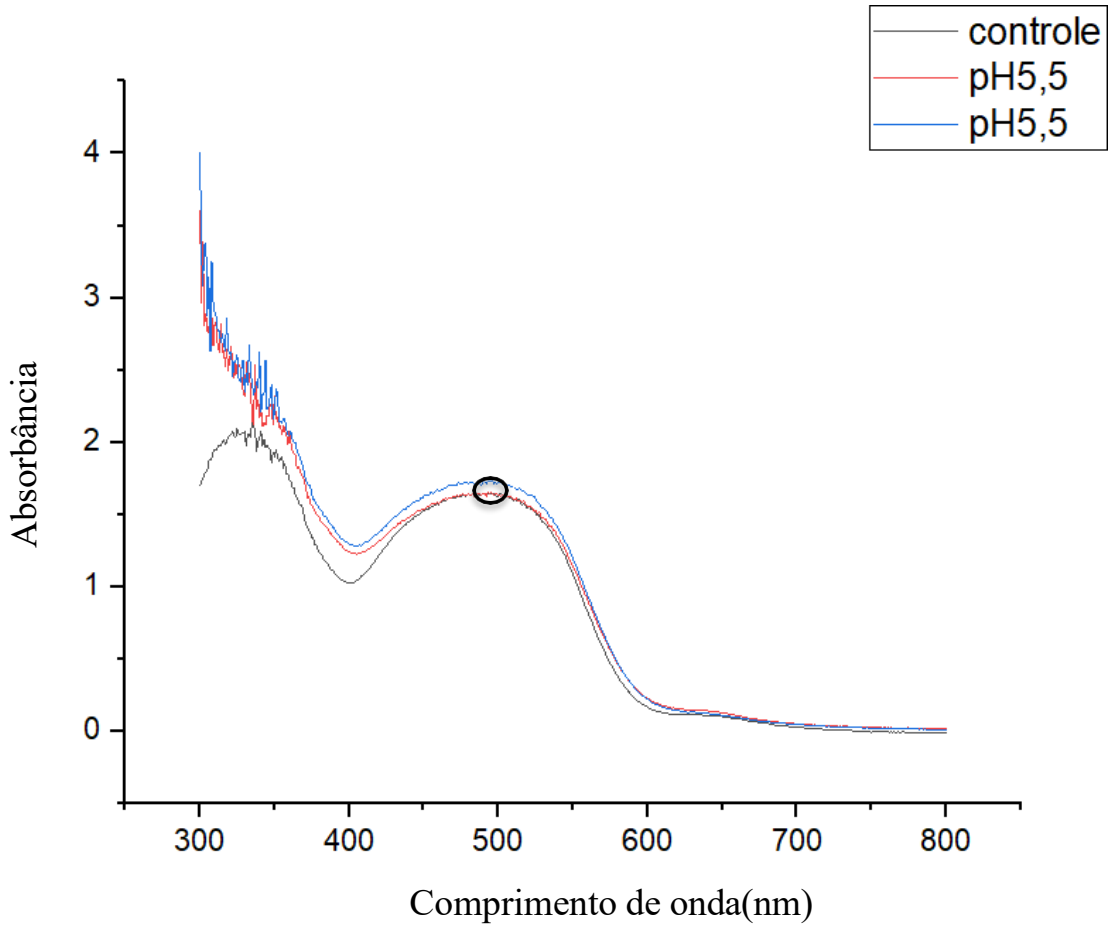
Fonte: Autoria própria

Figura 34: Perfil de absorbância do corante Verde malaquita em pH 3 após aplicação do extrato bruto de *S. commune* por 24 hrs o círculo representa o pico de absorbância a 614nm.



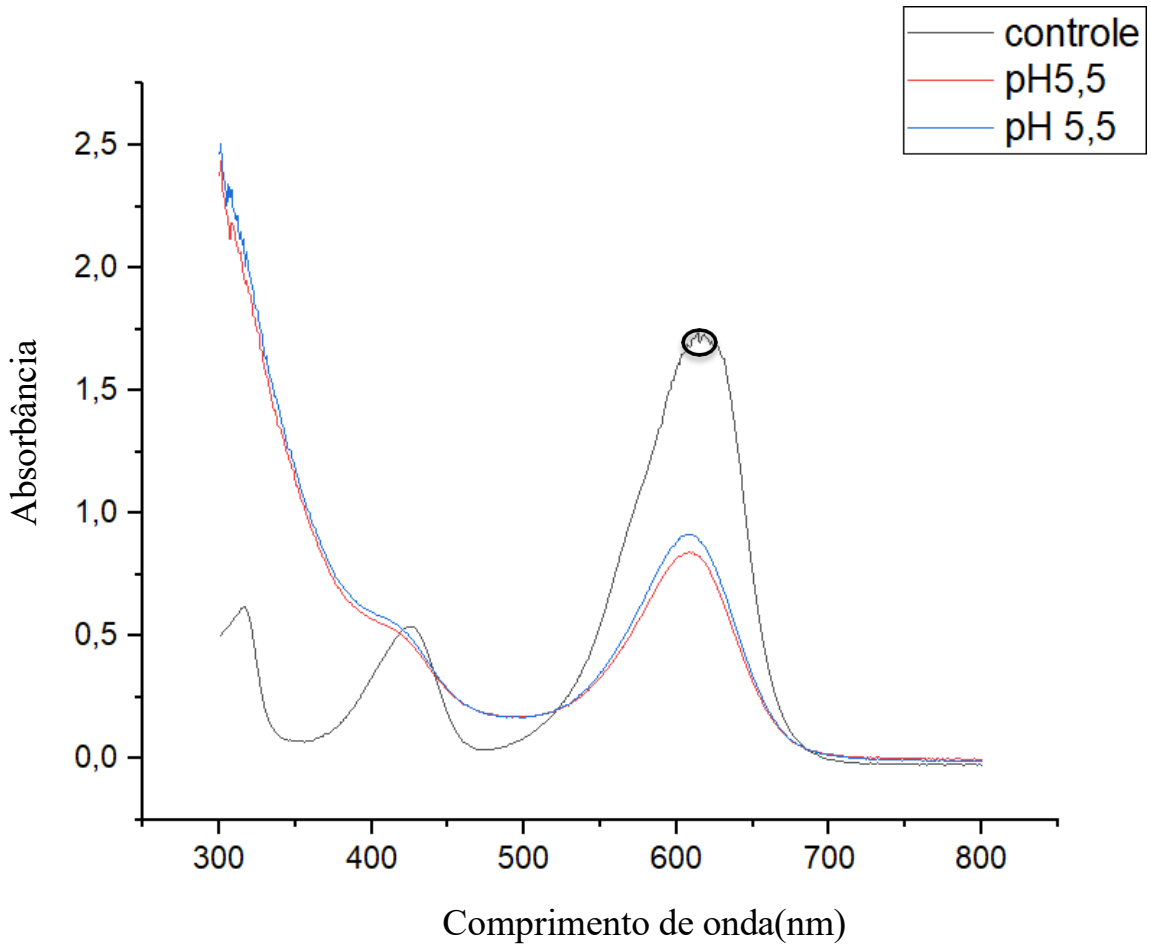
Fonte: Autoria própria

Figura 35: perfil de absorbância do corante Vermelho congo em pH 5,5 após aplicação do extrato bruto de *S. commune* por 24 hrs o círculo indica o pico a 497nm.



Fonte: Autoria própria

Figura 36: perfil de absorbância do corante verde malaquita em pH 5,5 após aplicação do extrato bruto de *S. commune* por 24 hrs o círculo representa o pico de absorbância a 614nm.



Fonte: Autoria própria

Em relação à capacidade das enzimas lignoliticas em degradar corantes, o trabalho de (PINTO et al., 2020) descreve uma manganês peroxidase produzida por uma levedura, a enzima foi capaz de degradar inúmeros corantes, com altas taxas de sucesso com a máxima de 100% de descoloração em 24h do corante vermelho reativo o trabalho de REKIK et al., 2019 utiliza da manganês peroxidase de um fungo da podridão branca semelhante ao do presente estudo (ambos da mesma classe filogenética Agaromycetes) estudar o potencial descolorante obtendo bons resultados atingindo valores próximos de 100% de descoloração em muitos dos corantes aplicados, logo atribuir a capacidade descolorante apresentada nos ensaios de ensaio bruto apenas às lacases é equivocado, mas a lacase é a única enzima lignolítica que não depende da adição de peróxido para sua atividade e a ausência da adição desse composto no ensaio, pode ter impedido que as enzimas peróxido-dependentes atuem em sua totalidade.

Na aplicação da lacase purificada nos corantes o vermelho congo foi degradado em todas as faixas de pH analisadas tendo uma ênfase maior no pH 3.

Tabela 2: resultado da degradação do corante vermelho congo pela lacase purificada de *S. commune* em 48 hrs

pH	Absorbância residual no pico de 497nm (%)
3	76,5
4	92,1
5,5	91,7

Autor: Autoria própria

Na tabela 2 podemos observar que em ambos os parâmetros analisados a lacase purificada teve um potencial maior em degradar o vermelho congo no pH 3 obtivemos uma redução em entre 26,4% e 23,5% do total da absorbância. Em comparação a outros trabalhos como em IARK et al., que cultivou o fungo *Oudemansiella canarii* em bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo e obteve uma redução de 65% na absorbância do vermelho congo e no trabalho de RUNZE LI, XUEPING LI et al uma lacase comercial imobilizada para atingir 95% de degradação do vermelho congo.

No corante verde malaquita obtivemos o maior resultado do estudo na redução de absorbância em pH 5,5 com uma redução de 36,2% na absorbância, já diferindo do vermelho congo que possuiu uma melhor degradação em pH 3,0.

Tabela 3: resultado da degradação do corante verde malaquita pela lacase purificada de *S. commune* em 48 h

pH	Absorbância residual (%) em 614nm
3,0	87,7
5,5	63,9

Autor: Autoria própria

Isso nos mostrou um dado parecido com o mostrado na varredura do ensaio com o extrato bruto que obteve maiores alterações nesse valor de pH para o corante verde malaquita.

Nos corantes *Brilliant blue-G* e *Brilliant blue-R* obtivemos resultado apenas em pH 3 e 4 como mostra a tabela 5

Tabela 4: resultado da degradação dos corantes *Brilliant blue G e R* pela lacase purificada de *S. commune* em 48 h

pH	***Brilliant blue-G***	***Brilliant blue-R***
	Absorbância residual a 595nm	Absorbância residual a 595nm
3,0	96,1%	73,8%
4,0	86,0%	88,2%

Autor: Autoria própria

A lacase estudada apresentou uma melhor performance degradando o *Brilliant blue-R* em relação ao *Brilliant blue-G.* Vale notar que os resultados da degradação dos corantes foram baixos em relação aos dos artigos lidos e citados, os valores não citados nos resultados não foram incluídos pois não houve alteração nos parâmetros analisados, dificuldades nos ensaios como a baixa disponibilidade enzimática que levava um ensaio de volume baixo que ao longo de 48 horas pode ter sido responsável pelas baixas taxas de degradação de corante, muito dos valores não citados foram superiores no ensaio que nos controle, indicando que talvez a evaporação do experimento continue sendo um problema mesmo ele sendo realizado em uma caixa térmica com algodão molhado para manter a humidade

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi demonstrado o potencial de um dos dois fungos testados em degradar a lignina e secretar lacases, sendo o *Schizophyllum commune* o fungo que foi capaz de secretar lacases que foi purificada e caracterizada, apresentando potencial em degradar corantes se saindo melhor em cultivo semissólido enquanto o fungo *Perenniporia medulla-panis* se mostrou incapaz de secretar lacase nas condições de cultivo semissólido mas apresentou um potencial melhor no cultivo com o licor. O estudo de lacases e aplicações de lacases tem se mostrado promissores em lidar com diversos problemas atuais como degradação do meio ambiente, problemas que se arrastarão para o futuro tornando estudos sobre o funcionamento de lacases, suas aplicações e dos microrganismos que as secretam essenciais para solucionar problemas atuais e futuros.

6 REFERÊNCIAS

ANDERSON, Eric M.; STONE, Michael L.; KATAHIRA, Rui; et al. Differences in S/G ratio in natural poplar variants do not predict catalytic depolymerization monomer yields. Nature Communications, v. 10, n. 1, p. 2033, 2019. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41467-019-09986-1. Acesso em: 19 set. 2023.

IBRAHIM, V.; MENDOZA, L.; MAMO, G.; HATTI-KAUL, R. **Blue Laccase from In vitro antioxidant activity of Sonneratia ovata Backer extract**. Res. J. Chem. Environ, v.22, p. 146-150, 2018.

ABDEL-HAMID, A. M.; SOLBIATI, J. O.; CANN, I. KO. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. In: **Advances in applied microbiology**. Academic Press, 2013. p. 1-28.

Acid Production in Saccharomyces cerevisae through Biosensor-Aided Genome Engineering. ACS Synthetic Biology, v.3, p-634-646, 2020.

acompanhamento da produção canavieira, 2021. Disponível em: https://www.udop.com.br/producao-brasileira-arquivos/15/13jan21_acompanhamento_producao_safra_2020a2021_atualizado_20201231.pdf. Acesso: 05/02/2021.

ASGHER, M. et al. Lignocellulose degradation and production of lignin modifying enzymes by Schizophyllum commune IBL-06 in solid-state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 195–201, 1 abr. 2016.

ASGHER, M. et al. Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by Schizophyllum commune IBL-06. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, n. 2, p. 189–193, 1 mar. 2008.

ASINA, F. **Biodegradation Of Lignin By Fungi, Bacteria and Laccases**. 2016, p. 123. Tese (Master of Science). University Of North Dakota, North, Dakota.

BARBIR, F.; VEZIROĞLU, T. N.; PLASS JR, H. J. Environmental damage due to fossil fuels use. **International journal of hydrogen energy**, v. 15, n. 10, p. 739-749, 1990.

Biorefinering Of Lignocellulose: The impact of Process Severity on the Uniformity of Lignin Oil Composition. J. Braz. Chem. Soc, v. 30, p. 479-491, 2019.

BUSWELL, John A.; CAI, Yijin; CHANG, Shu-ting. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by Lentinula (Lentinus) edodes. FEMS Microbiology Letters, v. 128, n. 1, p. 81–87, 1995. Disponível em: https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07504.x. Acesso em: 19 set. 2023.

BRUIJNINCX, P. C. A.; WECKHUYSEN, B. M. **Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in Bioengineering, Biorefining and Catalysis**. Angewandte Chemie, v.55, p. 8164-8215, 2016.

BUGG, T. D. H.; RAHMANPOUR, R. **Enzymatic conversion of lignin into renewable chemicals**. Current Opinion in Chemical Biology, v. 29, p. 10-17, 2015.

Changes of microbial population structure related to lignin degradation during lignocelullosic waste composting. Bioresource Technology, v. 101, p. 4062-4067, 2010.

DANIEL, D. E. Biodegradação Anaeróbia de Compostos Derivados de Lignina e Xenobióticos. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Anterior, Departamento de Ciências, Covilhã, 2014.

DOS SANTOS, M. B. C.; SCARPASSA, J. A.; MONTEIRO, D. A.; LADINO-ORJUELA, G.; DA SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Evaluation of the tolerance and biotransformation of ferulic acid by Klebsiella pneumoniae TD 4.7. **Brazilian Journal of Microbiology**, v., n., p., 2021.

EISENTHAL, Robert; DANSON, Michael J. (Ed.). Enzyme assays: a practical approach. Practical Approach (Paperback), 2002

F.; VAN ELSAS, J. D. **Ecological insights into the dynamics of plant biomass-degrading microbial corsotia.** Trend Microbiology, v. 10, p. 788-796, 2017.

FARROW, A.; MILLER, K.A.; MYLLYVIRTA, L. **Toxic air: The price of fossil fuels.** Greenpeace Southeast Asia, p.44, 2020.

GARCIA, E. O.; CASAGRANDE, M. V.; RAGO, A. M.; JUNIOR, N. S. M. **Preservação de**

GREGORIO, R. **Pandemia educou o mercado, e investimento sustentável será regra, dizem gestores.** Valor Investe, 2020. Disponível em: https://valorinveste.globo.com/produtos/fundos/noticia/2020/05/22/pandemia-educou-o-mercado-e-investimento-sustentavel-sera-regra-dizem-gestores.ghtml. Acesso: 04/02/2021.

GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T.; **Potencial de palha de cana-de-açúcar para produção de etanol**. Química Nova. Vol. 35, No. 5. 2012.

HON, D. N. S.; SHIRAISHI, N. **Wood and cellulosic chemistry**. New York 2ª Ed: Marcel Dekker, 914p., 2001.

IDRIS; RAMADHANI, I.; KANTI, A.; SUDIANA, I. M. Screening of potential lignin-degrading fungi from the tropical forest for lignocellulose biotreatment. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 308, n., p., 2019.

IRSHAD, M.; ASGHER, M. Production and optimization of ligninolytic enzymes by white rot fungus Schizophyllum commune IBL-06 in solid state medium banana stalks. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 79, 2011.

JAVAID, R.; SABIR, A.; SHEIKH, N.; FERHAN, M. **Recent Advances in Applications of Acidophilic Fungi to Produce Chemicals.** Molecules, v.24, p. 786, 2019.

JANUSZ, Grzegorz; PAWLIK, Anna; SULEJ, Justyna; et al. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. FEMS Microbiology Reviews, v. 41, n. 6, p. 941–962, 2017. Disponível em: https://academic.oup.com/femsre/article/41/6/941/4569254. Acesso em: 19 set. 2023.

JEYABALAN, J. et al. A review on the laccase assisted decolourization of dyes: Recent trends and research progress. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 151, p. 105081, 1 out. 2023.

KAPOOR, M.; PANWAR, D. KAIRA, G. S. Bioprocesses for enzyme production using agroindustrial wastes: technical challenges and commercialization potential. (“Crop residues: applications of lignocellulosic biomass in ...”) In: DHILLON,

KIRTZEL, J. et al. Stone-Eating Fungi: Mechanisms in Bioweathering and the Potential Role of Laccases in Black Slate Degradation With the Basidiomycete Schizophyllum commune. **Advances in Applied Microbiology**, v. 99, p. 83–101, 1 jan. 2017.

KOKKONEN, Piia; BEIER, Andy; MAZURENKO, Stanislav; *et al*. Substrate inhibition by the blockage of product release and its control by tunnel engineering. **RSC Chemical Biology**, v. 2, n. 2, p. 645–655,2021.Disponível em: https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/cb/d0cb00171f. Acesso em: 17 set. 2023.

KOLOMYTSEVA, M. et al. Rapid identification of fungal laccases/oxidases with different pH-optimum. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 174–183, 1 nov. 2017.

KUMAR, V. P.; NAIK, C.; SRIDHAR, M. Production, purification and characterization of novel laccase produced by Schizophyllum commune NI-07 with potential for delignification of crop residues. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 432–441, 22 jul. 2015.

LAILI, Khumaidah et al. In vitro antioxidant activity of Sonneratia ovata Backer extract. Res. J. Chem. Environ, v. 22, n. 1, p. 151, 2018.

LIAO, J. C.; LIN, X. N. **Design and characterization of synthetic fungal-bacterial consortia for direct production of isobutanol from cellulosic biomass**. Proc Natl Acad Sci USA, v. 110, p. 14592-14597, 2013.

MARINOVI, M.; NOUSIAINEN, P.; DILOKPIMOL, A.; KONTRO, J.; MOORE, R.;**Métodos de obtenção e caracterização química.** Ciência rural, v. 31, p. 917-928, 2001.

Michaelis, L., Menten, M. L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z. 49, 333–369

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINTY, J. J.; SINGER, M. E.; SCHOLZ, S. A.; BAE, C. H.; AHN, J. H.; FOSTER, C. E.; MOREIRA, L. R. D. S. **Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*:** Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos. 2013. 272 p. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

N.; JENSEN, M. K.; FERREIRA, B. S.; BORODINA, I. **Improvement of cis,cis-Muconic natural poplar variants do not predict catalytic depolymerization monomer yields**. Nature communications, v.10, 2019.

OLIVEIRA, F. C. **Oxidação de lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos agroindustriais para obtenção de compostos químicos aromáticos de maior valor agregado.** 2015, p. 199. Tese (Doutorado em Ciências -Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) -Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

PINTO, P. A. et al. Phenolic and non-phenolic substrates oxidation by laccase at variable oxygen concentrations: Selection of bisubstrate kinetic models from polarographic data. **Biochemical Engineering Journal**, v. 153, p. 107423, 15 jan. 2020.

QING, Q.; LI, H.; KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Xylooligosaccharides production, quantification, and characterization in context of lignocellulosic biomass pretreatment. In:

REKIK, H. et al. Physical and enzymatic properties of a new manganese peroxidase from the white-rot fungus Trametes pubescens strain i8 for lignin biodegradation and textile-dyes biodecolorization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 514–525, 15 mar. 2019.

SANTOS, Solange Xavier dos. Diversidade, isolamento em cultura e perfil enzimático de fungos decompositores de madeira da Estação Ecológica do Noroeste Paulista - São José do Rio PreMirassol, SP. 222 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Instituto de Biociências (Campus de Rio Claro). Rio Claro. (98/10858-0)

SAQIB, A. A. N. et al. A thermostable crude endoglucanase produced by *Aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water. **Enzyme Research**, v. 2012, 2012.

SAQIB, A. A. N. et al. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641–646, 2010.

SIBIKIN, I.; KARGER-KOCSIS, J. **Toward Industrial use of anionically activated lactam polymers: Past, present and future**. Advanced Industrial and Engeneering Polymer Research, v. 1, p. 48-60, 2018.

SIDDIQUI, K. S. et al. Thermostabilization of carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger* by carboxyl group modification. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 4, p. 325–330, 1997.

SIGOILLOT, J-C. et al. Fungal strategies for lignin degradation. **Advances in botanical research**, v. 61, p. 263-308, 2012.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. **Biological pretreatment of lignocellulosic biomass Syntrophic co-culture of aerobic *Bacillus* and anaerobic *Clostridium* for bio-fuels and bio-hydrogen production**. International Journal of Hydrogen Energy, v. 33, p. 5137-5146, 2008.

TENKANEN, M.; SIIKA-AHO, M. An α-glucuronidase of Schizophyllum commune acting on polymeric xylan. **Journal of Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 149–161, 10 mar. 2000.

TOKER, S. K.; EVLAT, H.; KOÇYİĞİT, A. Screening of newly isolated marine-derived fungi for their laccase production and decolorization of different dye types. **Regional Studies in Marine Science**, v. 45, p. 101837, 1 jun. 2021.

TOLALPA, L. C.; SALLES, J. F.; VAN ELSAS, J. D**. Bacterial Synergism in Lignocellulose Biomass Degradation – Complementary Roles of Degraders As Influenced by Complexity of the Carbon Source.** Frontiers on Microbiology, v.8, p. 1-30, 2017.

VARGAS, J.; MORELATO, L. H. T.; ORTEGA, J. O.; BOSCOLO, M.; METZKER, G. **Upgrading 1-butanol to unsaturated, carbonyl and aromatic compounds: a new synthesis approach to produce important organic building blocks.** Green Chemistry, v.22, p. 2365-2369, 2020.

WARD, R. S.; JONES, R. L. **Polyurethanes and Silicone Polyurethane Copolymers**. Comprehensive Bio materials II, v.1, p. 570-619, 2017.

X. **Lignin depolymerization and utilization by bacteria**. Bioresource Technology, v. 269, p. 557-566, 2018.

XU, F. Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 924–928, 10 jan. 1997.

XU, Z.; LEI, P.; ZHAI, R.; WEN, Z.; JIN, M. **Recent advances in lignin valorization with bacterial cultures: microorganism, metabólic pathway, and bio-products**. Biotechnology for Biofuels, v.12, p. 19, 2019.

ZAKZESKI, J. et al. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. **Chemical reviews**, v. 110, n. 6, p. 3552-3599, 2010.

ZHU, D.; ZHANG, P.; XIE, C.; ZHANG, W.; SUN, J.; QIAN, W. J.; YANG, B. Biodegradation of alkaline lignin by Bacillus ligniniphilus L1. **Biotechnol Biofuels**, v. 10, n., p. 44, 2017.

ASGHER, M. et al. Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by Schizophyllum commune IBL-06. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, n. 2, p. 189–193, 1 mar. 2008.

ASGHER, M. et al. Lignocellulose degradation and production of lignin modifying enzymes by Schizophyllum commune IBL-06 in solid-state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 195–201, 1 abr. 2016.

IRSHAD, M.; ASGHER, M. Production and optimization of ligninolytic enzymes by white rot fungus Schizophyllum commune IBL-06 in solid state medium banana stalks. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 79, 2011.

JEYABALAN, J. et al. A review on the laccase assisted decolourization of dyes: Recent trends and research progress. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 151, p. 105081, 1 out. 2023.

KIRTZEL, J. et al. Stone-Eating Fungi: Mechanisms in Bioweathering and the Potential Role of Laccases in Black Slate Degradation With the Basidiomycete Schizophyllum commune. **Advances in Applied Microbiology**, v. 99, p. 83–101, 1 jan. 2017.

KOLOMYTSEVA, M. et al. Rapid identification of fungal laccases/oxidases with different pH-optimum. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 174–183, 1 nov. 2017.

KUMAR, V. P.; NAIK, C.; SRIDHAR, M. Production, purification and characterization of novel laccase produced by Schizophyllum commune NI-07 with potential for delignification of crop residues. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 432–441, 22 jul. 2015.

PINTO, P. A. et al. Phenolic and non-phenolic substrates oxidation by laccase at variable oxygen concentrations: Selection of bisubstrate kinetic models from polarographic data. **Biochemical Engineering Journal**, v. 153, p. 107423, 15 jan. 2020.

REKIK, H. et al. Physical and enzymatic properties of a new manganese peroxidase from the white-rot fungus Trametes pubescens strain i8 for lignin biodegradation and textile-dyes biodecolorization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 514–525, 15 mar. 2019.

TENKANEN, M.; SIIKA-AHO, M. An α-glucuronidase of Schizophyllum commune acting on polymeric xylan. **Journal of Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 149–161, 10 mar. 2000.

TOKER, S. K.; EVLAT, H.; KOÇYİĞİT, A. Screening of newly isolated marine-derived fungi for their laccase production and decolorization of different dye types. **Regional Studies in Marine Science**, v. 45, p. 101837, 1 jun. 2021.

XU, F. Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 924–928, 10 jan. 1997.