

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS
LIGNINOLÍTICAS EXPRESSAS PELOS FUNGOS *Chaetomium
cupreum* URM 5066 E *Mucor racemosus* CBMAI 847”**

BRUNA SOARES DIONIZIO*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
título de MESTRE EM QUÍMICA,
área de concentração: QUÍMICA.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza

***Bolsista Capes**

São Carlos- SP

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Bruna Soares Dionízio, realizada em 25/05/2018:

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza
UFSCar

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur
UFSCar

Prof. Dr. Andre Luiz Meleiro Porto
IQSC/USP

Dedico este trabalho à minha mãe Gedalva, aos meus irmãos, Bianca e Izaque, e ao meu pai Alexsandro (in memoriam).

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.

O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece.

Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal; Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;

Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O amor nunca falha; mas havendo profecias, serão aniquiladas; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, desaparecerá;

Porque, em parte, conhecemos, e em parte profetizamos;

Mas, quando vier o que é perfeito, então o que o é em parte será aniquilado.

Quando eu era menino, falava como menino, sentia como menino, pensava como menino, mas, logo que cheguei a ser homem, acabei com as coisas de menino.

Porque agora vemos por espelho em enigma, mas então veremos face a face; agora conheço em parte, mas então conhecerei como também sou conhecido.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor.”

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me manter forte diante das dificuldades e permitir que eu chegasse até aqui, dando-me sabedoria e graças.

À Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza, por ter me acolhido em seu laboratório, pelos dois anos de convivência, ensinamentos e paciência.

Ao Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto, por ceder os micro-organismos marinhos e o de compostagem.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, por ceder às ligninas.

À Profa. Dra. Maria Teresa M. Novo Mansur e a Célia Regina Câmara, pelos experimentos realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada, por me auxiliar.

Ao Dr. Hugo César Ramos de Jesus, pela colaboração com o experimento de espectrometria de massas e pelas explicações.

Aos amigos e colegas do grupo LBFEE Adriana Miranda, Ariele Moreira, Bruno Amaral, Claudia Alves, Evandro Pietro, Juliana Rodrigues, Kelli Miccoci, Mariana Fracola, Melissa Tomaz e Paulo Adalberto, em especial a Katia Correa, pelos momentos compartilhados e discussões científicas, pelas risadas e cafés.

Aos meus amigos, Carol, Célia, David, Gaby, Juliete, Karol, Késia, Larissa, Marília, Nereu, Talyson, Tiago e Yghor por sempre me ouvirem nos momentos difíceis, pelos bons conselhos e por entenderem minha ausência. Ao Arthur e a Juliana, pelo bom convívio.

À Profa. Dra. Ana Maria Quejeiro, pelas palavras de apoio e incentivo. Jamais me esquecerei dos seus bons conselhos. Quero agradecer também a Amanda Lys, Elane Lourenço, Everton Martins, em especial ao Ítalo Almeida, pelos bons momentos vividos e amizade.

Ao Diêgo Babos, pela sua imensa paciência, companheirismo, amor, atenção e conselhos. Obrigada por acreditar em mim e no meu potencial para chegar até aqui, você tornou essa trajetória mais leve. Te amo!

À minha querida mãe, Gedalva Soares, por sempre me ajudar, aconselhar, por seu infinito amor e carinho. Obrigada por compreender a minha ausência em muitos momentos e por apoiar as minhas escolhas. Amo você!

Aos meus irmãos, Bianca Soares e Izaque Soares, pelos momentos de descontração, por me escutarem, apoiarem e pelas palavras de motivação. E a todos os meus familiares. Amo vocês!

Aos professores do Departamento de Química da UFSCar, pelo conhecimento transmitido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar, as secretárias da pós-graduação: Ariane, Cristina e Luciani, e aos funcionários do departamento de química.

A Capes pelo auxílio financeiro.

Agradeço a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a conclusão dessa dissertação. Obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
BEN	Balanço Energético Nacional
BSA	Albumina de Soro Bovino, do inglês Bovine Serum Albumin
CBMAI	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
CID	Dissociação Induzida por Colisão, do inglês Collision-Induced Dissociation
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Da	Dalton
DEAE	Dietilanoalamina, do inglês Diethylethanolamine
DTT	1,4-Ditiotreitol
EB	Extrato bruto
EC	Comissão de enzimas, do inglês Enzyme Commission
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica, do inglês Electron Paramagnetic Resonance
ϵ	Coefficiente de absorvidade
FPLC	Cromatografia Líquida de Proteína Rápida, do inglês Fast Protein Liquid Chromatography
FPZSP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo
HBT	1-Hidroxibenzotriazol
IAA	Iodoacetamida
K_{av}	Coefficiente de partição
Lac	Lacase
LC	Lignina extraída do bagaço de cana-de-açúcar
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LE	Lignina extraída de <i>Eucalyptus</i>
LiP	Lignina peroxidase

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MM	Massa Molecular
MnP	Manganês peroxidase
PC	Pré-coluna
PDB	Banco de Dados de Proteínas, do inglês <i>Protein Data Bank</i>
pI	Ponto isoelétrico
QFF	Q Fluxo Rápido, do inglês Q Sepharose Fast Flow
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio, do inglês Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SYR	Siringaldazina, do inglês Syringaldazine
U	Unidade enzimática
URM-UFPE	Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco, URM do inglês University Recife Mycologia
TEMPO	2,2,6,6-Tetrametilpiperidina-1-oxila
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

LISTA DE TABELAS

TABELA 5.1: Atividade enzimática das amostras do fungo <i>M. racemosus</i>	48
TABELA 5.2: Resumo das propriedades das quatro oxidases isoladas de <i>M. racemosus</i>	54
TABELA 5.3: Atividade enzimática das amostras do fungo <i>C. cupreum</i>	61
TABELA 5.4: Recuperação das frações com atividade após a purificação das enzimas.....	65
TABELA 5.5: Dados obtidos por espectrometria de massas na identificação das proteínas contidas no <i>pool 1</i>	70
TABELA 5.6: Dados obtidos por espectrometria de massas na identificação das proteínas contidas no <i>pool 2</i>	71
TABELA 5.7: Resumo das propriedades das três oxidases isoladas de <i>C. cupreum</i>	74

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1: Arranjo da biomassa lignocelulolítica presente na parede celular dos vegetais.	5
FIGURA 2.2: Monômeros de monolignóis precursores de ligninas. (a) álcool <i>p</i> -cumarílico, (b) álcool coniferílico e (c) álcool sinapílico	7
FIGURA 2.3: Estrutura química proposta para uma lignina de folhosa (<i>Fagus sylvatica</i>)	8
FIGURA 2.4: Representação dos sítios T1, T2 e T3 de lacases, e seus respectivos átomos de cobre.....	11
FIGURA 2.5: Representação do sítio catalítico de multicobre oxidases.....	12
FIGURA 2.6: Ciclo catalítico de manganês peroxidases.....	14
FIGURA 2.7: Ciclo catalítico de lignina peroxidases	16
FIGURA 5.1: Esquema ilustrativo da reação de oxidação do ABTS	41
FIGURA 5.2: Ensaio de atividade com o substrato ABTS em meio de cultura sólido	42
FIGURA 5.3: Variação da atividade enzimática em função do tempo de cultivo do fungo <i>M. racemosus</i> em meio de cultura adaptado de TIEN & KIRK (1988)	44
FIGURA 5.4: Variação da atividade enzimática em função do tempo de cultivo do fungo <i>M. racemosus</i> em meio de cultura adaptado de PASSARINI et al. (2011)	45
FIGURA 5.5: Cromatograma obtido na purificação das oxidases presentes no extrato bruto do <i>M. racemosus</i> precipitado com 70% de SA e aplicado na coluna de troca aniônica Hitrap QFF.....	46
FIGURA 5.6: Análise em SDS-PAGE 15% da purificação parcial das oxidases expressas pelo fungo <i>M. racemosus</i> (corado com prata)	47
FIGURA 5.7: Cromatograma obtido na purificação das oxidases presentes no <i>pool 1</i> aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex 75.....	49

FIGURA 5.8: Análise em gel de tricina das frações com atividade frente ao substrato álcool veratrílico eluídas da Superdex 75 (corado com coomassie). ..	50
FIGURA 5.9: Cromatograma obtido na purificação das oxidases presentes no <i>pool 2</i> aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex 75.....	51
FIGURA 5.10: Análise em SDS-PAGE 15% das frações com atividade frente ao substrato álcool veratrílico eluídas da Superdex 75 (corado com prata)	52
FIGURA 5.11: Variação da atividade enzimática em função do tempo de cultivo do fungo <i>C. cupreum</i> em meio de cultura adaptado de PASSARINI et al. (2011)	55
FIGURA 5.12: Variação da atividade enzimática em função do tempo de cultivo do fungo <i>C. cupreum</i> em meio de cultura adaptado de PONTING (1999).	56
FIGURA 5.13: Análise do extrato bruto do fungo <i>C. cupreum</i> por eletroforese e zimografia. (a) SDS-PAGE 15% corado com coomassie. (b) zimografia com SDS-PAGE 1% utilizando o substrato ABTS.....	58
FIGURA 5.14: Cromatograma obtido na purificação da amostra do <i>C. cupreum</i> aplicada na coluna de troca aniônica DEAE-Sepharose	60
FIGURA 5.15: (a) Análise em SDS-PAGE 15% da purificação parcial das oxidases expressas pelo fungo <i>C. cupreum</i> (corado com prata) e (b) zimografia com ABTS.....	61
FIGURA 5.16: Cromatograma obtido na purificação das oxidases presentes no <i>pool 1</i> aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex 200.....	62
FIGURA 5.17: Cromatograma obtido na purificação das oxidases presentes no <i>pool 2</i> aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex 200.....	64
FIGURA 5.18: Análise em SDS-PAGE 15% das frações com atividade frente ao substrato ABTS eluídas da Superdex 200 na purificação do <i>pool 2</i> (corado com prata).....	65
FIGURA 5.19: Curva de atividade máxima para enzima E1 no (a) pH ótimo e (b) temperatura ótima.....	67

FIGURA 5.20: Curva de atividade máxima para enzima E2 no (a) pH ótimo e (b) temperatura ótima.....	67
FIGURA 5.21: Curva de atividade máxima para enzima E3 no (a) pH ótimo e (b) temperatura ótima.....	68
FIGURA 5.22: Fragmento peptídico detectado por espectrometria de massas do <i>pool 2</i>	72
FIGURA 5.23: Estrutura tridimensional de lacases de <i>Coriolopsis caperata</i> e <i>Trametes trogii</i>	73
FIGURA 5.24: Crescimentos dos fungos utilizando duas diferentes ligninas como substrato.....	76
FIGURA 5.25: Atividade qualitativa em placa da degradação da lignina pelo extrato bruto do fungo <i>M. racemosus</i> , (a) LC e (b) LE	77
FIGURA 5.26: Atividade qualitativa em placa da degradação da lignina pelo extrato bruto do fungo <i>C. cupreum</i> , (a) LC e (b) LE	78

RESUMO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EXPRESSAS PELOS FUNGOS *Chaetomium cupreum* URM 5066 E *Mucor racemosus* CBMAI 847. A degradação da lignina, que juntamente com a celulose e a hemicelulose constituem a parede celular de plantas, é geralmente dificultada pela sua estrutura complexa, sua alta massa molecular e a sua insolubilidade. Contudo, fungos são capazes de degradar a biomassa lignocelulósica empregando enzimas específicas como as Lacases, Manganês peroxidases e Lignina peroxidases. Este trabalho teve como proposta identificar e purificar enzimas ligninolíticas produzidas por quatro fungos: *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996, *Penicillium* sp. FPZSP 151 e *Chaetomium cupreum* URM 5066. Através de atividade em placa utilizando ABTS como substrato, observou-se que os fungos *C. cupreum* e *M. racemosus* foram os melhores produtores de oxidases. Os dois fungos foram então selecionados e cultivados em meio líquido, sendo os maiores valores de atividades enzimáticas observadas no 7º dia de crescimento para ambos, apresentando $37,50 \pm 2,67 \text{ U L}^{-1}$ para *C. cupreum* e $0,231 \pm 0,007 \text{ U L}^{-1}$ para *M. racemosus*. Foi possível purificar quatro enzimas presentes no extrato bruto do *M. racemosus*, as quais apresentaram atividade frente ao álcool veratrílico, indicando que podem ser lignina peroxidases. Foram purificadas e caracterizadas três enzimas presentes no extrato bruto de *C. cupreum*, as quais apresentaram atividade com os substratos ABTS e SYR, sendo ao menos uma das enzimas pertencente à subclasse das lacases. Ensaio qualitativos demonstraram que as enzimas produzidas pelo fungo *C. cupreum* foram capazes de degradar a lignina. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os fungos *M. racemosus* e *C. cupreum* são produtores de enzimas ligninolíticas e que fungo *C. cupreum* tem grande potencial para a aplicação em processos biotecnológicos, atuando na degradação de ligninas. Além disso, essa é a primeira vez em que é reportada a purificação de enzimas oxidases expressas por esses fungos.

Palavras-chave: *Chaetomium cupreum* URM 5066, *Mucor racemosus* CBMAI 847, enzimas ligninolíticas, lignina peroxidase, lacase.

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES EXPRESSED BY FUNGI *Chaetomium cupreum* URM 5066 AND *Mucor racemosus* CBMAI 847. The degradation of lignin, which together with cellulose and hemicellulose constitutes the cell wall of plants, is generally hampered by its complex structure, its high molecular weight and its insolubility. However, fungi are able to degrade the lignocellulosic biomass by employing specific enzymes such as Laccases, Manganese peroxidases and Lignin peroxidases. This work aimed to identify and purify ligninolytic enzymes produced by four fungi: *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996, *Penicillium* sp. FPZSP 151 and *Chaetomium cupreum* URM 5066. Through plaque activity using ABTS as substrate it was observed that *C. cupreum* and *M. racemosus* are the best producers of oxidases. The two fungi were then selected and cultivated in liquid medium, with the highest values of enzymatic activity observed on the 7th day of growth for both, and presenting $37.50 \pm 2.67 \text{ U L}^{-1}$ for *C. cupreum* and $0.231 \pm 0.007 \text{ U L}^{-1}$ for *M. racemosus*. It was possible to purify four enzymes present in the crude extract of *M. racemosus*, which have activity with veratryl alcohol, indicating that they may be lignins peroxidases. Three oxidases present in the crude extract of *C. cupreum* were purified and characterized, which have activity with substrates ABTS and SYR, at least one of the enzymes belonging to the subclass of laccases. Qualitative tests demonstrated that the enzymes produced by *C. cupreum* fungus were capable of degrading lignin. The results obtained in this work show that the fungi *M. racemosus* and *C. cupreum* are ligninolytic enzymes producers and that *C. cupreum* fungus has great potential for application in biotechnological processes, acting in the degradation of lignins. Moreover this is the first time that a purification of oxidases enzymes expressed by these fungi is reported.

Key words: *Chaetomium cupreum* URM 5066, *Mucor racemosus* CBMAI 847, ligninolytic enzymes, lignin peroxidase, laccase.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
SUMÁRIO.....	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Biomassa lignocelulósica: caracterização, aplicações e desafios.....	5
2.2. Enzimas ligninolíticas.....	10
2.2.1. Lacase (Lac)	10
2.2.2. Manganês peroxidase (MnP).....	14
2.2.3. Lignina peroxidase (LiP).....	15
2.3. Fungos no processo biotecnológico da biomassa lignocelulósica	16
2.4. Fungos e suas potencialidades na produção de oxidases	19
3. OBJETIVOS	22
4. METODOLOGIA	23
4.1. Fungos avaliados	23
4.2. Armazenamento dos micro-organismos	23
4.3. Ensaio qualitativo para produção de enzimas ligninolíticas	24
4.4. Cultivo em meio líquido dos fungos <i>M. racemosus</i> CBMAI 847 e <i>C. cupreum</i> URM 5066.....	24
4.4.1. Meios de cultura avaliados para a produção de enzimas extracelulares do fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847	244
4.4.2. Meios de cultura avaliados para a produção de enzimas extracelulares do fungo <i>C. cupreum</i> URM 5066	26
4.5. Determinação de atividade enzimática	27
4.5.1. Determinação de oxidases totais: uso do substrato ABTS.....	27
4.5.2. Determinação de lignina peroxidase (LiP): uso do substrato álcool veratrílico	28
4.5.3. Zimografia	29
4.6. Purificação das enzimas.....	29
4.6.1. Purificação de enzimas extracelulares produzidas pelo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847.....	30

4.6.2. Purificação de enzimas extracelulares produzidas pelo <i>C. cupreum</i> URM 5066.....	31
4.7. Caracterização das proteínas	33
4.7.1. Determinação de proteínas totais	33
4.7.2. Eletroforese bidimensional: determinação do ponto isoelétrico	33
4.7.3. Avaliação da atividade enzimática em função do pH e da temperatura.....	35
4.7.4. Determinação da massa molecular aparente	35
4.7.5. Análise por espectrometria de massas.....	37
4.8. Testes qualitativos com diferentes ligninas.....	38
4.8.1. Avaliação de crescimento dos fungos em meio sólido de cultura contendo lignina.....	39
4.8.2. Avaliação qualitativa da degradação da lignina pelo extrato bruto .	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1. Ensaio qualitativo para a produção de enzimas ligninolíticas.....	41
5.2. Estudos com o fungo <i>M. racemosus</i> CBMAI 847.....	43
5.2.1. Produção de enzimas ligninolíticas	43
5.2.2. Purificação das enzimas extracelulares.....	45
5.2.3. Determinação da massa molecular aparente das proteínas purificadas.....	53
5.3. Estudos com o fungo <i>C. cupreum</i> URM 5066	55
5.3.1. Produção de enzimas ligninolíticas	55
5.3.2. Purificação das enzimas	59
5.3.3. Caracterização das enzimas purificadas.....	66
5.4. Testes qualitativos com diferentes ligninas.....	75
5.4.1. Avaliação de crescimento dos fungos em meio sólido de cultura contendo lignina.....	75
5.4.2. Avaliação qualitativa da degradação da lignina pelo extrato bruto dos fungos	76
6. CONCLUSÕES	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes energéticas renováveis é uma demanda crescente, pois estas contribuem para o desenvolvimento socioeconômico e para a preservação do meio ambiente. Um exemplo de importante fonte de energia renovável é a utilização da biomassa vegetal provinda do bagaço da cana-de-açúcar na produção de etanol de segunda geração.

Segundo dados do Balanço Energético Nacional - BEN, vinculado ao Ministério de Minas e Energia, em 2016, a matriz energética brasileira apresentou uma oferta de 43,5% de energia renováveis, sendo uma das mais elevadas do mundo. Porém, 56,5% da matriz energética ainda são oriundas de fontes não renováveis. As fontes de energias renováveis brasileira são constituídas por 17,5% da biomassa do bagaço da cana-de-açúcar, 12,3% hidráulica, 8,0% lenha e carvão vegetal e 5,4% de outras fontes renováveis. Aproximadamente 60% das fontes renováveis brasileiras (biomassa, lenha e carvão vegetal) apresentam em sua composição química materiais lignocelulósicos. Os setores da indústria e do transporte são os responsáveis por aproximadamente 65% do consumo de toda energia produzida (BRASIL, 2017a).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a produção de cana-de-açúcar no ano de 2017 alcançou aproximadamente 623 milhões de toneladas, produzindo 37 milhões de toneladas de açúcar e 27.197.189 milhões de m³ de etanol. Deste total de etanol produzido, 16.195.705 milhões de m³ foram de etanol hidratado e 11.001.484 milhões de m³ foram de etanol anidro (BRASIL, 2017b).

O etanol produzido a partir da sacarose da cana-de-açúcar é chamado de etanol de primeira geração. Enquanto que o etanol de segunda geração (bioetanol) advém dos resíduos agrícolas e agroindustriais. O bioetanol pode ser produzido a partir de qualquer biomassa celulósica como, por exemplo, de subprodutos da cana-de-açúcar como o bagaço, a folha e a palha. Contudo,

esses subprodutos normalmente são utilizados como combustíveis na produção de calor e energia elétrica (VÁSQUEZ et al., 2007). Na safra 2015/16, a produção do bagaço-de-cana foi de 166,4 milhões de toneladas no país, sendo que deste total 55,2% foram produzidos somente no estado de São Paulo (BRASIL, 2016).

Um desafio enfrentado para a produção de etanol de segunda geração é o pré-tratamento da biomassa, etapa realizada para desestruturar o complexo lignocelulósico, sendo o principal problema a remoção da lignina. A presença da lignina dificulta a digestão da celulose pelas enzimas hidrolases, que são enzimas responsáveis pela bioconversão da celulose em monômeros de glicose que serão convertidos em etanol no processo de fermentação, e isso acontece devido à rígida associação da celulose com a lignina (MOOD et al., 2013)

O pré-tratamento com ácido sulfúrico tem sido um dos mais empregados. No entanto, esse tratamento apresenta alguns problemas como a formação e dificuldades de eliminação de inibidores como furfural e compostos fenólicos no processo, a corrosão dos equipamentos e a geração de resíduos tóxicos. Estes são alguns inconvenientes que impedem a aplicação generalizada deste método e que podem tornar o procedimento de elevado custo (MOOD et al., 2013; BEHERA et al., 2014).

Mesmo tendo em vista as vantagens do pré-tratamento biológico como especificidade de reações, pH e temperatura brandas de trabalho, menos consumo de energia e menos produção de resíduos tóxicos, quando comparado com o pré-tratamento químico, o pré-tratamento ácido ainda é o método mais empregado nessa etapa. O motivo da preferência da hidrólise ácida comparada à hidrólise enzimática são os longos períodos de pré-tratamento requeridos em função da baixa velocidade de degradação do material lignocelulósico conseguido com as enzimas atualmente disponíveis para tal fim, bem como o rendimento do processo enzimático. A combinação de tratamento biológico com

outro tipo de tratamento tem sido considerada bastante promissora, porém, pode requerer enzimas resistentes em condições mais severas (SALVACHÚA et al., 2011).

No final do processo de obtenção de açúcares para a geração do etanol, provindo de materiais lignocelulósicos, ainda resta a lignina, que é usualmente empregada para produzir energia, onde o calor de combustão da lignina é 3,5 vezes maior que o do próprio bagaço da cana (ERENO, 2007). Uma possibilidade de utilização desse resíduo é fazer a degradação da lignina, obtida de diversos materiais lignocelulósicos, para a obtenção de produtos químicos com maior valor agregado.

Outro setor industrial, além da indústria sucroalcooleira, que tem como resíduo a lignina é a indústria de papel e celulose. Durante o processo de polpação, a lignina é extraída na etapa de branqueamento, visto que a lignina é a fração responsável pela tonalidade escura presente na polpa de celulose e que a alvura elevada é característica de um produto final de alta qualidade. Nesse setor, a extração da lignina vai depender da alvura desejada de acordo com tipo de papel que será produzido, e é feita dessa forma por razões econômicas. O resíduo que contém lignina normalmente é queimado nas caldeiras para geração de energia ou descartado em aterros sanitários (CASTRO, 2009; EMBRAPA, 2015; HONG et al., 2015).

O melhor conhecimento do processo de degradação de materiais lignocelulolíticos, incluindo o estudo das melhores condições e otimização dos fatores envolvidos, tem permitido, por exemplo, que a biomassa vegetal seja utilizada na produção de etanol de segunda geração, fazendo com que se torne uma via economicamente viável. Além disso, pode contribuir também para que a lignina seja empregada para outros fins comerciais, e não apenas para queima em caldeiras nas indústrias.

Uma possibilidade é fazer o uso da biotecnologia para a obtenção de enzimas estáveis e de micro-organismos que possam produzir enzimas

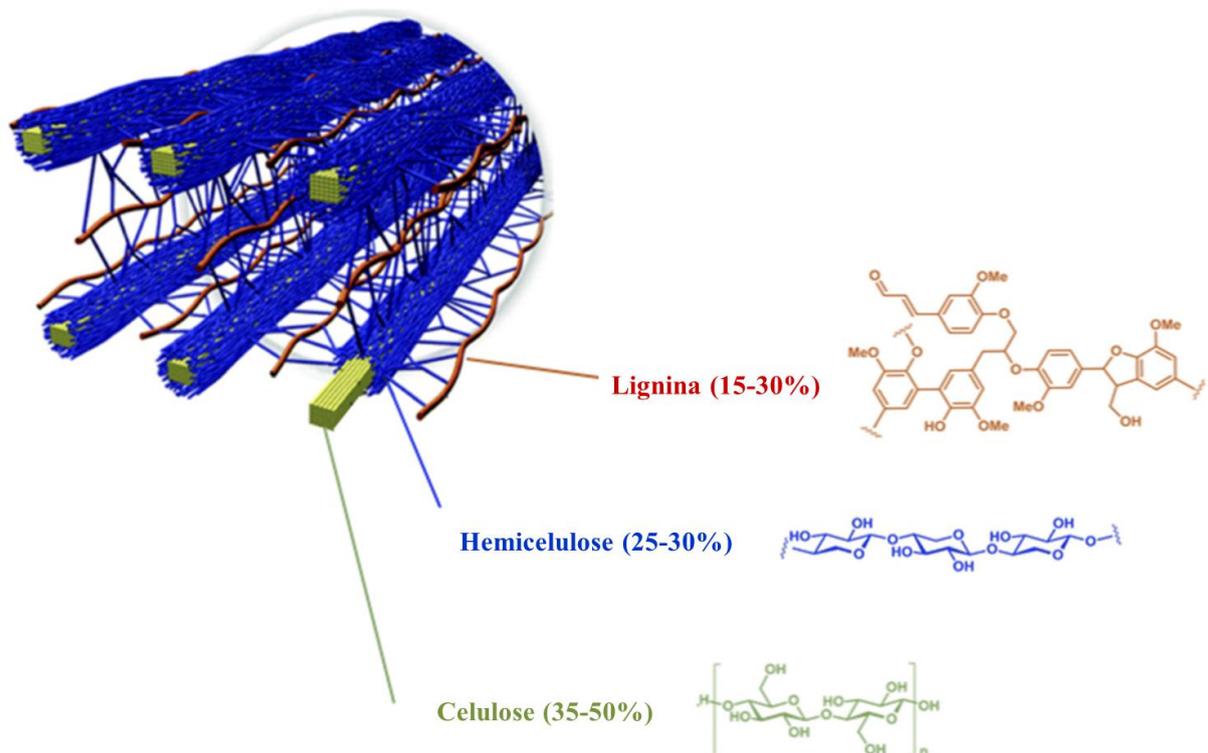
capazes de degradar a lignina presente na lignocelulose, auxiliando assim, no pré-tratamento da biomassa vegetal ou serem empregadas na degradação do resíduo de lignina para produção de produtos químicos com valor comercial agregado. Nesse contexto, a busca de enzimas que degradem a lignina e apresentem resistência às condições extremas de pH, temperatura e que sejam capazes de apresentar termoestabilidade tem sido alvo de estudos, para que possam ser utilizadas como biocatalisadores a serem aplicados com alta eficiência nas etapas de pré-tratamento dos materiais lignocelulolíticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa lignocelulósica: caracterização, aplicações e desafios

A biomassa lignocelulósica é formada por matéria orgânica oriunda de fontes vegetais ou dos resíduos agroindustriais, os quais são gerados pelo processamento do material vegetal. O material lignocelulósico, presente na parede celular dos vegetais, é constituído basicamente por celulose (35-50%), hemiceluloses (25-30%), lignina (15-30%) e, em menor quantidade, por sais minerais e extratos (FIGURA 2.1) (BRETHAUER & STUDER, 2015; ESPRO et al., 2017).

FIGURA 2.1: Arranjo da biomassa lignocelulolítica presente na parede celular dos vegetais.



Fonte: Adaptado de ESPRO et al., 2017.

Celuloses são as moléculas orgânicas mais abundantes na biosfera e quimicamente, trata-se de homopolissacarídeos lineares e não ramificados formados por 10.000 a 15.000 unidades de D-glicose conectadas através de ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (BRETHAUER & STUDER, 2015).

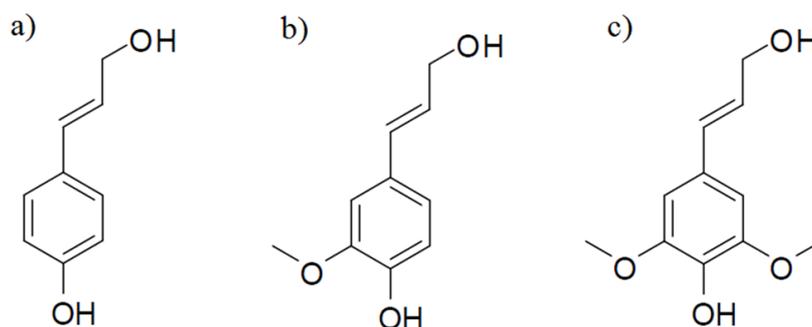
As celuloses são bastante empregadas nas indústrias farmacêuticas, na forma nativa ou modificadas estruturalmente, sendo utilizadas, por exemplo, para a composição de materiais de acondicionamento e embalagens. Além disso, na construção civil a celulose é empregada como espessantes, e no setor energético pode ser utilizada para a produção de etanol de segunda geração (NETO et al., 1997; NETZSCH, 2018).

Hemiceluloses são polissacarídeos com massa molecular mais baixa que as celuloses e trata-se de heteropolissacarídeos de 200 a 400 unidades de diferentes pentoses como xilose e arabinose, hexoses como manose, glicose e galactose; e açúcares ácidos como ácido D-galacturônico e D-glucurônico. Estas estão intrinsicamente associadas à celulose e à lignina nos tecidos vegetais (BRETHAUER & STUDER, 2015).

As hemiceluloses apresentam como função estrutural estabilizar a parede celular através de ligações de hidrogênio com a celulose e de ligações covalentes com a lignina. Além disso, são empregadas como energia extracelular e como mecanismo de retenção de água em sementes (WYMAN et al., 2005). Assim como a fração celulósica, a hemicelulósica também pode ser empregada na produção de etanol.

Ligninas, diferentemente de celulose e hemicelulose, não são polissacarídeos e sim polímeros biossintetizados a partir de monômeros derivados de fenilpropanóides, os monolignóis, que variam entre si pelo grau de metoxilação, sendo eles o álcool *p*-cumarílico (4-Hidroxifenil, H), o álcool coniferílico (Guaiacil, G), e o álcool sinapílico (Siringil, S) (FIGURA 2.2) (FUKUSHIMA & HATFIELD, 2003; BRETHAUER & STUDER, 2015).

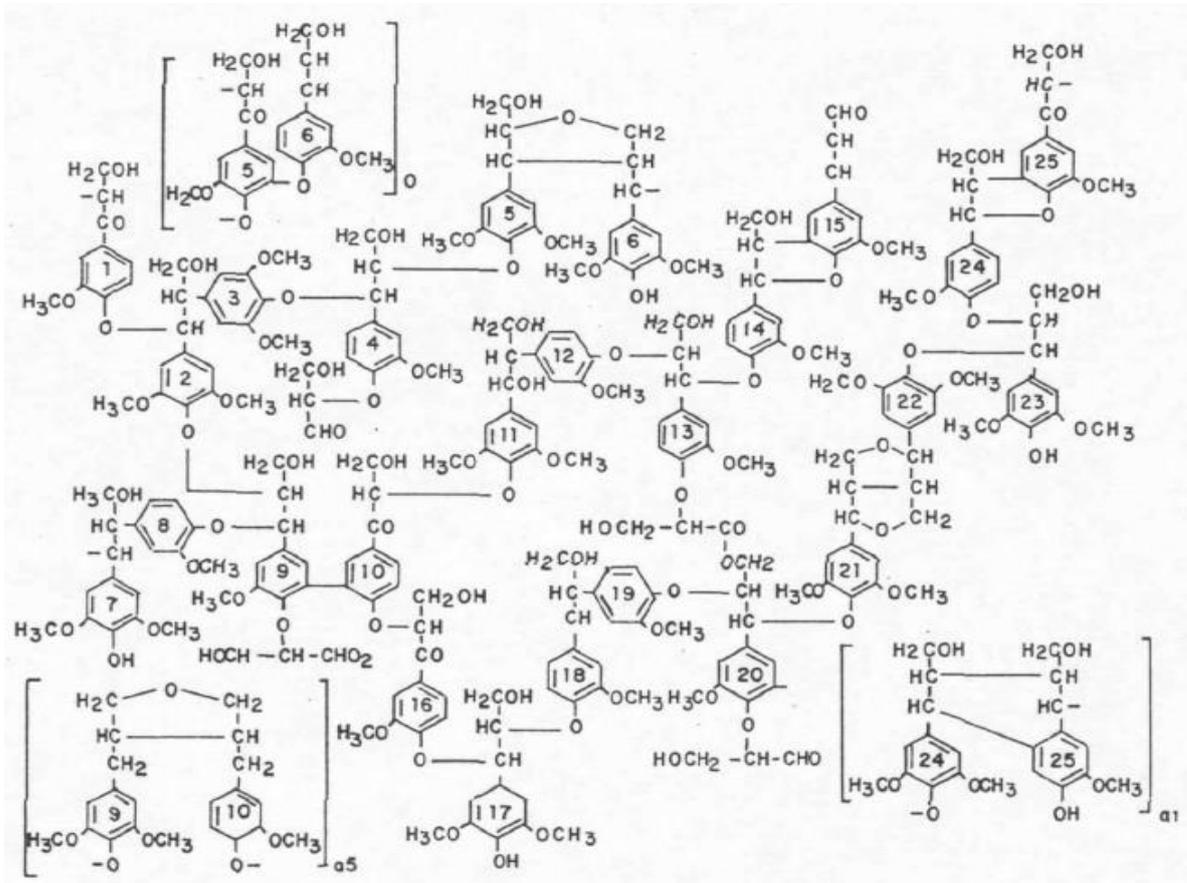
FIGURA 2.2: Monômeros de monolignóis precursores de ligninas. (a) álcool *p*-cumarílico, (b) álcool coniferílico e (c) álcool sinapílico.



Fonte: COSTA, 2014.

A lignina é uma macromolécula, definida como uma substância hidrofóbica, com estrutura tridimensional, amorfa e altamente ramificada (SILVA et al., 2011). A sua estrutura química é bastante complexa devido ao grande número de combinações possíveis entre as unidades precursoras, como pode ser observado no exemplo de lignina folhosa mostrada na FIGURA 2.3. Entretanto, durante o processo de extração a lignina acaba sofrendo modificações, portanto as suas estruturas não são totalmente conhecidas. Além disso, a composição da lignina também difere quanto à espécie vegetal, órgãos, tecidos e até mesmo das frações da parede celular. Durante o desenvolvimento das células a lignina é incorporada como o último componente na parede celular, interpenetrando as fibrilas e assim fortalecendo e enrijecendo as paredes celulares (KLOCK et al., 2005).

FIGURA 2.3: Estrutura química proposta para uma lignina de folhosa (*Fagus sylvatica*).



Fonte: NIMZ, 1981.

Na estrutura lignocelulósica, a lignina funciona como uma espécie de ‘cola’ ligando-se às cadeias celulósicas e hemicelulósicas (FIGURA 2.1). A lignina desempenha funções importantes para o vegetal como transporte de água, nutrientes e metabólitos, confere resistência física e impermeabilidade às fibras vegetais, e também atua protegendo as plantas contra invasão de patógenos e/ou pragas (STICKLEN, 2008; SÁNCHEZ, 2009).

Para que a biomassa lignocelulósica seja empregada como matéria prima para a produção de etanol e de outras substâncias químicas com valor agregado, é necessário que a celulose, a hemicelulose e a lignina sejam separadas. Nessa etapa é necessário que haja um pré-tratamento, visando à desestabilização do complexo lignocelulósico e a deslignificação. O pré-

tratamento utilizado pode ser térmico, químico, enzimático, físico e/ou combinação dos mesmos, e a escolha dependerá do grau de separação requerido e do processo que fará uso dessas substâncias (RAMOS, 2003; MOOD et al., 2013).

Esforços sempre são direcionados para a melhor compreensão das vias de biossíntese e a degradação da lignina, visando otimizar os processos de deslignificação usados na indústria de celulose e papel, sucroalcooleira, bem como à nascente indústria de conversão da biomassa lignificada em etanol de segunda geração (CARVALHO et al., 2009; HONG et al., 2015; ASINA et al., 2016).

O processo de sacarificação da celulose e da hemicelulose, bem como o da fermentação de açúcares na produção de etanol, pode ser afetado pela lignina de duas maneiras:

- i- Adsorção irreversível das enzimas hidrolíticas na lignina, impedindo a sua atividade enzimática na celulose;
- ii- Impedimento da fibra celulósica de se entumecer, devido às propriedades hidrofóbicas da lignina, reduzindo a superfície acessível para as enzimas.

Esses inconvenientes levam à necessidade de utilização de maiores quantidades de enzimas hidrolíticas, aumentando os custos e inviabilizando o processo (DAMASCENO et al., 2010). Assim, a remoção seletiva e quantitativa da lignina é um fator crítico para a digestibilidade da biomassa.

O emprego de enzimas para a hidrólise da biomassa lignocelulósica para a obtenção de açúcares fermentáveis e a segregação da lignina é preferível, quando comparado com a hidrólise ácida (DAMASCENO et al., 2010). A hidrólise enzimática é um processo altamente específico, sendo realizada em condições mais brandas (pH em torno de 5 e temperatura inferior a 50 °C), levando a um menor consumo energético e menor impacto ambiental, consequência dos resíduos menos tóxicos gerados no decorrer do processo. Além disso, evita problemas de corrosão provocados pelo emprego de ácidos

(por exemplo, H_2SO_4) normalmente usados na hidrólise ácida, apesar desse método fornecer alto rendimento de glicose para ser empregada nos processos de bioconversão (CARVALHO et al., 2009; DAMASCENO et al., 2010; MOOD et al., 2013).

A ligação complexa da lignina à celulose e à hemicelulose faz com que a remoção física e química da lignina na biomassa não seja totalmente eficiente e consuma muita energia. Dessa forma, estudos vêm sendo desenvolvidos para tornar viável a utilização de enzimas ligninolíticas extracelulares expressas por diversos micro-organismos para a aplicação nos processos industriais de deslignificação (HONG et al., 2015; ASINA et al., 2016; KUMAR et al., 2018).

2.2. Enzimas ligninolíticas

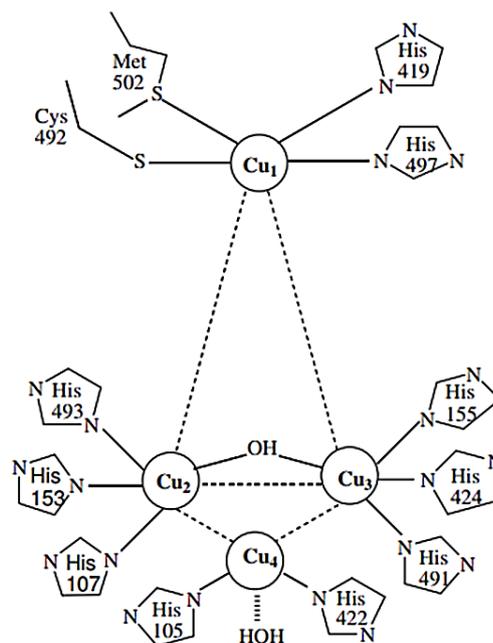
Os fungos têm dois tipos de sistemas enzimáticos extracelulares. O chamado sistema hidrolítico é relacionado com a etapa onde o fungo produz hidrolases responsáveis pela degradação de polissacarídeos e, portanto, está relacionado à etapa de hidrólise, onde os polímeros de celulose e hemicelulose são clivados em monômeros de açúcares solúveis, hexoses e pentoses. O outro sistema é o ligninolítico, que é oxidativo, e é onde o fungo consegue degradar lignina e está relacionado ao pré-tratamento do material lignocelulolítico (SÁNCHEZ, 2009).

A biodegradação de lignina é um processo oxidativo catalisado por enzimas chamadas ligninases, onde as mais conhecidas são as lacases (Lac), manganês-peroxidases (MnP) e lignina-peroxidases (LiP) (MARTÍNEZ et al. 2005).

2.2.1. Lacase (Lac)

As lacases são fenoloxidasas (EC 1.10.3.2) e fazem parte do subgrupo da superfamília das multicobre oxidases (MCOs), que catalisa a redução do oxigênio molecular produzindo água como único subproduto. São glicoproteínas com átomos de cobre localizados no seu sítio catalítico. Para a atividade catalítica da lacase, quatro átomos de cobre por monômero são essenciais. Esses cobres estão localizados em três sítios: no sítio T1 está localizado o Cu1, no sítio T2 o Cu4 e o sítio T3 possui dois cobres, o Cu2 e Cu3, como mostrado na FIGURA 2.4 (MOROZOVA et al., 2007; KUMAR et al., 2018).

FIGURA 2.4: Representação dos sítios T1, T2 e T3 de lacases, e seus respectivos átomos de cobre.



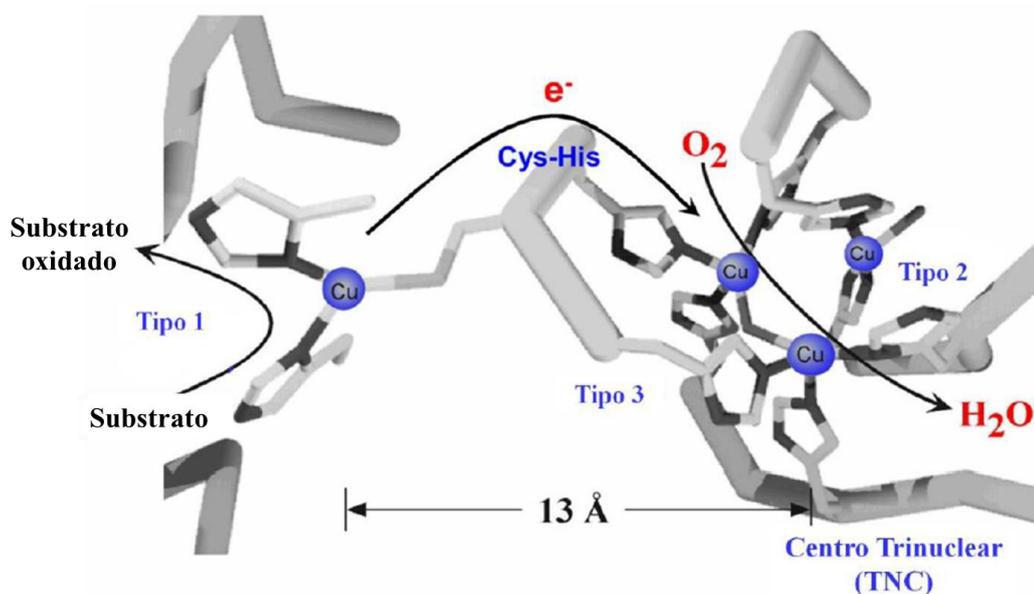
Fonte: Adaptado de KUNAMNENI et al., 2008.

O cobre localizado no sítio T1 apresenta absorção a 610 nm e pode ser detectado por espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis) e é relacionado com a cor azul das lacases. Portanto, as lacases que absorvem nessa região são denominadas de lacases azuis. O sítio T1 pode ser detectado também por ressonância paramagnética eletrônica (EPR – *electron paramagnetic resonance*).

O cobre do sítio T2 não é detectável por UV-Vis, mas é por EPR. O sítio T3 é formado por um par de átomos de cobre, que formam um par binuclear, antiferromagnético, e podem ser detectados por UV-Vis com absorção em torno de 330 nm, mas não são observados por EPR (NAKAMURA & GO, 2005; KUMAR et al., 2018). As lacases que absorvem a 330 nm são conhecidas como lacases amarelas ou brancas (LEONTIEVSKY et al., 1997).

Estruturalmente as lacases são formadas por três domínios denominados 1, 2 e 3. No ciclo catalítico, o sítio T1 (localizado no domínio 3) é reduzido pelo substrato, o qual transfere seus elétrons através do tripeptídeo His-Cys-His, que é altamente conservado em MCOs, a um complexo trinuclear designado como *trinuclear cluster* (TNC), formado pelos sítios T2 e T3 (localizados entre os domínios 1 e 3). Em seguida ocorre a redução do oxigênio a água no TNC (FIGURA 2.5) (SOLOMON et al., 2008; KÜES & RÜHL, 2011). As oxidações dos substratos pela enzima geram radicais, os quais podem sofrer hidratação, desproporção, polimerização ou despolimerização (MUNK et al., 2015; ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

FIGURA 2.5: Representação do sítio catalítico de multicobre oxidases. As setas em preto indicam o fluxo de elétrons.



Fonte: Adaptado de SOLOMON et al., 2008.

As lacases têm pouca especificidade e por isso conseguem reagir com diferentes substratos como os polifenóis, fenóis metoxi-substituídos e aminas aromáticas. Entretanto, o substrato siringaldazina tem sido considerado como o mais específico para identificar lacases (KÜES & RÜHL, 2011; IKE et al., 2015a).

Alguns fatores irão influenciar na oxidação dos substratos pelas lacases, como seus tamanhos e seus potenciais de redução. As lacases podem não oxidar substratos muito volumosos por causa do impedimento estérico, que impede que os substratos tenham acesso ao sítio ativo da enzima. E os substratos que possuem potenciais de redução superiores ao da enzima não são oxidados (IKE, 2015b; CAÑAS & CAMARERO, 2010).

Apesar disso, esses fatores podem ser superados pelo uso de mediadores, como por exemplo, o benzaldeído, ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico), HBT (1-hidroxibenzotriazol), TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila), dentre outros (MOROZOVA et al., 2007). Na presença de mediadores, as lacases podem realizar degradação de substratos fenólicos e não fenólicos. Os mediadores, após sofrerem oxidação pela enzima, se tornam intermediários oxidantes fortes para degradar unidades não fenólicas e também impedem a polimerização de pequenos compostos reativos formados durante a degradação, ou seja, os mediadores agem como transportadores de elétrons (KUMAR et al., 2018).

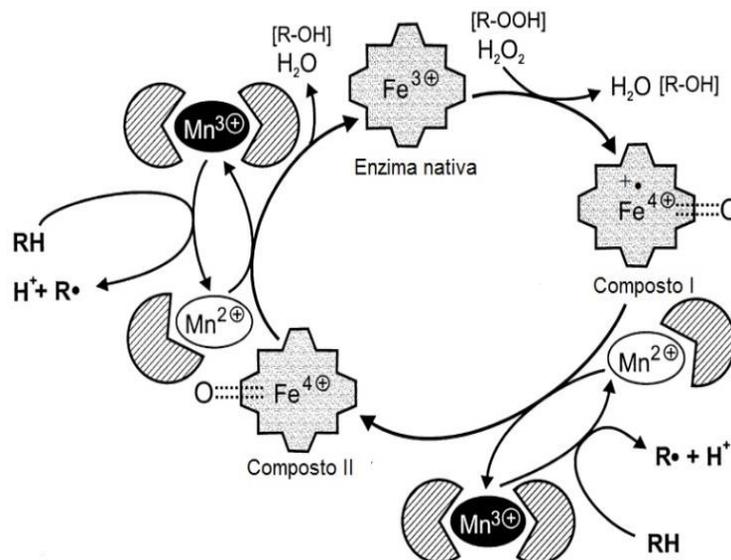
As lacases amarelas, apesar de apresentarem o cobre do sítio T1 (que fornece absorção a 610 nm), têm absorção a 330 nm (LEONTIEVSKY et al., 1997). Um interessante comportamento de tais lacases é a capacidade de oxidar substratos não fenólicos mesmo na ausência de mediadores químicos. Assim, lacases amarelas são enzimas com capacidade de uso em processos biotecnológicos que visem à degradação de lignina com a redução de custo industrial, uma vez que não necessitam de mediadores químicos. Ainda são

poucos estudos descritos na literatura sobre lacases amarelas e o seu mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido (IKE, 2015b).

2.2.2. Manganês peroxidase (MnP)

Manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) é uma glicoproteína que contém ferro como grupo prostético, dependente de H_2O_2 e do íon Mn^{2+} para sua atividade (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010). O ciclo catalítico das MnP, representado na FIGURA 2.6, inicia-se com a ligação do H_2O_2 ou peróxidos orgânicos ao ferro da enzima nativa. A quebra da ligação O-O do peróxido requer a transferência de 2 elétrons do grupo heme da enzima formando um complexo radicalar, denominado como composto I, liberando a água (HOFRICHTER, 2002; CARVALHO et al., 2009).

FIGURA 2.6: Ciclo catalítico de manganês peroxidases.



Fonte: Adaptado de HOFRICHTER, 2002.

A formação do composto II se dá pela redução da enzima, formando um composto não radicalar. Esse processo ocorre na presença do íon Mn^{2+} que é oxidado a Mn^{3+} , o íon age como doador de elétron para esse

complexo intermediário. A conversão do composto II à enzima nativa acontece pela oxidação exclusivamente de Mn^{2+} , gerando mais um íon Mn^{3+} , liberando a segunda molécula de água (FIGURA 2.6) (HOFRICHTER, 2002; CARVALHO et al., 2009).

Enquanto o composto I pode ser convertido em composto II tanto na presença de Mn^{2+} quanto de outros doadores de elétrons com potencial redox apropriado, a conversão do composto II até a enzima nativa é pouco reduzida por outros substratos, ocorrendo somente na presença de Mn^{2+} para completar o ciclo (HOFRICHTER, 2002).

Os íons Mn^{3+} formados durante o ciclo catalítico é estabilizado por ácidos orgânicos, como o ácido oxálico, que podem abstrair elétrons de vários compostos orgânicos (incluindo fenóis, aminas aromáticas, compostos sulfurados e ácidos graxos insaturados) de maneira inespecífica, levando à formação de radicais. Por causa da inespecificidade do íon Mn^{3+} , o sistema dessa enzima tem sido eficiente para oxidação de poluentes orgânicos. Estas enzimas podem participar também das reações de despolimerização de ligninas e cloroligninas, desmetilação de lignina e deslignificação (GOLD & ALIC, 1993; HOFRICHTER, 2002).

2.2.3. Lignina peroxidase (LiP)

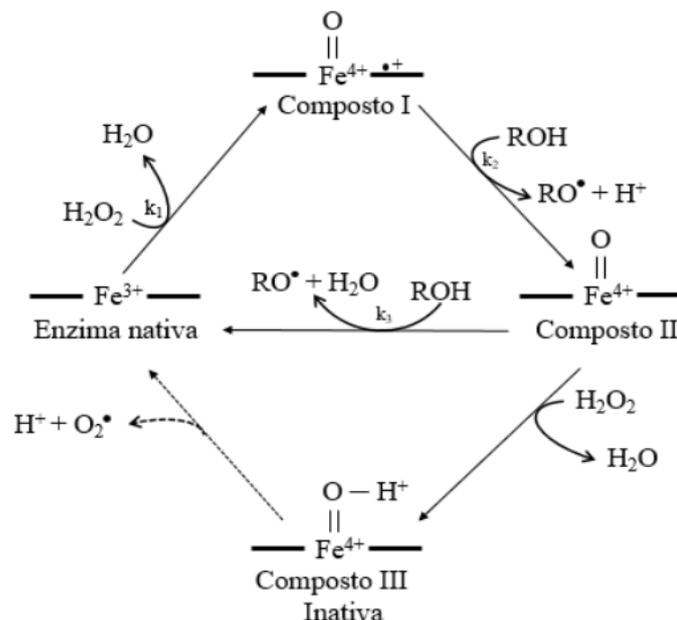
Lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) são glicoproteínas que contém ferro como grupo prostético e precisam de H_2O_2 para a sua atividade catalítica (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010). Essas proteínas são capazes de degradar compostos fenólicos e não fenólicos, pois apresentam um potencial de redução maior, quando comparado com os das Lac e MnP, não necessitando de mediadores (CARVALHO et al., 2009; WONG, 2009).

Durante o ciclo catalítico da LiP, representado na FIGURA 2.7, a enzima oxida os substratos pela transferência de elétrons em várias etapas e pela formação de radicais intermediários. O ferro contido no grupo prostético da

enzima passa por estados de oxido-redução. A primeira etapa inicia com a oxidação do Fe(III) da enzima nativa para Fe(IV), pela ação do H_2O_2 , com a geração do radical catiônico da LiP (composto I).

O composto I é reduzido, por transferência de um elétron, e formado o composto II, que ainda contém Fe(IV). O agente redutor pode ser um substrato como, por exemplo, o álcool veratrílico ou o H_2O_2 . E por último, ocorre a etapa de redução por um elétron que retorna a enzima a seu estado nativo, completando o ciclo catalítico. Na falta do substrato redutor, o composto II é oxidado pelo H_2O_2 para um composto III, uma conformação da LiP com baixa capacidade catalítica que, com excesso de H_2O_2 , é rapidamente inativada (FIGURA 2.7) (MARTÍNEZ, 2002).

FIGURA 2.7: Ciclo catalítico de lignina peroxidases.



Fonte: ELY et al., 2016.

2.3. Fungos no processo biotecnológico da biomassa lignocelulósica

Os fungos são organismos eucariotos, heterótrofos, unicelulares ou pluricelulares, e a sua parede celular é constituída principalmente pelo

polissacarídeo quitina. Os fungos podem apresentar duas unidades morfológicas básicas, a leveduriforme ou a estrutura filamentosa denominada hifal, havendo a possibilidade de mudança entre uma morfologia ou outra, dependendo do ambiente, da temperatura ou do oxigênio/dióxido de carbono disponíveis. (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

Os fungos leveduriformes apresentam células unicelulares, delimitadas e pequenas. Enquanto que as hifas são extremamente polarizadas, na forma de tubos que, continuamente estendem-se em suas extremidades, podendo ser septadas (com septos) ou cenocíticas (sem septos). O agrupamento de hifas, ramificadas ou não, denomina-se micélio (MORAES et al., 2009; ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

Tratando-se de fungos, emprega-se o termo reprodução para se referir aos processos tanto de origem assexual, que ocorre através de brotamento, fragmentação ou esporos; quanto sexual, que originam os esporos. Os esporos têm as funções de produção de novos indivíduos, de dispersão a um novo local e a sobrevivência do organismo até o retorno de condições favoráveis para o seu desenvolvimento (MORAES et al., 2009; ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

No Reino Fungi, cita-se quatro filos principais, sendo eles:

- i- Filo *Chytridiomycota*: são predominantemente aquáticos, sendo os únicos fungos que apresentam esporos flagelados, chamados de zoósporos. Podem ser unicelulares ou multicelulares, as quais apresentam hifas cenocíticas. São sapróbios (nutrem-se de matéria orgânica proveniente de organismos mortos) ou parasitas de plantas, animais ou outros fungos. Um exemplo de fungo desse filo é o *Batrachochytrium dendrobatidis*, fungo parasita que ameaça a população mundial de anfíbios.
- ii- Filo *Zigomycota*: são sapróbios, simbiontes ou parasitas. Podem se reproduzir de forma assexual (formam esporângios) e sexual, sem formação dos corpos frutíferos, através da produção de zigósporo

(esporo). As hifas desse filo também são cenocíticas. Dois exemplos de fungo desse grupo são os bolores dos gêneros *Mucor* e *Rhizopus*, encontrados sobre frutas e vegetais em processo de apodrecimento.

- iii- Filo *Ascomycota*: apresenta o maior número de espécies do Reino Fungi. São sapróbios, parasitas ou simbiontes. Podem se apresentar na forma de leveduras (unicelular) ou micelial (multicelular). Os fungos filamentosos possuem hifas septadas e suas estruturas reprodutivas, chamadas de ascos, formam os ascósporos (esporos), já a reprodução assexuada se dá pela formação e liberação dos conídios. A reprodução nesse grupo pode ocorrer também por brotamento, no caso dos unicelulares.

Formam os líquens, que é a associação mutualista entre fungos e algas ou cianobactérias, e formam também as micorrizas, que é a associação mutualista entre fungos e a raiz de plantas superiores. Fazem parte desse filo fungos dos gêneros *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Chaetomium*, por exemplo.

- iv- Filo *Basidiomycota*: são comumente denominados de “cogumelos”. A maioria possui basídio, que é a estrutura responsável pela produção dos basidiósporos (esporos), apresentam corpo frutífero e possui hifas com septos. São sapróbios, simbiontes ou parasitas. Certas espécies são fonte de proteínas e cultivadas para fins comerciais, como por exemplo, o cogumelo da espécie *Pleurotus ostreatus*, que é popularmente conhecida no Brasil como *shimeji* (SILVA & COELHO, 2006; ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

Devido às características morfológicas e de desenvolvimento apresentados, os fungos possuem grande potencial de utilização para diversos fins econômicos. Destaca-se a produção de fungos para fins alimentícios tais como os cogumelos, queijos, bebidas alcoólicas, entre outros; no setor farmacêutico os fungos são empregados para a produção de antibióticos, como a penicilina e hormônios; no setor industrial são utilizados para produzir enzimas

de interesse, como a papaína e β -galactosidase; na agricultura são empregados como os biopesticidas ou no controle biológico; e na área ambiental os fungos podem estar sendo utilizados na biodegradação, micorremediação ou até mesmo ser aplicado a tratamento de efluentes (SILVA & COELHO, 2006; ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

Na degradação dos componentes estruturais da madeira os fungos são classificados de acordo com a decomposição que é capaz de realizar: podridão branca e parda, que é causada principalmente por basidiomicetos e ascomicetos, e a de podridão mole da madeira, causada por ascomicetos. Os fungos de podridão branca são capazes de degradar celulose, hemicelulose e lignina, em aproximada intensidade. Fungos de podridão parda são capazes de degradar de forma intensa a celulose e hemicelulose, porém degrada fracamente a lignina. E os fungos de podridão mole conseguem degradar todos os componentes, entretanto, em baixa velocidade (MARTÍNEZ et al., 2005; CASTRO, 2009).

O setor industrial, em especial as indústrias de celulose e papel e a sucroalcooleira, têm grande interesse nos fungos visando a obtenção de enzimas que sejam efetivas na biodegradação de materiais lignocelulósicos. A biodegradação de materiais lignocelulósicos, como a madeira e biomassas vegetais em geral, sob condições controladas, com os extratos enzimáticos fúngicos ou com os próprios fungos, tem-se mostrado um importante processo biotecnológico de aplicação industrial. Cita-se as principais aplicações o emprego de enzimas para a hidrólise da biomassa lignocelulósica na obtenção de açúcares fermentáveis e de enzimas que degradem exclusivamente a lignina, levando a segregação da lignina (CARVALHO et al., 2009; AMIN et al., 2018).

2.4. Fungos e suas potencialidades na produção de oxidases

Neste trabalho foram avaliados quatro fungos quanto à capacidade

de produção de enzimas oxidases, as quais são responsáveis pela degradação da lignina: *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996, *Penicillium* sp. FPZSP 151 e o *Chaetomium cupreum* URM 5066. A seguir, serão discutidos brevemente, alguns trabalhos que empregaram esses fungos em diversas propostas biotecnológicas.

Em 2010, BONUGLI-SANTOS e colaboradores avaliaram a atividade enzimática (LiP, MnP e Lac) de 3 fungos marinhos, dentre eles o fungo *Mucor racemosus* CBMAI 847, e reportaram que esse fungo é capaz de produzir enzimas ligninolíticas. Este trabalho foi o primeiro a relatar que um fungo do filo *Zicomycota* é capaz de produzir oxidases. PASSARINI e colaboradores, em 2011, fizeram estudo de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) utilizando o *M. racemosus* CBMAI 847 e afirmaram que o fungo conseguiu degradar 44% de benzo[a]pireno após 8 dias de incubação. Em outro trabalho, DAÂSSI et al. (2016) afirmam que o fungo *M. racemosus* possui atividade enzimática positiva para lacase a partir de *screening* realizado com guaiacol e ABTS. Os autores fizeram testes quantitativos utilizando os mesmos substratos do ensaio em placa e afirmaram também que o fungo é capaz de degradar alguns corantes avaliados. Dessa forma, é relatada a capacidade desse fungo em produzir enzimas ligninolíticas, porém ainda não haviam sido realizados estudos de purificação e caracterização das enzimas.

Os trabalhos mais recentes com o fungo *Chaetomium cupreum* URM 5066, fungo pertencente ao filo *Ascomycota* e isolado da raiz de cana-de-açúcar, têm sido voltados para expressão de proteínas recombinantes ou biocontrole (ZHANG et al., 2013; PANTHAMA et al., 2015; JIANG et al., 2017; VILAVONG & SOYTONG, 2017). Apesar de ser explorado mais como antifúngico, pois este fungo é capaz de produzir pigmento de coloração avermelhada com atividade antifúngica, azafilonas (KANOKMEDHAKUL et al., 2006), esse fungo também é capaz de produzir oxidases. QASEMIAN e colaboradores (2012) avaliaram a produção de lacase halotolerantes (Cl) por

fungos isolados de área costeira, dentre eles o fungo *Chaetomium* sp., e afirmam que este fungo produz lacase. Ademais, em 1998, CHEFETZ e colaboradores (1998) estudaram a produção de lacase pelo fungo *Chaetomium thermophilum*, as enzimas foram identificadas, purificadas e caracterizadas. Sendo assim, os fungos do gênero *Chaetomium* são capazes de produzir enzimas ligninolíticas, não sendo relatadas na literatura enzimas dessa classe relacionada ao *Chaetomium cupreum* até o momento.

Os fungos do gênero *Penicillium*, o qual pertencente ao filo *Ascomycota*, tem sido explorados quanto à produção de enzimas hidrolíticas, de produtos de interesse industrial ou de metabólitos secundários (HAN et al., 2018; ROJAS-AEDO et al., 2018; SANTA-ROSA et al., 2018). Porém este fungo também é capaz de produzir enzimas ligninolíticas, como lacases, como reportados por ELSHAFEI et al. (2012) e EL-SHORA et al. (2008). No presente trabalho foram estudados fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* isolados de diferentes ambientes, o *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996, isolado de ambiente marinho e o *Penicillium* sp. FPZSP 151, isolado de compostagem.

A proposta de se estudar a capacidade de produção de enzimas ligninolíticas em diversos fungos, isolados de ambientes diferentes, tem como objetivo aumentar as possibilidades de encontrar enzimas que tenham seletividade para degradar preferencialmente a lignina e reduzir as perdas nos processos industriais. Enzimas com boa atividade ligninolítica e estabilidade podem permitir a diminuição de tempo de incubação e um bom rendimento dos produtos desejáveis.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de produção de enzimas ligninolíticas por quatro fungos, *Mucor racemosus* CBMAI 847, *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996, *Penicillium* sp. FPZSP 151 e o fungo *Chaetomium cupreum* URM 5066. Bem como identificar, purificar e caracterizar as proteínas de interesse, além de analisar a degradação da lignina por essas enzimas.

✓ Objetivos específicos:

- Otimizar o cultivo dos micro-organismos em meios líquidos de cultura;
- Determinar a atividade enzimática máxima nos extratos brutos obtidos para a produção de oxidases extracelulares;
- Identificar e purificar as proteínas de interesse;
- Caracterizar as proteínas purificadas; e
- Realizar testes qualitativos de degradação de ligninas pelas enzimas ligninolíticas.

4. METODOLOGIA

4.1. Fungos avaliados

Neste trabalho foram estudados quatro fungos para a avaliação da capacidade de produção de enzimas ligninolíticas. Dois fungos avaliados foram isolados de ambiente marinho: *Mucor racemosus* CBMAI 847, isolado da espécie de cnidário *Mussismilia hispida* e o *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996, isolado da esponja marinha *Chelonaplysilla erecta*. Esses micro-organismos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto, do Instituto de Química de São Carlos, USP.

Também foram estudados dois fungos de ambiente terrestre: *Penicillium* sp. FPZSP 151, isolado de compostagem e caracterizado pela Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos da UNIFESP, o qual também foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto. E o fungo *Chaetomium cupreum* URM 5066, fungo endofítico, isolado da raiz de cana-de-açúcar, adquirido da Micoteca URM do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

4.2. Armazenamento dos micro-organismos

Os fungos foram cultivados em placa de Petri contendo meio de cultura constituído de extrato de malte 2% (m/v) e Ágar 1,6% (m/v). Para o cultivo dos fungos de ambiente marinhos (*Mucor racemosus* CBMAI 847 e *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996) foi acrescentado NaCl 3% (m/v) ao meio de cultura. Todos os fungos foram cultivados a 28 °C durante 7 dias. Em seguida, as placas contendo os fungos foram armazenadas a 4 °C. Utilizando essas placas, os fungos eram repicados sempre antes de algum cultivo em meio líquido ou a cada três meses para a manutenção.

4.3. Ensaio qualitativo para produção de enzimas ligninolíticas

Para a avaliação qualitativa da produção de enzimas ligninolíticas empregou-se a metodologia descrita por POINTING (1999). Todos os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo 25 mL de meio mínimo (KH_2PO_4 1 g L⁻¹, tartarato de amônio 0,5 g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g L⁻¹, CaCl_2 0,007 g L⁻¹, extrato de levedura 0,01 g L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,007 g L⁻¹ e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,001 g L⁻¹), suplementado com extrato de malte 2% (m/v), 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico) (ABTS) 0,1% (m/v), Ágar 1,6% (m/v) e 250 µL de uma solução de glicose 20% (m/v). O meio mínimo suplementado e a solução de glicose 20% (m/v) foram esterilizados separadamente em autoclave por 20 min sob pressão de 1 atm.

Os quatro fungos foram inoculados com um disco (10 mm de diâmetro) em placas de Petri contendo o meio de cultura, que foram vedadas com filme de parafina plástica (Parafilm M[®]) e mantidas em estufa a 28 °C durante 6 dias. O ensaio foi realizado em triplicata. Foram utilizados dois controles, sendo eles, uma placa contendo apenas o meio de cultura (sem inóculo) e uma placa contendo meio de cultura sem o substrato ABTS e inoculada com os fungos. Essas placas também foram mantidas em estufa a 28 °C durante 6 dias.

Os dois fungos mais promissores para a produção de enzimas ligninolíticas (*M. racemosus* CBMAI 847 e *C. cupreum* URM 5066) foram cultivados em meio de cultura líquido, conforme metodologia descrita a seguir.

4.4. Cultivo em meio líquido dos fungos *M. racemosus* CBMAI 847 e *C. cupreum* URM 5066

4.4.1. Meios de cultura avaliados para a produção de enzimas extracelulares do fungo *M. racemosus* CBMAI 847

Para a avaliação da produção de enzimas ligninolíticas secretadas pelo fungo *M. racemosus* foram utilizadas duas metodologias descritas na literatura: a metodologia adaptada de TIEN & KIRK (1988) e a de PASSARINI et al. (2011).

✓ Metodologia adaptada de TIEN & KIRK (1988)

O fungo primeiramente foi cultivado em meio sólido contendo extrato de malte 2% (m/v), Ágar 1,6% (m/v) e NaCl 3% (m/v), durante 7 dias a 28 °C . Em seguida, 200 mL de meio de cultura, descrito a seguir, foram inoculados com 8 discos (10 mm de diâmetro) retirados das extremidades do micélio da placa. Posteriormente, o frasco de erlenmeyer contendo o inóculo foi incubado no shaker a 28 °C e 150 rpm durante 15 dias. O experimento foi realizado em triplicata biológica. O preparo do meio de cultura está dividido em três tópicos:

- i- Preparo de solução de elementos traços: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6,2 g L⁻¹, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,6 g L⁻¹, NaCl 1 g L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g L⁻¹, CoCl_2 0,2 g L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g L⁻¹, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g L⁻¹, H_3BO_3 0,01 g L⁻¹, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g L⁻¹ e ácido nitriloacético 1,5 g L⁻¹.
- ii- Preparo de meio basal: KH_2PO_4 20 g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10,3 g L⁻¹, CaCl_2 1 g L⁻¹ e 100 mL de solução de elementos traços (quantidades para volume final de 1 L de meio).
- iii- Preparo do meio de cultura: 20 mL de meio basal, 20 mL de glicose 10% (m/v), 2 mL de tiamina 0,01% (m/v), 5 mL de tartarato de amônio 0,8% (m/v), 20 mL de álcool veratrílico 4 mM, 12 mL de solução de elementos traços e 121 mL de água deionizada.

Dentre essas soluções utilizadas, as soluções de glicose, tartarato de amônio e a água deionizada foram autoclavadas por 20 min sob pressão de 1

atm, enquanto que as demais soluções foram filtradas utilizando membranas estéreis de poro 0,20 μm .

✓ Metodologia de PASSARINI et al. (2011)

O fungo foi inoculado em meio sólido contendo extrato de malte 2% (m/v), Ágar 1,6% (m/v) e NaCl 3% (m/v), cultivado em estufa a 28 °C durante 7 dias. Em seguida, 8 discos (10 mm de diâmetro) retirados das extremidades do micélio da placa foram transferidos para um frasco de erlenmeyer (1 L) contendo 80 mL de meio de cultura com extrato de malte 2% (m/v) e NaCl 3% (m/v), incubados em estufa a 28°C durante 7 dias, estático. Posteriormente, foram acrescentados 120 mL de meio Sabouraud dextrose (peptona de carne 1% (m/v) e glicose 2% (m/v)), pH $5,6 \pm 0,2$, incubando o meio por mais 15 dias, a 28 °C e sob agitação (150 rpm). O pH do meio Sabouraud foi aferido com HCl. Os meios foram esterilizados em autoclave por 20 min sob pressão de 1 atm. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

4.4.2. Meios de cultura avaliados para a produção de enzimas extracelulares do fungo *C. cupreum* URM 5066

Para a avaliação da produção de enzimas ligninolíticas secretadas pelo fungo *C. cupreum* foram testados dois meios de cultivo descritos na literatura científica, um foi a metodologia adaptada de PASSARINI et al. (2011) e o outro a metodologia adaptada de POINTING (1999).

✓ Metodologia adaptada de PASSARINI et al. (2011)

Foi empregada a mesma metodologia descrita anteriormente para o cultivo do fungo *M. racemosus*, porém o meio sólido não continha NaCl 3% porque sendo este fungo de ambiente terrestre não necessitaria de um meio

salino. Além disso, ao meio líquido Sabouraud dextrose foi acrescentado $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0,001 \text{ g L}^{-1}$. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

✓ Metodologia adaptada de POINTING (1999)

O fungo foi inoculado em placa de Petri contendo extrato de malte 2% (m/v) e Ágar 1,6% (m/v), cultivado a 28 °C durante 7 dias. Em seguida, utilizando um frasco de erlenmeyer (1L) contendo 200 mL de meio mínimo, suplementado com extrato de malte 2% (m/v) e 2 mL de uma solução de glicose 20% (m/v), foram inoculados com 8 discos (10 mm de diâmetro) retirados das extremidades do micélio da placa. O meio mínimo suplementado e a solução de glicose foram esterilizados separadamente em autoclave por 20 min sob pressão de 1 atm. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

Todos os cultivos, tanto para o *M. racemosus*, quanto para o *C. cupreum*, foram acompanhados por no mínimo 16 dias através de ensaios enzimáticos para oxidases totais (metodologia descrita a seguir), coletando 1 mL de extrato bruto a cada 24 h, a fim de determinar a máxima produção de enzimas extracelulares.

4.5. Determinação de atividade enzimática

4.5.1. Determinação de oxidases totais: uso do substrato ABTS

Para a determinação enzimática de oxidases totais foram utilizados 70 μL do substrato ABTS 1 mM, 7 μL de H_2O_2 0,1 mM, 70 μL de MnSO_4 20 mM e extrato bruto (para *M. racemosus* e *C. cupreum* foram usados 70 μL e 7 μL de extrato bruto, respectivamente). O volume final da reação foi completado com solução tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, até 700 μL . O meio reacional foi incubado a 25 °C durante 5 min (IKE, 2015b). As medidas de

absorbância foram determinadas no comprimento de onda de 420 nm, utilizando um espectrofômetro (Beckman Coulter).

A concentração do substrato ABTS oxidado foi calculada usando o coeficiente de absorvidade molar de $36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e empregando a equação de Beer-Lambert (Equação 1) (WOLFENDEN & WILSON 1982).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad [\text{Eq. 1}]$$

onde A é a absorbância medida, ϵ o coeficiente de absorvidade ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c a concentração (M) e l o caminho óptico (cm).

A concentração obtida foi convertida de molar para micromolar e dividida pelo tempo de reação, obtendo-se a concentração da proteína em U L^{-1} . Sendo assim, uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir $1 \mu\text{mol}$ de ABTS oxidado (ABTS^{++}) por minuto. Todas as reações foram realizadas em triplicata ($n=3$).

4.5.2. Determinação de lignina peroxidase (LiP): uso do substrato álcool veratrílico

Para a determinação enzimática de lignina peroxidase foi avaliada a oxidação do álcool veratrílico como substrato. O ensaio consistiu em $70 \mu\text{L}$ de álcool veratrílico 10 mM , $70 \mu\text{L}$ de H_2O_2 2 mM e $70 \mu\text{L}$ de extrato enzimático bruto em tampão tartarato de sódio 125 mM , pH 3,0. O volume final da reação foi de $700 \mu\text{L}$, obtido adicionando uma solução tampão tartarato de sódio 125 mM , pH 3,0, para completar o volume. A reação tem início ao adicionar-se a solução de H_2O_2 , sendo assim, esta era adicionada por último. O meio reacional foi incubado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min (TIEN & KIRK, 1988).

As medidas de absorbância foram determinadas no comprimento de onda de 310 nm , utilizando um espectrofômetro (Beckman Coulter). A concentração de álcool veratrílico oxidado foi calculada usando o coeficiente de

absortividade de $9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e empregando a equação 1. (TIEN & KIRK, 1988). Todas as reações foram realizadas em triplicata ($n=3$).

Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir $1 \mu\text{mol}$ de veratraldeído por minuto.

4.5.3. Zimografia

Para as zimografias, foram preparados géis de acrilamida/bisacrilamida 15% (m/v) e SDS 1% (m/v), conforme metodologia descrita por LAEMMLI (1970). As amostras de extrato bruto e de proteínas purificadas foram diluídas em tampão de amostra desnaturante (tampão Tris-HCl 1 M, pH 6,8 1,2% (v/v), β -mercaptoetanol 1% (v/v), SDS 0,4% (m/v), glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,02% (m/v)) na proporção 2:1 (amostra: tampão) e aplicadas diretamente no gel, sem desnaturar as proteínas com aquecimento. A eletroforese em gel foi realizada a temperatura ambiente, sendo as amostras empacotadas no gel aplicando uma voltagem de 80 V e para o fracionamento uma voltagem de 120 V (GONÇALVES & STEINER 1996).

Ao término da eletroforese foi realizado o procedimento de renaturação das proteínas. Para isso, o gel foi incubado em 25 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, durante 1 hora, sendo feitas trocas da solução tampão a cada 15 min (GONÇALVES e STEINER 1996).

Os substratos usados para detectar a atividade enzimática em gel foram ABTS 1 mM e siringaldazina (SYR) $10 \mu\text{M}$ em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Outro substrato avaliado foi o álcool veratrílico 10 mM e H_2O_2 2 mM em tampão tartarato de sódio 125 mM, pH 3,0.

4.6. Purificação das enzimas

4.6.1. Purificação de enzimas extracelulares produzidas pelo *M. racemosus* CBMAI 847

Após o período de cultivo, o extrato bruto do fungo (meio de cultura com as enzimas) foi filtrado utilizando-se um papel de filtro qualitativo de porosidade 3 μm . Em seguida, o filtrado foi centrifugado a 10000 g a 4 °C durante 5 min e armazenado em tubo Falcon de 50 mL, a -20 °C.

Antes de iniciar a purificação, 40 mL de extrato bruto foram descongelados em banho de gelo e centrifugados novamente a 10000 g, a 4 °C durante 5 min.

✓ Precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)

O extrato bruto foi precipitado com 30%, 50% e 70% de (NH₄)₂SO₄ de forma sequenciada. O sal foi adicionado lentamente a 40 mL de extrato bruto até atingir a concentração de 30%. Após a adição do sal o meio era deixado sob leve agitação durante 15 min, posteriormente centrifugado a 10000 g, a 4 °C durante 10 min. O precipitado foi reservado e ao sobrenadante foi adicionado (NH₄)₂SO₄ até atingir a concentração de 50%, o meio foi deixado em repouso e foi utilizado o mesmo processo de centrifugação da precipitação anterior. O precipitado obtido com 50% foi reservado e ao sobrenadante foi adicionado (NH₄)₂SO₄ até atingir a concentração de 70%, seguindo o mesmo procedimento das precipitações anteriores.

Os precipitados foram ressuspensos em 4 mL de tampão acetato 50 mM, pH 5,0 e transferidos para membranas de diálise (SnakeSkin™ Dialysis Tubing 3.5K MWCO, 22 mm) e submetidos a diálise com solução tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Foram executadas 3 trocas da solução tampão, sendo que as duas primeiras foram mantidas por 1 h e a última troca da diálise por 16 horas.

As proteínas presentes no extrato foram avaliadas por atividade

enzimática e eletroforese em gel SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 15% (LAEMMLI, 1970). Após definir a melhor condição de precipitação do extrato bruto empregando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a amostra passou a ser denominada como pré-coluna.

✓ Cromatografia em coluna de troca iônica

A pré-coluna (4 mL) foi aplicada em coluna de troca aniônica de 1 mL Hitrap QFF acoplada ao sistema FPLC (*Fast protein liquid chromatography*- GE Healthcare), a qual foi previamente equilibrada com solução tampão acetato 50 mM, pH 5,0 (tampão A). A solução de eluição utilizada foi tampão acetato 50 mM, pH 5,0, acrescido de NaCl 1 M (tampão B). Foi empregado um fluxo de 1 mL min^{-1} . As frações obtidas foram analisadas quanto à atividade (mesmo ensaio usado para determinar oxidases totais) e por eletroforese em SDS-PAGE 15%.

✓ Cromatografia em coluna de exclusão molecular

Frações com atividade ligninolíticas eluídas da coluna QFF foram aplicadas em uma coluna de exclusão molecular de 120 mL Superdex 75 (GE Healthcare), acoplada ao sistema FPLC. A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato 50 mM, pH 5,0, acrescido de NaCl 150 mM. Na análise cromatográfica foi empregado um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. As frações obtidas foram analisadas quanto à atividade para lignina peroxidase e por eletroforese em SDS-PAGE 15%.

4.6.2. Purificação de enzimas extracelulares produzidas pelo *C. cupreum* URM 5066

Após o período de cultivo, o extrato bruto obtido do fungo *C. cupreum* foi filtrado utilizando-se um papel de filtro qualitativo de porosidade 3

µm. Em seguida, o filtrado foi centrifugado a 10000 g a 4°C durante 5 min e armazenado em tubo Falcon de 50 mL, a -20 °C.

Antes de iniciar a purificação, 40 mL de extrato bruto foram descongelados em banho de gelo e centrifugados novamente a 10000 g, a 4 °C durante 5 min.

✓ Membrana de ultrafiltração

Foi utilizada uma membrana de ultrafiltração de 50 kDa (Amicon® Ultra-15 Millipore) para concentrar os 40 mL extrato bruto até aproximadamente 4 mL. A amostra foi centrifugada a 1500 g a 4 °C durante 5 min, sendo centrifugadas alíquotas de 10 mL por vez, acarretando em um total de 4 centrifugações. Posteriormente, o extrato bruto concentrado foi lavado com solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, ainda utilizando a membrana de corte, da seguinte forma: ao extrato bruto concentrado foram adicionados 5 mL de solução tampão e centrifugado novamente, foram realizadas 3 lavagens, resultando em um volume final de 1 mL. Essa amostra concentrada foi denominada de pré-coluna, a qual foi aplicada na coluna de troca iônica.

✓ Cromatografia em coluna de troca iônica

A pré-coluna (1 mL) foi aplicada em coluna de troca aniônica de 1 mL DEAE-Sepharose (GE Healthcare) acopladas ao sistema FPLC, a qual foi previamente equilibrada com tampão acetato 50 mM, pH 5,0 (tampão A). A solução de eluição utilizada foi tampão acetato 50 mM, pH 5,0 acrescido de NaCl 1 M (tampão B). Na análise cromatográfica empregou-se um fluxo de 1 mL min⁻¹. As frações obtidas foram analisadas quanto à atividade enzimática (mesmo ensaio utilizado para determinar oxidases totais) e por eletroforese em SDS-PAGE 15%.

✓ Cromatografia em coluna de exclusão molecular

As frações eluídas da coluna de troca iônica que apresentaram atividade foram concentrados em membrana de ultrafiltração de 10 kDa (Amicon[®] Ultra-15 Millipore), a 4500 g durante 10 min, até aproximadamente 1 mL. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em coluna de exclusão molecular de 120 mL Superdex 200 (GE Healthcare) acoplada ao sistema FPLC. A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato 50 mM, pH 5,0, acrescido de NaCl 150 mM. O fluxo utilizado na cromatografia foi de 0,5 mL min⁻¹. As frações obtidas foram analisadas quanto à atividade (mesmo ensaio usado para determinar oxidases totais) e por eletroforese em SDS-PAGE 15%.

4.7. Caracterização das proteínas

4.7.1. Determinação de proteínas totais

A quantificação das proteínas totais nos extratos brutos e amostras purificadas foram determinadas utilizando-se o método de BRADFORD (1976). A determinação de proteínas totais foi realizada medindo a absorvância no comprimento de onda de 595 nm, sendo as concentrações obtidas em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína. A curva de calibração foi construída utilizando-se diferentes concentrações de albumina de soro bovino (BSA) como padrão de calibração.

4.7.2. Eletroforese bidimensional: determinação do ponto isoelétrico

Para a determinação do ponto isoelétrico (pI) foi utilizada uma amostra do *pool 2* purificada a partir do extrato bruto do *C. cupreum* (obtida na purificação realizada na coluna DEAE-Sepharose), cuja concentração de proteínas totais foi de 51,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Uma alíquota de 200 μL dessa amostra contendo 10,36 μg de proteínas, solubilizadas em tampão acetato de sódio 50

mM, pH 5,0, foram precipitadas utilizando o 2-D Clean Up kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante, a fim de remover qualquer sal presente na amostra. Em seguida, a amostra foi solubilizada em tampão BF3 (Ureia 7 M, Tiourea 2M, 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 4% (m/v), Amidosulfobetaine-14 (ABS-14) 2% (m/v), 1,4-Ditiotreitol (DTT) 100 mM, pharmalyte (pH 3-10), pharmalyte (pH 4-7) e pharmalyte (pH 6-11)).

A eletroforese bidimensional foi conduzida de acordo com o procedimento de CARNIELLI et al. (2017). A solução com as proteínas dessalinizadas foi adicionada a uma *strip* de isoeletrofocalização (Immobiline™ DryStrip pH 3-10, 13 cm, GE Healthcare), a qual foi deixada em repouso durante 18 h para a hidratação em contato com a amostra. Após esse período, a *strip* foi inserida ao sistema Ettan IPGphor 3 IEF (GE Healthcare) para isoeletrofocalização a 20 °C, utilizando-se o *software* Ettan IPGphor 3. O programa utilizado na IEF consistiu nas seguintes etapas: 100 V por 14 h, 500 V por 1 h, gradiente até 1000 V por 3 h, gradiente até 8000 V por 3 h, 8000 V por 2 h e a 100 V por 1 h, totalizando 24 horas. Ao final da IEF, as proteínas foram separadas de acordo com seus pontos isoeletrônicos.

Para a separação na segunda dimensão, a *strip* foi incubada por 15 min, sob agitação, em 5 mL de uma solução de equilíbrio (Ureia 6 M, SDS 0,06 M, Tris 0,12 M, e Glicerol 30% (v/v) em pH 8,8) contendo 10 mg mL⁻¹ de DTT. Em seguida, a *strip* foi incubada por 15 min em 5 mL de solução de equilíbrio contendo 25 mg mL⁻¹ de Iodoacetamida (IAA). A *strip* foi colocada no topo de um gel de poliacrilamida a 12,5%, que foi selado com agarose a 1% contendo traços de azul de bromofenol.

A eletroforese da segunda dimensão foi realizada em sistema Hoefer™ SE600 (GE Healthcare) em tampão de corrida contendo Tris 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1% (m/v), a 15 °C (Sistema MultiTemp III, GE Healthcare). A corrida foi realizada mantendo-se a corrente elétrica a 20 mA nos

primeiros 30 min e a 48 mA até o término da corrida. As proteínas que haviam sido separadas pelo pI, são separadas agora pela diferença de massa molecular, formando assim os *spots*. Ao final da eletroforese, o gel foi corado com azul de coomassie. Os valores do pI de cada *spot* foram estimados manualmente.

4.7.3. Avaliação da atividade enzimática em função do pH e da temperatura

✓ Interferência do pH

O pH ótimo das proteínas purificadas foi determinado utilizando-se o substrato ABTS, como descrito no item 3.5.1 desta dissertação, conquanto os ensaios foram realizados em diferentes valores de pH. A variação do pH foi obtida utilizando-se o tampão citrato-fosfato (tampão McIlvaine), no qual soluções de citrato de sódio 0,1 M e fosfato de sódio dibásico 0,2 M foram misturadas em diferentes proporções para a obtenção do pH desejado (MCILLVAINE, 1921). A faixa de pH utilizada foi de 2,2 até 4,0. As reações foram realizadas em triplicata (n=3).

✓ Interferência da temperatura

A determinação da temperatura ótima foi realizada nos respectivos pH ótimos das enzimas, previamente definidos. A reação enzimática utilizada foi a mesma descrita no item 3.5.1 desta dissertação, porém as reações foram incubadas em banho seco variando as temperaturas de 25 °C a 80 °C. As reações foram realizadas em triplicata (n=3).

4.7.4. Determinação da massa molecular aparente

Para a determinação da massa molecular aparente, as proteínas de interesse purificadas foram analisadas utilizando a coluna de exclusão molecular

analítica de 24 mL Superose 12 (GE Healthcare) acoplada ao sistema FPLC. A coluna foi primeiramente equilibrada com solução tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, contendo 150 mM de NaCl. As eluições foram realizadas utilizando esse mesmo tampão e empregando um fluxo de 0,5 mL min⁻¹.

Foi construída a curva de calibração utilizando quatro proteínas de massas moleculares conhecidas: λ-globulina (160 kDa), BSA (67 kDa), Anidrase carbônica (30 kDa) e Citocromo C (12,3 kDa), as quais são denominadas de proteínas padrão. O volume zero da coluna foi determinado usando o marcador *blue dextran*.

Utilizando os respectivos volumes de eluição das proteínas padrão e das proteínas de interesse, calculou-se os coeficientes de partição (K_{av}) empregando a Equação 2.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad [\text{Eq. 2}]$$

onde, V_e é volume de eluição de cada proteína, V_0 é o volume zero da coluna e V_t é o volume total da coluna.

Os cálculos foram feitos utilizando o programa Microsoft Excel 2010, do qual foi plotado o gráfico de K_{av} versus logMM (log da massa molecular) a partir da eluição das proteínas padrão e obtida a equação da curva de calibração (WILSON, 2010).

A partir do ajuste linear foi possível determinar a massa molecular aparente de cada proteína de interesse, pois o coeficiente de partição está relacionado com o log MM, como mostrado na Equação 3.

$$K_{av} = -a(\log MM) + b \quad [\text{Eq. 3}]$$

onde a é o coeficiente linear e b o coeficiente angular obtidos a partir da curva de calibração.

4.7.5. Análise por espectrometria de massas

Inicialmente foi realizada a digestão enzimática da amostra e para isso uma alíquota de 200 μL da amostra ($60\text{-}100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi submetida à redução das ligações dissulfeto através da adição de 15 μL de solução de 1,4-Ditiotreitol 10 mM (DTT em solução tampão bicarbonato de amônio 50 mM), incubada durante 30 min em temperatura ambiente. A subsequente alquilação dos grupos tióis livres foi realizada através da adição de 10 μL de solução de Iodoacetamida 50 mM (IAA, em solução tampão bicarbonato de amônio 50 mM). A mistura reacional foi mantida a 30 °C durante 30 min em ambiente com luminosidade reduzida. Por fim, foi realizada a digestão enzimática pela adição de tripsina porcina (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega) em uma proporção de 1:30 (m:m) enzima:substrato, incubando-se por 17 h a 37 °C. Após digestão enzimática, a mistura de peptídeos resultantes foi dessalinizada e fracionada utilizando cartuchos de extração em fase sólida “*homemade*” C18 StageTips (RAPPSILBER, 2007).

Após a digestão das proteínas, foi executada a análise por LC-MS e para isso 50 μg de amostra digerida foi analisada utilizando-se um sistema cromatográfico em nano fluxo Easy-nLC II (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific), com uma fonte de ionização em nano eletrospray (Nanospray flex, Thermo Fisher Scientific). A separação cromatográfica dos peptídeos foi realizada utilizando-se uma coluna de fase reversa C18-A2 Thermo Easy (10 cm L x 75 μm D.I., 3 μm , 120 Å, Thermo Fisher Scientific) e uma pré-coluna C18-A1 Thermo Easy (2 cm L x 75 μm D.I., 3 μm , 120 Å, Thermo Fisher Scientific).

As amostras foram eluídas durante 150 min, com gradiente de 5% de Acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico (solvente B) e 95% de água deionizada com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) durante 5 min, de 5-40% de B, no intervalo de tempo de 5 a 100 min.; de 40-99% de B (de 100 a 115 min.);

99% de B, (de 115 a 135 min.); de 99-5% de B (de 135 a 145 min.) e de 5% de B (de 145 a 150 min.), a um fluxo de 200 nL min⁻¹.

As análises foram feitas com fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID, Collision-induced dissociation) com 35% de energia, com o espectrômetro de massas no modo *full-scan*, no intervalo de 300 a 1800 *m/z*, em modo positivo, voltagem do nanospray de 2.3 KV e temperatura da fonte em 250 °C. Os dados foram adquiridos utilizando o *software* XCalibur, versão 2.0.7 (Thermo Fisher Scientific).

As análises de LC-MS foram processadas (deconvolução, deisotopização e correção de medida de *m/z*) pelo software MASCOT Distiller (Matrix Science Ltd) e analisadas por busca em banco de dados empregando-se o sistema MASCOT v.2.4. (Matrix Science Ltd). Como parâmetros da busca foram selecionados digestão com tripsina com até 2 sítios de clivagem perdidos, carbamidometilcisteínas como modificação fixa, oxidação em resíduos de metionina como modificação variável e tolerância de massa de peptídeos e fragmentos ambos em $\pm 0,15$ Da. As buscas foram feitas no banco de dados NCBIInr.

4.8. Testes qualitativos com diferentes ligninas

Os fungos *M. racemosus* e *C. cupreum* foram avaliados quanto ao seu crescimento em meio mínimo na presença de duas diferentes ligninas: uma oriunda do bagaço de cana-de-açúcar (LC), e extraída pelo método de polpação alcalina; e uma lignina de *Eucalyptus* (LE), da qual foi extraída pelo processo Kraft e sofreu processo de sulfonação, fornecida pela empresa Suzano Papel e Celulose, ambas gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Moacir Rossi Forim do grupo de pesquisa de Produtos Naturais da UFSCar. Também foi avaliada a capacidade de degradação das ligninas pelas proteínas presentes no extrato bruto desses dois fungos.

4.8.1. Avaliação de crescimento dos fungos em meio sólido de cultura contendo lignina

Para a avaliação de crescimento dos fungos em meio sólido contendo lignina empregou-se a metodologia adaptada descrita por POINTING (1999). Os fungos *C. cupreum* e *M. racemosus* foram cultivados em placas de Petri contendo 25 mL de meio mínimo, lignina 0,1% (m/v), Ágar 1,6% (m/v) e 250 µL de uma solução de glicose 20% (m/v). O meio mínimo suplementado e a solução de glicose foram esterilizados separadamente em autoclave por 20 min sob pressão de 1 atm.

Os fungos foram inoculados com um disco (10 mm de diâmetro) em placas de Petri contendo o meio de cultura, vedadas com filme de parafina plástica (Parafilm M[®]) e mantidas em estufa a 28 °C durante 10 dias. O ensaio foi realizado em triplicata.

Na avaliação do teste foram preparados dois tipos de controles, sendo eles uma placa contendo apenas o meio de cultura (sem inóculo) e uma placa contendo meio de cultura sem o substrato lignina e inoculada com os fungos para o controle negativo. Essas placas também foram mantidas em estufa a 28 °C durante 10 dias.

4.8.2. Avaliação qualitativa da degradação da lignina pelo extrato bruto

Para a avaliação da degradação da lignina pelos extratos brutos dos fungos *M. racemosus* CBMAI 847 e *C. cupreum* URM 5066 foram preparadas placas de Petri com 25 mL de meio contendo 0,1% de lignina e 1,6% de Ágar. Após solidificação das placas, estas foram furadas (5 mm de diâmetro). Para a análise do efeito do extrato bruto do *M. racemosus* na lignina foram feitos 5 orifícios sendo adicionados: (1) 100 µL de extrato bruto, (2) 100 µL de extrato bruto acrescido de 10 µL de H₂O₂ 0,1 mM, (3) 10 µL de H₂O₂ 0,1 mM, (4) 100

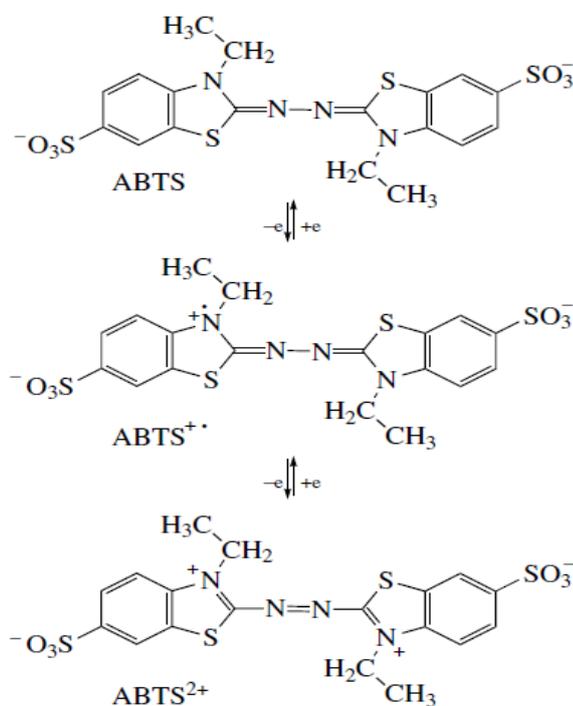
μL meio de cultura sem enzimas e no orifício (5) nada foi colocado. Para o *C. cupreum* foram feitos 3 orifícios sendo adicionados: (1) 100 μL de extrato bruto, (2) 100 μL meio de cultura sem enzimas e no orifício (3) nada foi colocado. As placas foram mantidas a 25 °C durante 24 h. Após esse período de incubação, as placas foram aspergidas com uma solução 1% de FeCl_3 e $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, preparada no momento do uso.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Ensaio qualitativo para a produção de enzimas ligninolíticas

Para avaliar a capacidade de produção de enzimas ligninolíticas pelos quatro fungos estudados, foi realizado um ensaio em meio de cultura sólido na presença do ABTS como substrato. O teste de atividade baseia-se na oxidação do ABTS a $ABTS^{+\cdot}$ (FIGURA 5.1). A formação do cátion radicalar resulta no surgimento de uma coloração esverdeada na placa inoculada, consequência da oxidação do substrato (POINTING, 1999). A reação de oxidação do ABTS é catalisada por enzimas produzidas pelos fungos, logo esse teste indica se o fungo é capaz de expressar enzimas oxidorredutases, como as lacases e peroxidases (FILLATA et al., 2016).

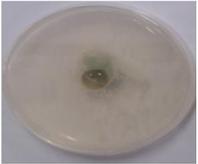
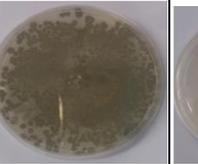
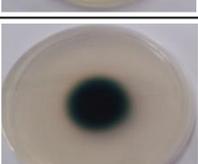
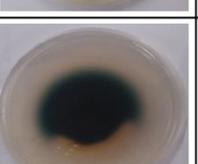
FIGURA 5.1: Esquema ilustrativo da reação de oxidação do ABTS.



Fonte: MOROZOVA et al., 2007.

Na FIGURA 5.2 estão apresentados os ensaios em placas de Petri após 2, 4 e 6 dias da inoculação dos fungos, além das placas controles. Na avaliação do teste foram preparados dois tipos de controles, sendo eles, uma placa contendo apenas o meio de cultura (sem inóculo), onde foi possível observar e se certificar que o ABTS não sofre oxidação espontânea (foto-oxidação, por exemplo). E as placas do controle negativo, constituídas de meio de cultura sem ABTS e inoculadas com os fungos, que permitiram comprovar que a coloração formada não provém de algum outro constituinte do meio ou subprodutos produzidos pelos fungos.

FIGURA 5.2: Ensaio de atividade com o substrato ABTS em meio de cultura sólido (n=3).

Dias Fungo	2	4	6	Controle Negativo	Controle sem inóculo
<i>Mucor racemosus</i> CBMAI 847					
<i>Penicillium oxalicum</i> CBMAI 1996					
<i>Penicillium sp.</i> FPZSP 151					
<i>Chaetomium cupreum</i> URM 5066					

Fonte: Autor, 2018.

Dentre os quatros fungos avaliados, o *Penicillium sp.* FPZSP 151 não foi capaz de oxidar o ABTS dentro das condições estudadas, como

observado pela ausência de coloração verde na placa de Petri. Os outros três fungos oxidaram o ABTS, porém os fungos *M. racemosus* CBMAI 847 e *C. cupreum* URM 5066 foram os melhores produtores de oxidorreductases quando comparados com o *P. oxalicum* CBMAI 1996 (FIGURA 5.2).

Estudos anteriores com diferentes fungos têm relatado a atividade ligninolítica em meio sólido utilizando o ABTS como substrato, esse ensaio tem sido utilizado principalmente para triagem de micro-organismos produtores de lacases (CHAIRATTANAMANOKORN et al., 2006; RAMÍREZ et al., 2012; FILLATA et al., 2016).

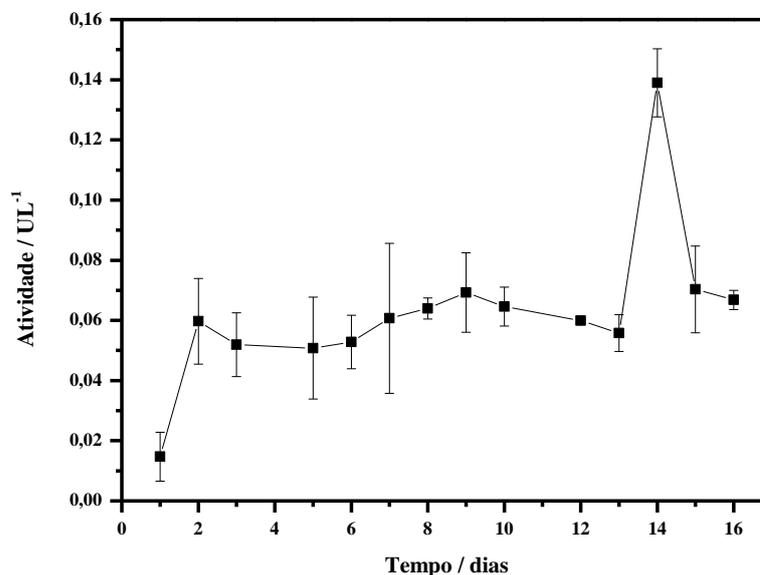
Considerando que os fungos *M. racemosus* CBMAI 847 e *C. cupreum* URM 5066 mostraram boa capacidade de oxidar o substrato ABTS em meio sólido, esses dois fungos foram selecionados e cultivados em meio líquido para produzir, identificar e isolar as enzimas ligninolíticas oriundas dos mesmos. Assim, os resultados obtidos para cada um dos fungos serão descritos a seguir separadamente.

5.2. Estudos com o fungo *M. racemosus* CBMAI 847

5.2.1. Produção de enzimas ligninolíticas

O meio de cultura TIEN & KIRK (1988) é um meio bastante relatado na literatura científica, empregado na produção de oxidases por fungos (CHAIRATTANAMANOKORN et al., 2006; LEE et al., 2015; IKE et al., 2015a). Dessa forma, este meio foi escolhido para a avaliação da expressão de oxidases extracelulares pelo fungo *M. racemosus*. A atividade enzimática para oxidases totais foi acompanhada a cada 24 h durante 16 dias, onde foi possível observar um máximo de atividade no décimo quarto dia ($0,139 \pm 0,011 \text{ U L}^{-1}$), FIGURA 5.3.

FIGURA 5.3: Variação da atividade enzimática em função do tempo de cultivo do fungo *M. racemosus* em meio de cultura adaptado de TIEN & KIRK (1988). Ensaio realizado com o substrato ABTS (n=3).



Fonte: Autor, 2018.

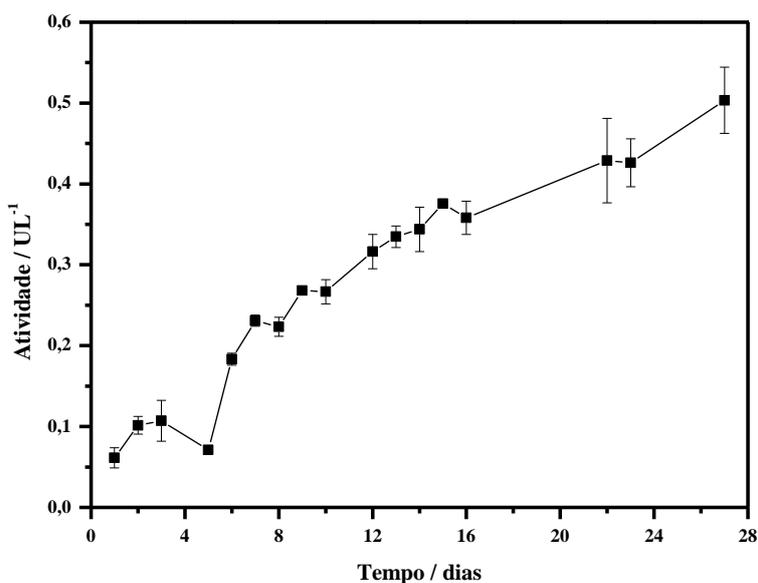
Também foi avaliada a produção de enzimas ligninolíticas em outro meio de cultura, descrito por PASSARINI et al. (2011). Esses autores avaliaram a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos pelo fungo *M. racemosus* CBMAI 847, demonstrando que este fungo é capaz de produzir enzimas oxidases. Ao utilizar esse meio de cultura, as atividades enzimáticas para oxidases totais foram acompanhadas a cada 24 h durante 27 dias.

Observou-se que a atividade vai aumentando ao longo do período estudado, sem apresentar um máximo de atividade, FIGURA 5.4. Observa-se também que a atividade enzimática no meio de PASSARINI e colaboradores (2011) foi maior do que a obtida no meio de TIEN & KIRK (1988). Portanto, o meio descrito por PASSARINI e colaboradores (2011) foi utilizado para o crescimento do fungo nos estudos subsequentes de produção e isolamento das enzimas.

Uma vez que a atividade enzimática aumenta ao longo do tempo, FIGURA 5.4, houve a necessidade de escolher um determinado período de

incubação do fungo e optou-se pelo sétimo dia de cultivo, pois neste período houve uma boa produção de enzimas ligninolíticas, sendo a atividade determinada de $0,231 \pm 0,007 \text{ U L}^{-1}$.

FIGURA 5.4: Variação da atividade enzimática em função do tempo de cultivo do fungo *M. racemosus* em meio de cultura adaptado de PASSARINI et al. (2011). Ensaio realizado com o substrato ABTS (n=3).



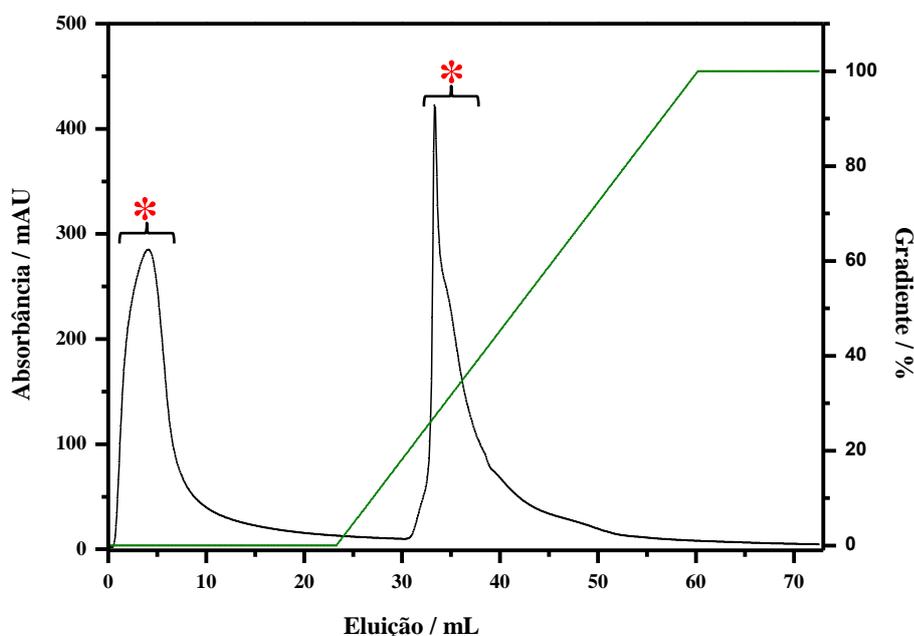
Fonte: Autor, 2018.

5.2.2. Purificação das enzimas extracelulares

Determinados o meio de cultura e o tempo de cultivo passou-se, então, para a etapa de purificação das enzimas. O extrato bruto (meio de cultura) foi inicialmente precipitado com sulfato de amônio (SA), onde, através de SDS-PAGE 15% (dados não mostrados), foi possível observar que com 50% de SA uma das proteínas era parcialmente precipitada e que com 70% de SA todas as proteínas eram precipitadas. Observou-se que a precipitação com SA não seria uma metodologia interessante para purificar as enzimas, mas que poderia ser empregada para concentra-las. Portanto, os ensaios com precipitação foram realizados com 70% de SA.

A amostra precipitada foi dialisada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, e avaliada quanto à atividade de oxidases totais. Em seguida, essa amostra, denominada de pré-coluna (PC), foi aplicada em uma coluna de troca aniônica Hitrap QFF. Na FIGURA 5.5, é apresentado o cromatograma correspondente a essa purificação, em que as frações que apresentaram atividade frente ao substrato ABTS estão indicadas com um asterisco.

FIGURA 5.5: Cromatograma obtido na purificação das oxidases presentes no extrato bruto do *M. racemosus* precipitado com 70% de SA e aplicado na coluna de troca aniônica Hitrap QFF. Frações com atividade para oxidases totais utilizando o substrato ABTS (*).



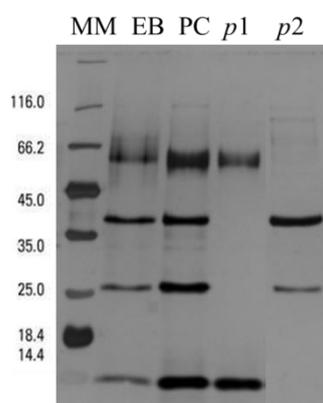
Fonte: Autor, 2018.

Ao realizar o ensaio de atividade para oxidases totais utilizando o substrato ABTS, foi possível observar que as proteínas que não foram retidas na coluna apresentaram atividade, que são as frações pertencentes à primeira banda do cromatograma, as quais foram reunidas e denominadas de *pool 1*. As proteínas retidas na coluna, frações eluídas correspondentes a segunda banda do

cromatograma, também apresentaram atividade, essas frações também foram reunidas e denominadas de *pool 2*.

Uma amostra do *pool 1* e do *pool 2* foram concentradas 2X no *speed-vacuum* e analisadas por eletroforese em SDS-PAGE 15%, FIGURA 5.6. Observa-se no gel que o extrato bruto apresentava, majoritariamente, quatro proteínas e que após a cromatografia com a coluna aniônica foi possível separá-las parcialmente. O *pool 1* continha uma proteína de massa molecular de aproximadamente 60 kDa e uma outra proteína de massa molecular abaixo de 14 kDa, enquanto que o *pool 2* possuía outras duas proteínas, uma com massa molecular de aproximadamente 38 kDa e outra proteína próximo de 25 kDa.

FIGURA 5.6: Análise em SDS-PAGE 15% da purificação parcial das oxidases expressas pelo fungo *M. racemosus* (corado com prata). Marcador de massa molecular (MM), extrato bruto (EB), pré-coluna (PC), *pool 1* (*p1*) e *pool 2* (*p2*).



Fonte: Autor, 2018.

As atividades determinadas, expressas em mU L^{-1} , para o extrato bruto, pré-coluna, *pool 1* e *pool 2*, utilizando o ABTS como substrato, estão descritas na TABELA 5.1.

TABELA 5.1: Atividade enzimática das amostras do fungo *M. racemosus*. Ensaio realizado utilizando o substrato ABTS.

	Atividade (mU L ⁻¹)
Extrato bruto	206,39
Pré-coluna	104,26
<i>pool 1</i>	48,60
<i>pool 2</i>	37,44

Fonte: Autor, 2018.

Ao analisar as amostras no gel SDS com suas respectivas atividades, observa-se que à medida que se inicia o processo de concentração e purificação parcial, a atividade diminui. O processo de isolar as proteínas pode acarretar em uma atividade menor, uma vez que a proteína isolada em alguns casos pode se tornar instável, devido à perda da sua conformação estrutural, decorrente do ambiente artificial em se encontram (KAUFMANN, 1997).

Na literatura, é descrito que alguns parâmetros podem influenciar a estabilidade protéica e, conseqüentemente, a atividade enzimática como, por exemplo, pH, força iônica, temperatura, a presença ou ausência dos cofatores, dentre outros (KAUFMANN, 1997). Dessa maneira, pode ser que alguns desses parâmetros estejam contribuindo para a diminuição das atividades enzimáticas ao longo do processo de purificação.

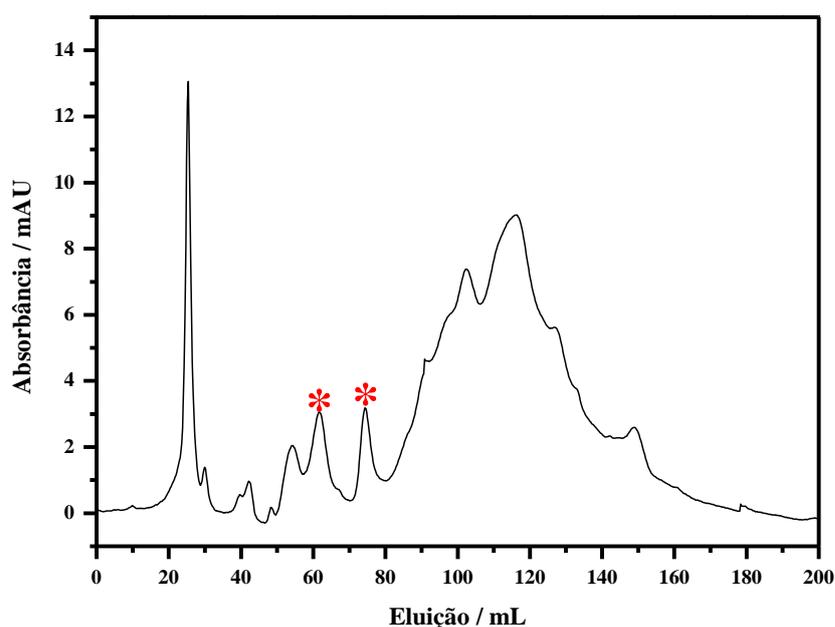
Em seguida, o *pool 1* e o *pool 2* foram aplicados, separadamente, em coluna de exclusão molecular Superdex 75 para a separação das demais proteínas, pois cada *pool* continha predominantemente duas proteínas. O processo cromatográfico foi acompanhado com os ensaios de atividade e de eletroforese.

Na FIGURA 5.7 é apresentado o cromatograma quando o *pool 1* foi aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex 75, onde observou-se a separação de diversas bandas. Não foi possível detectar atividade de nenhuma

das frações eluídas na Superdex 75 utilizando o substrato ABTS, provavelmente, porque as frações eluídas estavam diluídas e este substrato não foi sensível suficiente para detectar a atividade enzimática nessas condições.

Dessa forma, buscou-se na literatura um teste de atividade mais específico. Há relatos na literatura que o fungo *M. racemosus* pode expressar lignina peroxidase (BONUGLI-SANTOS et al., 2010), assim o substrato escolhido para realização dos testes foi o álcool veratrílico (TIEN & KIRK, 1988). As frações que apresentaram atividade frente ao substrato álcool veratrílico estão indicadas com um asterisco no cromatograma.

FIGURA 5.7: Cromatograma obtido na purificação das oxidases presentes no *pool* 1 aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex 75. Frações com atividade frente ao substrato álcool veratrílico (*).

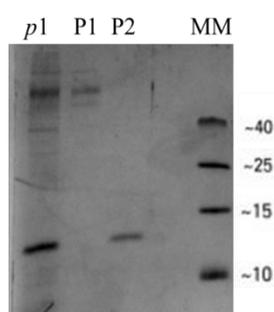


Fonte: Autor, 2018.

As frações que apresentaram atividade foram concentradas 4X no *speed-vacuum* e analisadas por eletroforese em gel de tricina, FIGURA 5.8. Ao analisar o gel, pode-se concluir que a coluna de exclusão molecular foi eficiente para a separação das duas proteínas majoritárias no *pool* 1, além de

apresentarem um bom grau de pureza. A proteína de massa molecular acima de 40 kDa foi denominada de proteína 1 (P1) e no cromatograma (FIGURA 5.7) é a banda correspondente a eluição com aproximadamente 65 mL. Enquanto que a proteína de massa molecular de aproximadamente 13 kDa foi denominada de proteína 2 (P2) e equivale a banda que eluiu com aproximadamente 75 mL.

FIGURA 5.8: Análise em gel de tricina das frações com atividade frente ao substrato álcool veratrílico eluídas da Superdex 75 (corado com coomassie). *pool* 1 (*p1*), proteína 1 (P1), proteína 2 (P2) e marcador de massa molecular (MM).



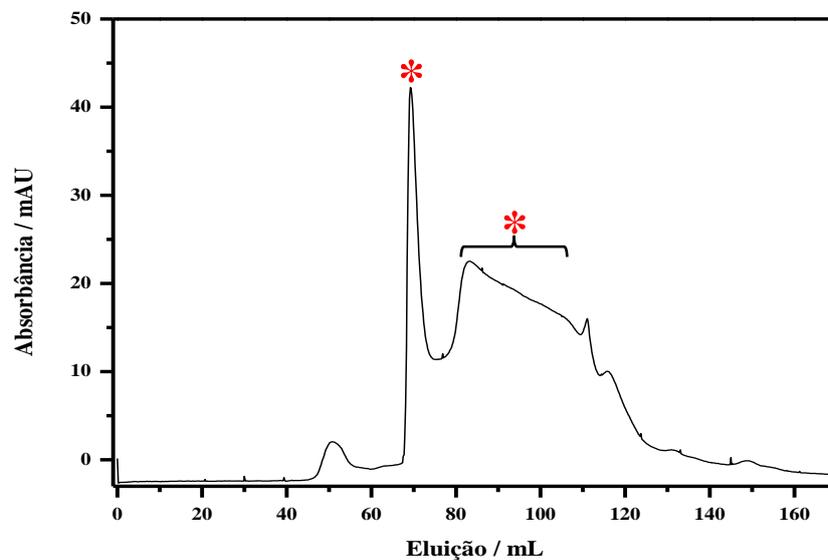
Fonte: Autor, 2018.

As atividades enzimáticas determinadas utilizando o substrato álcool veratrílico para P1 foi de $1823,6 \text{ mU L}^{-1}$ e para P2 foi de $494,6 \text{ mU L}^{-1}$. Pode-se observar que a P1 tem atividade três vezes maior que a P2, apesar das duas proteínas terem concentrações aproximadas, segundo análise do gel de tricina (FIGURA 5.8). Isso pode estar relacionado com a especificidade da enzima com o substrato e não apenas com a concentração da enzima em solução, pois a especificidade irá depende da energia de ligação da enzima-substrato (NELSON & COX, 2014).

O cromatograma obtido quando o *pool* 2 foi aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex 75 encontra-se ilustrado na FIGURA 5.9. Assim como na purificação do *pool* 1, não foi possível detectar atividade utilizando o substrato ABTS nas frações eluídas a partir da injeção do *pool* 2 na coluna de

exclusão de molecular, portanto neste caso também foi utilizado o substrato álcool veratrílico para determinação da atividade enzimática. As frações que apresentaram atividade frente ao substrato álcool veratrílico estão indicadas com um asterisco no cromatograma.

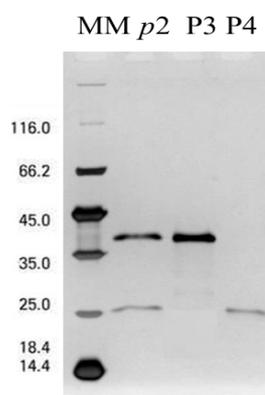
FIGURA 5.9: Cromatograma obtido na purificação das oxidases presentes no *pool 2* aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex 75. Frações com atividade frente ao substrato álcool veratrílico (*).



Fonte: Autor, 2018.

As frações eluídas do *pool 2* que apresentaram atividade frente ao substrato álcool veratrílico foram concentradas 4X no *speed-vacuum* e analisadas por eletroforese, FIGURA 5.10. As duas enzimas, denominadas de proteína 3 (P3) e proteína 4 (P4), foram separadas de forma eficiente pela coluna de exclusão molecular e mostraram um bom grau de pureza. A P3 corresponde às frações eluídas com aproximadamente 70 mL, banda de maior absorbância; enquanto que a P4 corresponde as frações que eluíram entre 80 e 100 mL.

FIGURA 5.10: Análise em SDS-PAGE 15% das frações com atividade frente ao substrato álcool veratrílico eluídas da Superdex 75 (corado com prata). Marcador de massa molecular (MM), *pool 2* (p2), proteína 3 (P3) e proteína 4 (P4).



Fonte: Autor, 2018.

As atividades enzimáticas obtidas utilizando o substrato álcool veratrílico para a P3 foi de $541,9 \text{ mU L}^{-1}$ e para a P4 foi $550,5 \text{ mU L}^{-1}$. Apesar das atividades das duas proteínas estarem próximas, ao comparar o cromatograma (FIGURA 5.9) com o gel (FIGURA 5.10), observa-se que a P4 eluiu em muitas frações, ou seja, P4 está mais diluída, o que justifica estar menos concentrada no gel, se comparada com a P3. Então a atividade de P4 está sendo maior do que a P3, já que P4 está mais diluída e está tendo atividade próxima a P3, neste caso também, assim como a P1 e P2, essa diferença pode estar relacionado com especificidade da enzima com o substrato.

Dessa maneira, as quatro enzimas oxidases produzidas pelo fungo *M. racemosus* foram purificadas e, dadas as atividades detectadas utilizando o substrato álcool veratrílico, pode-se inferir que as enzimas possam ser lignina peroxidase (TIEN & KIRK, 1988; SUGIURA et al., 2009; BONUGLI-SANTOS et al., 2010). Sendo assim, essa é a primeira vez em que é reportada a purificação de enzimas oxidases expressa por esse fungo.

5.2.3. Determinação da massa molecular aparente das proteínas purificadas

Observou-se que a enzima P2, que no gel de tricina (FIGURA 5.8) apresentou ter massa molecular menor que 15 kDa, estava eluindo seguidamente da proteína P1, que tem massa molecular de aproximadamente 60 kDa, sendo que o esperado seria que houvesse uma distância maior entre as bandas de eluição devido a diferença de massa molecular. Portanto, foram determinadas as massas moleculares aparente das proteínas como descrito no item 3.7.3 dessa dissertação.

Para a determinação da massa molecular aparente, as proteínas purificadas (P1, P2, P3 e P4) e as proteínas padrões foram analisadas utilizando a coluna de exclusão molecular analítica Superose 12, de 24 mL.

Foi plotado o gráfico K_{av} versus $\log MM$ e a equação linear da curva obtida para a calibração, a qual foi construída com os volumes de eluição das proteínas padrões, foi a seguinte:

$$y = - 0,3712x + 1,0085 \quad R^2 = 0,9864 \quad [\text{Eq. 4}]$$

Utilizando os coeficientes linear e angular da equação 4, foi possível estimar a massa molecular aparente das quatro proteínas purificadas. Segundo os cálculos realizados, a P1 tem massa molecular aparente de 67 kDa, esse valor de massa molecular está próximo ao observado no gel desnaturante que foi de aproximadamente 60 kDa (FIGURA 5.6), indicando assim, que a proteína se comporta como monômero.

A massa molecular esperada da P2 como monômero era entre 10 e 15 kDa (FIGURA 5.8), porém de acordo com os cálculos da massa molecular aparente a proteína possui 27 kDa. Ao comparar o volume de eluição da P2 com as proteínas padrões, observa-se que a P2 eluiu próximo a proteína padrão de 30 kDa (dados não reportados), isso sugere que a proteína P2 se encontra na forma de um oligômero, podendo se tratar de um dímero.

A massa molecular aparente da proteína P3 foi 38 kDa e da proteína P4 de 21 kDa. Esses valores de massas moleculares são aproximados aos observados no gel desnaturante (FIGURA 5.10), logo as proteínas P3 e P4 apresentam serem monoméricas.

Na TABELA 5.2 estão descritas de forma resumida as características das quatro enzimas isoladas do fungo *M. racemosus*. As enzimas isoladas (P1-P4) apresentaram atividade frente ao álcool veratrílico, podendo-se inferir que possam ser classificadas como ligninas peroxidases e que a P1 foi a que apresentou ter maior atividade. Como já descrito no item 2.2.3, LiP são glicosiladas, logo deve-se considerar que a estimativa da massa molecular é um pouco maior do que o peso molecular da proteína constituída apenas pelos aminoácidos.

TABELA 5.2: Resumo das propriedades das quatro oxidases isoladas de *M. racemosus*. Atividade determinada com o substrato álcool veratrílico.

	MM aparente (kDa)	Forma oligomérica	Atividade (mU L ⁻¹)
P1	67	Monômero	1823,6
P2	27	Dímero	494,6
P3	38	Monômero	541,9
P4	21	Monômero	550,5

Fonte: Autor, 2018.

Estudos anteriores com os fungos *Trametes versicolor* (JOHANSSON et al., 1993) e *Phanerochaete chrysosporium* (TIEN & KIRK, 1988) demonstram a produção de várias ligninas peroxidases pelos fungos e sugerem a multiplicidade de genes que codificam a expressão de isoenzimas, como as peroxidases, com diferentes estruturas primárias. Dessa forma, as quatro proteínas purificadas podem ser todas da mesma classe.

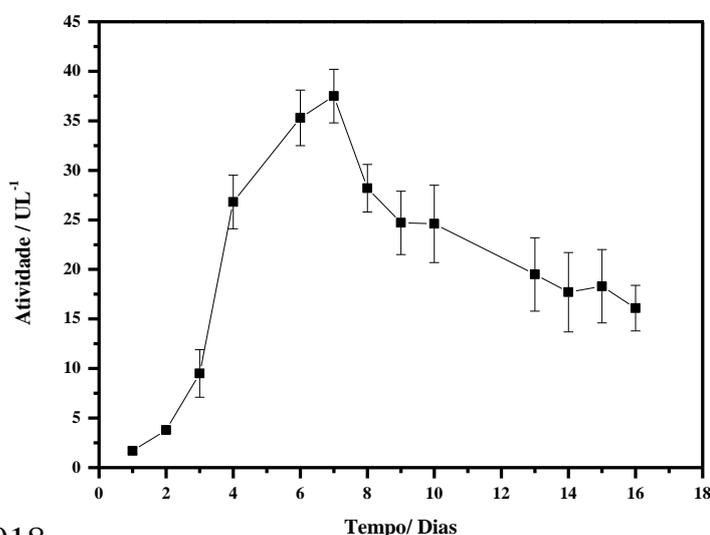
5.3. Estudos com o fungo *C. cupreum* URM 5066

5.3.1. Produção de enzimas ligninolíticas

Como descrito na literatura, um fungo do mesmo gênero *Chaetomium* foi estudado e foi comprovada a produção de lacases pelo fungo *C. thermophilum* (CHEFTZ et al., 1998). Uma vez que essas enzimas são dependentes de cobre, optou-se por adicionar o sulfato de cobre nos meios de cultura onde foi cultivado o fungo *C. cupreum*.

Para a avaliação da produção de enzimas ligninolíticas expressas pelo fungo *C. cupreum* foram escolhidos dois meios de cultura. Um dos meios utilizado foi o meio com a melhor expressão de oxidases pelo fungo *M. racemosus*, o meio de cultura adaptado de PASSARINI et al. (2011). Ao utilizar esse meio, as atividades enzimáticas para oxidases totais foram acompanhadas a cada 24 h durante 16 dias, onde foi possível observar um máximo de atividade no sétimo dia de $37,50 \pm 2,67 \text{ U L}^{-1}$, FIGURA 5.11.

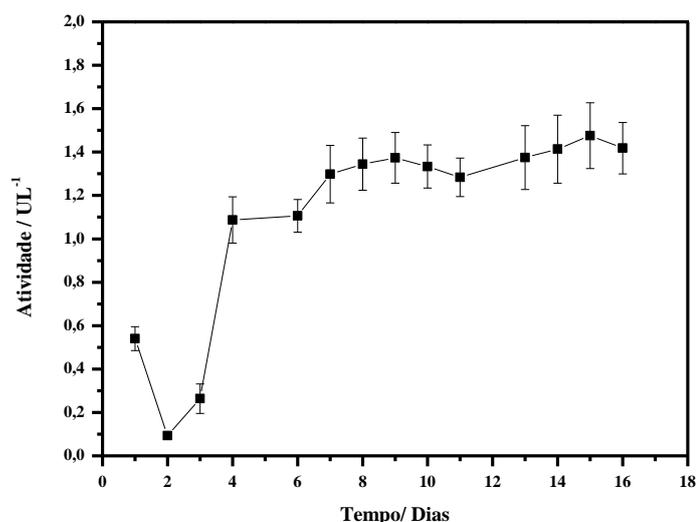
FIGURA 5.11: Variação da atividade enzimática em função do tempo de cultivo do fungo *C. cupreum* em meio de cultura adaptado de PASSARINI et al. (2011). Ensaio realizado com o substrato ABTS (n=3).



Fonte: Autor, 2018.

Utilizando o outro meio de cultura, o meio descrito por POINTING (1999), o qual foi adaptado, foram realizados os ensaios para oxidases totais e foi detectado o máximo de atividade também no sétimo dia de cultivo, $1,29 \pm 0,13 \text{ U L}^{-1}$, como se pode observar na FIGURA 5.12. Esse meio foi escolhido para ser testado porque ao analisar as atividades qualitativas em placa, FIGURA 5.2, já no segundo dia o fungo apresentou resultados positivos para a produção enzimática de oxidases. Outro fator que contribuiu para testar esse meio de cultivo foi o fato de que esse meio é similar ao utilizado por CHEFTZ e colaboradores (1998) para expressão da lacase do fungo *C. thermophilum*.

FIGURA 5.12: Variação da atividade enzimática em função do tempo de cultivo do fungo *C. cupreum* em meio de cultura adaptado de PONTING (1999). Ensaio realizado com o substrato ABTS (n=3).



Fonte: Autor, 2018.

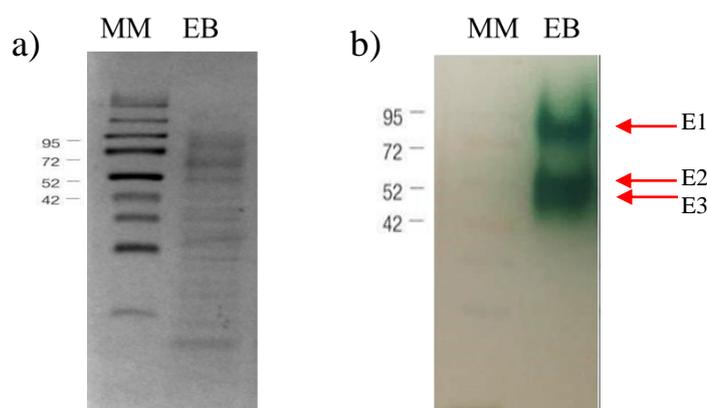
A literatura indica que, geralmente, a maior produção de lacases por fungos ocorre entre o quinto e o décimo quarto dia de cultivo, dependendo da espécie fúngica (ELISASHVILI & KACHLISHVILI, 2009). Para os dois meios de cultura avaliados o máximo de atividade foi no sétimo dia de cultivo. Ao comparar os meios de cultivo é notório que, ao utilizar o meio de cultura adaptado de PASSARINI et al. (2011) a produção de enzimas oxidases foi maior

quando comparado ao meio adaptado de PONTING (1999). Sendo assim, esse foi o meio de cultura empregado para expressão das enzimas a serem purificadas.

Após definir o meio de cultivo que apresentou a melhor atividade e o tempo de crescimento, foi realizado o ensaio de zimografia (atividade em SDS-PAGE 1%) com uma amostra do extrato bruto a fim de identificar quais bandas de proteínas possuíam atividade frente aos substratos ABTS, SYR e álcool veratrílico. O substrato ABTS tem sido utilizado para detectar lacases e, quando acrescido de sulfato de manganês e peróxido de hidrogênio no meio reacional, detecta-se a atividade para as oxidases totais (IKE, 2015b; KUMAR et al., 2018). O substrato SYR tem sido descrito como o mais específico para a identificação de lacases (CHEFTZ et al., 1998; KÜES e RÜHL, 2011; IKE et al., 2015a), enquanto que o substrato álcool veratrílico tem sido utilizado para a detecção de lignina peroxidase (TIEN & KIRK, 1988; SUGIURA et al., 2009; BONUGLI-SANTOS et al., 2010)

Na FIGURA 5.13 são apresentados os resultados obtidos com o substrato ABTS, sendo que em (a) observa-se as proteínas presentes no extrato bruto através do gel SDS 15% corado com coomassie. É observado que o extrato bruto de *C. cupreum* apresenta mais bandas, portanto, mais proteínas, do que o observado para o *M. racemosus*. Com a mesma amostra desse extrato foi realizada a zimografia com o substrato ABTS, FIGURA 5.13 (b), na qual foi possível identificar três enzimas denominadas enzima 1 (E1), enzima 2 (E2) e enzima 3 (E3), indicadas pelas setas vermelhas, que puderam ser detectadas devido o aparecimento da coloração esverdeada referente a oxidação do substrato ABTS.

FIGURA 5.13: Análise do extrato bruto do fungo *C. cupreum* por eletroforese e zimografia. (a) SDS-PAGE 15% corado com coomassie. (b) Zimografia com SDS-PAGE 1% utilizando o substrato ABTS. Marcador de massa molecular (MM) e extrato bruto (EB).



Fonte: Autor, 2018.

Apesar da E2 e E3 aparentarem ser uma única banda, tratam-se de duas proteínas, pois no início da reação com ABTS observou-se duas bandas com coloração esverdeada. Devido ao fato da reação ter acontecido rapidamente ficou apresentando ser somente uma proteína. Dessa maneira, foi possível identificar as proteínas de interesse dentre as muitas proteínas expressas pelo fungo e, assim, procurar uma estratégia de purificação. Esse experimento também proporcionou estimar as respectivas massas moleculares, que estão aproximadamente entre 50 e 80 kDa.

Utilizando a SYR como substrato no ensaio de zimografia, que é um composto amarelo, foi observado o surgimento da coloração rósea nas bandas correspondentes as proteínas que foram capazes de oxidar esse substrato, que tem como resultado a formação da quinona e, conseqüentemente, o surgimento da cor rósea (dados não mostrados). As bandas marcadas com SYR foram as mesmas bandas quando usado o substrato ABTS. A SYR tem sido descrita como sendo o substrato mais específico para lacases (CHEFTZ et al., 1998; KÜES e RÜHL, 2011; IKE et al., 2015a). Sendo assim, é um indício de

que as enzimas detectadas no extrato bruto do *C. cupreum* possam ser lacases, pois reagiram tanto com o ABTS como com a SYR.

Ao realizar a zimografia utilizando o substrato álcool veratrílico não foram observadas marcações de bandas de proteínas, mesmo utilizando uma placa de UV no fotodocumentador, pois o veratraldeído, produto da reação do álcool veratrílico, é detectado a 310 nm (TIEN & KIRK, 1988). Portanto, pode-se inferir que as enzimas não são ligninas peroxidases.

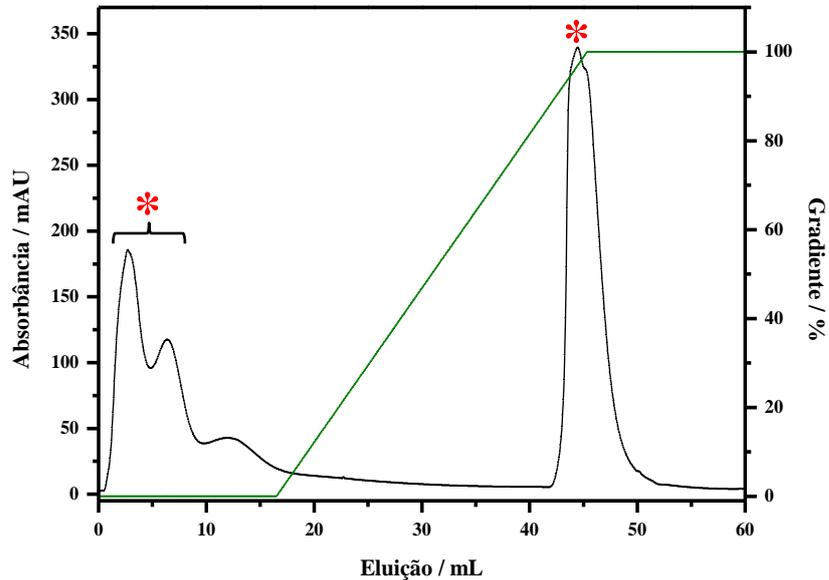
5.3.2. Purificação das enzimas

Determinados o meio de cultura, o tempo de cultivo e as proteínas de interesse, passou-se, então, para etapa de purificação das enzimas. Inicialmente foram testados os ensaios de precipitação sequenciada com sulfato de amônio, porém as proteínas de interesse precipitaram parcialmente, restando ainda proteínas em solução mesmo com 70% de sal.

Dessa forma, foi escolhido utilizar a membrana de ultrafiltração de 50 kDa para concentrar a amostra, uma vez que as massas moleculares das oxidases haviam sido estimadas entre 50 e 80 kDa. Ao utilizar a membrana de ultrafiltração era trocado o meio de cultura por tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Além disso, na amostra restavam proteínas com massa molecular superior a aproximadamente 50 kDa, sendo assim, nessa etapa ocorria uma pré-purificação. A amostra obtida nesse processo foi aqui denominada de pré-coluna.

A pré-coluna foi aplicada na coluna DEAE-Sepharose, na FIGURA 5.14 é apresentado o cromatograma correspondente a essa purificação e as frações que apresentaram atividade frente ao substrato ABTS estão indicadas com um asterisco.

FIGURA 5.14: Cromatograma obtido na purificação da amostra do *C. cupreum* aplicada na coluna de troca aniônica DEAE-Sepharose. Frações com atividade para oxidases totais utilizando o substrato ABTS (*).



Fonte: Autor, 2018.

Utilizando o ensaio enzimático para oxidases totais foi possível detectar atividade nas proteínas que não foram retidas na coluna, que são as frações pertencentes às primeiras bandas do cromatograma, essas frações foram reunidas e denominadas de *pool 1*. Detectou-se atividade também nas proteínas retidas na coluna, que são as frações correspondentes a banda que eluiu com aproximadamente 100% de gradiente, essas frações também foram reunidas e denominadas de *pool 2*.

O *pool 1* e o *pool 2* foram concentrados em membrana de ultrafiltração de 10 kDa até o volume de aproximadamente 600 μL . Na TABELA 5.3 estão descritas as atividades enzimáticas, expressas em mU L^{-1} , do extrato bruto e das frações semi-purificadas e concentradas, *pool 1* e *pool 2*, que apresentaram atividade frente ao ABTS.

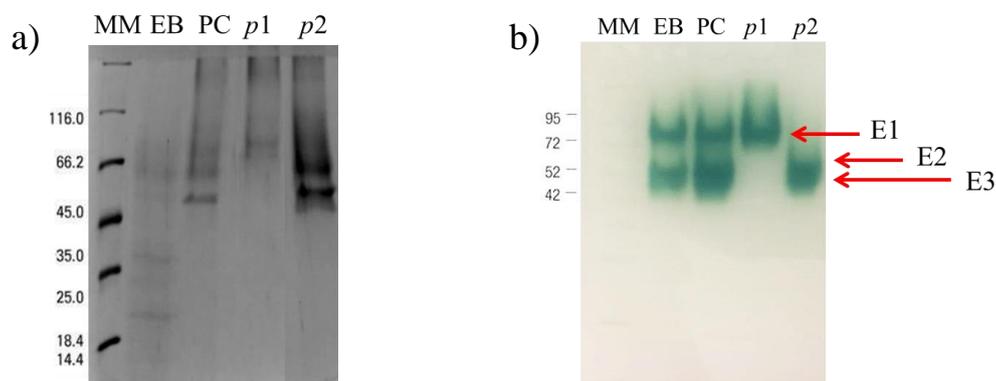
TABELA 5.3: Atividade enzimática das amostras do fungo *C. cupreum*. Ensaio realizado utilizando o substrato ABTS.

	Atividade (mU L ⁻¹)
Extrato bruto	2736,7
Pré-coluna	1488,7
<i>pool 1</i>	1351,9
<i>pool 2</i>	2215,4

Fonte: Autor, 2018.

Uma amostra do *pool 1* e outra do *pool 2* foram concentradas 2X no *speed-vacuum* e analisadas por eletroforese em gel SDS 15% e zimografia, FIGURA 5.15. Pode-se observar e confirmar através da zimografia que houve uma purificação parcial das proteínas, onde a E1 foi separada das enzimas E2 e E3, indicadas pelas setas em vermelho na FIGURA 5.15 (b).

FIGURA 5.15: (a) Análise em SDS-PAGE 15% da purificação parcial das oxidases expressas pelo fungo *C. cupreum* (corado com prata) e (b) Zimografia com ABTS. Marcador de massa molecular (MM), extrato bruto (EB), pré-coluna (PC), *pool 1* (p1) e *pool 2* (p2).

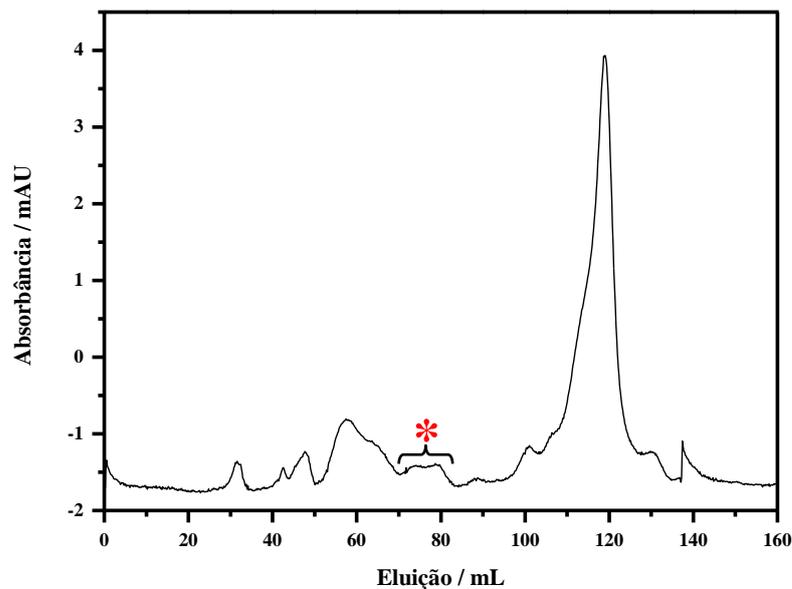


Fonte: Autor, 2018.

Após a cromatografia em coluna de troca iônica, o *pool 1* foi aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex 200 a fim de melhorar a

pureza da amostra, apesar da enzima ter sido isolada das demais de interesse, ainda havia outras proteínas contaminantes presente na solução. Na FIGURA 5.16 é apresentado o cromatograma obtido com a purificação do *pool* 1, em que as frações com atividade frente ao substrato ABTS estão indicadas com um asterisco. As frações que deram atividade foram concentradas em membrana de ultrafiltração de 10 kDa, uma vez que as eluições da coluna de exclusão molecular saem bastante diluídas.

FIGURA 5.16: Cromatograma obtido na purificação das oxidases presentes no *pool* 1 aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex 200. Frações com atividade para oxidases utilizando o substrato ABTS (*).



Fonte: Autor, 2018.

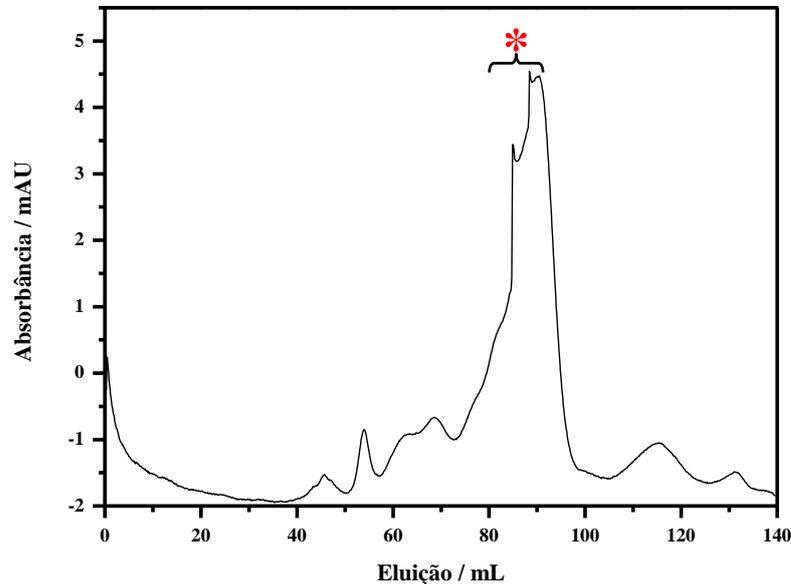
Apesar de que as frações que deram atividade terem sido concentradas na membrana de ultrafiltração, não foi possível visualizar a proteína em SDS-PAGE 15%, mesmo corando com prata, devido à baixa concentração. Mas, através do cromatograma ilustrado na FIGURA 5.16 fica evidente a eliminação de algumas proteínas contaminantes, podendo-se inferir que a purificação na Superdex 200 foi eficiente e, conseqüentemente, aumentou o grau de pureza da proteína de interesse.

A amostra do *pool 2* (FIGURA 5.15), aparentemente, continha duas proteínas de massa molecular muito próximas, o que torna difícil a separação por coluna de exclusão molecular. Por outro lado, a separação por troca iônica também não seria tão simples. Então, optou-se por determinar o ponto isoelétrico (pI) das proteínas contidas na amostra do *pool 2* e tentar separá-las utilizando colunas de troca iônica mudando somente o pH de eluição.

Seguindo o protocolo descrito no item 4.7.2 dessa dissertação, foram estimados os pI's das duas proteínas contidas no *pool 2*. O pI determinado para E2 foi de 4,7 e para E3 foi de 4,3. Mesmo os valores de pI's das enzimas estarem muito próximos, foram testadas algumas purificações utilizando coluna de troca iônica DEAE-Sepharose e Hitrap QFF em tampão de acetato de sódio 50 mM pH 4,0 e em pH 4,5. Testou-se também a coluna iônica Hidroxiapatita tipo I, a qual possui caráter aniônico e catiônico, em tampão fosfato 50 mM pH 5,8. Todos os testes foram realizados em diferentes condições de análises cromatográficas. Porém, nenhuma dessas tentativas foi bem-sucedida para o isolamento das proteínas. Sendo assim, foi testada por último a coluna de exclusão molecular Superdex 200.

Dessa forma, o *pool 2* também foi aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex 200 e na FIGURA 5.17 é apresentado o cromatograma obtido com a purificação. As frações com atividade frente ao substrato ABTS estão indicadas com um asterisco. As frações que deram atividade foram concentradas em membrana de ultrafiltração de 10 kDa, uma vez que as eluições da coluna de exclusão molecular saem bastante diluídas.

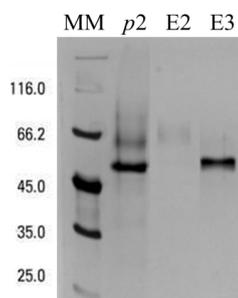
FIGURA 5.17: Cromatograma obtido na purificação das oxidases presentes no *pool 2* aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex 200. Frações com atividade para oxidases utilizando o substrato ABTS (*).



Fonte: Autor, 2018.

Foi possível observar através da eletroforese em gel SDS 15% e por atividade com ABTS que a utilização da coluna Superdex 200 foi eficaz para separação de frações das proteínas puras, FIGURA 5.18, as amostras aplicadas no gel foram concentradas 4X no *speed-vacuum*. As frações com as proteínas isoladas foram das extremidades da banda cromatográfica, pois as frações mais internas contêm a mistura das duas enzimas.

FIGURA 5.18: Análise em SDS-PAGE 15% das frações com atividade frente ao substrato ABTS eluídas da Superdex 200 na purificação do *pool 2* (corado com prata). Marcador de massa molecular (MM), *pool 2* (*p2*), enzima 2 (E2) e enzima 3 (E3), respectivamente.



Fonte: Autor, 2018.

Na TABELA 5.4 estão descritas as recuperações das frações com atividade após a purificação das três enzimas de interesse, incluindo todas as etapas seguidas no processo de purificação.

TABELA 5.4: Recuperação das frações com atividade após a purificação das enzimas. Ensaio realizado com o substrato ABTS.

	Atividade (mU L ⁻¹)	Proteínas totais (mg L ⁻¹)	Ativ. Esp. (mU mg ⁻¹)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	2736,7	42,8	64,0	100	1
Ultrafiltração	1488,7	51,1	29,1	54,4	0,5
<i>pool 1</i>	1351,9	30,3	44,7	49,4	0,7
E1	323,1	2,1	154,3	11,8	2,4
<i>pool 2</i>	2215,4	51,2	43,3	81,0	0,7
E2	895,0	0,9	1028,7	32,7	16,1
E3	263,3	2,0	129,7	9,6	2,0

Fonte: Autor, 2018.

Conforme apresentado na TABELA 5.4 o rendimento da purificação da E1 foi de 11,8%, para a E2 de 32,7% e E3 de 9,6%. A diminuição do rendimento ao longo do processo deve-se ao efeito do tratamento e pelo processo de priorizar o isolamento. Entretanto, pode-se observar que à medida que foram realizadas as purificações a atividade específica de cada enzima isolada aumentou, isso indica que o processo de purificação foi bem-sucedido, dentro das condições utilizadas (ADALBERTO & SOUZA, 2015).

5.3.3. Caracterização das enzimas purificadas

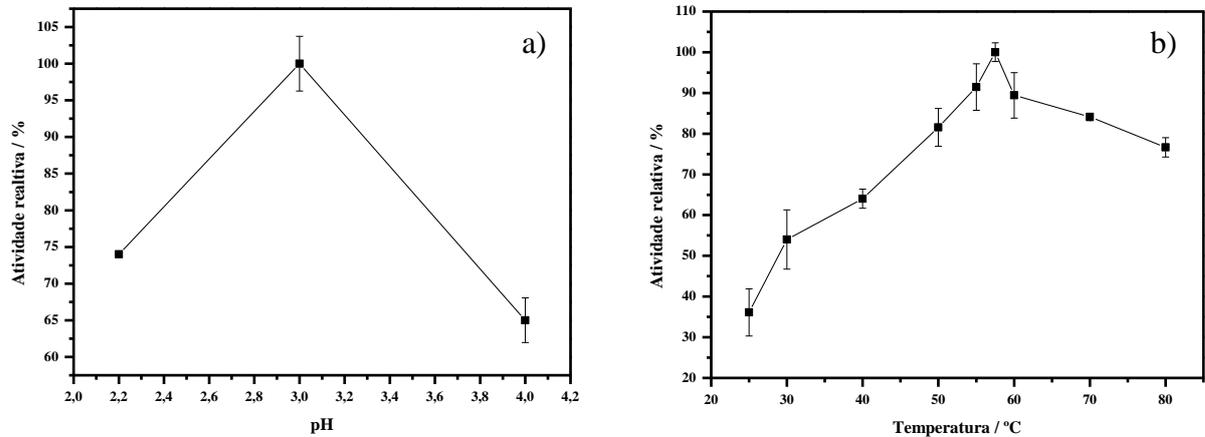
✓ Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

A atividade das enzimas purificadas (E1, E2 e E3) foram primeiramente avaliadas variando-se o pH entre 2,2 e 4,0, utilizando o substrato ABTS. Ao realizar uma busca na literatura, observou-se que o pH ótimo de lacases usando o ABTS como substrato varia entre 2,6 e 4,0, portanto optou-se por determinar o pH ótimo das três enzimas nessa faixa pH (MOREIRA et al., 2014; IKE et al., 2015a; KUMAR et al., 2018).

Após determinar o pH ótimo das enzimas, foram realizados os testes de atividade em função da variação da temperatura, utilizando o tampão do pH ótimo determinado para cada uma das enzimas, nesta outra caracterização também foi utilizado o ABTS como substrato. A seguir serão apresentados os resultados obtidos com cada enzima separadamente.

O máximo de atividade para E1 foi a pH 3,0, como pode ser observado na curva de atividade *versus* pH (FIGURA 5.19a) e o máximo de atividade variando a temperatura dessa enzima em seu pH ótimo foi a 57,5 °C (FIGURA 5.19b). É possível observar que a enzima a 80 °C ainda mantém mais de 75% de atividade e entre as temperaturas de 50-70 °C a enzima possui mais de 80% de atividade.

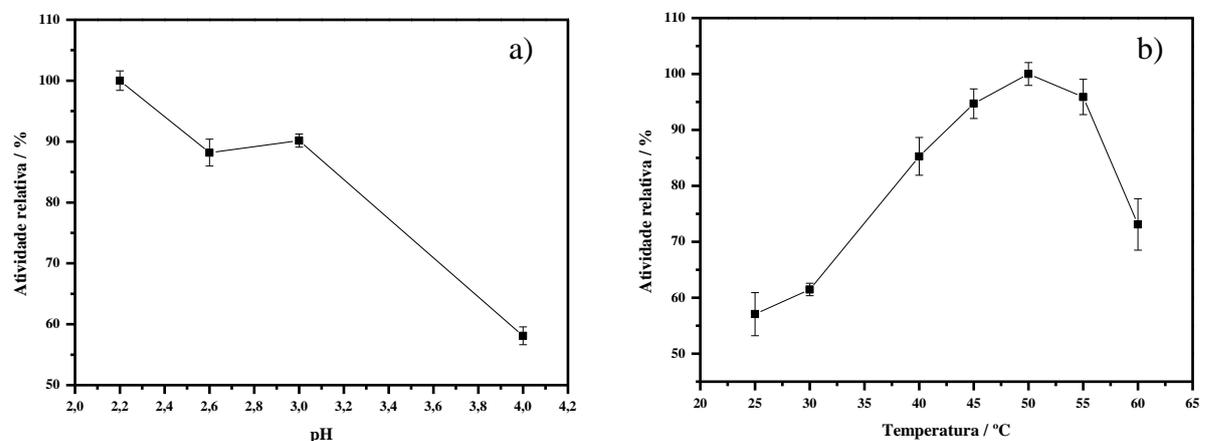
FIGURA 5.19: Curva de atividade máxima para enzima E1 no (a) pH ótimo e (b) temperatura ótima.



Fonte: Autor, 2018.

Na FIGURA 5.20 estão apresentadas as curvas obtidas com os ensaios realizados com a E2. Em (a) observa-se o pH ótimo da E2 que corresponde a pH igual a 2,2. Foi analisada a possibilidade de utilizar um pH mais ácido, porém a enzima perdeu a atividade, inferindo assim, que o pH ótimo é realmente 2,2. Em (b) pode ser observada que temperatura ótima no pH 2,2 para esta enzima que foi a 50 °C. A temperatura ambiente (25 °C) fica evidente que a enzima conserva mais de 50% de atividade.

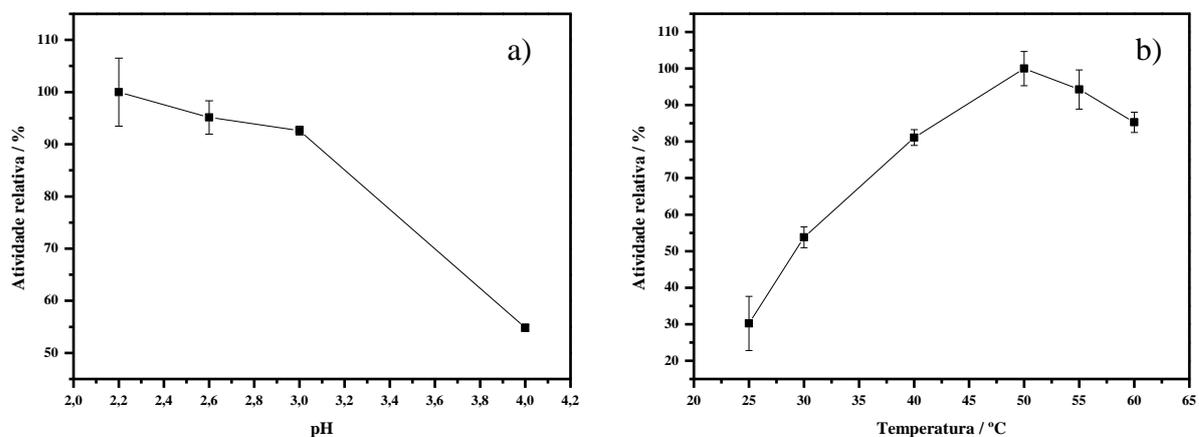
FIGURA 5.20: Curva de atividade máxima para enzima E2 (a) variando pH e (b) variando a temperatura.



Fonte: Autor, 2018.

Na FIGURA 5.21a é apresentado o máximo de atividade para E3 ao realizar os ensaios para determinar o pH ótimo, que ficou entre o pH 2,2 e 3,0. Na FIGURA 5.21b, pode-se observar que temperatura ótima foi a 50 °C para esta enzima, sendo este ensaio realizado usando tampão a pH 2,2. A enzima mantém mais de 80% de atividade nas temperaturas entre 40-60 °C.

FIGURA 5.21: Curva de atividade máxima para enzima E3 (a) variando pH e (b) variando a temperatura.



Fonte: Autor, 2018.

Os valores ótimos de pH e temperatura encontrados para as possíveis lacases estão de acordo com a literatura (MOREIRA et al., 2014; IKE et al., 2015a; KUMAR et al., 2018). O pH ótimo de lacases depende do substrato utilizado, sendo que para substratos fenólicos as lacases fúngicas frequentemente apresentam um pH ótimo que pode variar de 3 a 7; já para os substratos não-fenólicos, o pH ótimo é menor do que 4. A interferência da temperatura na atividade das lacases fúngicas varia, sendo que os valores ótimos de temperatura encontrados abrangem uma faixa de 25-80 °C, porém a maioria das enzimas tem atividade máxima entre 50-70 °C (MADHAVI & LELE, 2009).

As três enzimas caracterizadas são classificadas como termofílicas, uma vez que apresentaram atividades ótimas superiores a 45°C (KUMAR et al., 2018). Além do mais, as enzimas suportam pHs ácidos, o que possibilita serem empregadas em processos industriais que exijam tal condição.

✓ Identificação das proteínas por espectrometria de massas

Para a identificação por espectrometria de massas das proteínas uma amostra do *pool 1* (contendo a E1) e do *pool 2* (contendo E2 e E3), frações obtidas na etapa de purificação com a coluna DEAE- Sepharose a partir do extrato bruto do fungo *C. cupreum*, foram digeridas e analisadas por LC-MS. As análises de LC-MS foram processadas pelo software MASCOT Distiller. O genoma do fungo *C. cupreum* ainda não foi sequenciado, logo não tem banco de dados específico para esta espécie. Sendo assim, as análises foram realizadas em bancos de dados fúngicos contendo cerca de 4 milhões de sequência de proteínas.

A análise realizada com a amostra do *pool 1*, segundo o banco de dados do NCBI, apresentou identidade com proteínas hipotéticas, ou seja, proteínas que ainda não foram estudadas e nem identificadas quanto a sua função, mas também foram obtidos alinhamentos com oxidases, como é o caso da FAD dependente oxidoreductase (TABELA 5.5).

Não se pode inferir com certeza qual é a proteína devido as impurezas contidas na amostra, pois E1 não estava totalmente pura quando este ensaio foi realizado. Para um resultado com maior confiabilidade se faz necessário à realização de novas análises por espectrometria de massas com a E1 mais purificada a fim de identificar a subclasse da enzima.

TABELA 5.5: Dados obtidos por espectrometria de massas na identificação das proteínas contidas no *pool 1*.

Número de acesso	Identificação da proteína	Score	Cobertura da sequência (%)	Micro-organismo
A0A166L346	Uncharacterized	1697	22	<i>Peniophora</i> sp.
A0A229Y087	Uncharacterized	1697	31	<i>Neosartorya fumigata</i>
A0A166DRU8	alpha-1,2-Mannosidase	873	12	<i>Peniophora</i> sp.
A0A166GWP0	Uncharacterized	426	4	<i>Peniophora</i> sp.
A0A0J5PSU6	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	315	22	<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5
Q4WFG4	Alpha,alpha-trehalose glucohydrolase	307	16	<i>Neosartorya fumigata</i>
A0A166ABC8	FAD dependente oxidoreductase	230	9	<i>Peniophora</i> sp.
A0A166D5C5	Carbohydrate-binding module family 5	223	5	<i>Peniophora</i> sp.
AOA165X252	Glucoamylase	213	12	-
A0A166H6E3	Alpha/beta-hydrolase	212	2	<i>Peniophora</i> sp.

Fonte: Autor, 2018.

Na análise do *pool 2* observou-se que a amostra tem identidade com uma sequência de lacase do fungo *Peniophora incarnata*, sendo identificado um fragmento contendo 43 resíduos de aminoácidos resultando em cerca de 13% de cobertura (TABELA 5.6). É importante ressaltar que o genoma da espécie fúngica estudada ainda não foi sequenciado, conseqüentemente, não há um banco de dados de proteínas preditas relacionadas ao *C. cupreum*. Esse é, provavelmente, o motivo que levou à baixa cobertura das sequências proteicas.

TABELA 5.6: Dados obtidos por espectrometria de massas na identificação das proteínas contidas no *pool 2*.

Número de acesso	Identificação da proteína	Score	Cobertura da sequência (%)	Micro-organismo
A0A166AJQ1	FAD-binding domain-containing protein	914	26	<i>Peniophora</i> sp.
A0A1B0QV45	Laccase	588	13	<i>Peniophora incarnata</i>
A0A166EB23	Glycoside hydrolase	427	10	<i>Peniophora</i> sp.
A0A166ABC8	FAD dependent oxidoreductase	415	12	<i>Peniophora</i> sp.
A0A0J5Q5Z0	Aspartic endopeptidase Pep1/aspergillopepsin	377	25	<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5
Q4WFG4	Alpha,alpha-trehalose glucohydrolase TreA/Ath1	347	11	<i>Neosartorya fumigata</i>
A0A0J5PK40	Carboxypeptidase	296	28	<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5
A0A165XQ23	Uncharacterized	270	4	<i>Peniophora</i> sp.

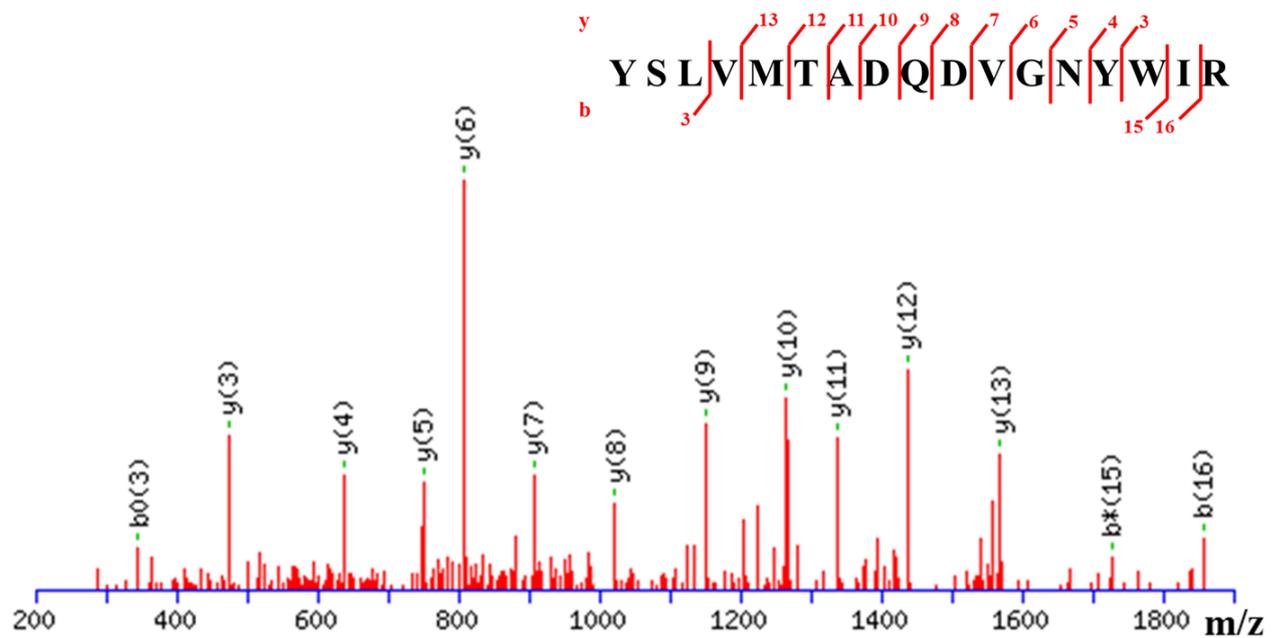
Fonte: Autor, 2018.

Dentro do fragmento de 43 resíduos de aminoácidos identificados foi detectado o seguinte peptídeo triptico: YSLVMTADQDVGNYWIR (FIGURA 5.22), que é altamente conservado em lacases. A partir de uma busca por identidade sequencial de YSLVMTADQDVGNYWIR utilizando o programa BLASTP 2.8.0 (ALTSCHUL et al., 1997), foram identificadas cerca de 30 proteínas descritas como lacases que apresentaram identidade superior a 80%

em relação ao peptídeo em questão. Esses resultados indicam que uma das duas proteínas presentes no *pool 2* (E2 ou E3) é uma lacase e, sugere-se, que o peptídeo YSLVMTADQDVGNYWIR possa ser classificado como um motivo estrutural em lacases.

A figura abaixo ilustra o espectro de ESI(+)-MS/MS do peptídeo YSLVMTADQDVGNYWIR. Como pode ser observado, a maioria dos fragmentos do tipo y, que podem ser gerados por CID (dissociação induzida por colisão), foram observados e atribuídos.

FIGURA 5.22: Fragmento peptídico detectado por espectrometria de massas do *pool 2*.

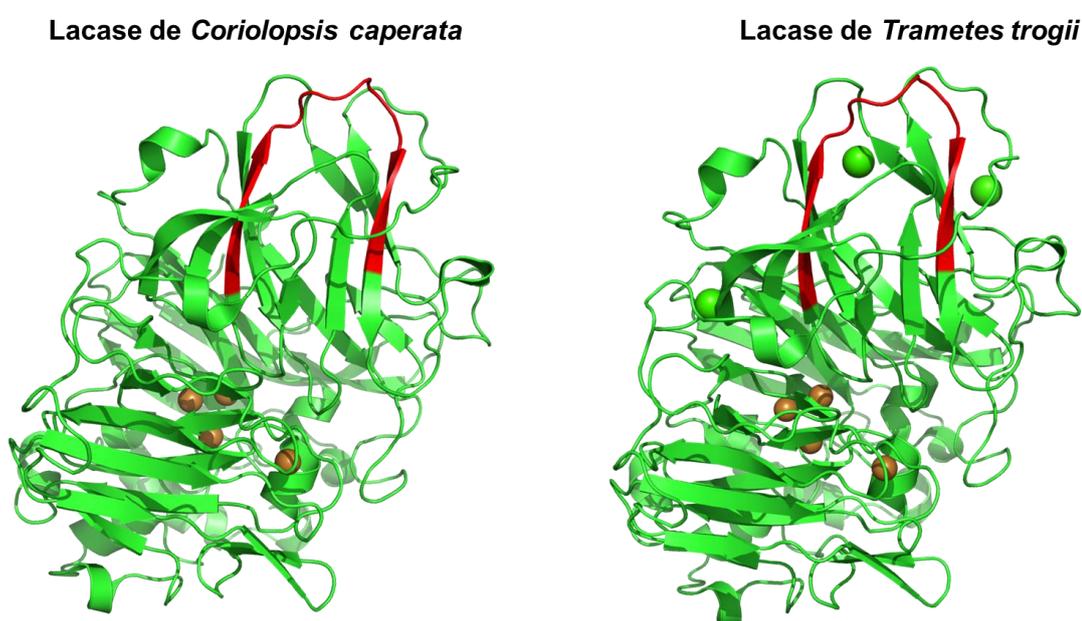


Fonte: Autor, 2018.

Na FIGURA 5.23 estão apresentadas as estruturas tridimensionais de lacases de *Coriolopsis caperata* (GLAZUNOVA et al., 2015) e *Trametes trogii* (MATERA, 2008) visualizadas com o programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, version 2.1. Schorödinger, LLC). A sequência conservada em lacases, YSLVMTADQDVGNYWIR, foi observada nas duas estruturas como destacado em vermelho na figura. É possível identificar que

essa sequência assume conformação de folha- β antiparalelas. Além dessas duas proteínas, foram analisadas outras e foi possível verificar a presença desta mesma sequência, confirmando a conservação nas estruturas proteicas de lacases.

FIGURA 5.23: Estrutura tridimensional de lacases de *Coriolopsis caperata* e *Trametes trogii*. Coordenadas das estruturas foram retiradas no PDB (*Protein Data Bank*).



Fonte: Autor, 2018.

As análises executadas indicam que o peptídeo identificado na espectrometria de massas corresponde a um domínio conservado de lacases. Logo, ao menos uma das duas enzimas contidas no *pool 2* pode ser lacase, ou até mesmo as duas, pois podem se tratar de isoformas.

Os resultados de caracterização das enzimas E1, E2 e E3 estão sumarizados na TABELA 5.7. Pode ser observado que as três enzimas possuem melhor atividade em pH extremo, o que possibilita sua aplicação em processos industriais que precisam ser realizados em condições ácidas. Além disso, as

enzimas apresentam atividade ótima em temperaturas a 50 °C ou mais, o que as tornam termofílicas.

TABELA 5.7: Resumo das propriedades das três oxidases isoladas de *C. cupreum*. Temperatura e pH ótimos determinados com o substrato ABTS.

	MM aparente por SDS-PAGE (kDa)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	pI	Zimografia com ABTS e SYR
E1	~ 80	3,0	57,5	ND*	+
E2	~ 66	2,2	50	4,7	+
E3	~ 55	2,2-3,0	50	4,3	+

* Não determinado.

Fonte: Autor, 2018.

O ensaio de zimografia utilizando os substratos ABTS e SYR infere que as três enzimas purificadas são lacases e através do resultado da espectrometria de massas foi possível confirmar que ao menos uma das três enzimas é de fato uma lacase.

As massas moleculares de lacases, geralmente, estão aproximadamente entre 40-80 kDa por monômero, porém existem lacases com massas moleculares menores, como é o caso da proteína dimérica RL5 que possui 28 kDa por monômero (CHEFETZ et al., 1998; BELOQUI et al., 2006; MOREIRA et al., 2014; IKE et al., 2015a; KUMAR et al., 2018). Dessa maneira, as massas moleculares das três enzimas, considerando que todas são lacases, estariam de acordo com o que tem sido relato na literatura para outras enzimas da mesma subclasse (TABELA 5.7).

Como descrito na introdução dessa dissertação, até momento não há relatos na literatura de enzimas da classe oxidase que tenham sido identificadas, purificadas e caracterizadas relacionadas à espécie do fungo *Chaetomium*

cupreum. Dessa maneira, essa é a primeira vez em que é reportada a purificação e a caracterização de lacases expressas pelo fungo *C. cupreum*.

5.4. Testes qualitativos com diferentes ligninas

5.4.1. Avaliação de crescimento dos fungos em meio sólido de cultura contendo lignina

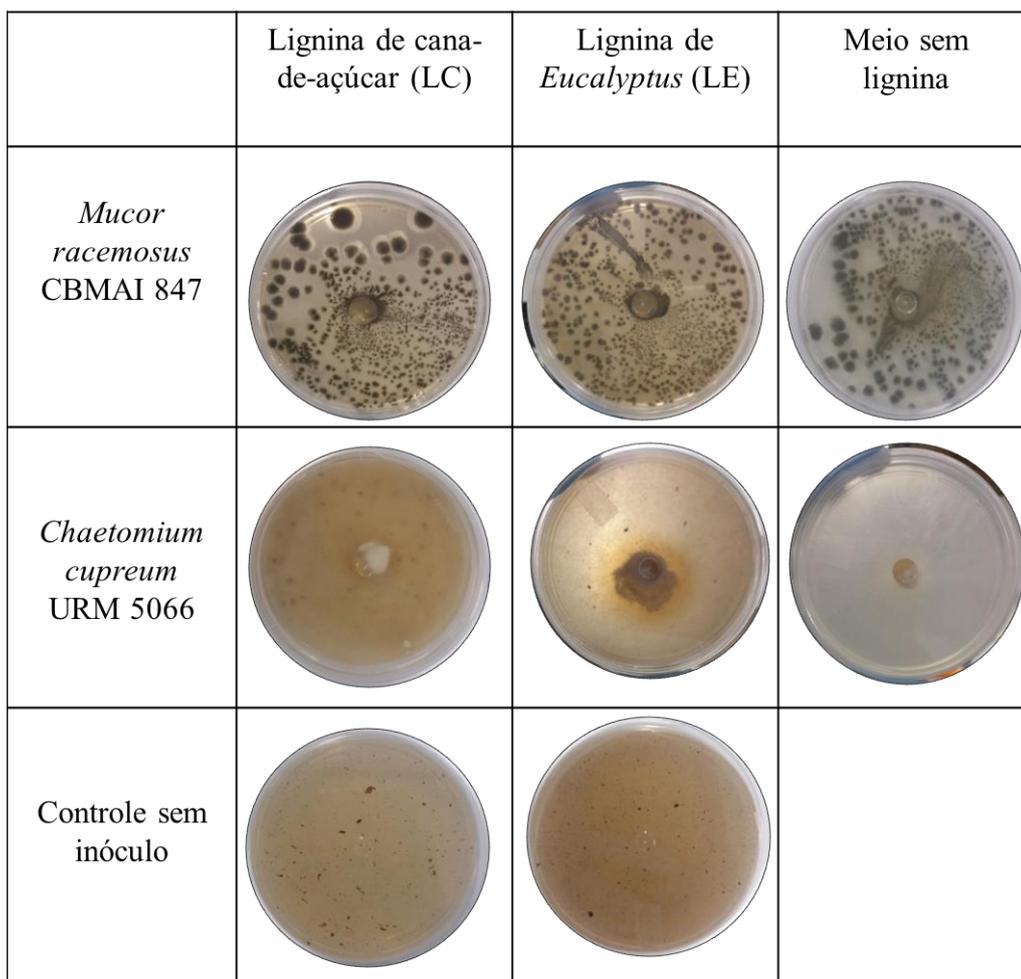
Foi analisado o crescimento dos fungos *M. racemosus* e *C. cupreum* nas placas contendo meio mínimo e duas ligninas de origem diferentes (LC: lignina extraída do bagaço de cana-de-açúcar e a LE: lignina extraída de *Eucalyptus*) durante 6 dias. Este ensaio foi realizado para analisar a capacidade do fungo em utilizar a lignina como substrato para o desenvolvimento microbiano, já que a lignina atua protegendo as plantas contra invasão de patógenos e/ou pragas (POINTING, 1999; STICKLEN, 2008).

Na FIGURA 5.24, pode-se observar que ambos os fungos foram capazes de crescer em meio contendo lignina. Ao analisar as placas inoculadas com o fungo *M. racemosus* observou-se que não houve diferenças significativas no seu desenvolvimento quando comparado com os meios com e sem lignina. Logo, não foi possível concluir se o fungo usou ou não a lignina como substrato para seu crescimento, mas somente que o fungo cresceu mesmo na presença de lignina.

Ao observar o crescimento do fungo *C. cupreum* (FIGURA 5.24), fica evidente que o fungo se desenvolveu melhor na presença de lignina do que na ausência de lignina, o qual continha somente o meio mínimo. Dessa maneira, pode-se inferir que o fungo utilizou a lignina como substrato para o seu crescimento. Pode-se observar também que este fungo formou um halo de cor marrom, que pode indicar a degradação da lignina, já que no crescimento do

fungo em meio sem lignina o mesmo não foi observado, assim como nas placas de controle sem inóculo também não foi observada mudança de coloração.

FIGURA 5.24: Crescimentos dos fungos utilizando duas diferentes ligninas como substrato.



Fonte: Autor, 2018.

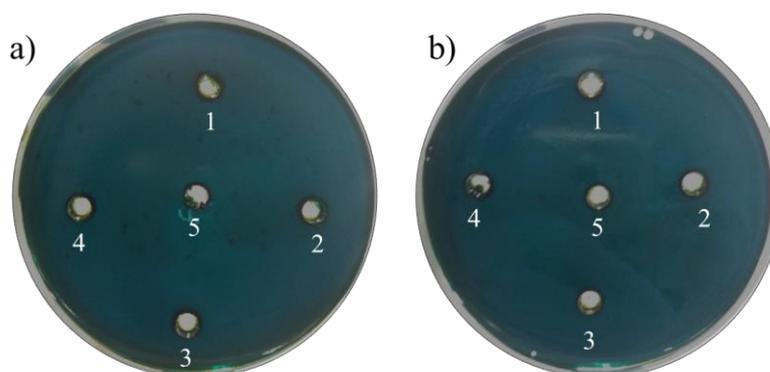
5.4.2. Avaliação qualitativa da degradação da lignina pelo extrato bruto dos fungos

Após 24h de incubação dos extratos brutos dos fungos *M. racemosus* e *C. cupreum* nas placas contendo as ligninas LC e LE, como descrito no item 4.8.2, as placas foram emersas em solução 1% de FeCl_3 e $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Neste experimento, os grupos fenólicos da lignina não degradada

pelas enzimas presentes nos extratos brutos serão verificados pelo surgimento da coloração azul-esverdeada. As áreas em que houver oxidação dos compostos fenólicos, realizadas pelas enzimas oxidases presentes no extrato bruto, ficarão clareadas (POINTING, 1999).

A FIGURA 5.25 mostra as placas obtidas no experimento para o extrato bruto do fungo *M. racemosus* sendo que a figura a, com a lignina LC e a figura b com a lignina LE. Em cada orifício (1-5) foram aplicados: extrato bruto puro (1), extrato bruto na presença de H_2O_2 (2), somente H_2O_2 (3), meio de cultura sem inóculo (4) e um orifício (5) ficou vazio. Observa-se que não houve o aparecimento de regiões claras em nenhum dos orifícios, indicando que não houve a degradação das ligninas estudadas. Os motivos pelos quais não foi observada a degradação podem estar relacionados a dois fatores: a concentração das enzimas ligninolíticas presente nesse extrato podem não ser suficientes para serem identificadas na degradação destas ligninas; e, o ensaio realizado pode não estar nas melhores condições de atividade enzimática (concentração de H_2O_2 adicionado, pH, temperatura e tempo de incubação).

FIGURA 5.25: Atividade qualitativa em placa da degradação da lignina pelo extrato bruto do fungo *M. racemosus*, (a) LC e (b) LE. (1) 100 μ L de extrato bruto, (2) 100 μ L de extrato bruto acrescido de 10 μ L de H_2O_2 0,1 mM, (3) 10 μ L de H_2O_2 0,1 mM, (4) 100 μ L meio de cultura sem enzimas e (5) vazio.

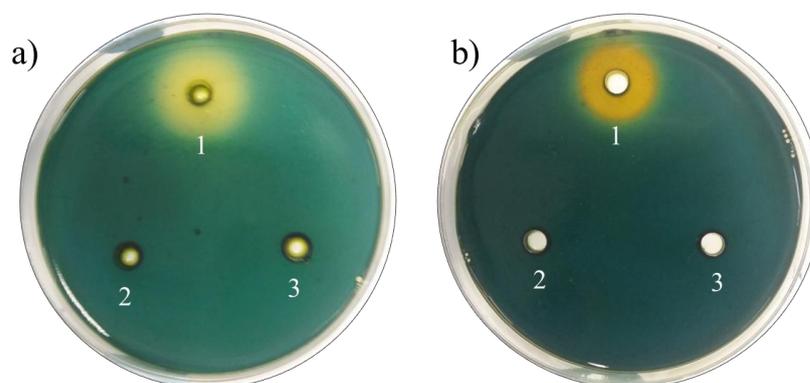


Fonte: Autor, 2018.

Nos ensaios realizados com extrato bruto do fungo *C. Cupreum* (FIGURA 5.26) foram feitos três orifícios onde foi aplicado extrato bruto (1), meio de cultura sem inóculo (2) e deixou-se um orifício vazio (3). Foi possível observar uma região clareada para ambas as ligninas estudadas, LC e LE (orifício 1) ao emergir as placas em solução 1% de FeCl_3 e $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. A presença dessa área clareada indicou que as enzimas ligninolíticas presentes no extrato bruto foram capazes de degradar compostos fenólicos das ligninas em apenas 24 h de incubação.

Devido a sua capacidade de secretar enzimas ligninolíticas para o meio extracelular levando à degradação da lignina, o fungo *C. cupreum* apresenta potencial uso em processos onde a degradação de ligninas é essencial.

FIGURA 5.26: Atividade qualitativa em placa da degradação da lignina pelo extrato bruto do fungo *C. cupreum*, (a) LC e (b) LE. (1) 100 μL de extrato bruto, (2) 100 μL meio de cultura sem enzimas e (3) vazio.



Fonte: Autor, 2018.

6. CONCLUSÕES

Dos quatro fungos avaliados, o *M. racemosus* e *C. cupreum* foram os melhores produtores de oxidases. Utilizando o substrato ABTS para determinar a atividade enzimática nos meios de cultura líquidos detectou-se que o fungo *C. cupreum* apresentou atividade ligninolítica de aproximadamente 160 vezes maior do que o *M. racemosus*.

A partir do extrato bruto do fungo *M. racemosus* foi possível purificar quatro enzimas extracelulares, com atividade frente a álcool veratrílico, indicando que podem se tratar de enzimas lignina peroxidases.

Foram purificadas e caracterizadas três enzimas a partir do extrato bruto obtido do fungo *C. cupreum* com atividade enzimática utilizando o substrato ABTS. A capacidade das três enzimas em oxidar o substrato siringaldazina e ABTS nos ensaios de zimografia, juntamente com os resultados obtidos por espectrometria de massas, indicou que ao menos uma das enzimas pertence à subclasse das lacases.

De acordo com os experimentos qualitativos com as ligninas, os fungos *M. racemosus* e *C. cupreum* foram capazes de crescer na presença das ligninas. Todavia, nos ensaios realizados com os extratos brutos dos fungos, somente as enzimas presentes no extrato bruto do fungo *C. cupreum* mostrou-se capaz de degradar as ligninas.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os fungos *M. racemosus* e *C. cupreum* são produtores de enzimas ligninolíticas e que as enzimas expressas pelo fungo *C. cupreum* tem grande potencial para aplicação em processos biotecnológicos, atuando na degradação de ligninas. Além disso, essa é a primeira vez em que é reportada a purificação de enzimas oxidases expressa por esses fungos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADALBERTO, P. A. & SOUZA, D. H. F. “Obtenção e caracterização de enzimas para aplicação em cromatografia líquida”. IN: Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações. CASS, Q. B. & CASSIANO, N. 1a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015, cap. 14.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D. “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3389-3402, 1997.
- AMIN, R.; KHORSHIDI, A.; SHOJAEI, A. F.; REZAEI, S. & FARAMARZI, M. A. “Immobilization of laccase on modified Fe₃O₄@SiO₂@Kit-6 magnetite nanoparticles for enhanced delignification of olive pomace bio-waste”. *Int. J. Biol. Macromol.*, **114**: 106-113, 2018.
- ASINA, F.; BRZONOVA, I.; VOELLER, K.; KOZLIAK, E.; KUBÁTOVÁ, A.; YAO, B. & JI, Y. “Biodegradation of lignin by fungi, bacteria and laccases”. *Bioresour. Technol.*, **220**: 414-424, 2016.
- BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N. & KUMAR, S. “Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass”. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **36**: 91-106, 2014.
- BELOQUI, A.; PITA, M.; POLAINA, J.; MARTÍNEZ-ARIAS, A.; GOLYSHINA O. V.; ZUMÁRRAGA, M.; YAKIMOV, M. M.; GARCÍA-ARELLANO, H.; ALCALDE, M.; FERNÁNDEZ, V. M.; ELBOROUGH, K.; ANDREU, J. M.; BALLESTEROS, A.; PLOU F. J.; TIMMIS, K. N.; FERRER, M. & GOLYSHIN, P. N. “Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships”. *J. Biol. Chem.*, **281**(32): 22933-22942, 2006.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SILVA, M. & SETTE, L. D. “Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi”. *Enzym. Microb. Technol.*, **46**: 32-37, 2010.
- BRADFORD, M. M. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal. Biochem.*, **72**: 248, 1976.
- BRASIL. Companhia nacional de abastecimento- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar. Brasília, 2016. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>. Acesso em 29 abr. 2018.

- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento- MAPA. Estatísticas. Brasília, DF, 2017b. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 29 abr. 2018.
- BRASIL. Ministério de Minas e energia. Balanço energético nacional- BEN. Brasília, DF, 2017a. Disponível em: https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_Final_BEN_2017.pdf. Acesso em: 30 abr. 2018.
- BRETHAUER, S & STUDER, M. H. “Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals: a review”. *Chimia*, **69**(10): 542-81, 2015.
- CAÑAS, A. I. & CAMARERO, S. “Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes”. *Biotechnol. Adv.*, **28**(6): 694-705, 2010.
- CARNIELLI, C. M.; ARTIER, J.; DE OLIVEIRA, J. C.; NOVO-MANSUR, M. T.; “Xanthomonas citri subsp. citri surface proteome by 2D-DIGE: Ferric enterobactin receptor and other outer membrane proteins potentially involved in citric host interaction”. *J. Proteomics*, **51**: 251-263, 2017.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A. & MILAGRES, A. M. F. “Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira”, *Quim. Nova*, **32**(8), 2191-2195, 2009.
- CASTRO, H. F. “Papel e celulose”. Escola de Engenharia de Lorena– EEL, 2009. Apostila de processos químicos industriais II.
- CHAIRATTANAMANOKORN, P.; IMAI, T.; KONDO, R.; UKITA, M. & PRASERTSAN, P. “Screening thermotolerant white-rot fungi for decolorization of wastewaters”. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **128**(3): 195–204, 2006.
- CHEFETZ, B.; CHEN, Y. & HADAR, Y. “Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilium* and its role in humification”. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(9): 3175–3179, 1998.
- COSTA, E. S. “Nano-microencapsulados de extrato de *Azadirachta indica* usando ligninas do bagaço de cana-de-açúcar: estabilidade e eficácia contra insetos pragas”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2014. Tese de Doutorado, 140 p.
- DAÂSSI, D.; ZOUARI-MECHICHI, H.; BELBAHRI, L.; BARRIUSO, J.; MARTÍNEZ, M. J.; NASRI, M. & MECHICHI, T. “Phylogenetic and metabolic diversity of Tunisian forest wood-degrading fungi: a wealth of novelties and opportunities for biotechnology”. *Biotech.*, **6**(1): 46, 2016.
- DAMASCENO, C. M. B.; SOUSA, S. M. de; NODA, R. W.; PARRELLA, R. A. C.; SCHAFFERT, R. E. & MAGALHÃES, J. V. “A importância da

- lignina para a produção de etanol de segunda geração.” Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/884400/1/doc108.pdf>. Acesso em: 01 maio 2018.
- ELISASHVILI, V. & KACHLISHVILI, E. “Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes”. *J. Biotechnol.*, **144**(1): 37–42, 2009.
- ELSHAFEI, A. M.; HASSAN, M. M.; HAROUN, B. M.; ELSAYED, M. A. & OTHMAN, A. M. “Optimization of laccase production from *Penicillium martensii* NRC 345”. *Adv. Life Sciences*, **2**(1): 31-37, 2012.
- EL-SHORA, H. M.; YOUSSEF, M. M. & KHALAF, S. A. “Inducers and inhibitors of laccase from *Penicillium*”. *Biotechnology*, **7**(1): 35-42, 2008.
- ELY, C.; KEMPKA, A. P. & SKORONSKI, E. “Aplicação de peroxidases no tratamento de efluentes”. *Rev. Virtual Quim.*, **8**(5): 1537-1549, 2016.
- EMBRAPA AGROENERGIA. “Florestas energéticas”. *Agroenergia em revista*, 9a ed, 2015. Disponível em: https://issuu.com/embrapa/docs/agroenergiaemrevista_ed09_3. Acesso em: 01 maio 2018.
- ERENO, D. “Álcool de celulose”. *Pesquisa Fapesp*, **133**: 29-31, 2007.
- ESPOSITO, E. & AZEVEDO, J. L. “Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia”, 2a ed, Caxias do sul, Educs, 2010.
- ESPRO, C.; GUMINA, B.; PAONE, E. & MAURIELLO, F. “Upgrading lignocellulosic biomasses: hydrogenolysis of platform derived molecules promoted by heterogeneous Pd-Fe catalysts”. *Catalysts*, **7**(3): 78, 2017.
- FILLATA, U.; MARTÍN-SAMPEDROA, R.; MACAYA-SANZB, D.; MARTÍN, J. A.; IBARRA, D.; MARTÍNEZ, M. J. & EUGENIO, M. E. “Screening of eucalyptus wood endophytes for laccase activity”. *Process. Biochem.*, **51**: 589-598, 2016.
- FUKUSHIMA, R. S. & HATFIELD, R. D. “Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear”. *Pesq. Agropec. Bras.*, **38**(4): 505-511, 2003.
- GLAZUNOVA, O. A.; POLYAKOV, K. M.; FEDOROVA, T. V.; DOROVATOVSKII, P. V. & KOROLEVA, O. V. “Elucidation of the crystal structure of *Coriolopsis caperata* laccase: restoration of the structure and activity of the native enzyme from the T2-depleted form by copper ions”. *Acta Crystallogr. Sect., D*. **71**: 854-861, 2015.
- GOLD, M. H. & ALIC, M. “Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*”. *Microbiol. Rev.* **57**(3): 605-622, 1993.

- GONÇALVES, M. L. C. & STEINER, W. “Detection of laccase activity in polyacrylamide gels after electrophoresis under denaturing conditions”. *Biotechnol. Tech.*, **10**(9): 667, 1996.
- HAN, X.; LIU, G.; PAN, Y.; SONG, W. & QU, Y. “Consolidated bioprocessing for sodium gluconate production from cellulose using *Penicillium oxalicum*”. *Bioresour. Technol.*, **251**: 407-410, 2018.
- HOFRICHTER, M. “Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)”. *Enzyme Microb. Technol.*, **30**: 454-466, 2002.
- HONG, Y.; DASHTBAN, M.; CHEN, S.; SONG R. & QIN, W. “Lignin in paper mill sludge is degraded by white-rot fungi in submerged fermentation”. *Microb. Biochem. Technol.*, **7**(4): 177-181, 2015.
- IKE, P. T. L.; MOREIRA, A. C.; DE ALMEIDA, F. G.; FERREIRA, D.; BIROLI, W. G.; PORTO, A. L. M. & SOUZA, D. H. F. “Functional characterization of a yellow laccase from *Leucoagaricus gongylophorus*”. *SpringerPlus*, **4**: 654, 2015a.
- IKE, P. T. L. “Produção, Caracterização e Aplicação Biotecnológica de Lacases do Fungo *Leucoagaricus gongylophorus*”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2015b. Tese de Doutorado, 126 p.
- JIANG, C.; SONG, J.; CONG, H.; ZHANG, J. & YANG, Q. “Expression and characterization of a novel antifungal exo- β -1,3-glucanase from *Chaetomium cupreum*”. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **182**(1): 261-275, 2017.
- JOHANSSON, T.; WELINDER, K. G. & NYMAN, P. O. “Isozymes of lignin peroxidase and manganese(II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: II. Partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions”. *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**(1): 57-62, 1993.
- KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; NASOMJAI, P.; LOUANGSYSOUPHANH, S.; SOYTONG, K.; ISOBE, M.; KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S. & SUKSAMRARN, A. “Antifungal azaphilones from the fungus *C. cupreum* CC3003”. *J. Nat. Prod.*, **69**(6): 891-895, 2006.
- KAUFMANN, M. “Unstable proteins: how to subject them to chromatographic separations for purification procedures”. *J. Chromatogr. B*, **699**: 347-369, 1997.
- KLOCK, U.; MUÑIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A. & ANDRADE, A. S. *Química da madeira*. 3a ed. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2005.
- KÜES, U. & RÜHL, M. “Multiple Multi-Copper Oxidase Gene Families in Basidiomycetes – What for?”. *Curr. Genom.*, **12**: 72, 2011.

- KUMAR, M.; MISHRA, A.; SINGH, S. S.; SRIVASTAVA, S. & THAKUR, I. S. "Expression and characterization of novel laccase gene from *Pandoraea* sp. ISTKB and its application". *Int. J. Biol. Macromol.*, doi: 10.1016/j.ijbiomac. 2018.04.079, 2018.
- KUNAMNENI, A.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A. & ALCALDE, M. "Laccases and their applications: A patent review". *Recent Pat. Biotech.*, **2**: 10-24, 2008.
- LAEMMLI, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, **227**(5259): 680-685, 1970.
- LEE, H.; JANG, Y.; LEE, Y. M.; LEE, H.; KIM, G. H. & KIM, J. J. "Enhanced removal of PAHs by *Peniophora incarnata* and ascertainment of its novel ligninolytic enzyme genes". *J. Environ. Manage.*, **164**: 10-18, 2015.
- LEONTIEVSKY, A.; MYASOEDOVA, N.; POZDNYAKOVA, N. & GOLOVLEVA, L. "Yellow laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electrontransfer mediators". *FEBS Lett.*, **413**(3): 446-448, 1997.
- MADHAVI, V. & LELE, S. S. "Laccase: properties and applications". *BioResources*, **4**(4): 1694-1717, 2009.
- MARTÍNEZ, A. T. "Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases". *Enzyme and Microb. Technol.*, **30**: 425-444, 2002.
- MARTÍNEZ, A. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A. & DEL RÍO, J. C. "Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin". *Int. Microbiol.*, **8**(3): 195-204, 2005.
- MATERA, I.; GULLOTTO, A.; TILLI, S.; FERRARONI, M.; SCOZZAFAVA, A. & BRIGANTI, F. "Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate". *Inorg. Chim. Acta*. **361**: 4129-4137, 2008.
- MCILLVAINE, T. C. "A buffer solution for colorimetric comparison". *J. Biol. Chem.*, **49**: 183-186, 1921.
- MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M. & ARDJMAND, M. "Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment". *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **27**: 77-93, 2013.
- MORAES, A. M. L.; PAES, R. A. & HOLANDA, V. L. "Micologia". IN: *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de*

- saúde. MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G. & AMENDOEIRA, M. R. R. Vol 4. Rio de Janeiro: EPSJV/IOC, 2009, cap. 4.
- MOREIRA, S.; MILAGRES, A. M. F. & MUSSATO, S. I. “Reactive dyes and textile effluent decolorization by a mediator system od salt-tolerant laccase from *Peniophora cinerea*”. Sep. Purif. Technol., **135**: 183-189, 2014.
- MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; SHLEEV, S. V. & YAROPOLOV, Y. I. “Laccase–mediator systems and their applications: a review”. Appl. Biochem. Microbiol., **43**(5): 523-535, 2007.
- MUNK, L.; SITARZ, A. K.; KALYANI, D. C.; MIKKELSEN, J. D. & MEYER, A. S. “Can laccases catalyze bond cleavage in lignin?”. Biotechnol. Adv. **33**(1): 13-24, 2015.
- NAKAMURA, K. & GO, N. “Function and molecular evolution of multicopper blue”. Cell. Mol. Life Sci., **62**: 2050, 2005.
- NELSON, D. L & COX, M. M. “Princípios de bioquímica de Lehninger”. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NETO, L.; PETROVICK, S. A. & ROS, P. “A celulose na farmácia”. Cad. Farm., **13**(1): 19-23, 1997.
- NETZSCH- Derivados da celulose. Disponível em: <https://www.netzsch-grinding.com/pt/industria-quimica/celulose-polpa/derivados-de-celulose>. Acesso em: 30 abr. 2018.
- NIMZ, H. H.; ROBERT, D.; FAIX, O. & NEMR, M. “Carbon-13 NMR Spectra of lignins. 8 Structural differences between lignins of hardwood, Softwood, grasses and compression wood”. Holzforschung, **35**: 16-26, 1981.
- PANTHAMA, N.; KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K. & SOYTONG, K. “Chemical constituents from the fungus *Chaetomium cupreum* RY202”. Arch. Pharm. Res., **38**(5): 585-90, 2015.
- PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. & RODRIGUES, M. V. N. “Improved extraction method to evaluate the degradation of selected PAHs by marine fungi grown in fermentative medium”. J. Braz. Chem. Soc., **22**(3): 564-570, 2011.
- POINTING, S. B. “Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi”. Fungal Divers., **2**: 17-33, 1999.
- QASEMIAN, L.; BILLETTE, C.; GUIRAL, D.; ALAÏDARD, E.; MOINARD, M. & FARNET, A. M. “Halotolerant laccases from *Chaetomium* sp., *Xylogone sphaerospora*, and *Coprinopsis* sp. isolated from a Mediterranean coastal area”. Fungal Biol., **116**(10):1090-8, 2012.

- RAMÍREZ, M. G. C.; RIVERA-RÍOS, J. M.; TÉLLEZ-JURADO, A.; GÁLVEZ, A. P. M.; MERCADO-FLORES, Y. & ARANA-CUENCA, A. "Screening for thermotolerant ligninolytic fungi with laccase, lipase, and protease activity isolated in Mexico". *J. Environ. Manage.*, **95**: S256-S259, 2012.
- RAMOS, L. P. "The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials". *Quim. Nova*, **26**(6): 863-871, 2003.
- RAPPSILBER, J., MANN, M. & ISHIHAMA, Y. "Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips". *Nat. Protoc.*, **2**: 1896-190, 2007.
- ROJAS-AEDO, J. F.; GIL-DURÁN, C.; GOLO A.; VACA I.; LEVICÁN, G.; LARRONDO L. F. & CHÁVEZ, R. "The developmental regulator Pcz1 affects the production of secondary metabolites in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*". *Microbiol. Res.*, **212-213**:67-74, 2018.
- SALVACHÚA, D.; PRIETO, A.; LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; LU-CHAU, T.; MARTÍNEZ, A. T. & MARTÍNEZ, M. J. "Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw". *Bioresour. Technol.*, **102**(16): 7500-7506, 2011.
- SÁNCHEZ, C. "Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi". *Biotechnol. Adv.*, **27**: 185-194, 2009.
- SANTA-ROSA, P. S.; SOUZA, A. L.; ROQUE, R. A.; ANDRADE, E. V.; ASTOLFI-FILHO, S.; MOTA, A. J. & NUNES-SILVA, C. G. "Production of thermostable β -glucosidase and CMCCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region". *Electron. J. Biotechnol.*, **31**: 84-92, 2018.
- SILVA, R. R. & COELHO, G. D. "Fungos principais grupos e aplicações biotecnológicas". São Paulo, 2006. Disponível em: http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Ricardo_Silva_e_Glauciane_Coelho.pdf. Acesso em: 25 Jul. 2018.
- SILVA, V. F. N.; ARRUDA P. V.; FELIPE M. G.; GONÇALVES A. R. & ROCHA G. J. "Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing". *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38**(7): 809-17, 2011.
- SOLOMON, E. I.; AUGUSTINE, A. J. & YOON, J. "O₂ reduction to H₂O by the multicopper oxidases". *Dalton Trans*, **14**(30): 3921-3932, 2008.
- STICKLEN, M. B. "Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol". *Nat. Rev. Genet.*, **9**(6): 433-43, 2008.

- SUGIURA, T.; YAMAGISHI, K.; KIMURA, T.; NISHIDA, T.; KAWAGISHI, H. & HIRAI, H. "Cloning and homologous expression of novel lignin peroxidase genes in the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624". *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**(8): 1793-1798, 2009.
- TIEN, M. & KIRK, T. K. "Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*". *Methods Enzymol.*, **161**: 238-249, 1988.
- VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA JR., M. B. & PEREIRA JR., N. "Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation". *Appl. Bioch. Biotech.*, **141**: 136-140, 2007.
- VILAVONG, S. & SOYTONG, K. "Application of a new bio-formulation of *Chaetomium cupreum* for biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* causing coffee anthracnose on arabica variety in laos". *J. Agric. Sci.*, **39**(3): 303-310, 2017.
- WILSON, K. & WALKER, J. "Principles and techniques of biochemistry and molecular biology". 7a ed. Cambridge, Cambridge University Press, 2010.
- WOLFENDEN, R. S. & WILSON, R. L. "Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)". *J. Chem. Soc.*, **2**: 805, 1982.
- WONG, D. W. "Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes". *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **157**(2): 174-209, 2009.
- WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E. & VIKARI, L. "Hydrolysis of cellulose and hemicellulose". IN: *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*; DUMITRIU, S., 2a ed. New York: Dekker, 2005, cap. 43.
- ZHANG, H.; LI, W. & LI, M. "Molecular cloning and expression of β -1,4-endoxylanase gene from *Chaetomium cupreum* in yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Adv. Mat. Res.*, **779**: 191-194, 2013.