



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO  
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS  
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

**MARCO ANTÔNIO SILVA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LACASE DE  
*Lentinus crinitus***

**SUMÉ - PB  
2019**

**MARCO ANTÔNIO SILVA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LACASE DE  
Lentinus crinitus**

**Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Glauciane Danusa Coelho.**

**SUMÉ-PB**

**2019**



S586p Silva, Marco Antônio.

Purificação e caracterização e lacase de *Lentinus crinitus*. / Marco Antônio Silva. - 2019.

51 f.

Orientadora: Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.  
Monografia - Universidade Federal de Campina Grande;  
Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso  
de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. *Lentinus crinitus*. 2. Lacase purificada. 3. Biossurfactante. 4. Enzima ligninolítica. 5. Fibra de coco verde. 6. Fungos ligninolíticos. I. Coelho, Glauciane Danusa. II. Título.

CDU: 60(043.1)

**Elaboração da Ficha Catalográfica:**

Johnny Rodrigues Barbosa  
Bibliotecário-Documentalista  
CRB-15/626

**MARCO ANTÔNIO SILVA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LACASE DE  
Lentinus crinitus**

**Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.  
Orientadora – UAEB/CDSA/UFCG**

---

**Eng. Caio de Azevedo Lima  
Examinador Externo – FCFAR/UNESP**

---

**Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz.  
Examinador Interno I – UAEB/CDSA/UFCG**

---

**Professor Dr. Bruno Rafael Pereira Nunes.  
Examinador Interno II – UAEB/CDSA/UFCG**

**Trabalho aprovado em: 05 de dezembro de 2019.**

**SUMÉ - PB**

*Ao autor de minha história “Deus”,  
Às pessoas que estiveram ao meu lado nesta conquista,  
Às minhas mães, Telma e Ilma,  
Dedico*

“Deus nunca irá colocá-lo onde não tenhas instrumentos para prosseguir. Segue e confie.”

Dona Inácia

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao amigo Jesus pela oportunidade desta encarnação e por todas as coisas e pessoas que colocou em minha vida, elas foram suporte para realização desta conquista em meio de tantos obstáculos.

À Inácia, minha mentora espiritual, que sempre esteve ao meu lado, aconselhando-me, “brigando”, amando-me em sua infinita simplicidade e consolo singular.

Às minhas mães, Telma e Ilma, por toda dedicação e amor materno. Muito do que sou é devido essas mulheres por meio de singelos ensinamentos, bom... alguns gritos também, mas faz parte. Como sou grato! Eu amo vocês.

As minhas irmãs, Amélia e Milenna, que sinto um enorme amor, e que sempre torceram pelo meu sucesso e minha evolução pessoal como ser humano. À minha família, como todo, pela torcida e alegria constante.

A minha orientadora, Glauciane, pelo acolhimento como filho, amigo e orientando, agradeço muito todo ensinamento repassado ao longo desses felizes 4 anos de orientação - eu sei que não é fácil orientar uma pessoa como eu (rs). Ainda, agradeço o sentimento de amor materno, compreensão e paciência ou, às vezes, a falta dela (rs). Em meio de sua vida agitada e difícil, sempre soube ensinar e amar. Meu Muito Obrigado. Ao Fábio, pelo carinho e cervas nos almoços de domingo, e aos meus irmãos purtiços, Pepê, Beto e Vitória.

À Universidade Federal de Campina Grande que me acolheu, e me fez vivenciar um universo de oportunidades e direcionamento profissional por meio do ensino, extensão, pesquisa e suporte financeiro. Aos professores, Franklin Nóbrega, Fabiana Pimentel, Aldinete Barreto, Jean Queiroz, Bruno Nunes, Arianne Barros, Adriano Trindade, Nadege Dantas, Rafael Maia, Norma Oliveira, que tanto contribuíram para minha formação acadêmica. Ao Laboratório de Microbiologia, minha segunda casa, local onde aprendi praticamente tudo que eu sei, agradeço por tudo e todos que contribuíram para isso.

Às professoras, Valéria Ebinuma e Giovana Tommaso, pelas contribuições em minha construção como pesquisador e profissional.

Às meninas da limpeza, Patrícia, Bethânia e Adriana, que passaram por esses 4 anos contribuindo na limpeza do laboratório de Microbiologia, obrigado pela limpeza de minhas “bagunças” e pelas conversas descontraídas. Bethânia, gratidão pela amizade e torcida. As arrumadeiras da Residência Universitária, Marta Ladjane e IvanildaFêlix as artistas, pelos tantos risos e conversas sobre “coisas que não podem ser ditas”.

À família NUBEM, que me acolheu com tanto amor e atenção perante meu jeito de ser, em especial a professora Adriana Meira, minha querida amiga, Ana Paula, e meu companheiro

de evangelização, Tio Geo. Às criancinhas que tanto me ajudaram nesses 3 anos, fazendo-me um ser melhor a cada semana. Ao Evangelho das quartas feiras, que tanto me auxiliou e me fez refletir sobre muitas coisas.

Aos meus amigos do grupo ANORMAIS, Kamila, Davi, Tácia, Rainy, Andreza e Caio, não existe palavras para descrever o que vivemos. Vivemos o melhor momento de nossas vidas, momentos de transformações, loucuras (com e sem limites) e superações. Somos bons e estranhos amigos.

Aos meus amigos do grupo REVELAÇÕES, Biel, Lipe, Claudino, Papel, MB, Saulo, Samuel, MauMau e Victor, grato pela amizade e muitas risadas todas as vezes que nos reunimos.

Aos meus amigos da Residência Universitária, Dudé, Albano, Alice, Aleffy, Daniboy, Davi, Rainy, Laura, Mônica, Denis, Diego, Fafa, Geo, Hugo, Isaak, Isac, Fuzil, Jonathan, Magro, Manu, Regina, Rodrigo, Marcele, Roby, Day, Bahia, na qual passei por tantos momentos, alegres, estressantes, noites de estudo, noites de várias coisas. Minha casa querida, onde não esquecerei todas as histórias vivenciadas.

À GAE – Gerência de Assuntos Estudantis - pelo apoio e trabalho, em especial ao servidor Rogério.

As pessoas queridas, Marcele, Artur, Rebeca Willy, Paloma, Jubiatan, Teteu, João, Ialdo.

À minha querida amiga e braço direito, Kamila Sotero, pessoa que esteve e está comigo em todos os tipos de momentos. Pessoa que expresso minha gratidão e admiração. Esse nome vem a minha mente quando penso em empoderamento e o “nunca desistir”.

A minha amiga, Alice, que em meio de tantos obstáculos, seguiu em frente, e me faz refletir sobre o querer bem e doação ao próximo.

A Andreza, que foi meu ombro de lágrimas em algumas situações, e que nunca responde minha mensagem, mas tem um jeito não muito doce (tapas) de demonstrar esse grande amor que reina nesse coraçãozinho.

A Tácia, ser único, que do seu jeito demonstra seu carinho e atenção. Pessoa mais sem juízo da turma, mas que emana união e alegria.

Ao Davi, que entre o amor e o ódio, conseguimos nos superar nessa oportunidade de reencontro.

A Thayse, a minha amiga mais mão de vaca, mas que assim ficou rica, hahaha. Que sempre possamos nos encontrar por esse mundão. Obrigado por tudo.

A Taliana, meu denço, que conquistou a todos com alegria e doação.



Ao meu amigo de infância, André Martins, que sempre esteve disponível para me ouvir e que sempre me deu conselhos não muitos úteis. Eu agradeço pela compreensão e a pela nossa duradoura amizade.

A Dudé, pessoa que mais convivi presencialmente, que tenho tanto apresso e amizade. Pessoa que quis me converter para organização, e que agradeço toda atenção, e as festinhas em nosso quarto.

Aos que contribuíram por este trabalho, Alice e George, engradeceram esse TCC com essas mãos talentosas e mentes brilhantes.

Aos meus estagiários, que lavaram tantas louças minhas, Isac e Ana.

Aos professores, Jean Queiroz e Bruno Nunes, e ao Caio, por terem aceitado compor a minha banca e pelas contribuições tão enriquecedoras.

SILVA, M. A. **Purificação e caracterização de lacase de *Lentinus crinitus***.2019. 51 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Campina Grande, Área de Concentração: Biotecnologia, Sumé, SP.

### RESUMO

A busca por novas biomoléculas tem sido relatada por vários grupos de pesquisadores devido à crescente aplicabilidade em diversos setores. A lacase é uma enzima de grande importância no desenvolvimento de tecnologias verdes, dessa forma são consideradas “ecofriendly”. Nesse trabalho, objetivou-se purificar e caracterizar a enzima lacase produzida pelo fungo *Lentinus crinitus* durante fermentação semissólida, tendo a fibra de coco verde suplementada com farinha de soja como substrato. Foi realizada a cinética de produção de lacase e biossurfactantes. A lacase foi purificada por meio da precipitação com sulfato de amônio, seguido de diálise e cromatografia de troca iônica com uso de coluna de troca iônica Inertsil CX. A lacase purificada foi caracterizada em relação a temperatura e pH ótimos e à estabilidade ao pH e à temperatura. O pico de atividade de lacase na FSS ocorreu no sexto dia de fermentação com  $174 \text{ U.L.}^{-1}$ . A precipitação com 80% de saturação de sulfato de amônio foi eficiente na separação da lacase do biossurfactante. A CLAE apresentou um pico único de atividade de lacase, sendo que o rendimento foi de 4,79% e o fator de purificação foi de 0,13. A temperatura e pH ótimos foram de 40 °C e 2,2 respectivamente. Os altos valores de meia vida indicam o potencial de aplicação de lacase purificada de *L. crinitus* em processos biotecnológicos.

Palavras-chave: ABTS, basidiomiceto, biossurfactante, enzima ligninolítica, fibra de coco verde

SILVA, M. A. **Purification and characterization of *Lentinus crinitus* Laccase**. 2019. 51 p. Final Paper – Federal University of Campina Grande, Area of Concentration: Biotechnology, Sumé, PB.

### ABSTRACT

The search for new biomolecules has been reported by several groups of researchers due to the increasing applicability in various sectors. Laccase is an enzyme of great importance in the development of green technologies, so they are considered ecofriendly. This work aimed to purify and characterize the laccase enzyme produced by the fungus *Lentinus crinitus* during semi-solid fermentation, using green coconut fiber supplemented with soy flour as substrate. The kinetics of laccase and biosurfactant production were performed. Laccase was purified by ammonium sulfate precipitation, followed by dialysis and ion exchange chromatography using Inertsil CX ion exchange column. The purified laccase was characterized in relation to the optimum temperature and pH and the stability at pH and temperature. The FSS laccase activity peak occurred on the sixth day of fermentation with 174 U.L.<sup>-1</sup>. Precipitation with 80% ammonium sulfate saturation was efficient in separating the biosurfactant laccase. HPLC showed a single peak of laccase activity, with a yield of 4.79% and a purification factor of 0.13. The optimum temperature and pH were 40 °C and 2.2 respectively. The high half-life values indicate the potential for application of purified *L. crinitus* laccase in biotechnological processes.

Key words: ABTS, basidiomycete, biosurfactant, ligninolytic enzyme, green coconut fiber.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Basidiocarpo de <i>Lentinus crinitus</i> CCIBT 2611 .....	19
Figura 2. Estrutura cristalográfica de Lacase de <i>Lentinus sp.</i> .....	23
Figura 3. Mecanismo catalítico da enzima Lacase. ....	23
Figura 4. <i>L. crinitus</i> CCIBT 2611 tendo como suporte a fibra de coco verde suplementado com farinha de soja C/N: 90 .....	28
Figura 5. Índice de Emulsificação (●), Atividade de Lacase (▲) e pH (■) pelo sistema enzimático de <i>L. crinitus</i> CCIBT durante crescimento em bagaço do endocarpo epicarpo do coco verde suplementado com farinha de soja. ....	32
Figura 6. Estabilidade de emulsificação dos extratos brutos obtidos durante os 21 dias de incubação, após 24 h. as barras indicam desvio padrão entre triplicatas.....	33
Figura 7. Acompanhamento da estabilidade de emulsificação do extrato bruto obtido no nono dia de fermentação, durante 24 dias. ....	34
Figura 8. Perfil de eluição da atividade de lacase em cromatografia de troca iônica.....	34
Figura 9. O efeito da temperatura sobre a atividade de lacase de <i>L. crinitus</i> foi determinada no pH ótimo. ....	36
Figura 10. Efeito do pH sobre a atividade da lacase de <i>L. crinitus</i> durante dias de fermentação utilizando a fibra de coco verde como substrato. Utilizou-se tampão McIlvaine da faixa de 2,2 a 6,6. ....	36
Figura 11. Perfil de estabilidade da lacase de <i>L. crinitus</i> no pH 4,8 (▲) e pH 2,2 (■). ....	37
Figura 12. Estabilidade da atividade de lacase de <i>L. crinitus</i> nas temperaturas de 40°C (▲) e 50°C (■) no pH 4,8. ....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações dos biossurfcantantes .....	24
Tabela 2. Técnicas de purificação de lacases de Fungos.....	25
Tabela 3. Composição do meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) utilizado para cultivo do inóculo .....	26
Tabela 4. Concentração da mistura de reação para determinação da atividade enzimática. ....	29
Tabela 5. Avaliação do crescimento do microrganismo.....	32
Tabela 6. Etapas de purificação da lacase de <i>L.crinitus</i> . .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfato de Amônio

ABTS:2,2-azinobis-(3- ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)

BDA: Batata Dextose Agar

C/N: Relação Carbono Nitrogênio

CCIBt:Coleção de Cultura de Algas, Cianobactérias e Fungos

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

C/N: relação carbono nitrogênio

CV: Coco Verde

FSS: Fermentação em Estado Sólido

IFPMA: *International Federation ofPharmaceuticalManufacturers&Associations*

LiP: Lignina Peroxidase

MnP: Manganês Peroxidase

pH: potencial hidrogeniônico

q.s.p.: quantidade suficiente para

UNESCO: Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. <i>Objetivo Geral</i> .....	18
2.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1 <i>A Biotecnologia e o Mercado</i> .....	18
3.2 <i>Fungos Ligninolíticos</i> .....	19
3.3 <i>Lentinus crinitus</i> .....	20
3.4 <i>Fermentação Semisólida (FSS)</i> .....	20
3.5 <i>Coco Verde (Cocos nucifera L.)</i> .....	21
3.6 <i>Enzimas do Complexo Ligninolítico</i> .....	21
3.7 <i>Lacase</i> .....	22
3.8 <i>Biossurfactante</i> .....	24
3.9 <i>Purificação</i> .....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 <i>Local de realização do trabalho</i> .....	26
4.2 <i>Inóculo</i> .....	26
4.3 <i>Preparo do Substrato</i> .....	27
4.4 <i>Fermentação Semisólida (FSS)</i> .....	27
4.5 <i>Análise Qualitativa do Crescimento Microbiano</i> .....	28
4.6 <i>Obtenção do Extrato Enzimático</i> .....	28
4.7 <i>Determinação de Atividade Enzimática</i> .....	29
4.8 <i>Avaliação de Produção de Biossurfactante</i> .....	29
4.9 <i>Quantificação de Proteínas</i> .....	30
4.10 <i>Purificação de Lacase</i> .....	30
4.10.1 <i>Precipitação com sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i> .....	30
4.10.2 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i> .....	30
4.10.3 <i>Análise: purificação enzimática</i> .....	31
4.11 <i>Caracterização de Enzima Purificada</i> .....	31
4.11.1 <i>Determinação da temperatura e do pH ótimos de reação</i> .....	31
4.11.2 <i>Determinação da estabilidade ao pH</i> .....	31
4.11.3 <i>Determinação da estabilidade térmica</i> .....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1 <i>Avaliação Qualitativa de Crescimento de L. crinitus</i> .....	32

5.2 Cinéticas de Produção Enzimática e de Biossurfactantes .....	32
5.3. Caracterização do Biossurfactante .....	33
5.4 Purificação da Lacase de <i>L. crinitus</i> .....	34
5.5 Caracterização de Lacase Purificada de <i>L. crinitus</i> .....	35
6. DISCUSSÃO .....	38
7. CONCLUSÃO .....	40
REFERÊNCIAS .....	41



## 1 INTRODUÇÃO

A busca por novas biomoléculas tem sido relatada por vários grupos de pesquisadores devido à crescente aplicabilidade em diversos setores industriais, como alimentício, biorremediação, farmacêutico, entre outros (CHOI; HAN; KIM, 2015). Entre essas biomoléculas, destaca-se a lacase, que são glicoproteínas polifenol oxidases, que podem possuir 3 ou 4 átomos de cobre desempenhando papel essencial no sítio catalítico enzimático (STRONG; CLAUS, 2011). Essas enzimas abstraem elétrons do substrato e os transferem para o núcleo de cobre com concomitante redução de oxigênio em água, esse mecanismo favorece a inespecificidade da lacase, que dessa forma, pode ser aplicada em diversos processos biotecnológicos (VARJANI, 2016).

As atividades agroindustriais geram grandes quantidades de resíduos sólidos que podem ser utilizados em processos fermentativos para a produção de enzimas a partir de fungos basidiomicetos (ERGUN; UREK, 2017; PERALTA et al., 2017). A fibra de coco verde é um resíduo agroindustrial gerado em grande quantidade no Brasil (MARTINS et al., 2013), e que apresenta composição lignocelulósica favorável para produção de enzimas ligninolíticas (NISA et al. 2014). O fungo *Lentinus crinitus*, causador da podridão branca da madeira, é reconhecido pela capacidade de produzir a lacase em diversos substratos e de degradar poluentes (BOSCO; MOLLEA; RUGGERI, 2016; ALMEIDA; OLIVEIRA; SOUZA, 2018).

Na literatura, verifica-se que as lacases vêm sendo aplicadas para a degradação de diferentes tipos de compostos orgânicos recalcitrantes, como os corantes têxteis sintéticos (MOREIRA-NETO; MILAGRES; MUSSATTO, 2014; ALMEIDA et al., 2018), e organoclorados (PACHECO; SOARES, 2014; COELHO et al., 2019), e por isso, são consideradas enzimas “ecofriendly”, pois contribuem para o desenvolvimento de tecnologias verdes (RODRÍGUEZ-COUTO et al., 2012; SENTHIVELAN et al., 2016).

Considerando a importância das lacases para a aplicação em diversas áreas, esse trabalho propôs a utilização da fibra de coco verde para a produção, purificação e caracterização da lacase de *Lentinus crinitus* CCIBT 2611.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Produzir, purificar e caracterizar a lacase produzida pelo fungo basidiomiceto *Lentinus crinitus*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial da fibra de coco verde na produção de lacase e de biossurfactantes em FSS;
- Purificar a lacase produzida pelo fungo basidiomiceto *L. crinitus*;
- Caracterizar a enzima purificada quanto a temperatura e pH ótimos e a estabilidade a esses parâmetros.

## 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 3.1 A Biotecnologia e o Mercado

Globalmente, muitos são os desafios enfrentados a compensar os efeitos das mudanças climáticas, do descaso ambiental, assim como, dos problemas reemergentes. Uma das prioridades nessas resoluções é a busca, por meio da biotecnologia, de soluções com potencial e viabilidade de remediar questões socioambientais. Segundo a UNESCO, a biotecnologia é uma ciência que busca o desenvolvimento nas áreas de indústria, medicina e agricultura por meio de processos biológicos utilizando plantas, animais e microrganismos com o objetivo de melhoria na qualidade de vida da sociedade.

A biotecnologia vem sendo utilizada há milhares de anos na área de bioprocessos envolvendo a fermentação de diversas matérias primas para gerar uma variabilidade de produtos microbiológicos aquecendo o mercado de proteínas e enzimas utilizadas na catálise de reações bioquímicas. Dentre esses produtos, destacam-se os antibióticos, pesticidas, defensivos, biocompostos oriundos de processos envolvendo microrganismos (SALERNO et al., 2018), bem como enzimas e biossurfactantes (MARTINHO et al., 2019)

Segundo IFPMA - *International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations* (2017), a indústria tem investido constantemente em inovação nos Estados Unidos, sendo que 20% do faturamento anual é aplicado em P&D (Pesquisa e Desenvolvimento) referente as áreas de biotecnologia e farmacologia, o que representa cerca de US\$ 80 bilhões/ano. Esse percentual tem como

consequência a produção de mais de 50% de novas moléculas que foram desenvolvidas no mundo na década passada. Vale ressaltar que o mercado biotecnológico está em expansão em países pertencentes à União Europeia, e países emergentes da Ásia, como a China e Singapura.

Dados publicados pela Enzymes Market Size (2019) estimam que o mercado de enzima tenha crescimento anual de 6,8% entre os anos 2019 a 2026 atingindo um valor de mercado de US\$ 8,6 bilhões. Esse mercado está em exponencial desenvolvimento a partir da demanda de produtos farmacêuticos por enzimas eficientes, assim como, no setor de energia, combustível e alimentício. Em aplicações, cerca de 500 produtos são produzidos a partir de enzimas (KUMAR e SINGH, 2013).

### 3.2 Fungos Ligninolíticos

Os fungos constituem um grupo muito diversificado em relação a sua forma, à estrutura e à capacidade metabólica, e se desenvolvem por meio da metabolização de matéria orgânica e tem o crescimento afetado por fatores físicos e químicos como temperatura, umidade, concentração de oxigênio, pH, micronutrientes, fontes de carbono e nitrogênio, entre outros (LOGUERCIO-LEITE; ESPOSITO, 2004). Os fungos basidiomicetos possuem fase vegetativa, o micélio, que é formado por muitos filamentos denominados hifas, caracteristicamente produzem uma estrutura chamada basidiocarpo(Figura 1). Popularmente são conhecidos como de cogumelos ou orelhas-de-pau(GUGLIOTTA; CAPELARI, 1998).

Figura 1. Basidiocarpo de *Lentinus crinitus*CCIBT 2611



Fonte: Gugliotta e Capelari(1998)

Os basidiomicetos ligninolíticos excretam para o ambiente enzimas que são capazes de metabolizar polímeros complexos em moléculas menores, e que posteriormente, são utilizadas como nutrientes. Estes fungos basidiomicetos, decompositores de madeira, podem ser

classificados como causadores de podridão branca e podridão parda, atuando na degradação de matéria orgânica dinamizando a ciclagem de nutrientes (TUOMELA et al., 2000). Os fungos causadores da podridão parda degradam principalmente a celulose e hemicelulose, restando apenas moléculas de lignina. Já os fungos causadores de podridão branca apresentam complexos enzimáticos capazes de sintetizar fontes complexas de carbono, degradando além de celulose e hemicelulose, a lignina restando a madeira com aparência esbranquiçada. (LEONOWICZ et al., 1999; SHAH; NERUD, 2002).

A utilização de fungos basidiomicetos em processos biotecnológicos vem ganhando destaque devido a capacidade de crescimento em suporte agroindustriais, assim como de biodegradação de substâncias nocivas ao meio ambiente, podendo ser aplicados na biorremediação de poluentes orgânicos como corantes (SOTERO et al, 2017), organoclorados (COELHO et al 2019), compostos aminoaromáticos (LIMA et al., 2018), hidrocarbonetos aromáticos (VIEIRA et al., 2018).

### 3.3 *Lentinus crinitus*

O fungo *L. crinitus* é classificado, segundo o Catalogue of Life (2019), em Filo Basidiomycota; Classe Basidiomycetos; Ordem Poliporales; Família Poliporaceae e gênero *Lentinus*. Esse fungo é classificado como fungo de podridão branca, possui ampla distribuição na América do Sul, América Central, assim como, na África e Ásia e pode ser encontrado em madeira em decomposição (MAIA et al., 2006). No Brasil, há ocorrência do fungo na Região Amazônica e Mata Atlântica (COSTA; JESUS, 2010).

O gênero *Lentinus* é conhecido por produzir enzimas ligninolíticas (VALLE et al., 2014), bem como por degradar diferentes resíduos xenobióticos, como dicloclorofenol (JIA et al., 2016), e corante sintéticos (ALMEIDA et al., 2018, NIEBISCH et al., 2010). *L. crinitus* é utilizado na alimentação por grupos de indígenas da Amazônia Ocidental (FRANCO-MOLANO et al., 2005). Ainda, fungos do gênero *Lentinus* fazem parte dos cogumelos comestíveis consumidos pelo tribo indígena amazonense Sanõma, pertencente ao grupo étnico Yanomami (NISHIKIDO, 2019).

### 3.4 Fermentação Semissólida (FSS)

Diante do elevado custo para a produção de enzimas ligninocelulósicas, a fermentação semissólida (FSS) torna-se uma alternativa viável com a possibilidade do uso de uma variedade

de substratos, que apresentam baixo custo, favorecendo o uso dessas enzimas em aplicações industriais (GAOet al., 2008).

A FSS é um processo que utiliza substratos sólidos como suporte para crescimento de microrganismos e produção de metabólitos, tanto primários como secundários. Esses suportes são utilizados por fungos como fonte de carbono ou apenas como suporte inerte. A FSS possui como principal característica a presença de baixos níveis de água livre (SINDHU et al., 2015). Esse tipo de fermentação torna-se vantajosa por apresentar menores possibilidades de contaminação devido ao baixo nível de água livre, além da formação de um pequeno volume de subprodutos durante o processo, maior produtividade, assim como maior concentração do produto final, e principalmente, a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substrato (CASTRO; PEREIRA JR., 2010; YAZID et al., 2017).

### 3.5 *Coco Verde (Cocos nucifera L.)*

A parede celular dos vegetais é complexa e resistente, sendo que o material lignocelulósico corresponde a 60% da biomassa vegetal. Desse percentual, 10 a 30% corresponde a lignina, 15 a 35% a hemicelulose, e 30 a 50% corresponde ao teor de celulose, variando os percentuais de polissacarídeos de acordo com a matéria-prima e estado vegetativo da biomassa (RESENDE, 2017).

A casca de coco verde (CV) representa em torno de 80% da massa total do fruto, sendo composto pelo endocarpo, mesocarpo e epicarpo. A fibra de CV possui uma alta umidade, e a falta de aproveitamento do resíduo condiciona o destino final ao depósito em lixões. Entretanto, alguns setores da indústria utilizam esses resíduos para produção de produtos biotecnológicos, associando o ganho socioeconômico com os aspectos ambientais. O uso da fibra de coco é verificado na produção de compósitos poliméricos de polietileno (PERES, 2018), na produção de carboximetilcelulose (STEGMILLER et al., 2013), assim como, na imobilização de enzima lacase para clarificação de suco (LACERDA et al., 2018).

### 3.6 *Enzimas do Complexo Ligninolítico*

As enzimas do complexo enzimático ligninolítico, produzidas por fungos de podridão branca, são assim chamados pelo fato de serem capazes de degradar a celulose, a hemicelulose e a lignina devido a produção de duas classes principais de enzimas: as enzimas hidrolíticas – relacionadas à degradação de celulose e hemicelulose – e as enzimas fenoxidases e peroxidases – que estão relacionadas à degradação da lignina (NOVOTNY. et al., 2004; FARIA, 2010).

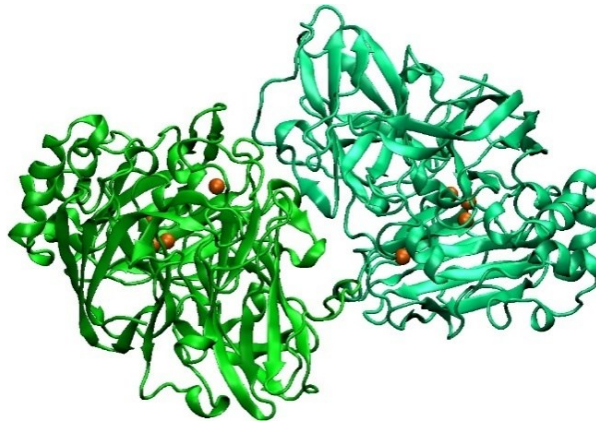
As principais enzimas ligninolíticas são a Manganês Peroxidase (MnP), a Lignina Peroxidase (LiP) e a Lacase, sendo que MnP e LiP possuem a capacidade de clivar ligações moleculares na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (AGUIAR 2006), e devido a isso podem ser utilizadas para remoção de moléculas de difícil degradação de compostos recalcitrantes. Entretanto, as peroxidases não são muito utilizadas devido a possibilidade de sua atividade ser prejudicada pela formação de radicais livres (SILVA, 2014). Por outra via, as lacases atuam na catálise de compostos fenólicos, e não fenólicos na presença de oxigênio. Para a degradação de compostos não fenólicos, as lacases necessitam de mediadores enzimáticos para aumentar o potencial redox (GARCIA, 2009).

### 3.7 Lacase

A lacase foi descrita pela primeira vez em uma árvore japonesa, *Rhus vernicifera* (YOSHIDA, 1883). A presença de metais no sítio ativo, bem como a ocorrência de lacases em fungos foram registradas por Bertrand em 1885 (BERTRAND, 1886). O interesse biotecnológico pelas lacases fúngicas surgiu pela constatação de que os fungos conseguem suportar ambientes adversos, a partir da liberação de enzimas capazes de atuar em diversas situações (VISWANATH et al., 2008). Além disso, a maioria das lacases fúngicas são identificadas como glicosiladas, auxiliando na estabilidade enzimática (CHO et al., 2011).

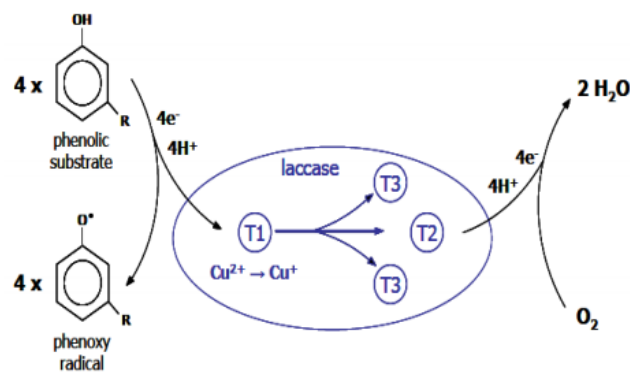
As lacases são ligninases (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxigênio oxidoreductase) produzidas por fungos basidiomicetos que contém três ou quatro átomos de cobre (JANUSZ et al., 2013). A Figura 2 representa um modelo tridimensional da estrutura dimérica da lacase de *Lentinus sp.* A reação enzimática inicia-se quando ocorre a transferência de elétron do substrato para um dos átomos de cobre e então há formação de um radical livre concomitantemente à redução do oxigênio à água (MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015; MARTÍNKOVÁ et al., 2016, BILAL et al., 2019). A redução do oxigênio forma duas moléculas de água, uma delas é transportada rapidamente para a solução e a outra permanece ligada fortemente ao íon cobre 2 (YAROLOV et al., 1994). Primeiramente o substrato reduz o site T1, depois disso transfere o elétron para o aglomerado trinuclear T2 / T3 (MINOCHEHERHOMJI; PRAJAPATI, 2018) (Figura 3).

**Figura 2** - Estrutura cristalográfica de Lacase de *Lentinus sp.*



Legenda: em diferentes tons de verde tem-se os dímeros da lacase de *lentinus sp.* No sítio catalítico da enzima contém um núcleo trímico de cobre. NCBI: ID 3X1B. Fonte: autoria própria.

**Figura 3** - Mecanismo catalítico da enzima Lacase.



Fonte: Minocheherhomji e Prajapati (2018)

A lacase tem recebido atenção devido a capacidade de degradar uma variedade de poluentes recalcitrantes, bem como pela inespecificidade (VARJANI, 2016). As lacases podem degradar compostos orgânicos de diferentes classes, podendo ser aplicadas em processos de biorremediação (MATE; ALCALDE, 2016), atuando na degradação de efluentes têxteis (GONZÁLEZ et al., 2019) por meio da desaminação e dessulfonação de corante sintéticos (LADE; GOVINDWAR; PAUL, 2015), em efluente papelero (SHARMA et al., 2019), na degradação de compostos aromáticos (KHAMBHATY et al. 2015), bem como, na sacarificação da biomassa e na produção de etanol celulósico (LOMASCOLO et al., 2011).

Estudos mais recentes demonstram o potencial da lacase na farmacologia. Estudos de Brugnerotto et al. (2016) verificaram a importância da lacase no desenvolvimento de biossensores para rutina, um flavonoide. As lacases purificadas podem ser utilizadas para

encapsulação celular (ROBERTS et al., 2016) e como inibidoras da transcriptase reversa do vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) (ZHANG et al., 2013).

### 3.8 Biossurfactante

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas de origem microbiana que auxiliam na redução da tensão interfacial e superficial dos líquidos imiscíveis (KARLAPUDI et al., 2018), que vêm sendo estudados para substituir os surfactantes sintéticos derivados do petróleo (LIU et al., 2018). Os microrganismos produzem biossurfactantes com finalidades fisiológicas, permitindo que esses cresçam em substratos hidrofóbicos, pela diminuição da tensão superficial, disponibilizando-os para o metabolismo (BARBOSA, 2011). Essas substâncias tensoativas possuem vantagens especiais em relação aos surfactantes químicos, como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água, capacidade de atuação em condições drásticas de pH, temperatura e salinidade (LIU et al., 2018; TRIPATHI et al., 2019) As características dos biossurfactantes permitem que essas biomoléculas possam ser aplicadas em várias áreas, conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1** - Aplicações dos biossurfactantes

<b>Indústria</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Função do surfactante</b>
Petróleo	Limpeza de reservatório de óleo; aumento da recuperação de petróleo	Reduzir a viscosidade e formar emulsões, facilitando a remoção de óleos pesados depositados em fundos de reservatórios
Ambiental	Biorremediação de águas e solos	Emulsificação e remoção de hidrocarbonetos; remoção de metais; agente espumante; detergente;
Alimentícia	Emulsificação; ingrediente funcional	Emulsionar favorecendo a consistência e a textura;
Agrícola	Biocontrole	Emulsionar pesticidas e herbicidas, facilitando a dispersão do composto ativo
Cosmética	Produtos de higiene e beleza	Emulsificantes, umectantes, espumantes, solubilizantes, mediadores da ação enzimática
Farmacêutica	Produtos terapêuticos	Inibir formação de coágulos; atividade antibacteriana e antifúngica; vacinas

**Fonte:** Singh et al.(2007)



### 3.9 Purificação

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por microrganismos constitui uma etapa complexa e custosa, devido as características dos meios e das biomoléculas de interesse, como enzimas. A purificação pode ser dividida em quatro etapas gerais: separação das células e fragmentos do meio de cultivo; concentração do material, purificação de alta resolução e o condicionamento final do produto (PESSOA Jr.; KILIKIAN, 2005).

Diferentes técnicas de purificação de proteínas têm sido utilizadas buscando a eficiência na obtenção de enzimas. Alguns métodos combinam precipitação e ultrafiltração a fim de reduzir o volume, e diferentes técnicas de cromatografia são utilizadas para isolamento e captura da enzima desejada, conforme apresentado na Tabela 2. Entretanto, essas operações unitárias trazem consigo desvantagens na obtenção quantitativa da enzima. Diante disso, técnicas em cromatografia em coluna estão sendo aplicadas em lacases com o objetivo de elucidar e otimizar a purificação enzimática (RAJEEVA; LELE, 2011).

**Tabela 2** - Técnicas de purificação de lacases de Fungos.

<b>Fungo</b>	<b>Técnica de Purificação</b>	<b>Referências</b>
<i>Lepiotaventriospora</i>	Troca iônica (3*) Filtração em gel	Zhang et al. (2013)
<i>Shiraia sp.</i>	Troca iônica (1*) Filtração em gel	Yang et al. (2013)
<i>Lentinussquarrosulus</i>	Troca iônica (1*) Filtração em gel	Mukhopadhyay; Banerjee (2015)
<i>Lentinustigrinus</i>	Coluna de Afinidade	Sadeghian-abadi (2019)
<i>Trametes pubescens</i>	Troca iônica (2*) Coluna de Afinidade	Si, Peng e Cui (2013)
<i>Trametes orientalis</i>	Troca iônica (2*)	Zheng et al. (2017)
<i>Trichodermaharzianum</i>	Troca iônica (1*) Filtração em gel	Bagewadi, Mulla e Ninnekar (2017)
<i>Deconicacastanella</i>	Filtração em gel	Coelho (2007)
<i>Pleurotuseryngii</i>	Troca iônica (3*) Filtração em gel	Wang e Ng (2006)

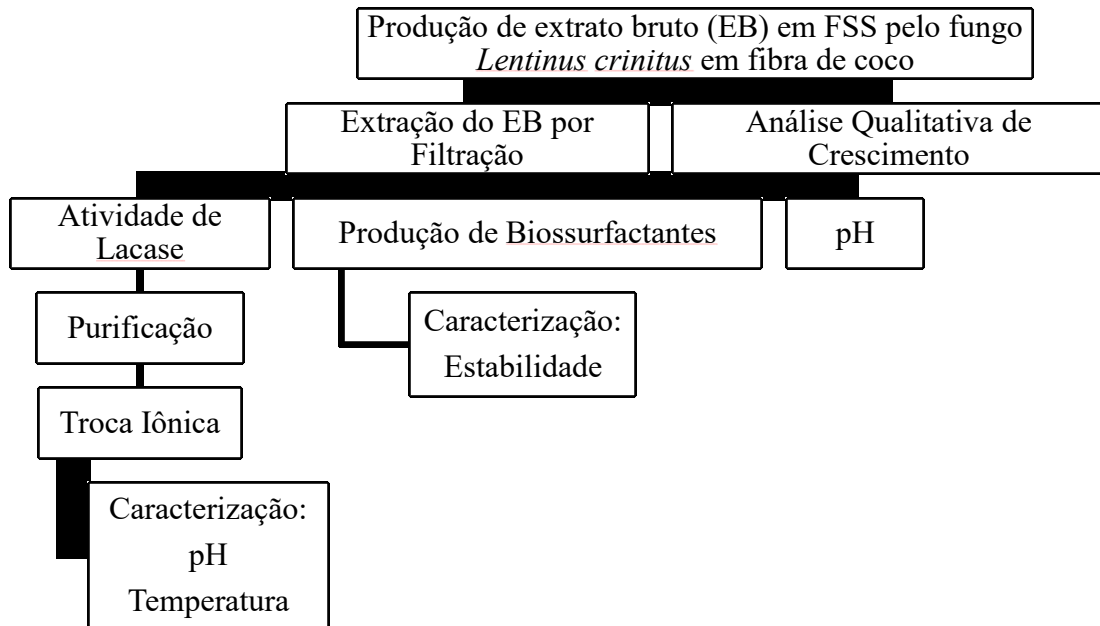
\*: número de cromatografias utilizadas

Fonte: Autoria própria.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia aplicada está apresentada de forma resumida no Fluxograma 1.

Fluxograma 1. Resumo da metodologia utilizada na pesquisa.



#### 4.1 Local de realização do trabalho

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e de Biologia Molecular no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido/CDSA/UFCG/Sumé-PB.

#### 4.2 Inóculo

O basidiomiceto *L. crinitus* CCIBt2611 pertence à Coleção de Cultura de Algas, Cianobactérias e Fungos (CCIBt) do Instituto de Botânica, da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Este fungo foi isolado de basidioma encontrado em madeira de mata de restinga no município de São Vicente, Região da Baixada Santista, SP (OKINO et al., 2000).

*L. crinitus* CCIBT 2611 foi cultivado em meio BDA (Tabela 2) a 28° C até que o crescimento atingisse toda a placa de Petri.

**Tabela 3** - Composição do meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) utilizado para cultivo do inóculo

COMPONENTE	QUANTIDADE
Batata	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	20 g
Água destilada	q.s.p. 1 L

Fonte: Fahim(1966)

### 4.3 Preparo do Substrato

A matéria-prima utilizada como substrato foi constituída de bagaço de coco verde (mesocarpo e epicarpo), que foi adquirido na cidade Sumé-PB, triturado em uma forrageira e lavado em água corrente até a retirada de todos sólidos solúveis totais, e de farinha de soja comercial da marca VITÃO lote 16048. Os substratos foram misturados de modo a se alcançar a proporção C/N 90 (MATHEUS et al., 2003). A umidade foi determinada utilizando se o determinador de umidade (Shimadzu MOC 63U) por 15 minutos a 105°C, e foi ajustada para 70% (bu) pela adição de um volume definido de água destilada, considerando que a densidade da água é igual a 1 g/cm<sup>3</sup>, realizou-se o cálculo a partir da Equação 1:

$$V_{AA}(g/cm^3) = m_{AA} = \frac{mi(U_2 - U_1)}{1 - U_2} \quad (1)$$

Em que:

VAA: volume de água a ser adicionada ao meio

m<sub>AA</sub>: massa de água a ser adicionada

m<sub>i</sub> = massa do meio a ser umidificado

U<sub>1</sub> = umidade do meio;

U<sub>2</sub> = umidade do meio desejada.

### 4.4 Fermentação Semisólida (FSS)

O inóculo foi preparado em frascos de vidro com tampa de rosca com capacidade de 900 mL e foi constituído de uma mistura de 30 g mesocarpo e epicarpo de coco verde triturado, suplementado com 0,3366g de farinha de soja, de forma a obter-se uma relação C/N 90. A umidade foi ajustada para 70 %. O sistema foi esterilizado em autoclave por 60 min a 121°C e 1 atm. Após resfriamento, 10 discos de 5 mm de diâmetro de crescimento micelial foram adicionados ao substrato (Ballaminut; Matheus 2007), que foi incubado em estufa a 28° C ± 2° C durante 21 dias. A Figura 4 apresenta o sistema de cultivo fúngico após os 21 dias de cultivo.

**Figura 4** - *L.crinitus* CCIBT 2611 tendo como suporte a fibra de coco verde suplementado com farinha de soja C/N: 90



**Fonte:** Dados da pesquisa

#### 4.5 *Análise Qualitativa do Crescimento Microbiano*

Por meio da observação visual, determinou-se, qualitativamente, o crescimento do fungo no substrato submetido à fermentação em estado sólido. O crescimento fúngico foi observado e determinado de acordo com o padrão adaptado da ASTM (*American Society for Testing Materials*), *Standard Methods G21-90* (1990), apresentando as seguintes faixas de crescimento:

- (-) ausência de crescimento;
- (+) pouco crescimento com turvação de pequenos fragmentos de micélio lançados no meio;
- (++) moderado crescimento com surgimento de “pellet” fino na superfície do meio;
- (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade a todo frasco.

#### 4.6 *Obtenção do Extrato Enzimático*

Em frasco de vidro em que conduziu-sea FSS, adicionou-se 50 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5. O conteúdo de cada frasco foi homogeneizado manualmente por 5 minutos, e em seguida agitado em mesa agitadora a 120 rpm durante 1 hora a 25 °C (BALLAMINUT, 2007). O extrato enzimático foi obtido por filtração a vácuo utilizando papel filtro. A determinação do pH do extrato bruto foi realizada em pHmetro digital 2600 INSTRUTHERM devidamente calibrado.

#### 4.7 Determinação de Atividade Enzimática

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do 2,2-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) a 420nm ( $\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) durante 600 segundos, em espectrofotômetro marca Instruterm modelo 1000a, seguindo o método descrito por Ballaminut e Matheus (2007). A mistura de reação está expressa na Tabela 4. Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{Mol}$  de ABTS por minuto.

**Tabela 4** - Concentração da mistura de reação para determinação da atividade enzimática.

Componentes (mM)	Concentração ( $\mu\text{L}$ )
Tampão acetato de sódio (50)	450
ABTS (5)	150
Extrato Enzimático	900

Fonte: Ballaminut e Matheus(2007)

#### 4.8 Avaliação de Produção de Biossurfactante

A determinação de biossurfactante foi feita por meio do cálculo do Índice de Emulsificação (IE). Em tubos de ensaio, com tampa de rosca, foram adicionados 2 mL de extrato bruto e 1 mL de querosene marca Five. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos e mantida à temperatura ambiente (25°C). Após 2 minutos a leitura foi realizada pela medição da altura da emulsão formada (BARBOSA; GONDIM; PAZ, 2007). Os testes foram realizados em duplicata e o IE foi calculado por meio da Equação 2:

$$\text{Índice da emulsão (\%)} = \frac{H_e}{H_t} \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

He: altura da emulsão;  
Ht: altura total do líquido.

A estabilidade de emulsificação foi avaliada em intervalos de 24 h após o início do ensaio, e foi calculada por meio das Equações 3 e 4 (Das et al. 1998)

$$VE (\%) = \frac{\text{altura da emulsão (mm)} \times \text{área da secção transversal (mm)}^2 \times 100}{\text{volume total (4000mm)}^3} \quad (3)$$

O acompanhamento da estabilidade da emulsão EE (%) foi realizada utilizando se a Equação 4.

$$EE (\%) = \frac{VE_t}{VE_0} (\%) \times 100 \quad (4)$$

Em que:

$VE_t(\%)$ : volume de emulsão medida no tempo t

$VE_0 (\%)$ : volume de emulsão no tempo zero

A emulsão foi considerada estável se 24 horas após a formação o volume corresponder a um valor igual ou maior que 50% do volume original (WILLUMSEN e KARLSON, 1997). Os testes foram realizados em triplicata.

#### 4.9 *Quantificação de Proteínas*

Para a quantificação das proteínas utilizou 4 ml da solução reagente Biureto (0,15 % sulfato de cobre; 0,6 % tartarato de sódio e potássio; 3 % hidróxido de sódio; 0,1 % iodeto de potássio) e 1 ml da amostra, diluída de forma que a absorbância lida no espectrofotômetro estivesse dentro da curva de calibração. As leituras foram realizadas por espectrofotômetro em 540 nm e a curva padrão foi construída com soro albumina bovina líquida. O espectrofotômetro foi previamente zerado com uma amostra em branco contendo: 4 ml da solução reagente Biureto e 1 ml de água destilada (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949).

#### 4.10 *Purificação de Lacase*

##### 4.10.1 *Precipitação com sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$*

O extrato enzimático (360 mL) proveniente da FSS, após 6 dias de cultivo (condição de maior expressão de atividade da lacase em teste preliminar) foi submetido à precipitação com sulfato de amônio a 80% (BURGUESS, 2009) em banho de gelo. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 2.000 rpm durante 20 minutos em temperatura ambiente e o precipitado foi ressuspenso em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0; dialisado contra o mesmo tampão durante 24 horas.

##### 4.10.2 *Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*

O extrato enzimático (15 mL) dialisado foi eluído em coluna Inertsil CX (cromatografia de troca iônica), equilibrada em tampão acetato de amônio 0,5 M pH 5,5 (Tampão A) ao fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, coletando-se frações de 0,5 mL, no total de 20 frações. A fase móvel foi constituída de 10% do tampão acetato de amônio 0,5 M pH 5,5 e 90% de água deionizada pH 6,7 durante 4 min. Em seguida procedeu-se um gradiente até atingir 100% de tampão acetato de amônio por 6 min. As frações obtidas foram submetidas à detecção da atividade da lacase e a verificação do melhor pH e temperatura, e suas respectivas estabilidades.

#### 4.10.3 *Análise: purificação enzimática*

Os cálculos foram realizados conforme as equações propostas por Walker (2009).

Atividade específica relaciona a sua atividade total com a quantidade total de proteína presente na solução, conforme a Equação 5

$$\text{Atividade específica} = \frac{\text{Atividade enzimática}}{\text{Proteínas totais}} \quad (5)$$

O rendimento é calculado pela razão entre a atividade do extrato purificado e a atividade do extrato bruto (equação 6).

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{\text{Atividade(extrato purificado)}}{\text{Atividade(extrato bruto)}} * 100 \quad (6)$$

O fator de purificação (Equação 7) indica o quanto a atividade específica da enzima de interesse aumentou. Nesse caso, para que a purificação seja bem-sucedida a atividade específica da proteína deve ser superior ao valor obtido antes do processo de purificação.

$$\text{Fator de purificação} = \frac{\text{Atividade específica (extrato purificado)}}{\text{Atividade específica (extrato bruto)}} \quad (7)$$

### 4.11 *Caracterização de Enzima Purificada*

#### 4.11.1 *Determinação da temperatura e do pH ótimos de reação*

A determinação do pH ótimo foi realizada por meio da incubação de 1mL da enzima purificada em presença de 1 mL de soluções tamponantes McIlvaine no intervalo de pH de 2,2 a 6,6. A determinação da temperatura ótima foi realizada por meio da incubação da enzima purificada nas temperaturas de 30 a 80°C, no pH ótimo. Os ensaios foram realizados em duplicata.

#### 4.11.2 *Determinação da estabilidade ao pH*

A determinação da estabilidade da enzima frente ao pH foi realizada, em duplicata, pela incubação de 1mL da enzima purificada e 1 mL da solução tampão McIlvaine nos pHs 2,2 e 4,8 nos intervalos de 0, 3, 6, 12, 24, 36 e 72 horas.

#### 4.11.3 *Determinação da estabilidade térmica*

A determinação da estabilidade frente a temperatura foi realizada pela incubação da enzima purificada em banho-maria nas temperaturas de 40 °C e 50 °C, nos intervalos de 0, 3, 6,

12, 24, 36 e 72. Em seguida, foi determinada a atividade residual. Os ensaios foram feitos em duplicatas.

#### 4.12 Análise dos Resultados

Os resultados foram analisados por meio de gráficos gerados pela utilização do programa computacional Origin Pro 8.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação Qualitativa de Crescimento de *L. crinitus*

O fungo apresentou um crescimento micelial moderado a partir do terceiro dia de incubação, e a partir do sexto dia de incubação verificou-se um ótimo crescimento, o que se manteve até os 21 dias (Tabela 5).

**Tabela 5** - Avaliação do crescimento do microrganismo.

Tempo de incubação (dias)	3	6	9	12	15	18	21
Avaliação do Crescimento	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

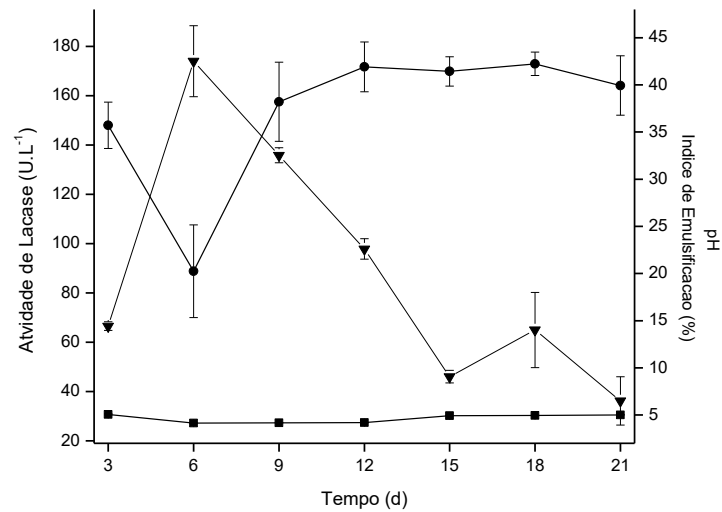
Legenda: (-) ausência de crescimento; (+) pouco crescimento com turvação de pequenos fragmentos de micélio lançados no meio; (++) moderado crescimento com surgimento de “pellet” fino na superfície do meio; (+++) ótimo crescimento de massa micelial da metade a todo frasco.

### 5.2 Cinéticas de Produção Enzimática e de Biosurfactantes

Na Figura 5 observa-se que a atividade de lacase foi verificada a partir do terceiro dia de cultivo ( $66,52 \text{ U.L}^{-1}$ ), sendo que o pico de produção da enzima ligninolítica (lacase) ocorreu no sexto (6º) dia de fermentação ( $174,01 \text{ U.L}^{-1}$ ). Os valores de pH variaram de 4,15 a 5,07. A ocorrência de biosurfactante foi verificada a partir do terceiro dia de fermentação (6,62%) e o maior índice de emulsificação foi detectado no décimo oitavo dia de incubação (42,23%).

**Figura 5** - Índice de Emulsificação (●), Atividade de Lacase (▲) e pH (■) pelo sistema enzimático de *L. crinitus* CCIBT durante crescimento em bagaço do endocarpo epicarpo do coco verde suplementado com farinha de soja.



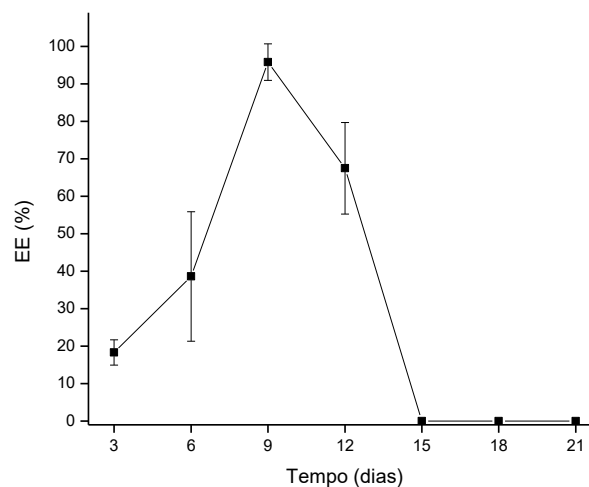


Após o pico de produção de biossurfactante, no nono dia de FSS, ocorre uma diminuição de atividade de lacase.

### 5.3. Caracterização do Biossurfactante

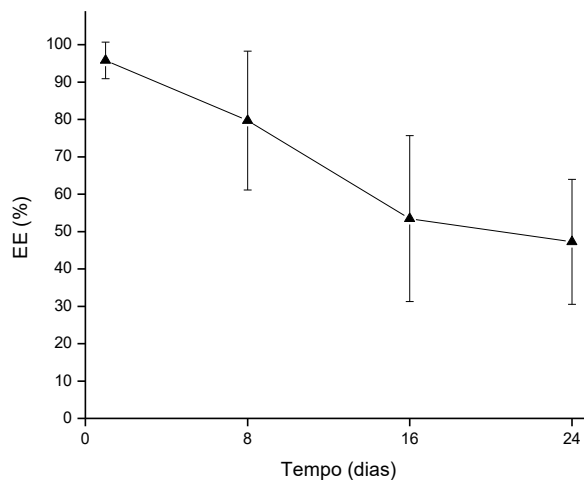
A estabilidade das emulsões após 24h está apresentada na Figura 6. Observa-se que a maior estabilidade foi verificada para a emulsão obtida no nono dia de fermentação (95%), sendo que as demais apresentaram estabilidade inferior a 50%.

**Figura 6** - Estabilidade de emulsificação dos extratos brutos obtidos durante os 21 dias de incubação, após 24 h. as barras indicam desvio padrão entre triplicatas.



A emulsão obtida com nove dias de fermentação apresentou-se mais estável que as demais, por isso teve a estabilidade acompanhada durante 24 dias (Figura 7). Nas primeiras 24 horas de incubação verificou-se 95% de estabilidade. Após esse período observa-se uma redução na estabilidade da emulsão, sendo que 24 dias após a obtenção da emulsão a estabilidade foi de 47%.

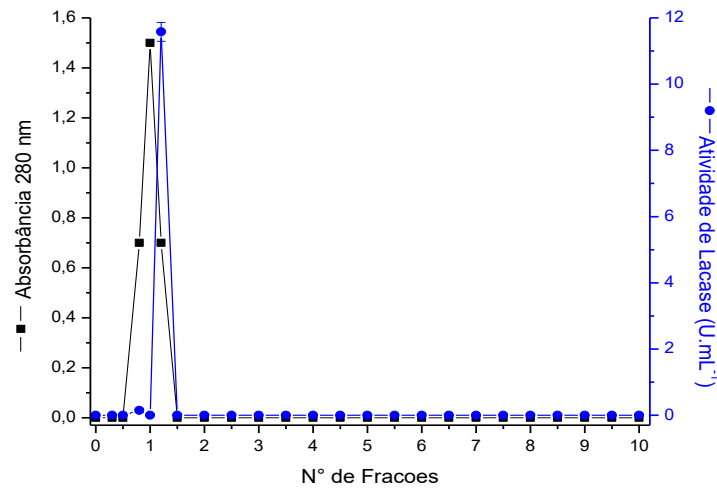
**Figura 7** - Acompanhamento da estabilidade de emulsificação do extrato bruto obtido no nono dia de fermentação, durante 24 dias.



#### 5.4 Purificação da Lacase de *L. crinitus*

Após a precipitação e diálise de proteínas foi verificado que a lacase ficou no material precipitado enquanto os biossurfactantes ficaram no sobrenadante. O precipitado teve o volume concentrado em vinte e quatro vezes em relação ao volume inicial. Na cromatografia de troca iônica foi observado somente um pico de atividade de lacase, que não coincide com o pico de leitura a 280nm (Figura 8).

**Figura 8** - Perfil de eluição da atividade de lacase em cromatografia de troca iônica.



Na purificação da lacase de *L. crinitus* foi observado acréscimo no fator de purificação enzimática em todas as etapas, sendo o maior aumento foi verificado entre as etapas de Precipitação em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e de cromatografia de troca iônica, resultando em um fator de purificação de 0,13 (Tabela 5).

**Tabela 6** - Etapas de purificação da lacase de *L. crinitus*.

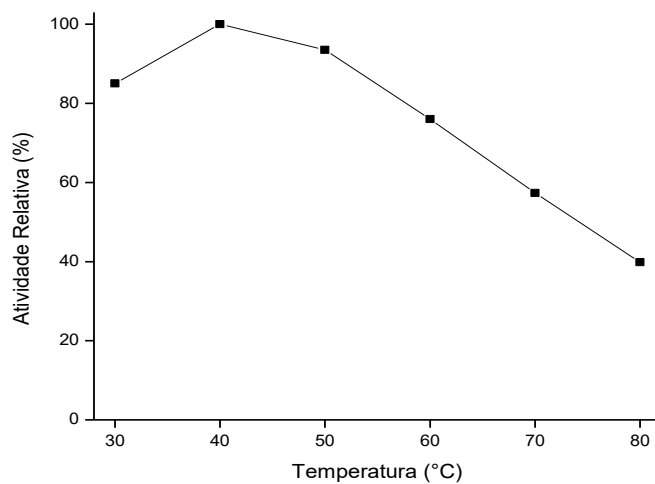
Etapa	Atividade Total (U)	Proteínas Totais (mg)	Atividade Específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	36,264	531,00	0,07	100	1
Precipitação em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	14,610	26,94	0,54	39,63	7,81
Cromatografia de Troca iônica	1,77	3,98	0,01	4,79	0,13

Fonte: Dados da Pesquisa

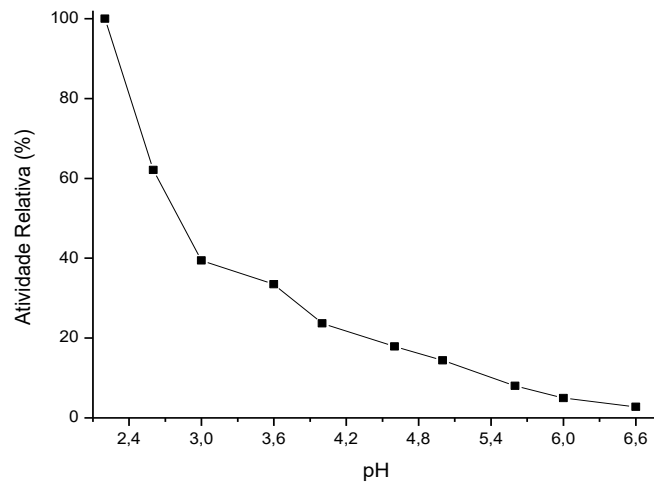
### 5.5 Caracterização de Lacase Purificada de *L. crinitus*

Os perfis de temperatura e pH ótimos estão apresentados nas Figuras 9 e 10, respectivamente. O perfil do efeito da temperatura sobre a atividade de lacase (Figura 9) indica que a temperatura ótima foi determinada em 40°C, sendo que a 50°C foi verificada que a enzima apresentou 94% de sua atividade relativa. Na Figura 10, verifica-se que a máxima atividade relativa foi em pH 2,2 e que a atividade de lacase foi reduzida com o aumento do pH. Sendo que em pH 6,6 a atividade relativa sofreu redução de cerca de 97%.

**Figura 9** - O efeito da temperatura sobre a atividade de lacase de *L. crinitus* foi determinada no pH ótimo.

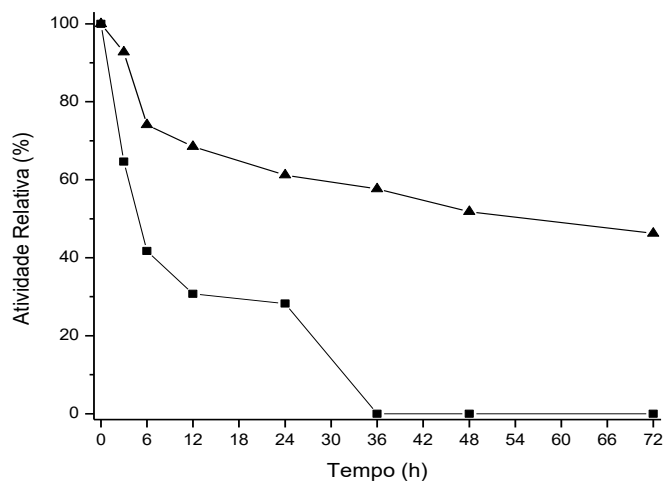


**Figura 10** - Efeito do pH sobre a atividade da lacase de *L. crinitus* durante dias de fermentação utilizando a fibra de coco verde como substrato. Utilizou-se tampão McIlvaine da faixa de 2,2 a 6,6.



A estabilidade ao pH foi avaliada no pH 2,2, pH ótimo da enzima, e no pH 4,8. Nos pHs 2,2 e 4,8 a enzima apresentou meia vida ( $T_{1/2}$ ) de cerca de 4,9 horas e 51,8 horas, respectivamente. A estabilidade da lacase foi mais baixa em pH 2,2, apresentando diminuição ao longo do tempo, com uma redução de 72% da atividade relativa com 24h, não sendo mais observada atividade enzimática a partir de 36h. Observa-se que com 3h de incubação em pH 4,8 a enzima tem perda de atividade de somente 7%, com queda gradativa (Figura 11).

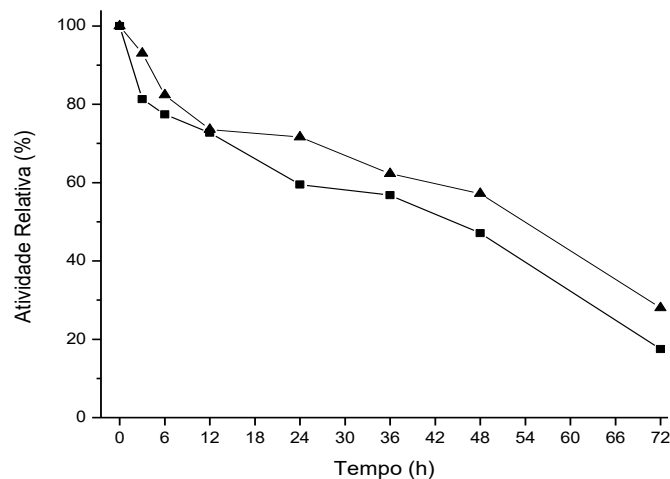
**Figura 11** - Perfil de estabilidade da lacase de *L. crinitus* no pH 4,8 (▲) e pH 2,2 (■).



A estabilidade térmica da lacase do fungo *L. crinitus* foi avaliada nas temperaturas de 40°C a 50°C e está mostrada na Figura 12. Observa-se que nas temperaturas de 40 e 50°C observaram-se perdas de 7 e 19 % respectivamente da atividade relativa da enzima em relação a atividade inicial com 180 min de incubação. Nas temperaturas de 40°C e 50°C

verificou-se meia vida de cerca de 53,9 horas e 44,4 horas, respectivamente. Verifica-se que com 36h e 48h de incubação a 50°C, a lacase manteve-se com 57% e 47% de sua atividade enzimática, respectivamente.

**Figura 12** - Estabilidade da atividade de lacase de *L. crinitus* nas temperaturas de 40°C (▲) e 50°C (■) no pH 4,8.



## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro relato da produção de lacase em FSS com fibra de coco verde (fonte de carbono) por *L. crinitus*, tendo-se obtido 174,01 U.L<sup>-1</sup>. Várias fontes de carbono são utilizadas na produção de enzimas ligninolíticas (WANG et al., 2016). Silva et al. (2019) avaliaram a produção de lacase pelo fungo *L. crinitus* usando vagem do amendoim suplementada com 2% de óleo de soja, como substrato, obtendo pico de produção de 29,63 U.L<sup>-1</sup> aos seis dias de FSS. Quando *L. crinitus* foi cultivado em FSS contendo bagaço de cana de açúcar identificou-se pico de atividade enzimática da lacase de 17,59 U.L<sup>-1</sup> aos 10 dias de incubação (BALLAMINUT, 2007). Segundo Valle et al. (2014), a relação entre fontes de carbono e nitrogênio podem afetar a produção de lacase por *L. crinitus*, sendo que estes fungos têm preferência por fontes simples de nitrogênio (HERNÁNDEZ et al., 2015).

Em trabalho realizado por Abreu et al. (2015) utilizando bagaço de coco verde em FSS para a produção de lacase por outro basidiomiceto, *P. castanella*, também se verificou altos níveis de produção de lacase, com pico de produção 113 U L<sup>-1</sup> com 30 dias de fermentação. Esses dados demonstram o potencial do uso do bagaço de coco verde na produção de enzimas ligninolíticas, como a lacase. Devido a composição desses materiais

lignocelulosicos, a utilização de resíduos agroindustriais tem recebido destaque pelo potencial de reutilização de resíduos para um fim mais nobre, tal como a produção de enzimas.

A produção de biossurfactantes por basidiomicetos é escassa na literatura. Lourenço (2017), pela primeira vez, relatou a produção de biossurfactante pelo fungo basidiomiceto *Trametes versicolor* em FSS tendo resíduos de moinho de azeitona como substrato. Produção de biossurfactante por espécies de *Pleurostium* sido relatada por fermentação submersa (VELIOGLU; UREK, 2016; ALVES et al., 2017) e por FSS (VELIOGLU; UREK, 2015) com Índice de emulsificação (IE) de 44,4%, 66,6%, e 29%, respectivamente. O uso de substratos ricos em polissacarídeos (FONTES et al., 2012) e em lipídios pode aumentar a produção de biossurfactantes (KALYANI et al., 2014), no entanto, a utilização de substratos renováveis, como resíduos agroindustriais visa a minimização dos custos de produção (ROCHA et al., 2014).

Procurando-se estabelecer uma relação entre a produção de lacase e biossurfactantes, observa-se que durante a cinética de produção há uma relação inversamente proporcional. Pesquisas sobre biossurfactantes, dos tipos liquenisina e surfactina, provenientes de bactérias tem indicado que essas moléculas podem apresentarem-se como quelantes de metais divalentes (GRANGEMARD et al., 2001; WEI, WANG; CHANG, 2004), inibindo a atividade enzimática de fosfatases conforme sugerido por Vass et al. (2001). Apesar dos autores supracitados terem se referido diretamente ao cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) que compõe o sítio catalítico das lacases, pode-se inferir que o biossurfactante produzido por *L. crinitus* pode ter promovido a quelação desse metal, e como consequência ter reduzido a atividade de lacase.

No processo de purificação, o precipitado apresentou coloração escura, provavelmente devido a presença de polifenóis proveniente da fibra de coco verde (COELHO, 2007). A purificação da enzima apresenta-se com o objetivo de remoção de contaminantes e de outras estruturas moleculares, por meio de várias técnicas, sendo que a pureza de uma enzima só pode ser verificada a partir da presença de uma única banda em gel de eletroforese (DAKO et al., 2012), por isso, esse trabalho trata-se de uma purificação parcial.

Estudos de purificação de lacases de basidiomicetos pertencentes a diversas espécies indicam a utilização de técnicas de cromatografia de troca iônica associada a cromatografia de filtração em gel, e em alguns casos, cromatografia de afinidade, atingindo altos valores de fator de purificação (YANG et al., 2013; ZHANG et al., 2013; PATEL et al., 2014;

MUKHOPADHYAY; BANERJEE, 2015; SADEGHIAN-ABADI et al., 2019). Sendo que não há na literatura registros do uso da coluna Inertsil CX na purificação de lacase de basidiomicetos.

Visto que as lacases produzidas pelo gênero *Lentinus* podem se apresentar na forma de dimerica (JENG; SHYUR; WANG, 2014), os baixos valores de rendimento e de fator de purificação identificados na última etapa de purificação podem ser decorrentes da separação dos dímeros da lacase de *L. crinitus*. Ainda, as diferentes velocidades de desnaturação da lacase de *L. crinitus* verificadas na Figura 11, podem sugerir a ocorrência de isoformas de lacase (COELHO et al., 2019), mas também podem confirmar a presença de dímeros de lacase.

Os valores ótimos de pH e de temperatura para a lacase de *L. crinitus* estão de acordo com o verificado para a maioria das lacases de basidiomicetos que estão na faixa ácida, e no intervalo de 40 a 60°C (PATEL et al., 2014; SADEGHIAN-ABADI et al., 2019). A lacase de *L. crinitus* mostrou-se estável nas condições estudadas, possibilitando o uso da enzima para tratamentos de efluentes industriais, visto que os mesmos ocorrem em temperaturas altas, e com longos períodos de detenção hidráulica.

## 7. CONCLUSÃO

- ✓ O fungo *L. crinitus* foi capaz de produzir a lacase e biossurfactantes em FSS utilizando fibra de coco verde como suporte enzimático;
- ✓ A precipitação com sulfato de amônio foi eficiente na separação da lacase do biossurfactante;
- ✓ A CLAE utilizando a coluna Inertsil CX pode ter promovido a desnaturação da lacase de *L. crinitus*;
- ✓ Os altos valores de meia vida indicam o potencial de aplicação de lacase purificada de *L. crinitus* em processos biotecnológicos.



## REFERÊNCIAS

ABREU, P. M. S.; CUNHA, L R. F.; CONRADO, L. S.; COELHO, G. D.; OLIVEIRA, B. F.; OLIVEIRA, R. C. **Potencial biotecnológico de basidiomicetos na produção de enzimas para degradação de polipropileno (pp) de copos descartáveis.** XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Fortaleza, 2015.

AGUIAR, A. P. **Seleção de espécies de basidiomicetos produtoras de ligninases para caracterização e aplicação das enzimas sobre corantes aromáticos.** 2006. 137 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos, São José do Rio Preto, SP.

ALMEIDA, P. H.; OLIVEIRA, A. C. C.; SOUZA, G. PN.; FRIEDRICH, J. C.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. Decolorization of remazol brilliant blue R with laccase from *Lentinus crinitus* grown in agro-industrial by-products. **An. Acad. Bras. Ciênc.** v.90, n.4, p.3463-3473. 2018. ISSN 0001-3765.

ALVES, E. P.; TAVARES, L. B. B.; GERN, R. M. M.; et al. Produção e caracterização de biossurfactantes metabolizados por *Pleurotussajor-caju* a partir de óleo de soja. *Matéria* (Rio de Janeiro), v.22, n.3, 2017.

BALLAMINUT, N. **Caracterização fisiológica do inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB274 empregado em biorremediação de solo.** Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, São Paulo, 2007.

BALLAMINUT, N., E MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**. 38: 248-252, 2007.

BAGEWADI, Zabin K.; MULLA, Sikandar I.; NINNEKAR, Harichandra Z. Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.15, n.1, p.139–150, 2017.

BARBOSA, S.A. **Desenvolvimento de biodetergentes utilizando biossurfactantes como matéria-prima.** (Tese) Renorbio - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, São Cristóvão – SE, 2011.

BARBOSA, A. P. A.; GONDIM, A. L. N.; PAZ, M. C. F. Remoção do corante preto pirazol por *Pseudomonas aeruginosa*. In: **II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**, João Pessoa, 2007.

BERTRAND, G. Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. **C R Hebd Seances Acad Sci**, 123, 463-465. 1896.

BILAL, Muhammad; RASHEED, Tahir; NABEEL, Faran; et al. Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation – A review. **Journal of Environmental Management**, v.234, p.253–264, 2019.

BOSCO, F.; MOLLEA, C.; RUGGERI, B. Decolorization of Congo Red by *Phanerochaete chrysosporium*: the role of biosorption and biodegradation. **3330**, 2016.

BRUGNEROTTO, P.; SILVA, T. R.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; VIEIRA, I. C. Gold Nanoparticles Stabilized in  $\beta$ -Cyclodextrin and Decorated with Laccase Applied in the Construction of a Biosensor for Rutin. **Electroanalysis**, v. 29, n. 4, p. 1031–1037. 2016. doi:10.1002/elan.201600697

CASTRO, A. M.; J. R, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, 33, p. 181-188, 2010.

CATALOGUE OF LIFE. Annual Checklist. Indexing the world's known species. 2019 Availablein:<<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/8889119c1703c945f273f58a8760ee99>> Access in: july 18, 2019.

CHOI, Jung-Min; HAN, Sang-Soo; KIM, Hak-Sung. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v.33, n.7, p.1443–1454, 2015.

CHO, E.-A.; SEO, J.; LEE, D.-W.; PAN, J.-G. Decolorization of indigo carmine by laccase displayed on *Bacillus subtilis* spores. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n.1, p.100–104.2011. doi:10.1016/j.enzmitec.2011.03.005.

COELHO, G.D. **Purificação parcial do sistema enzimático produzido por *Psilocybecastanella* CCB 444 durante o crescimento em solo.** 2007. 124F. Tese (Doutorado em biodiversidade vegetal e meio ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo. 2007.

COELHO, G. D.; BALLAMINUT, N.; THOMAZ, D. V.; GOMES MACHADO, K. M. Characterization of a thermostable *Deconicacastanella* Laccase and application toward pentachlorophenol degradation. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, p. 1–8. 2019. doi:10.1080/10826068.2019.1636280

COSTA, J. S.; JESUS, M. A. Seleção e isolamento de fungos lignocelulolíticos, In: 3º Congresso sobre Diversidade Microbiana da Amazônia (CDMicro) e XII Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental (ENAMA), Manaus, 2010.

DAKO, E. et al. The problems Associated with Enzyme Purification. In: EKINCI, D. (Ed.). **Chemical Biology**. IntechOpen,. p. 19-40, 2012.

DAS, M., DAS, S. K., MUKHERJEE, R. K. (1998) Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkanes and sugars. **Bioresource Technology**, 63: 231-235.

ENZYMES MARKET SIZE. **Enzymes Market - Global Industry Analysis, Market Size, Opportunities and Forecast, 2019 – 2026. Source:**Acumen Research and Consulting (2019). Available in:<<https://www.acumenresearchandconsulting.com/enzymes-market>> Access in: June 18, 2019.

ERGUN, S. O.; UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 2, p. 273-277. 2017. DOI: 10.1016/j.aasci.2017.04.003

FAHIM, M.M. The effect of light and other factors on the sporulation of *Alternaria porri*. **Transactions of the British Mycological Society** 49:73-78. 1966

FARIA, R. A. **Estudo da Produção de Enzimas Ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora***. 102 f. 2010. Tese (Mestrado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, 2010. Acesso em: Maio de 2018.

FRANCO-MOLANO, A.E.; VASCO-PALACIOS, A.M.; LÓPEZ-QUINTEIRO, C.A.; BOEKOUT, T. Macrohongos de la Región Del Médio Caquetá-Colombia. Universidad de Antioquia, **Medellín, Colombia**. 2005, 210pp.

FONTES, G. C.; RAMOS, N. M.; AMARAL, P. F. F.; et al. Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.29, n.3, p.483–494, 2012.

GAO J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermo-acidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresour. Technol**, 99, p.7623-7629, 2008.

GARCIA, T. A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. 2009. 126 p. Tese (doutorado) – Universidade de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Brasília, DF.

GONZÁLEZ, R.; VILLAGÓMEZ, R.; MADARIAGA, A.; CASTRO J.; GONZÁLEZ C. Consorcios biológicos diseñados para la producción de lacasas y eliminación de colorantes. **Revista Iberoamericana de Ciencias**. ISSN 2334-2501. 2019. Vol. 2 No. 2 p. 26-46.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**v177,p. 751-766 1949.

GUGLIOTTA, A. M.; CAPELARI, M. Taxonomia de basidiomicetos. *In*: Bononi, V. L. R. (Org.). **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. Instituto de Botânica, São Paulo, p. 184, 1998.

HERNÁNDEZ, C. A.; SANDOVAL, N.; MALLERMAN, J.; GARCÍA-PÉREZ, J.A.; FARNET, A.M.; PERRAUD-GAIME, I.; ALARCÓN, E. Ethanol induction of laccase depends on nitrogen conditions of *Pycnoporussanguineus*. **Electron J Biotechnol**, v.18. p. 327-332. 2015.

IFPMA, International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations. **The Pharmaceutical Industry and Global Health**. 2017. Available in:<<https://www.ifpma.org/wp-content/uploads/2017/02/IFPMA-Facts-And-Figures2017.pdf>> Access in: July 12, 2019.

JANUSZ, Grzegorz; KUCHARZYK, Katarzyna H.; PAWLIK, Anna; et al. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.52, n.1, p.1–12, 2013.

JENG, W. Y.; SHYUR, L. F.; WANG, A. H. J. Crystal structure of Laccase from *Lentinus* sp. At 1.8 Å resolution. **World Wide**. 2014. doi: 10.2210/pdb3xb1/pdb.

JIA, Z.; DENG, J.; CHEN, N.; SHI, W.; TANG, X.; XU, H. Bioremediation of cadmium-dichlorophen co-contaminated soil by spent *Lentinusedodes* substrate and its effects on microbial activity and biochemical properties of soil. **Journal of Soils and Sediments**, v. 17, n.2, p.315–325. 2016.doi:10.1007/s11368-016-1562-7

KALYANI, A. L. T.; NAGA SIREESHA, G.; GIRIJA SANKAR, G. G. et al. Isolation of bio-surfactant producing actinomycetes from terrestrial and marine soils. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.5, n.9, p.4015–4022, 2014.

KARLAPUDI A. P.; VENKATESWARULU, T.C.; TAMMINEEDI, J.; KANUMURI, J. L.; RAVURU, B. K. R.; DIRISALA, V. R.; VIDYA PRABHAKAR KODALI, V. P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. **Petroleum**, v.4, n.3, p.1-9, 2018.

KHAMBHATY, Y.; ANANTH, S.; SREERAM, K. J.; RAO, J. R.; NAIR, B. U. Dual utility of a novel, copper enhanced laccase from *Trichoderma aureoviridae*. **Int J Biol Macromol**, v. 29, n.81, p. 69–75, 2015.

KITAMOTO, D., ISODA, H., NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers - **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.94, n.3, p.187–201, 2002.

KUMAR, A.; SINGH, S. Directed evolution: Tailoring biocatalysis for industrial application. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 33, p. 365–378, 2013

LACERDA, M. F. A. R.; LOPES, F. M.; SARTORATTO, A.; PONEZI, A. N.; THOMAZ, D. V.; SCHIMIDT, F.; SANTIAGO, M. F. Stability of immobilized laccase on *Luffa Cylindrica* fibers and assessment of synthetic hormone degradation. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, p.1–6. 2018.

LADE, H., GOVINDWAR, S.; PAUL, D. (2015). Mineralization and Detoxification of the Carcinogenic Azo Dye Congo Red and Real Textile Effluent by a Polyurethane Foam Immobilized Microbial Consortium in an Upflow Column Bioreactor. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 12(6), 6894–6918.

LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO, N.; HOFRICHTER, M. Review: Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 175-185, 1999.

LIMA, D. P.; SANTOS, E. A.; MARQUES, M. R.; GIANNESI, G. C.; BEATRIZ, A.; YONEKAWA, M. K. A.; MONTANHOLI, A. S. Fungal bioremediation of pollutant aromatic amines. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 11, p. 34–44, 2018. doi:10.1016/j.cogsc.2018.03.012

LIU, G.; ZHONG, H.; YANG, X.; LIU, Y.; SHAO, B.; LIU, Z. Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 115. 2018. DOI 10.1002/bit.26517

LOGUERCIO-LEITE, C.; ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultra-estrutura. In: Espósito, E.; Azevedo, J. L. (Org.). **Fungos – Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS. pp. 15-46. 2004.

LOMASCOLO, A.; UZAN-BOUKHRIS, E.; HERPOËL-GIMBERT, I.; SIGOILLOT, J.; LESAGE-MEESSEN, C. Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. **Appl. Microbiol Biotechnol.** v.92:1129–1149, 2011.

LOURENÇO, L. A.; ALBERTON MAGINA, M. D.; TAVARES, L. B. B. et al. Biosurfactant production by *Trametes versicolor* grown on two-phase olive mill waste in solid-state fermentation. **Environmental Technology**, v. 39, n. 23, p. 3066–3076, 2018.

MAIA, L. C.; CAVALCANTI, M.A.Q.; GIBERTONI, T.; GOTO, B. T.; MELO, A. M. M.; BASEIA, I.G; SILVÉRIO, M. Fungos. In: PÔRTO, K.C.; ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; TABARELLI, M. (Org.). **Diversidade Biológica e Conservação da Floresta Atlântica ao Norte do Rio São Francisco**. 1ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006, v. 1, p. 75-106.

MANAVALAN, T; MANAVALAN, A; HEESE, K. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. **Curr Microbiol.** v. 70, p. 485–98, 2015.

MARTINHO, V.; SANTOS LIMA, L.M.; BARROS, C.A. et al. Enzymatic potential and biosurfactant production by endophytic fungi from mangrove forest in Southeastern Brazil. **AMB Expr**, v. 9, n.130, 2019. doi:10.1186/s13568-019-0850-1

MARTÍNKOVÁ, L.; KOTIK, M.; MARKOVÁ, E.; et al. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. **Chemosphere**, v. 149, p. 373–382, 2016.

MARTINS, A. P.; WATANABE, T.; SILVA, P.L.R.; BORELLI, C.; MARCICANO, J.P.P.; SANCHES, R. A. Aproveitamento de fibra de coco-verde para aplicabilidade têxtil. **Redige**. v. 4, n. 2, p. 1-16, 2013.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial Biotechnology**. v.10, n.6, p. 1457-1467, 2016. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1751\\_7915.12422/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1751_7915.12422/epdf)>. Acesso em 31 ago. 2019.

MATHEUS, D. R., BONONI, V. L. R., MACHADO, K. M. G., SILVA, R. R. e RODRIGUES, T. A. Growing Basidiomycetes In Bioreactors to be Applied To Bioremediation of HCB in Soil. Paper G-05, IN: Magar, V. S., Kelley, M. E. (Eds.), *In Situ and On-Site Bioremediation*— 2003.

**Proceedings of the Seventh International Symposium** (Orlando, FL; June 2003). -139-6, published by Battelle Press, Columbus, OH.

MOREIRA-NETO,S.; MILAGRES, A. M. F.; MUSSATTO, S. I. Reactive dyes and textile effluent decolorization by a mediator system of salt-tolerant laccase from *Peniophora cinerea*. **Sep. Purif. Technol.** v.135, p.183–189, 2014.

MINOCHEHERHOMJI, F. P.; PRAJAPATI, H. V. Laccase - A Wonder Molecule : A Review of its Properties and Applications. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 6, n. 1, p. 766–773, 28 fev. 2018.

MUKHOPADHYAY, M.; BANERJEE, R. Purification and biochemical characterization of a newly produced yellow laccase from *Lentinus squarrosulus* MR13. **3 Biotech**, v. 5, n. 3, p. 227–236, jun. 2015.

NIEBISCH, C. H.; MALINOWSKI, A. K.; SCHADECK, R.; MITCHELL, D. A.; KAVACORDEIRO, V.; PABA, J. L. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **J Hazard Mater**, v. 180, p. 316-322, 2010.

NISA, F. T.; ASGHER, M.; ANWAR, Z.; AFROZ, A.; ZEESHAN, N.; RASHID, U.; IRSHAD, M.; MEHMOOD, S.; SUGHRA, K. Influence of culture conditions on ligninolytic enzymes production from *Ganoderma lucidum* using agro-industrial residues. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 23. 2014.

NISHIKIDO, L. Cogumelos como hábitos alimentares dos índios Yanomami - conhecimento associado à ciência, preservação e defesa da floresta amazônica. **Journal of Brazilian Studies** ,v. 6, n.11, p. 205-210. 2019. <https://doi.org/10.14201/reb2019611205210>

NOVOTNY, C. et al. Ligninolytic fungi in biorremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 36, p. 1545-1551, 2004.

OKINO, L. K., MACHADO, K. M. G., FABRIS, C. e BONONI, V. L. R. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 16:889-893, 2000.

PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras. **Quim Nova**. v. 37, n.2, p. 209-214, 2014.



PATEL, Hardik; GUPTE, Shilpa; GAHLOUT, Mayur; et al. Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of *Pleurotusostreatus* HP-1. **3 Biotech**, v. 4, n. 1, p. 77–84, 2014.

PERALTA, R.; SILVA, B. P.; CORRÊA, R. G. C.; KATO, C. G.; SEIXAS, F. A.V.; BRACHT, A. Enzymes from Basidiomycetes—Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. p. 119-149, 2017 DOI: 10.1016/B978-0-12-803725-6.00005-4.

PERES, L. G. S. Obtenção e caracterização de compósitos poliméricos de polietileno de baixa densidade com fibra de coco. Tese de Doutorado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina / PR. 2018.

PESSOA JR., Adalberto; KILIKIAN, Beatriz Vahan, **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, 1. ed. [s.l.]: Join Bureau, [s.d.] 2005.

RAJEEVA, Suhas; LELE, S.S., Three-phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma sp.*WR-1, **BiochemicalEngineeringJournal**, v. 54, n. 2, p. 103–110, 2011.

REIS, F.A.S.L. **Estudo da síntese de biosurfactantes por Bacillus subtilis ATCC6633**. 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro.

RESENDE, R. R. Biotecnologia aplicada a Agroindústria. **Blucher**, Vol. 4, 1ª edição (Cap. 8 – pp 283 a 314), 2017. Acessoem: Outubro de 2019.

ROBERTS, J. J.; NAUDIYAL, P.; LIM, K. S.; POOLE-WARREN, L. A.; MARTENS, P. J. A comparative study of enzyme initiators for crosslinking phenol-functionalized hydrogels for cell encapsulation. **BiomaterialsResearch**, v. 20, n.1. 2016. doi:10.1186/s40824-016-0077-z

ROCHA E SILVA, N. M. P.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; et al. Screening of Pseudomonas species for biosurfactant production using low-cost substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 132–139, 2014.

RODRÍGUEZ-COUTO. Laccases for Denim Bleaching: An Eco-Friendly Alternative. **The Open Textile Journal**, 2012, 5, 1-7

SADEGHIAN-ABADI, Salar; REZAEI, Shahla; YOUSEFI-MOKRI, Mahsa; et al. Enhanced production, one-step affinity purification, and characterization of laccase from solid-state culture of *Lentinustigrinus* and delignification of pistachio shell by free and immobilized enzyme. **Journal of Environmental Management**, v. 244, p. 235–246, 2019

SALERNO, M. S.; MATSUMOTO, C.; FERRAZ, I. Biofármacos no Brasil: características, importância e delineamento de políticas públicas para o seu desenvolvimento. **Programa de Pesquisa para o Desenvolvimento Nacional (PNPD)**. 2018. ISSN 1415-4765.

SENTHIVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; PANDA, R. C. Recent Trends in Fungal Laccase for Various Industrial Applications: An Eco-friendly Approach - A Review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, p. 19-38, 2016.

SI, Jing; PENG, Feng; CUI, Baokai. Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 49–57, 2013.

SHAH, V.; NERUD, F. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 48, p. 857-870, 2002.

SHARMA, A., JAIN, KK, SRIVASTAVA, A. et al. **Bioprocess Biosyst Eng** (2019) 42: 367.

SILVA, R. R. Ergosterol para determinação da biomassa dos fungos *Lentinus crinitus* Berk e *Psilocybe castanella* Peck em biorremediação de solos. 2004. 108f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.

SILVA, M. A.; PINHEIRO, M. A. M.; SOTERO, K. K. S.; LIMA, J. C. L.; COELHO, G.D. Produção e caracterização da lacase por fungo *Lentinus crinitus* em fermentação em estado sólido utilizando a vagem do amendoim como substrato. In: IX Congresso Brasileiro de Micologia, Manaus/AM, 2019.

SINDHU, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. Solid-state Fermentation for the Production of Poly(hydroxyalkanoates). **Chem. Biochem. Eng. Q.** v. 29, p.173–181, 2015.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. **Application aspects. Biotechnology Advances**, v.25, p. 99-121, 2007.

STEGMILLER, L.; REIS, J. A. A. E S.; DE JESUS, R. W.; COSTA, L. D. DE M.; FERNANDES, A. A. R.; ALBUQUERQUE, E. D.; CORREA, J. D. S.; CUNHA, M. K.; BASTOS, M. C. M.; FERNANDES, P. M. B.; ZORZAL, P. B. **Process for obtaining carboxymethylcellulose from agroindustrial residues and carboxymethylcellulose and use thereof.** WO2013166575 A1; US2013324711-A1 ; TW201412776-A ; WO2013166575-A9 ; AU2013258896 A1 ; EP2847232-A1 ; AR91814-A1 ; KR2015058099-A ; JP2015523418-W ; VN42487-A ; CN105143273-A, 2013.

STRONG, P. J.; CLAUS, H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.** v. 41, p. 373–434, 2011.

TRIPATHI, L. ; TWIGG, M. ; ZOMPRA, K.; CHASAPI, S.; GUTIERREZ, T.; SPYROULIAS, G. et al. *O meio marinho: uma fonte promissora de microrganismos para a produção de biosurfactantes*. Sessão de pôsteres apresentada no Biosurfactants 2019, Stuttgart, Alemanha. 2019.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology.** v. 72, p. 169-183, 2000.

UNESCO, United Nations Educational and Cultural Organization. Available in: [http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/science-technology/basic\\_sciences/life-sciences/biotechnology/#topPage](http://www.unesco.org/new/en/natural-sciences/science-technology/basic_sciences/life-sciences/biotechnology/#topPage) Access in: July 12, 2019.

VALLE, J. S.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SANTANA, T.T.; et al. Optimum conditions for inducing laccase production in *Lentinus crinitus*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 8544–8551, 2014.

VARJANI, S. J. Microbial Laccases and Nanobiotechnology: Environmental Perspective. **Fungal Biology**, p.253–264, 2016. doi:10.1007/978-3-319-42990-8\_12

VASS, E.; BESSON, F.; MAJER, Z.; et al. Ca<sup>2+</sup>-Induced Changes of Surfactin Conformation: A FTIR and Circular Dichroism Study. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.282, n.1, p.361–367, 2001.

VELIOĞLU, Z.; UREK, R. O. Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation systems. **Turkish Journal of Biology**, v.39, p. 160-166, jan.2015.

VELIOGLU, Z.; UREK, R. O. Physicochemical and structural characterization of biosurfactant produced by *Pleurotus djamor* in solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 3, p. 430–438, jun. 2016.

VIEIRA, G. A. L.; MAGRINI, M. J.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; RODRIGUES, M. V. N.; SETTE, L. D. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by marine-derived basidiomycetes: optimization of the degradation process. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2018. doi:10.1016/j.bjm.2018.04.007

VISWANATH, B.; CHANDRA, M. S.; KUMAR, K. P.; RAJASEKHAR, R. B. Production and purification of laccase from *Stereum ostrea* and its ability to decolorize textile dyes. **DynBiochem Process Biotechnol Mol Biol**, v. 2, p.19–25, 2008.

WALKER, J. Protein structure, purification, characterisation and function analysis In: WILSON, K e WALKER, J. (org). **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7. ed. New York: Cambridge University Press, p. 300-351, 2009.

WANG, H. X.; NG, T. B. Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 5, p. 521–525, 2006.

WANG, F.; AI, M.; YANG, G. et al. Influence of Carbon Source on the Production of Extracellular Ligninolytic Enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. **BioResources**, v. 11, n. 3, p. 5676–5686, 2016.

WEI, Y.H.; WANG, L.F.; CHANG, J.S. Optimizing Iron Supplement Strategies for Enhanced Surfactin Production with *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Progress**, v.20, n.3, p.979–983, 2004.

WILLUMSEN, P. A. ;KARLSON, U. (1997) Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. **Biodegradation**. 7: 415 – 423.

YANG, Y. et al. Purification and characterization of a new laccase from *Shiraia sp.* SUPER-H168. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 351–357, fev. 2013.

YAROLOV, A.I.; SKOROBOGAT'KO, O. V.; VARTANOV, S.S.; VARFOLOMEYYER, SD. Laccase: Properties, Catalytic Mechanism, and Applicability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 49, p. 257-280, 1994.

YAZID, N. A.; BARRENA, R.; KOMILIS, D.; SÁNCHEZ, A. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organicwaste valorization: a review. **Sustainability**. v.9, p.2-28, 2017.

YOSHIDA, H. Chemistry of lacquer (Urushi) part 1. **J Chem Soc**, v. 43, p. 472–486, 1883.

ZHENG, Fei; AN, Qi; MENG, Ge; et al. A novel laccase from white rot fungus *Trametesorientalis* : Purification, characterization, and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 758–770, 2017.

ZHANG, G.-Q. et al. A laccase with inhibitory activity against HIV-1 reverse transcriptase from the mycorrhizal fungus *Lepiotaventriosospora*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85–86, p. 31–36, jan. 2013.