



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

CLEDSON BARROS DE SOUZA

PRODUÇÃO, ISOLAMENTO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE LACASES,
CASEINASES E COLAGENASES DE *AMPHOBOTRYS RICINI* OBTIDAS POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Maceió
2022

CLEDSON BARROS DE SOUZA

PRODUÇÃO, ISOLAMENTO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE LACASES,
CASEINASES E COLAGENASES DE *AMPHOBOTRYS RICINI* OBTIDAS POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Tese de doutorado
apresentada ao programa de
Pós-graduação em Química e
Biotecnologia da Universidade
Federal de Alagoas, como
requisito parcial para obtenção
de grau de doutor em ciências.

Área de concentração:
Bioquímica e biotecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Hugo
Juarez Vieira Pereira.
Coorientador: Prof. Dr. José
Maria Rodrigues da Luz.

Maceió
2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S729p Souza, Cledson Barros de.

Produção, isolamento parcial e caracterização de lacases, caseinases e colagenases de *Amphobotrys ricini* obtidas por fermentação em estado sólido / Cledson Barros de Souza. – 2022.

[100] f. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: Hugo Juarez Vieira Pereira.

Co-orientador: José Maria Rodrigues da Luz.

Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 83-98.

Anexos: f. [99]-[100].

1. *Amphobotrys ricini*. 2. Lacase. 3. Corantes - Descoloração. 4. Caseinase. Colagenase microbiana. I. Título.

CDU: 66.099.7



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **Cledson Barros de Souza** intitulada: **“Produção, isolamento parcial e caracterização de lacases, caseinases e collagenases de *Amphobotrys ricini* obtidas por fermentação em estado sólido”**, apresentada, em sessão fechada, ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 29 de novembro de 2022, às 15h, por meio de videoconferência

Maceió, 29 de novembro de 2022.

Comissão Examinadora:

Dr. JOSE MARIA RODRIGUES DA LUZ, UFAL
Coorientador

Dr. LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO, UFAL
Examinador(a) Externo(a) ao Programa

Dra. MELISSA FONTES LANDELL, UFAL
Examinador(a) Externo(a) ao Programa

Dr. VALTER ALVINO DA SILVA, UFAL
Examinador(a) Externo(a) ao Programa

Dr. FRANCIS SOARES GOMES, UFAL
Examinador Interno

Dr. HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA, UFAL,
Presidente

RESUMO

Introdução: *Amphobotrys ricini* é um fungo fitopatogênico que infecta a espécie vegetal conhecida como mamoneira. Sabe-se que o fungo produz enzimas de importância biotecnológica para colonizar vegetais. Dado o pouco conhecimento sobre seus produtos de secreção, torna-se importante investigar sua capacidade de produzir proteases e ligninases. **Objetivo:** Produzir, isolar parcialmente e caracterizar proteases e ligninases produzidas pelo *A. ricini* através de cultivos em estado sólido e propor aplicações para as enzimas obtidas. **Metodologia:** O fungo foi cultivado sobre diferentes resíduos e coprodutos agroindustriais, para definir as melhores condições de produção de proteases e ligninases, e a partir delas, as enzimas foram extraídas e submetidas a técnicas de isolamento e caracterização. As ligninases obtidas tiveram seu potencial de descoloração de corantes medido e as proteases foram submetidas a testes de atividade sobre a caseína, o colágeno e a coagulação de leite. **Resultados e Discussão:** Das ligninases investigadas, foram encontradas apenas lacases. O fungo foi capaz de promover descoloração em meio de cultura contendo azul de bromofenol. As lacases foram parcialmente isoladas por precipitação salina e cromatografia de troca iônica. Entre as atividades apresentadas pelas proteases, foi possível confirmar atividade sobre a caseína, o colágeno e a capacidade de coagular o leite. As enzimas foram parcialmente purificadas através de extração em sistema aquoso bifásico. **Conclusões:** O fungo é um produtor de lacases com capacidade de biorremediação de corantes e outras moléculas contaminantes de efluentes industriais, suas caseinases podem ser aplicadas na fabricação de laticínios e foi confirmada a presença de atividade colagenolítica, que possui grande importância na indústria alimentícia e farmacêutica.

Palavras-chave: *Amphobotrys ricini*; Lacase; Descoloração; Caseinase; Colagenase.

ABSTRACT

Introduction: *Amphobotrys ricini* is a phytopathogenic fungus that infects a plant species known as castor bean. It is known that the fungus produces enzymes of biotechnological importance to colonize plants. Given the little knowledge about its strengthening products, it is important to investigate its ability to produce proteases and ligninases. **Objective:** To produce, partially isolate and characterize proteases and ligninases produced by *A. ricini* through solid state cultivation and propose applications for the transmitted enzymes. **Methodology:** The fungus was cultivated on different residues and agro-industrial co-products, to define the best conditions for the production of proteases and ligninases, and from them, the enzymes were extracted and provided for isolation and characterization techniques. The external lignins had their dye discoloration potential measured and the proteases were maintained for activity tests on casein, collagen and milk coagulation. **Results and Discussion:** Of the investigated ligninases, only laccases were found. The fungus was able to promote discoloration in a culture medium containing bromophenol blue. The laccases were partially separated by salt precipitation and ion exchange chromatography. Among the activities developed by the proteases, it was possible to confirm the activity on casein, collagen and the ability to coagulate milk. Enzymes were partially purified by ingestion in a biphasic aqueous system. **Conclusions:** The fungus is a producer of laccases capable of bioremediation of dyes and other contaminants from industrial effluents, its caseinases can be applied in the manufacture of dairy products and the presence of collagenolytic activity was confirmed, which is of great importance in the food and pharmaceutical industry.

Keywords: *Amphobotrys ricini*; Laccase; Discoloration; caseinase; collagenase.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 <i>Amphobotrys ricini</i>	11
2.2 Fermentação em estado sólido	16
2.3 Precipitação salina de proteínas	17
2.4 Obtenção de proteases microbianas por sistemas aquosos	18
2.5 Cromatografia líquida de proteínas por troca iônica	19
2.6 Ligninases microbianas	21
2.7 Lacases microbianas	23
2.8 Caseinases microbianas	27
2.9 Colagenases e gelatinases microbianas	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 SEÇÃO EXPERIMENTAL I: ISOLAMENTO PARCIAL DE LACASE E DESCOLORAÇÃO DO AZUL DE BROMOFENOL	32
4.1 Materiais e métodos	32
4.1.1 Obtenção do fungo, resíduos e preparo de inóculo	32
4.1.2 Teste em placa de oxidação do ABTS	32
4.1.3 Testes de degradação de azul de Bromofenol em meio líquido e sólido	33
4.1.4 Seleção dos meios de cultura e do tempo de FES para a produção de oxidoredutases	34
4.1.5 Quantificação de atividade de enzimas oxidoredutases	35
4.1.6 Precipitação salina	35
4.1.7 Diálise	36
4.1.8 Cromatografia de troca iônica	36
4.1.9 SDS-PAGE	37
4.1.10 Coloração com nitrato de prata em gel de poliacrilamida	37
4.1.11 Quantificação de proteínas	37

4.2 Resultados e discussão	38
4.2.1 Obtenção do fungo, resíduos e preparo de inóculo	38
4.2.2 Teste em placa de oxidação do ABTS	38
4.2.3 Testes de degradação de azul de Bromofenol em meio líquido e sólido	40
4.2.4 Seleção dos meios de cultura e do tempo de FES para a produção de oxidoredutases	42
4.2.5 Precipitação salina	47
4.2.6 Diálise	49
4.2.7 Cromatografia de troca iônica	49

5 SEÇÃO EXPERIMENTAL II: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ENZIMAS COAGULANTES DE LEITE

5.1 Materiais e métodos	53
5.1.1 Obtenção do farelo de trigo, do fungo e preparo de inóculo	53
5.1.2 FES para a produção de proteases	53
5.1.3 Quantificação de proteínas	53
5.1.4 Quantificação de atividade para tripsina, quimotripsina e elastase 2 e atividade caseinolítica	54
5.1.5 Cálculo da atividade enzimática coagulante de leite	54
5.1.6 Produção de coágulo seco e cálculo de umidade	55
5.1.7 Precipitação salina	55
5.1.8 Sistema Aquoso Bifásico	56
5.1.9 SDS-PAGE	56
5.1.10 Coloração com nitrato de prata em gel de poliacrilamida	56
5.1.11 Efeito da temperatura sobre a atividade caseinolítica	57
5.1.12 Efeito da temperatura sobre a estabilidade caseinolítica	57
5.1.13 Efeito do pH sobre a atividade caseinolítica	58
5.1.14 Efeito do pH sobre a estabilidade caseinolítica	58
5.1.15 Inibição enzimática de proteases	59
5.1.16 Efeito de solventes orgânicos na atividade caseinolítica	59

5.1.17 Efeito de detergentes na atividade caseinolítica	60
5.1.18 Efeito de desnaturantes sobre a atividade caseinolítica	61
5.1.19 Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica	61
5.1.20 Teste de tolerância aos íons sódio e cálcio	62
5.1.21 Zimografia em gel de poliacrilamida com caseína e gelatina	62
5.2 Resultados e discussão	63
5.2.1 Obtenção do farelo de trigo, do fungo, preparo de inoculo e FES para a produção de proteases	63
5.2.2 Quantificação de atividade caseinolítica e atividades para as proteases tripsina, quimotripsina e elastase 2	64
5.2.3 Cálculo da atividade enzimática coagulante de leite, produção de coágulo seco e cálculo de umidade	64
5.2.4 Precipitação salina	67
5.2.5 Sistema aquoso bifásico	68
5.2.6 Efeito da temperatura sobre a atividade caseinolítica	69
5.2.7 Efeito da temperatura sobre a estabilidade caseinolítica	70
5.2.8 Efeito do pH sobre a atividade caseinolítica	71
5.2.9 Efeito do pH sobre a estabilidade caseinolítica	72
5.2.10 Inibição enzimática de proteases	73
5.2.11 Efeito de solventes orgânicos na atividade caseinolítica	74
5.2.12 Efeito de detergentes na atividade caseinolítica	75
5.2.13 Efeito de desnaturantes sobre a atividade caseinolítica	76
5.2.14 Teste de efeito de íons metálicos	76
5.2.15 Teste de tolerância aos íons sódio e cálcio	77
5.2.16 Zimografia em gel de poliacrilamida com caseína e colágeno	78
6 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	80
6.1 Conclusão geral	80
6.2 Perspectivas	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
APENDICE	96

1 INTRODUÇÃO

Amphobotrys ricini é um fungo filamentoso mais conhecido pelo seu caráter fitopatogênico na infecção da espécie *Ricinus communis* L., conhecida também como mamoneira (MILANI *et al.*, 2005). A infecção que o fungo produz nesse vegetal é chamada de mofo cinzento (YAMUNA *et al.*, 2015). Essa infecção é importante, pois pode levar a perdas de até 100% da colheita da mamoneira (DE LIMA *et al.*, 2015). O derivado mais usado da mamoneira é o óleo extraído dos frutos, que possui propriedades desejáveis na fabricação de vários produtos de importância médica (CARVALHO, 1997; GIBELLI, 2001), além do potencial na produção de biodiesel, sendo colocada no programa nacional de biodiesel do Brasil pela Lei 11.097 de 13 de Janeiro de 2005 (CAVALCANTE *et al.*, 2008).

Entretanto, esse fungo possui pouquíssimas informações disponíveis sobre as proteínas que produz, sendo a única proteína isolada a endoglucanase caracterizada por Silva *et al.* (2018), usada na sacarificação de resíduos agroindustriais. Enzimas são biomoléculas interessantes para diversas aplicações devido à alta especificidade aos seus substratos específicos (NELSON & COX, 2015). Sabe-se que esse fungo produz algumas enzimas industrialmente importantes, como lipases, celulasas, proteases e pectinases (CHAGAS, 2012). Porém, para indicar potenciais aplicações biotecnológicas de enzimas, é desejável caracterizá-las no seu maior grau de pureza possível.

As ligninases são enzimas degradadoras de lignina. As ligninases mais comuns são as lacases, as manganês peroxidases, as ligninas peroxidases e as peroxidases versáteis (KUMAR & CHANDRA, 2020). São enzimas produzidas por vários microorganismos, incluindo fungos (KUMAR & CHANDRA, 2020). Sabe-se que o *A. ricini* produz enzimas para a invasão de células vegetais do seu hospedeiro preferencial, a mamoneira (THOMAS & ORELLANA, 1963). Também é conhecido que a mamoneira é uma planta vascular (MELO, BELTRÃO & DA SILVA, 2003) e que a lignina está presente em todas as plantas vasculares (WONG, 2009).

As ligninases são enzimas capazes de degradar uma grande sorte de moléculas orgânicas (VALLI, WARIISHI & GOLD, 1990; WONG, 2009; KUMAR & CHANDRA, 2020), portanto são usadas para diversas aplicações biotecnológicas, como biorremediação, processamento de alimentos, processos ligados ao

reestabelecimento da saúde, prospecção de biossensores e em nanotecnologia, fabricação de papel, polpa de celulose, processos petroquímicos, têxteis e degradação de corantes (OLAJUYIGBE & FATOKUN, 2017; COUTO & HERRERA, 2006; AI, WANG & HUANG, 2015; UPADHYAY, SHRIVASTAVA & AGRAWAL, 2016; WONG, 2009).

Proteases são enzimas hidrolíticas com capacidade de romper ligações peptídicas de outras proteínas e peptídeos (NELSON & COX, 2015). Proteases microbianas são pelo menos dois terços do total de proteases produzidas e correspondem a mais de 60% de todas as enzimas usadas industrialmente no mundo (BANDARI *et al.*, 2021) e nos últimos anos, aumentou o interesse nesse grupo de enzimas pelas possibilidades de aplicação na fabricação de laticínios, tecidos, detergentes e formulações farmacêuticas (SOUZA *et al.*, 2015). Os microorganismos são considerados fontes preferidas de enzimas de interesse industrial pelas vantagens tecnológicas que possuem (DUARTE NETO, 2018).

Outro tipo de atividade proteolítica relevante são atividades collagenolíticas, que podem ser empregadas no tratamento de doenças, como a doença de Peyronie (CHUNG, SCOTT & WANG, 2020), e no tratamento de diversos tipos de lesões em que o tratamento tópico com enzimas é fundamental (MÓDOLO, 2020 *apud* BERNAL *et al.*, 2021). A grande maioria das proteases comercializadas são serino proteases (HONIG, 2014). As collagenases também podem ser usadas na indústria alimentícia e na produção de compostos bioativos e peptídios (PAL & SURESH, 2016). A capacidade de produzir collagenases são fator de virulência de microorganismos patógenos (PAL & SURESH, 2016).

Diante da possibilidade do fungo estudado ser um produtor de enzimas ligninolíticas ou de proteases com aplicações importantes, bem como da falta de conhecimento sobre seus produtos de expressão, esse trabalho foi realizado para investigar essas possibilidades, apontando, se possível, aplicações biotecnológicas para as enzimas estudadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Amphobotrys ricini*

A espécie *A. ricini* é o principal fitopatógeno de *Ricinus communis* L., planta vulgarmente chamada de mamoneira, carrapateira ou rícino (MILANI *et al.*, 2005).

O mofo cinzento, como é denominado a doença causada pelo fungo, é conhecida por causar muitos danos à planta e perda de produção, principalmente no período de formação dos frutos quando ocorrem em períodos intensamente chuvosos (YAMUNA *et al.*, 2015), tendendo à altíssima disseminação em temperaturas em torno de 25°C combinadas com umidades relativas superiores a 75% (CHAGAS *et al.*, 2010). As perdas associadas à ausência de controle da presença do fungo em plantações de rícino podem chegar a 100% da produtividade (DE LIMA *et al.*, 2015). O fungo pode permanecer viável por até um ano no solo na forma de escleródio (SILVA *et al.*, 2013). O mofo cinzento da mamoneira foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos em 1918 nos Estados Unidos por GODFREY (1923). É uma doença onde o fungo completa muitos ciclos de seu desenvolvimento em um ciclo do hospedeiro, portanto descrita como policíclica (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Uma maior esporulação do fungo sobre os frutos da mamoneira parece estar relacionado à uma menor resistência ao fungo e vice-versa (SILVA *et al.*, 2008). Genótipos de mamoneira produtoras de cápsulas de frutos com poucos acúleos parecem menos susceptíveis à instalação do mofo cinzento que os detentores de muitos acúleos (LIMA & SOARES, 1990).

O impacto econômico do crescimento descontrolado do *A. ricini* está relacionado à perda da quantidade e qualidade do óleo produzido em decorrência da diminuição da frutificação da planta (LIMA, ARAUJO & BATISTA, 2001). O óleo produzido pela planta possui relevância comercial pelo uso na fabricação de detergentes, resinas plásticas, inseticidas, vernizes, tintas, fungicidas, bactericidas, próteses humanas de crânio, dentes, coluna vertebral e mamas (CARVALHO, 1997; GIBELLI, 2001). Já foram relatadas ocorrências do mofo cinzento em cultivares de mamoneira em diferentes países, essas relacionadas com os organismos *Amphobotrys ricini* e *Botrytis cinerea* (BUCHWALD *et al.*, 1949; HENNEBERT, 1973; HONG *et al.*, 2001). Sua principal forma de propagação ocorre através de esporos carregados pelo vento e sua presença em sementes (NEEGAARD, 1979). Insetos polinizadores também contribuem para a propagação dos esporos do fungo (KIMATI, 1980; MASSOLA JÚNIOR & BEDENDO, 2005). Fatores como umidade, chuvas, pH, temperatura e estágio de desenvolvimento da planta também são importantes na determinação do grau de invasão de sementes e nas células dos vegetais adultos (NAGARAJA & KRISHNAPPA, 2016). Não apenas os conídios, como também ascósporos e fragmentos do micélio podem

causar a doença (FLETCHER, 1981). Provavelmente a presença de aberturas e ferimentos nos hospedeiros facilite a invasão do *A. ricini* (SOARES, 2012). O tipo de inóculo, atividade de água, o acesso a nutrientes, presença de solução de continuidade nos frutos ou flores, tamanho e tempo das feridas bem como a presença de aberturas naturais são alguns dos fatores que influenciam a capacidade do fungo se instalar e se disseminar no hospedeiro (HOLZ, COERTZE & WILLIAMSON, 2007).

No Brasil, a espécie *A. ricini* é bastante presente em diferentes áreas de cultivo (CHAGAS *et al.*, 2010). O mofo cinzento da mamoneira teve o primeiro registro no Brasil no estado de São Paulo, 1932 (GONÇALVES, 1936) e já foi descrita como a principal doença associada ao cultivo do rícino em algumas regiões do país (LIMA, ARAUJO & BATISTA, 2001). A doença ganhou importância econômica à medida que se aumentava o plantio para exploração comercial e hoje é considerada amplamente distribuída, desenvolvendo-se onde as condições ambientais forem favoráveis (HOFFMANN, COUTINHO & DUARTE, 2003). Na região nordeste do país, já foi documentado em plantações do agreste dos estados da Paraíba e Pernambuco (LIMA & SOARES, 1990). A propensão ao maior crescimento em temperaturas maiores deve estar relacionada à regulação de determinados genes do fungo (WAHID *et al.*, 2007) e pode ter relação com a presença de micovírus em micélios de *A. ricini* (YU *et al.*, 2019), algo frequente nessa espécie de fungo (YU, 2016). Isso é importante, pois os micovírus podem conferir características diferentes ao fungo hospedeiro, a depender do tipo de relação entre eles, que pode ser de mutualismo, comensalismo ou parasitismo (ZHOU *et al.*, 2021).

Duas espécies euforbiáceas ornamentais, *Acalypha hispida* e *Jatropha podagrica*, já apresentaram colonização natural pelo *A. ricini* em suas inflorescências relatada no Brasil (LIMA *et al.*, 2008). Outras espécies também foram relatadas como hospedeiros do fungo *A. ricini*, como *Caperonia palustris* (WHITNEY & TABER, 1986), *Euphorbia supina*, *Euphorbia pulcherrima*, (HOLCOMB *et al.*, 1989), *Euphorbia heterophylla* L. (BARRETO & EVANS 1998; MENDES *et al.* 1998) e *Euphorbia milii* (HOFFMANN, COUTINHO & DUARTE, 2003).

O primeiro registro de ocorrência do fungo *A. ricini* no estado da Flórida ocorreu em Gainesville, 2019, em menos de 5% dos exemplares da espécie *E.*

pulcherrima, que foram cultivadas em estufas (KRASNOW *et al.*, 2020). Uma euforbiácea de grande importância econômica que pode servir como hospedeiro do *A. ricini* é a *Manihot esculenta* Crantz, conhecida como mandioca (HOLCOMB *et al.*, 1989; KUMAR *et al.*, 2007). A ocorrência da forma saprofítica já foi relatada na espécie *Vicia faba* L., uma espécie de fava (FAN *et al.*, 2015). Também é referido seu caráter fitopatogênico em plantações de morangos, ainda que sua ocorrência como causadora do mofo cinzento seja minoritária (DOWLING, 2018).

O fungo *A. ricini* já teve um registro de patente do seu uso para o controle biológico da espécie *Caperona palustres*, uma erva daninha também euforbiácea (WHITNEY, 1990), o que evidencia que organismos patogênicos podem ser úteis para o ser humano a depender do contexto, nesse caso, combatendo perdas econômicas e aumentando produtividade de cultivares de importância comercial.

Sabe-se que para que um fitopatógeno possa infectar seu hospedeiro, este precisa invadir os tecidos, acessar nutrientes, se multiplicar e contornar as ações de defesa do metabolismo do vegetal, que envolve enzimas, hormônios e substâncias tóxicas (PASCHOLATI, 1995). Thomas e Orellana (1963) observaram que não era possível encontrar invasão pelo tubo germinativo, através de estômatos ou cutículas dos frutos antes de digestão enzimática desses tecidos por pectinases.

O perfil de produção de enzimas na espécie é bastante desconhecido, bem como suas potencialidades para aplicação. Já se sabe que o fungo *A. ricini* produz enzimas hidrolíticas como celulasas e pectinases, para a invasão de tecidos dos frutos da mamoneira (THOMAS & ORELLANA, 1963), invadindo a capsula dos frutos devido ao grande teor de açúcares solúveis no interior da polpa, posto que os frutos com maior teor de açúcares solúveis no interior são mais susceptíveis à invasão do que aqueles com menor teor (THOMAS & ORELLANA, 1962).

Aquelas cápsulas da mamoneira que possuem maior resistência à invasão do fungo, são aquelas que através da síntese de produtos da oxidação de fenóis, possuem maior capacidade de inativar pectinases, celulasas e outras hidrolases (THOMAS, 1963) e que possuem concentrações menores de pectina solúvel, Na^+ e K^+ , enquanto apresentam altas quantidades de Ca^{+2} e Mg^{+2} (THOMAS & ORELLANA, 1964). As cápsulas mais resistentes também apresentam menor conteúdo de flavonoides e outros metabólitos relacionados, enquanto apresentam

maior taxa de peroxidases e polifenoloxidasas (JARVIS, 1977).

Atividades do tipo celulase mais altas estão relacionadas com estágios iniciais de colonização do fungo sobre a mamoneira (KAPAT *et al.*, 1998). Sabe-se que o fungo cultivado em meio líquido Batata Dextrose com extrato de ervilhas produz enzimas malicas, α -esterase, β -esterase e superóxido dismutase, que podem ser detectadas utilizando o caldo em que o micélio foi cultivado. A superóxido dismutase pode ser detectada mesmo em caldo com micélio congelado a -20°C por até dois meses (HOFFMANN, COUTINHO & DUARTE, 2003). A superóxido dismutase é uma das enzimas que pode provocar alterações no equilíbrio redox nos tecidos colonizados do hospedeiro por fungos do gênero *Botrytis* (LYON, GOODMAN & WILLIAMSOM, 2007). Devido à grande semelhança entre o *A. ricini* e os fungos do gênero *Botrytis*, é esperado que essas enzimas apresentem grande relevância na fitopatogênese do mofo cinzento da mamoneira (THOMAS & ORELLANA, 1962).

Chagas (2012) descreve em seu trabalho que ao observar crescimento de isolados do *A. ricini* em testes realizados em placa de petri, que há degradação de substratos relacionados à atividade de enzimas lipases, celulasas, proteases e em maior medida, de enzimas pectinases. Lipases podem estar ligadas à alteração de ceras e cutículas, bem como na adesão de conídios ao hospedeiro (COMMÉNIL, BRUNET & AUDRAN, 1997; COMMÉNIL, BELINGHERI & DEHORTER, 1998), além de estar envolvida na produção de ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, glicerídeos e fosfolipídios, que estão relacionados a processos metabólicos importantes como transporte e oxidação de ácidos graxos (REED, 1975). É esperado que tanto lipases quanto cutinases, enzimas hidrolíticas de cutinas, ceras produzidas por vegetais que recobrem suas partes aéreas, sejam atuantes na invasão dos frutos, como em outras infecções de fungos do gênero *Botrytis* (KARS & VAN KAN, 2007).

Já pectinases devem estar relacionadas ao mecanismo de invasão fúngica de células vegetais, degradando matéria péctica na parede celular (CLARK & LORBEER, 1976; COLE, DEWEY & HAWES, 1998; COLLMER & KEEN, 1986). Muitos organismos colonizadores de vegetais produzem proteases que podem participar da invasão celular, especialmente na degradação de proteínas de membrana e da parede celular de vegetais, atuando sinergicamente com outras enzimas extracelulares, como poligalacturonases, pectoliasas e xilanases

(VALUELA & MOSLOV, 2004). Geralmente pectinases são produzidas com meios simples, contendo fontes de carbono, nitrogênio e sais simples (JARVIS, 1977). Metilesterases poligalacturonases, pectina-metil-trans-eliminases e poligalacturonato-metil-trans-eliminases são enzimas produzidas por diversos fungos invasores de células vegetais, incluindo vários do gênero *Botrytis* e *Amphobotrys* (JARVIS, 1977). Nenhuma proteína oriunda de qualquer uma das formas do fungo jamais foi isolada ou caracterizada, com a notável exceção do trabalho sobre o isolamento e caracterização de uma endo-1,4- β -D-glucanase halotolerante e termoestável produzida por fermentação em estado sólido, capaz de sacarificar diferentes resíduos agroindustriais como bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (SILVA *et al.*, 2018).

2.2 Fermentação em estado sólido

O conceito de fermentação em bioquímica difere significativamente do conceito utilizado na biotecnologia industrial. A bioquímica como ciência básica reconhece o processo de fermentação como a oxidação enzimática de fontes de carbono na ausência de oxigênio que resulta na produção de substâncias orgânicas mais simples, decorrente da reposição de ATP (NELSON & COX, 2015). Já a fermentação na biotecnologia industrial é o processo em que se usam microrganismos ou enzimas de organismos vivos para obtenção de produtos de origem biológica, que podem ser mais células microbianas, enzimas ou outras substâncias químicas de interesse industrial (BORZANI, *et al.*, 2001). A fermentação em estado sólido pode ser definida como o processo de obtenção de produtos de origem microbiana utilizando matéria orgânica sem a adição de água às partículas da fase sólida (BORZANI, *et al.*, 2001). Como qualquer processo fermentativo biológico, pode ser usado para obtenção de células viáveis de microrganismos, suas enzimas ou produtos gerados a partir da ação de enzimas sobre substratos contidos nos resíduos sólidos (BORZANI, *et al.*, 2001).

.Pode utilizar microrganismos como leveduras, fungos filamentosos, bactérias ou enzimas produzidas por quaisquer organismos vivos para obter seus produtos desejados (BORZANI, *et al.*, 2001). A matéria sólida usada para obter os produtos de interesse podem ser os mais diversos, podem ser resíduos de processamento agroindustriais como esterco de animais, palha de milho, bagaço de cana, farelo de cereais como arroz e trigo, restos alimentares como cascas de maçã, banana,

laranja e até mesmo alguns rejeitos não oriundos de matérias primas como tecidos e papel, bem como moléculas obtidas de biomassa tratada, como celulose, hemicelulose e lignina. A fermentação em estado sólido é utilizada para diferentes propósitos, como produção de moléculas de interesse com ácidos orgânicos e etanol, obtenção de antibióticos, elaboração de ração proteicamente enriquecida, elaboração de condimentos e alimentos, entre outros.

Os meios de fermentação podem necessitar de algum tipo de tratamento, como diferentes modalidades de trituração, secagem, suplementação de nutrientes, correção de pH, hidrólise ácida ou básica, umidificação, entre outros, para condicionar o meio para o processo desejado de obtenção dos produtos biotecnológicos (BORZANI, *et al.*, 2001). A fermentação em estado sólido possui algumas vantagens e desvantagens (BORZANI, *et al.*, 2001). Costumam usar meios de fermentação de baixo custo, obtendo grandes rendimentos em produtos de interesse sem grandes gastos no controle energético dos sistemas (BORZANI, *et al.*, 2001). Porém, a homogeneidade de distribuição de células ao redor do resíduo é dificultada, bem como o controle de temperatura, umidade, pH, sobretudo quando há ampliação de escala no processo (BORZANI, *et al.*, 2001). Entretanto, é uma modalidade de fermentação ainda muito utilizada na obtenção de diferentes produtos devido as vantagens atribuídas a ela. Importante salientar que alguns produtos só podem ser obtidos a partir desse processo (BORZANI, *et al.*, 2001).

2.3 Precipitação salina de proteínas

A precipitação salina de proteínas, também chamada de *salting out*, é uma técnica de separação de proteínas que consiste em retirar de solução, proteínas de um extrato pela adição de sal. Geralmente, esse tipo de separação é executado pela lenta adição de sais inertes, como o sulfato de amônio, em diferentes concentrações. A separação de frações de proteínas da amostra só é possível pela retirada daquilo que precipitou em determinada concentração de sal, para que se prossiga com o fracionamento em quantidades cada vez maiores. O procedimento comumente é executado por meio de uma fase de adição de lenta do sal, de preferência com a amostra em agitação, um período de repouso e uma centrifugação, que auxilia na precipitação das proteínas que saem de solução em determinada concentração do sal. O sobrenadante é separado do corpo de fundo,

o primeiro é levado para o próximo ciclo de precipitação, enquanto o segundo é suspenso em solução aquosa, que pode ser solução tampão de extração (NELSON & COX, 2015). A precipitação salina separa proteínas e também as concentra. Quanto maior o número de frações, maior a chance de isolamento, e também maior a duração do processo.

O sal age sobre as proteínas de formas diferentes a depender das concentrações em que estão presentes na amostra. A adição de sal em baixas quantidades aumenta a polaridade da solução e a quantidade de espécies químicas capazes de fazer interações intermoleculares com as proteínas, facilitando solvatação das mesmas, aumentando a solubilidade das mesmas. Nessa situação descrita, temos o *salting in*. Já no *salting out*, os íons do sal inerte competem pelas interações intermoleculares das proteínas, e como os íons são mais facilmente solvatados pela água, as proteínas têm suas interações moleculares com a água desfeitas. Sem interações suficientes para mantê-las em solução, as proteínas precipitam (NELSON & COX, 2015).

2.4 Obtenção de proteases microbianas por sistemas aquosos

Em linhas gerais, sistemas aquosos são sistemas líquidos de separação de moléculas de propriedades químicas diferentes, através da mistura de dois solventes ou soluções de polaridade diferentes, geralmente um mais polar e outro menos polar, que após centrifugação, são separados, juntamente com as moléculas de determinada amostra aplicada ao sistema. Essa separação ocorre pela maior afinidade da molécula a um dos solventes, onde os semelhantes arrastam semelhantes para a sua fase e repelem os diferentes para a fase oposta (NADAR, PAWAR & RATHOD, 2017).

Sistemas aquosos têm sido usados em pesquisas de extração e purificação de enzimas, devido à versatilidade, capacidade de integração de processos, menor custo e ganho de escala facilitado. Alguns exemplos de soluções que podem ser usadas para compor sistemas aquosos de separação de proteínas são polímeros de diferentes polaridades, sais, surfactantes, álcoois e compostos micelares. A separação das frações do sistema pode ser executada através de centrifugação, mas também por outros métodos, como a separação por alteração de temperatura do sistema, por exemplo (NADAR, PAWAR & RATHOD, 2017).

Várias proteases microbianas já foram isoladas parcialmente ou isoladamente

através da aplicação de sistemas aquosos. Uma cepa modificada geneticamente de *Stenotrophomonas acidaminiphila* produziu em grandes quantidades uma serina protease alcalina obtida por fermentação em efluente de processamento de mandioca, enzima que foi purificada por um sistema aquoso bifásico composto por uma fase de polietilenoglicol 1500 e outra de sal citrato de sódio, que teve 73,87% de recuperação (ASITOK *et al.*, 2022).

Uma prolil endopeptidase produzida por *Aspergillus niger* produzida a partir de fermentação líquida contendo soja em pó, xarope de milho e glicose foi purificada parcialmente e caracterizada através da aplicação da amostra em sistema aquoso bifásico composto por solução de etanol e sulfato de amônio com 90,23% de recuperação (JIANG *et al.*, 2021). Uma serino protease produzida pela espécie *Paenibacillus graminis* por fermentação submersa utilizando endosperma do vegetal *Gliricidia sepium* foi purificada através de um sistema aquoso bifásico composto por polietilenoglicol 8000 e fosfato de sódio com recuperação de 145.52% (DO COUTO *et al.*, 2022).

Uma queratinase produzida pela cepa *Kytococcus sedentarius* TWHKC01 obtida por fermentação em caldo marinho comercial foi extraída do meio com a aplicação de um sistema aquoso bifásico composto por soluções de polietilenoglicol 2000 e citrato de sódio (KEE *et al.*, 2022). Foi extraída de processo fermentativo uma metaloprotease da cepa *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279, através de sistema aquoso bifásico executado com a mistura de uma solução de polietilenoglicol 400 e sal citrato de sódio (ALVES *et al.*, 2022).

A cepa *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi usada para a produção de uma protease fibrinolítica através de fermentação sobre resíduo de maracujá, que foi purificada através de uma rota que envolve um sistema aquoso bifásico composto por polietilenoglicol 8000 e fosfato de sódio e cromatografia de filtração em gel, obtendo rendimento de 57,49% (ALENCAR *et al.*, 2021). Como observado, é possível não só purificar, como também extrair enzimas de importância biotecnológica com a técnica dos sistemas aquosos bifásicos, usando resíduos líquidos e sólidos de baixo custo nos cultivos.

2.5 Cromatografia líquida de proteínas por troca iônica

As cromatografias líquidas de proteínas são técnicas de separação moléculas polipeptídicas realizadas através da aplicação de uma amostra em uma coluna de

fase estacionária sólida eluída por uma fase móvel líquida (NELSON & COX, 2015). As colunas são geralmente compostas por polissacarídeos que podem ou não ter outros compostos na sua estrutura além do polissacarídeo específico (HEALTHCARE, 2010).

As colunas também apresentam diferentes grupos químicos em sua estrutura, a depender do princípio pelo qual ela separa proteínas de uma amostra (HEALTHCARE, 2010). Resinas de separação por interação hidrofóbica possuem grupos hidrofóbicos, como grupos fenólicos; colunas de separação por afinidade podem ter inibidores enzimáticos ou ligantes de afinidade intermediária, enquanto resinas de filtração em gel são ausentes em grupos adicionados para interação química.

Nas resinas de troca iônica, é necessária a presença de grupos químicos com capacidade de ionização. Esse tipo de resina, como todas as outras, é composta por microesferas chamadas de *beads*, que são compostos por algum polissacarídeo contendo grupos capazes de assumir carga absoluta positiva ou negativa. Esses grupos químicos ionizáveis são chamados de trocadores iônicos (HEALTHCARE, 2010).

Os trocadores iônicos podem ser catiônicos, quando o grupo ionizável da resina é negativo e troca íons positivos, ou aniônicos, quando o grupo ionizável da resina é positivo e faz trocas de íons negativos. Os trocadores também podem ser chamados de fortes, quando resistem à alteração de carga em uma ampla faixa de pHs e fracos, quando pequenas alterações de pH são capazes de alterar sua carga (HEALTHCARE, 2010).

Na troca iônica, são trocadas cargas de sal por cargas das proteínas ionizadas da amostra aplicada. As proteínas passam pela coluna e aquelas com carga oposta à dos trocadores iônicos se ligam à resina. Os trocadores iônicos se ligam às regiões de carga oposta nas proteínas, liberando o íon salino previamente ligado ao trocador (HEALTHCARE, 2010).

O processo de cromatografia precisa ser executado em algumas etapas. Primeiro a coluna precisa ser equilibrada com a sua fase móvel, geralmente uma solução tampão aquosa sem sal, onde essa passa pela coluna, preparando-a para receber a amostra. A adição da amostra é feita aplicando-a no topo da coluna equilibrada e então essa percorre toda a coluna, onde as proteínas com grupos de carga oposta à dos trocadores se ligam à matriz da fase estacionária (HEALTHCARE,

2010).

Existe uma etapa facultativa, mas importante nas cromatografias de troca iônica, que é a lavagem. Na lavagem, a coluna é submetida pelo menos um volume da coluna para a remoção das proteínas fracamente adsorvidas à resina. Isso facilita o isolamento de proteínas, pois se eliminam proteínas indesejadas no início da cromatografia que poderiam ser eluídas juntas com proteínas de interesse (HEALTHCARE, 2010).

Após a lavagem, é necessário dessorver as proteínas que se ligaram à resina de forma gradual. A saída das proteínas de sua interação com a coluna pode ser feita através de eluição em blocos, onde se aplica concentrações de sal em patamares diferentes e crescentes, ou pode ser feita em gradiente linear, onde são aplicadas concentrações de sal de forma linear e crescente, do zero até a concentração máxima de sal estipulada. O sal remove proteínas diferentes em diferentes concentrações, pois as proteínas possuem afinidades diferentes com a resina (HEALTHCARE, 2010).

Depois de eluir as proteínas adsorvidas, a resina deve ser restaurada à sua condição original. Isso é feito pelo fluxo da fase estacionária com máxima concentração de sal usada na cromatografia, onde os grupos ionizados são neutralizados pelo seu respectivo contra íon no sal. As frações podem então ser analisadas para verificar se as proteínas de interesse foram purificadas. A capacidade da coluna de reter proteínas da amostra aplicada é proporcional ao volume da coluna. Quanto mais resina na coluna, maior a capacidade dela (HEALTHCARE, 2010).

2.6 Ligninases microbianas

Resíduos lignocelulósicos são uma das principais fontes de biomassa renovável disponíveis na terra (SAINI *et al.*, 2015). Esses resíduos são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo esta última correspondente a uma quantidade de 15 a 20% de toda a massa lignocelulósica no planeta (CHAURASIA *et al.*, 2019). A lignina é um dos biopolímeros mais presentes e mais intrincados na natureza. Possui muitas ligações químicas entre seus monômeros, o que explica a recalcitrância dos resíduos que a contêm (WONG, 2009). A lignina é composta por unidades de fenilpropano, pela polimerização de resíduos de guaiacil, siringuil e p-hidroxifenil, formados dos

alcoois sinafílico, p-cumarílico e coniferílico (HORN *et al.*, 2012). É uma molécula presente em todas as plantas vasculares e uma das fontes de carbono mais abundantes, perdendo apenas para a celulose (WONG, 2009).

As enzimas mais comuns na degradação de lignina são enzimas da classe das oxidoredutases, as lacases (EC 1.10.3.2), manganês peroxidases (EC 1.11.1.13), ligninas peroxidases (EC 1.11.1.14) e versátil peroxidases (EC 1.11.1.16) (KUMAR & CHANDRA, 2020). A atividade dessas enzimas pode ser potencializada por outras enzimas como lipases, quinonas redutases, feruloil esterases, aril-alcool oxidases, catecol-2,3-dioxigenases (KUMAR & CHANDRA, 2020). Também são citadas como enzimas sinérgicas na degradação de lignina a glioxal oxidase, piranose 2-oxidase, celobiose/quinona oxidoredutases e celobiose desidrogenase (WONG, 2009).

As enzimas lignina peroxidase, manganês peroxidase e versátil peroxidases fazem parte da superfamília das heme peroxidases classe II, que desempenham diferentes reações de biossíntese e degradação (WONG, 2009; WELINDER, 1992). Vários microorganismos são capazes de degradar matéria lignocelulósica e fibras de madeira, como bactérias e fungos (KUMAR & CHANDRA, 2020). Essas enzimas oxidam seus substratos em reações de vários passos de transferência de elétrons, com a formação de um cátion intermediário (WONG, 2009).

A lignina peroxidase é uma enzima capaz de desconstruir a lignina na presença de H_2O_2 (EDWARDS *et al.*, 1993). É uma enzima não específica para substratos e degrada diversos compostos fenólicos e aromáticos e diferentes compostos não fenólicos derivados de lignina (VALLI, WARIISHI & GOLD, 1990). Sua atividade enzimática pode ser medida pela reação de oxidação do álcool veratrílico, seu substrato preferencial, para veratraldeído, expressa pelo aumento da absorbância em medição espectrofotométrica no comprimento de onda de 310 nm (WONG, 2009). Também pode ser medida em decréscimo da absorbância no comprimento de onda de 664 nm na reação de oxidação do azul de metileno como substrato (MAGALHÃES *et al.*, 1996). São monoméricas e glicosiladas, possuindo massa molecular contida no intervalo de 38-68 kDa e apresentando pHs ótimos próximos de 3,0 (CHOINOWSKI *et al.*, 1999; WONG, 2009).

A manganês peroxidase é uma enzima que apresenta massa molecular entre 40-50 kDa, produzidas por fungos basidiomicetos, bactérias e algas que utilizam vários genes na produção dessas isoenzimas (WONG, 2009). Microorganismos

ligninolíticos realizam conversão de Mn^{+2} em Mn^{+3} reações de múltiplos passos (KUMAR & CHANDRA, 2020). A enzima também produz H_2O como um dos produtos de reação a partir do H_2O_2 (WONG, 2009). A Mn^{+2} controla a transcrição do gene *mnp*, dependente da concentração do íon e do crescimento (BROWN, JULIE, ALIC & MARGARET, 1991; GETTEMY *et al.*, 1998). A manganês peroxidase oxida vários substratos fenólicos monoméricos, como corantes, e compostos aromáticos originados da lignina (WONG, 2009). Também degrada compostos não fenólicos como os ácidos aromáticos hidrocarbônicos (STEFFEN, HOFRICHTER & HATAKKA, 2002; SHIN, KIM & LIM, 2005).

As versáteis peroxidases ou híbrida peroxidase (manganês-lignina peroxidase) compreendem enzimas oxidoredutases glicoproteicas (KUMAR & CHANDRA, 2020). Estudos genéticos dessas enzimas em fungos revelaram que elas são sintetizadas a partir de genes em comum com as ligninas peroxidases e as manganês peroxidases (YADAV *et al.*, 2014). Possuem a capacidade de oxidar substratos de alto ou baixo potencial redox, corantes fenólicos com substituições químicas e também o íon Mn^{+2} (HEINFLING *et al.*, 1998). Também podem degradar outros compostos fenólicos, não fenólicos, originados da lignina ou não, na ausência de Mn^{+2} ou qualquer mediador, como o álcool veratrílico, um importante mediador para a ação das ligninas peroxidases (KUMAR & CHANDRA, 2020).

2.7 Lacases microbianas

Lacases, EC 1.10.3.2, benzenodiol oxigênio oxidoredutases (MAYER & STAPLES, 2002), são enzimas da família das oxidases azuis multicobreadas, que catalisam transferências de quatro elétrons, cada um oriundo de uma molécula de substrato, tendo uma molécula de oxigênio como aceptor final desses elétrons, convertendo-o em H_2O (BRIJWANI, RIGDON & VADLANI, 2010). São as oxidoredutases mais estudadas entre aquelas classificadas como oxidases (KUMAR *et al.*, 2016) e são capazes de oxidar uma grande variedade de poluentes químicos orgânicos e inorgânicos (BOURBONNAIS & PAICE, 1990; GIARDINA *et al.*, 2010).

A primeira descrição da existência de lacases foi feita a partir do estudo da seiva da espécie vegetal *Toxicodendron vernicifluum*, anteriormente classificada como *Rhus vernicifera* (KUMAR *et al.*, 2016). São enzimas capazes de degradar um espectro de moléculas maior que as tirosinases e seu aceptor final de elétrons,

o gás oxigênio, um aceptor não limitante, faz com que as lacases sejam mais apropriadas a aplicações biotecnológicas, sejam ambientais ou industriais (PAWLIK *et al.*, 2016).

Lacases fúngicas são responsáveis pela produção de pigmentos nos esporos, modificação de moléculas fenólicas tóxicas e atuam de forma sinérgica com peroxidases e outras enzimas na desconstrução da lignina (LEATHAM & STAHMANN, 1981; YOUN, HAH & KANG, 1995; EGGERT, TEMP & ERIKSSON, 1997). Produzidas no processo de degradação da lignina, são capazes de oxidar uma grande gama de moléculas aromáticas que contenham grupamentos aminas e hidroxilas (KUMAR *et al.*, 2016), incluindo fenóis e aminas aromáticas (MANSUR *et al.*, 1997).

São enzimas amplamente difundidas na natureza, encontradas em fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota (KUMAR *et al.*, 2016). Também são bastante presentes em plantas e insetos (MAYER & STAPLES, 2002). *Trametes versicolor*, *Thermopsis villosa* e *Aspergillus flavus* são exemplos de fungos produtores de lacase (KUMAR *et al.*, 2016). Lacases fúngicas tendem a se apresentarem como isoenzimas que se oligomerizam para formar complexos multiméricos (PAWLIK *et al.*, 2016). As massas moleculares desses monómeros estão compreendidas entre 50 e 110 kDa (DEAN & ERIKSSON, 1994). Lacases fúngicas se apresentam geralmente como glicoproteínas, onde a porção de natureza carboidrática corresponde de 10 a 45% das suas massas moleculares (THURSTON, 1994). Os sítios de ligação do cobre L1, L2, L3 e L4 estão presentes em toda enzima que é ou já foi classificada como lacase (DWIVEDI *et al.*, 2011, RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013).

Lacases são consideradas ecologicamente sustentáveis por não necessitar de substâncias nocivas como o peróxido de hidrogênio como cofator para execução de sua atividade, como outras oxidases e peroxidases (CAÑAS & CAMARERO, 2010; RODRÍGUEZ-COUTO, 2012; SHARMA, DANGI & SHUKLA, 2018). Muitos autores têm usado lacases para degradar poluentes químicos do ambiente, como moléculas fenólicas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (DOMARADZKA, GUZIK & WOJCIESZYŃSKA, 2015; MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2016).

Difenóis, polifenóis, benzenotióis e diaminas são alguns exemplos de moléculas xenobióticas sobre as quais lacases podem agir (GIARDINA *et al.*, 2010). É possível ainda degradar moléculas não fenólicas adicionando mediadores

orgânicos de baixo peso molecular às reações (MOROZOVA *et al.*, 2007). São bastante úteis em diferentes tipos de processos industriais, como na fabricação de papel, polpa de celulose, processos petroquímicos e têxteis (OLAJUYIGBE & FATOKUN, 2017). Também são usados em biorremediação, processamento de alimentos, processos ligados ao reestabelecimento da saúde, prospecção de biossensores e em nanotecnologia (COUTO & HERRERA, 2006; AI, WANG & HUANG, 2015; UPADHYAY, SHRIVASTAVA & AGRAWAL, 2016).

A grande maioria das lacases são oriundas de organismos vegetais e fungos (BALDRIAN *et al.*, 2006; FOROOTANFAR & FARAMARZI, 2015), especificamente os fungos de podridão branca degradadores de lignina (ATALLA *et al.*, 2010; AI, WANG & HUANG, 2015; UPADHYAY, SHRIVASTAVA & AGRAWAL, 2016). A capacidade de lacases oxidarem seus substratos depende mais dos potenciais de oxidação do que da distribuição espacial destes ao interagir com as enzimas. A lignina pode ser desconstruída por lacases usando diversos mediadores, e por possuir diversos tipos de grupamentos químicos, sua desconstrução oferece a possibilidade de produzir diferentes tipos de moléculas que podem servir para a construção dos mais diversos materiais de importância para a indústria química e médica (LANGE, DECINA & CRESTINI, 2013).

Produzir enzima em grande quantidade para aplicar em escala industrial é uma limitação importante (ZIMBARDI *et al.*, 2016), levando à procura de cepas de fungos hiper produtoras de lacases (GASSARA *et al.*, 2011; YAO *et al.*, 2013). Obter lacases que suportem processos que empreguem extremos de pH e temperatura é outra limitação, que impulsiona a busca por enzimas que resistam a essas condições extremas (HILDÉN, HAKALA & LUNDELL, 2009; SINGH *et al.*, 2015). Enzimas termoestáveis frequentemente apresentam maior resistência a extremos de pH e agentes desnaturantes (HILDÉN, HAKALA & LUNDELL, 2009).

Há lacases extraídas e isoladas de bactérias apresentando aplicações biotecnológicas. Um exemplo é a enzima LAC1 extraída de *Alcaligenes faecalis* XF1, enzima extracelular isolada através de precipitação salina com sulfato de amônio 0-80%, diálise e cromatografia em resina de troca aniônica DEAE-Cellulose. A rota apresentou recuperação de 12% e a enzima exibiu pH ótimo de 8,0 e temperatura ótima de 80°C, contendo massa molecular aproximada de 71 kDa, tendo características cinéticas medidas com os substratos DMP, ABTS e Guaiacol. Também teve atividade de degradação de diferentes corantes, índigo

carmin, verde malaquita, cristal violeta e vermelho congo (MEHANDIA, SHARMA & ARYA, 2020).

A bactéria do solo *Sinorhizobium meliloti* teve uma lacase isolada com membrana de ultra filtração Amicon® 8200 com massa de corte de 10 kDa YM-10, sucedida de DEAE-Sepharose, IDA-Sepharose quelante de cobre e por fim, uma coluna de cromatofocalização PBE-94 foi usada, obtendo recuperação de 19,2%, 70 kDa e $pI=4,77$ (PAWLIK *et al.*, 2016). Essa enzima parece apresentar, através da análise do gene codificador dela, características comuns em lacases, como as quatro sequências conservadas, abundantes em histidinas, que estão associados aos sítios ligação portadores dos íons cobre e teve suas características cinéticas mensuradas com DMP, Siringaldazina, Guaiacol e ABTS (PAWLIK *et al.*, 2016).

Por causa de suas diferentes aplicações em biotecnologia, diferentes grupos têm estudado a otimização da obtenção de lacase por microorganismos produtores ao longo dos anos, otimização de produção essa que geralmente é buscada através da variação de uma variável independente por vez, enquanto se mantém outras variáveis fixas. Entretanto, essa abordagem de tentativa-erro experimental vem sendo substituída ao longo do tempo por análises estatísticas executadas através de programas, a fim de resultados mais favoráveis em custo e efetividade de otimização. A expressão de lacases por fungos dependem de diferentes fatores no cultivo, como temperatura, pH, natureza de fontes de carbono e nitrogênio, composição do meio, entre outros (KUMAR *et al.*, 2016).

A espécie *Aspergillus flavus*, após otimização de produção de lacases em meio líquido, mostrou máxima produção de lacase no décimo segundo dia em cultivo estacionário, temperatura de 35°C, pH 7, inoculado com disco de 1,5 cm de diâmetro. Após extração e filtração, foi executada uma purificação parcial com fracionamento salino através de adição de sulfato de amônio seguida de diálise, apresentando 11,05% e 13,17% de recuperação respectivamente cada etapa, utilizando ABTS como substrato na medição da atividade (KUMAR *et al.*, 2016).

Uma lacase com estabilidade do pH 3,0 ao 11,0, temperatura ótima a 50°C, pH ótimo igual a 7,0 e massa de 56 kDa foi isolada e caracterizada da linhagem *Sporotrix carnis* CPF-05. A rota de purificação consistiu de precipitação com sulfato de amônio 0-80%, diálise, cromatografia de troca iônica em resina de DEAE Sephacel com eluição em gradiente crescente de NaCl e cromatografia de gel filtração em resina de Sephadex G-200 obtendo recuperação de 3,9%,

aumentando sua pureza em 2,84 vezes. Sua atividade foi medida pela oxidação do ABTS e apresentou potencialização de sua atividade em presença de íons Cu^{+2} e Mn^{+2} , enquanto apresentou inibição pelos íons Ca^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} e Ba^{+2} (OLAJUYIGBE & FATOKUN, 2017). Importante destacar que o *Sporotrix carnis* é um fungo que cresce sobre matéria vegetal e a inibição da sua enzima lacase por íons Ca^{+2} e Mg^{+2} é um indicativo do que pode ocorrer nas infecções do *Amphobotrys ricini*, ou seja, talvez uma ou mais enzimas atuantes na invasão dos frutos da mamoneira, lacases por exemplo, sejam inibidas por esses íons, posto que já é conhecido que frutos com maior quantidade desses metais são menos vulneráveis ao ataque do fungo.

2.8 Caseinases microbianas

Caseínas são fosfoproteínas abundantes no leite que se organizam em estruturas coloidais micelares que possuem três subunidades hidrofóbicas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e β , que permanecem envoltas nas subunidades hidrofílicas de k-caseína (DA SILVA *et al.*, 2017). É a proteólise das k-caseínas que permite que as subunidades no interior da micela sejam expostas ao solvente da suspensão e aos íons Ca^{+2} , provocando a estabilização das cargas e a separação entre a fase solúvel e a fase insolúvel do leite (PONTUAL *et al.*, 2012).

Enzimas proteolíticas são usadas há muito tempo em diferentes aplicações na indústria (DA SILVA *et al.*, 2017). Proteases de microorganismos são bastante estudadas e são um dos grupos de enzimas com atividade hidrolítica mais importantes contemporaneamente (SOUZA *et al.*, 2015). Nos últimos anos, proteases microbianas despertam bastante interesse pelo seu potencial de aplicação em formulações de detergentes, laticínios, fabricação de tecidos e até mesmo em formulações farmacêuticas (SOUZA *et al.*, 2015). Proteases microbianas são preferenciais quanto à fonte, pois apresentam vantagens econômicas e tecnológicas (SARAN, ISAR & SAXENA, 2007). Esse grupo de representa um dos maiores grupos de enzimas usadas industrialmente no mercado, atingindo aproximadamente 60% do mesmo (ZAMBARE, NILEGAONKAR & KANEKAR, 2011).

Devido à capacidade de crescer em meios de baixo custo produzindo grandes quantidades de enzimas, proteases fungicas tem chamado atenção de biotecnologistas ambientais (ANITHA & PALANIVELU, 2013). Na indústria de

laticínios, a principal aplicação de proteases é a fabricação de queijo, agindo sobre a caseína (RAO *et al.*, 1998). A renina oriunda do aparelho digestivo de bezerros tem sido gradualmente substituída por proteases produzidas pelos micro-organismos *Mucor michei* e *Endothia parasítica* na fabricação de queijos (DEMAIN & ADRIO, 2008). A remoção de micélio da extração pode ser feita através de filtração (SOUZA *et al.*, 2015) e geralmente sua obtenção não oferece riscos aos humanos (GERMANO *et al.*, 2003). Essas são consideradas vantagens sobre a obtenção de enzimas de bactérias, bem como a viabilidade de obtenção de grandes quantidades de enzimas de meios fermentativos (HAJJJI *et al.*, 2010).

Na fabricação de queijo geralmente são usadas aspartato peptidases, que precisam de alguma especificidade na hidrólise de ligações peptídicas entre os resíduos de fenilalanina e metionina das cadeias de κ -caseína do leite (DA SILVA *et al.*, 2016). Genericamente, aspartato proteases possuem uma especificidade pela quebra de ligações peptídicas formadas entre resíduos de aminoácidos que contém um grupo R hidrofóbico (MERIEM *et al.*, 2014). Um exemplo de aspartato protease é a caseínase de 38 kDa isolada a partir de um fungo basidiomiceto chamado *Phanerochaete chrysosporium*. Sua rota de isolamento ocorreu com aplicação do extrato obtido a partir de fermentação submersa em coluna de exclusão molecular Sephadex G-50, troca catiônica Source 15 S e nova exclusão molecular sephacryl S- 100, resultando em uma enzima 10,8 vezes mais pura com recuperação final de 4,2% (DA SILVA *et al.*, 2017).

Aspartato proteases do fungo *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 obtida de fermentação em estado sólido sobre farelo de trigo e da bactéria *Bacillus subtilis* SMDFS 2BMN715837 obtida de fermentação submersa foram capazes de serem usadas na fabricação do queijo Dambo (MAMO *et al.*, 2020). *Mucor thermohyalospora* MTCC 1384 e *Rhizopus azygosporus* MTCC 10195 produziram em fermentação em estado sólido sobre farelo de trigo com soja desengordurada, proteases capazes de coagular proteínas do leite de búfalo e de vaca (CHINMAYEE *et al.*, 2019). Proteases microbianas alcalinas e neutras possuem um papel importante no preparo de molhos de soja e outros derivados (SOUZA *et al.*, 2015). Tratamentos proteolíticos sobre caseína, soro de leite ou proteína de soja geram hidrolisados que podem ser incorporados a dietéticos e formulações médicas para diferentes tipos de usuários (KUMAR & TAKAGI, 1999; RAO *et al.*, 1998; RAMAMURTHY, UPADHYAY & KOTHARI, 1991).

Caseinases de plantas costumam apresentar atividades aspartato e serina proteásicas (PONTUAL *et al.*, 2012). A religiosina B, uma caseinase vegetal da espécie *Ficus religiosa* é uma serino protease (KUMARI, SHARMA & JAGANNADHAM, 2012). Os frutos de *Bromelia hieronymi* produzem enzimas cisteína proteases formadoras de coágulo de leite (BRUNO *et al.*, 2010). As flores de *Moringa oleifera* produzem aspartato, serina e cisteína proteases capazes de hidrolisar caseína (PONTUAL *et al.*, 2012). Entretanto, microorganismos já foram identificados como produtores de serino proteases com atividade hidrolítica sobre caseína, como a serino protease produzida por *Bacillus subtilis* que é capaz de hidrolisar azocaseína (LEIGHTON *et al.*, 1973) ou *Bacillus licheniformis* BL312 que produz serina proteases alcalinas capazes de coagular leite bovino (ZHANG *et al.*, 2019).

Entretanto, há algumas serino proteases protegidas por patente oriundas de fungos, como aquela serino-protease de *Mucor pusillus* que coagula enzimas do leite (CORNELIUS, ASMUS & STERNBER, 1982). As patentes depositadas para serina-proteases de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium equiseti* com diferentes usos foram depositadas por Juntunen *et al.* (2013) e Juntunen *et al.* (2015). O fungo *Mucor subtilissimus* URM 4133 teve uma serina-protease isolada através de rota que utilizou coluna de troca aniônica HiTrap DEAE Fast Flow com gradiente crescente de NaCl, onde a fração com atividade foi liofilizada e resuspendida para ser reaplicada na mesma coluna novamente, tendo sido concentrada duas vezes. Após duas corridas em troca iônica, a enzima foi aplicada em coluna de gel filtração resultando em 62% de recuperação, isolando a enzima de 30 kDa em 35 vezes (GOMES *et al.*, 2020).

2.9 Colagenases e gelatinases microbianas

Colagenases são enzimas capazes de executar a quebra do colágeno na sua forma nativa, de tripla hélice, ou desnaturada (RANI & POOJA, 2018). Já as gelatinases, são enzimas capazes de quebrar moléculas de gelatina, um produto da hidrólise parcial de colágeno (BONCI *et al.*, 2021; VAN PHUONG *et al.*, 2021). A gelatina pode ser produzida ao submeter o colágeno à ação da água fervente (VAN PHUONG *et al.*, 2021). O colágeno é a principal proteína estrutural, presente em diversas estruturas de organismos vivos, como ossos, músculos, pele e tendões (BADOEI-DALFARD, MONEMI & HASSANSHAHIAN, 2022). A

gelatina é uma molécula em altas quantidades em tecidos de animais, incluindo os seres humanos (BONCI *et al.*, 2021).

O colágeno é a proteína em maior quantidade nas matrizes extracelulares dos tecidos de mamíferos (RANI & POOJA, 2018). São moléculas formadas por triplas hélices supertorcidas compostas por 3 cadeias polipeptídicas de α -hélices formadas por resíduos de glicina, prolina e hidroxiprolina (NELSON & COX, 2014). São as principais proteínas usadas na fabricação de bebidas, alimentos, medicamentos e cosméticos (BADOEI-DALFARD, MONEMI & HASSANSHAHIAN, 2022).

Devido à estrutura resistente dos colágenos, apenas pela ação de algumas proteases podem ser degradadas, o que inclui cisteína proteases e metaloproteinases de mamíferos e também metaloproteinases microbianas (DUARTE, CORREIA & ESTEVES, 2016; ALIPOUR *et al.*, 2016, BHAGWAT, & DANDGE, 2018). Desempenha funções importantes em diferentes processos biológicos como a adesão celular e a formação de órgãos (BHAGWAT, & DANDGE, 2018). Os peptídeos obtidos através da quebra do colágeno possuem importância industrial e farmacêutica (DUARTE, CORREIA & ESTEVES, 2016; ALIPOUR *et al.*, 2016), enquanto as collagenases possuem sua utilização na indústria têxtil, alimentícia, médica e cosmética (DUARTE, CORREIA & ESTEVES, 2016; ALIPOUR *et al.*, 2016; BHAGWAT, & DANDGE, 2018; PAL & SURESH, 2016).

Colagenases bacterianas são capazes de hidrolisar tanto o colágeno nativo quanto o desnaturado, raramente são produzidas por bactérias não patogênicas (BADOEI-DALFARD, MONEMI & HASSANSHAHIAN, 2022). Frequentemente apresentam como limitação sua instabilidade em longos períodos de uso e o elevado custo de obtenção para uso industrial (BADOEI-DALFARD, MONEMI & HASSANSHAHIAN, 2022). Em se tratando de bactérias, espécies anaeróbias, bactérias do gênero *Clostridium*, apresentam as collagenases mais conhecidas e de maior disponibilidade para uso industrial (RANI & POOJA, 2018). Algumas bactérias são capazes de produzir gelatinases, que hidrolisam a gelatina em polipeptídeos menores, para facilitar a absorção de aminoácidos pela bactéria (VAN PHUONG *et al.*, 2021). A produção de gelatinases por organismos endofíticos é um fator de proteção para plantas do ataque de fungos patogênicos (VAN PHUONG *et al.*, 2021). As enzimas agem degradando a matriz extracelular

produzida por fungos fitopatogênicos, comprometendo a adesão dos mesmos à planta, impedindo o avanço da infecção (INOUE *et al.*, 2007). O crescimento do fitopatógeno *Magnaporthe oryzae* sobre o trigo pode ser debelado pela ação de uma metaloprotease, a gelatinase B (VAN PHUONG *et al.*, 2021). Também foram encontradas nas raízes de arroz, 76 isolados de bactérias endofíticas produtoras de gelatinases e outras enzimas com capacidade de combater o fungo *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (VAN PHUONG *et al.*, 2021).

Já foram encontradas atividades altas para gelatinases em algumas espécies de fungos. Park *et al.* (2018) relatou o isolamento de 88 fungos produtores de gelatinase, oriundos de massas de ovos do peixe da espécie *Arctoscopus japonicus*, sendo as espécies *Aspergillus candidus* SFC102207, *Beauveria felina* SFC101682, and *Penicillium cf. concentricum* SFC101540 identificadas como grandes produtores de gelatinases. Anju *et al.* (2018) relatou a produção de algumas enzimas de importância comercial, entre elas, collagenases produzidas por duas espécies de fungos patogênicos de nematoides: *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys conoides*. As atividades collagenolíticas e gelatinolíticas estão entre aquelas frequentemente estudadas em organismos patogênicos (BONCI *et al.*, 2021), incluindo aqueles dermatófitos, grandes produtores desse tipo de enzima (SHARMA *et al.*, 2017). BONCI *et al.* (2021) relatou o isolamento de fungos dermatófitos de origem clínica produtores de gelatinases, *Microsporum canis*, *Nannizzia gypsea*, *Nannizzia nana*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton sp.* e também isolados obtidos do ambiente de *N. gypsea*, *N. nana*. e *Trichophyton sp.*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar parcialmente a(s) oxidoredutase(s) e a(s) protease(s) produzidas pelo *A. ricini* por fermentação em estado sólido, empregando coprodutos e resíduos agroindustriais como meio de cultura.

3.2 Objetivos específicos

1. Testar diferentes resíduos e coprodutos agroindustriais para o cultivo em estado sólido do *A. ricini*;
2. Identificar atividades de diferentes oxidoredutases e proteases presentes nos extratos proteicos oriundos do crescimento fungico;
3. Descrever rotas de isolamento parcial para as enzimas extraídas;
4. Definir aplicações para as enzimas extraídas.

4 SEÇÃO EXPERIMENTAL I: ISOLAMENTO PARCIAL DE LACASE E DESCOLORAÇÃO DO AZUL DE BROMOFENOL

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Obtenção do fungo, resíduos e preparo de inóculo

O fungo estudado é identificado como *Amphobotrytis ricini* URM 5627, foi obtido da micoteca da Universidade Federal de Pernambuco. Os resíduos de bagaço de cana-de-açúcar, fibra de casca de coco e o pó de madeira, além do farelo de trigo, foram obtidos através de doação de estabelecimentos industriais da cidade de Maceió, Alagoas. Com exceção do farelo de trigo, todos foram secos e triturados no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, na cidade de Rio Largo. Os resíduos foram previamente submetidos à secagem sob circulação de ar a 50°C por 24 h e trazidos ao laboratório onde foram autoclavados a 121°C, 1 atm por 30 min e armazenados até o momento da utilização.

O inóculo foi preparado a partir de uma placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA). O fungo foi cultivado a 25°C por 21 dias e armazenado sob refrigeração a 8°C por 30 dias. Em seguida, fungo foi repicado sobre a superfície do meio de cultura BDA contendo 0,1% (m/m) de lignina para promover a indução da síntese de oxidoredutases. Após o crescimento do micélio, a placa foi armazenada em estufa microbiológica a 25°C por 21 dias. Esses inóculos foram usados na etapa de fermentação em estado sólido (FES).

4.1.2 Teste em placa de oxidação do ABTS

O teste foi executado de acordo com KAMESHWAR & QIN (2017) com modificações. Foi preparado meio Ágar Batata Dextrose em água deionizada, que foi autoclavado por 15 min a 121°C e depois teve adicionado 1 mM de ABTS previamente filtrado em filtro milipore® 0,22 µm. Cada placa de petri foi preenchida com 10 mL do BDA com ABTS. As placas contendo o meio foram deixadas em repouso sob radiação UV por 20 min. Após esse tempo, cada placa recebeu um disco de 1,5 cm do *A. ricini*, vedando-se as placas logo em seguida. As placas foram mantidas em estufa microbiológica por 25°C e observadas até a visualização do halo característico da presença de produção de lacases.

4.1.3 Testes de degradação de azul de Bromofenol em meio líquido e sólido

Os ensaios foram conduzidos em microplacas, foram executados em pH 5,0 a 100 mM em acetato de sódio e em pH 8,0 a 100 mM em Tris-HCl. Cada reação foi executada a partir de uma mistura de 180 µL do corante dissolvida na solução tampão e 20 µL do extrato bruto contendo atividade lacase-símile. O branco teve a amostra enzimática substituída pelo tampão de extração. Foram testados dois corantes alimentícios, verde e laranja, da marca Arcólor® em duas concentrações cada, 0,1% e 0,01% (v/v), onde as leituras foram feitas no comprimento de onda de 420 nm. Também foram testados os corantes têxteis azul e azul marinho da marca Tingecor Guarany® em duas concentrações cada, 0,01% e 0,1% (w/v). Tiveram as absorbâncias medidas a 600 nm. Foram também testados nas concentrações de 0,01% e 0,1% (w/v) as descolorações dos seguintes corantes em suas respectivas absorbâncias: Vermelho do congo (497 nm), vermelho de fenol (431 nm), vermelho de metila (429 nm), vermelho de rutênio (530 nm), vermelho da prússia (420 nm), azul de comassie (580 nm), azul de toluidina (630 nm), azul de metileno (664 nm), azul de bromofenol (600 nm), azul de remazol R (546 nm), rodamina B (546 nm), verde de bromocresol (614 nm) e cristal violeta (600 nm). As reações foram incubadas a 25°C em ambiente escuro, e as absorbâncias foram medidas no momento inicial da reação e a cada 24 h por 4 dias.

O teste de descoloração do Azul de Bromofenol em placa foi executado segundo TEKERE *et al.* (2001) com modificações. Foi dissolvido meio Agar Batata Dextrose em água deionizada. O meio foi autoclavado por 15 min a 121°C e depois adicionado 0,02% de azul de bromofenol previamente filtrado em filtro

milipore® 0,22 µm. Cada placa de petri foi preenchida com 10 mL do BDA com o corante. As placas contendo o meio foram deixadas em repouso sob radiação UV por 20 min. Após esse tempo, cada placa recebeu um disco de 1,5 cm do *A. ricini*, vedando-se as placas logo em seguida. As placas foram mantidas em estufa microbiológica por 25°C e observadas até a visualização de descoloração do azul de bromofenol, indicando a presença de lacases e a capacidade de processar o corante.

4.1.4 Seleção dos meios de cultura e do tempo de FES para a produção de oxidorreduções

Quatro resíduos ou coprodutos agrícolas foram testados na FES: farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, fibra de casca de coco e pó de madeira. Todos os resíduos e coprodutos foram esterilizados a 121°C e 1 atm por 30 min em uma autoclave vertical e armazenados à temperatura ambiente até o momento do uso. Cada 10 g de resíduo ou 5 g, no caso do bagaço de cana de açúcar, foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL, que foram esterilizados novamente a 121°C e 1 atm por 30 min em uma autoclave vertical. Os discos de 1,5 cm de diâmetro do meio Agar Batata Dextrose com 0,1% de lignina contendo o micélio foram colocados nos resíduos ou coprodutos agroindustriais. Os Erlenmeyers foram tampados com algodões previamente esterilizados por autoclave e mantidos a 25°C em repouso. Os tempos de incubação foram de 0, 7 e 14 dias. Em cada tempo, foram realizadas as extrações dos produtos liberados extracelularmente pelo *A. ricini*. Essas extrações foram feitas com a adição de solução tampão de concentração 100 mM de tartarato de sódio contendo 5 mM de EDTA em pH 3,5, em uma relação de 20 mL de solução para cada 10 g do substrato. As extrações no bagaço foram executadas com 20 mL de solução extratora para cada 5 g de resíduo. Após 5 min de contato da solução extratora com os cultivos sólidos, as extrações foram filtradas em papel filtro e centrifugadas por 15 min, 4°C a 9000 x g. Os sobrenadantes foram coletados e designados como extrato proteico bruto (EPB). Os EPBs tiveram suas atividades oxidorreduções investigadas por diferentes métodos espectrofotométricos utilizando substratos enzimáticos comerciais para diferentes enzimas e o teor de proteínas das extrações foi quantificado pelo método de Bradford (1976), a fim de verificar qual melhor meio de cultivo e tempo para a produção dessas enzimas.

4.1.5 Quantificação de atividade de enzimas oxidoredutases

Foram executados ensaios de atividade para diferentes enzimas oxidoredutases. Foram feitos testes de atividade para as enzimas manganês peroxidase, através do ensaio descrito por Paszczyński, Crawford & Huynh, (1988), para a lignina peroxidase pelo método de Magalhães *et al.* (1996), para a atividade tirosinase como mensurada por No *et al.* (1999) e para a atividade peroxidase por método descrito por Simões-Alves *et al.* (2019).

As reações de atividade para a presença de lacase foram executadas em microplacas com volume total de 200 µL medindo a oxidação enzimática do ABTS segundo relatado por Afreen *et al.* (2017). A atividade de formação do cátion ABTS⁺ foi calculada de acordo com a fórmula abaixo, baseada na definida por Holme & Pech (1996), com modificações:

$$\text{Atividade (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_t \text{ (mL)} \times 10^6}{\epsilon \times t \text{ (min)} \times V_s \text{ (mL)}}$$

Onde o $\epsilon=36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ é o coeficiente de extinção do ABTS⁺ em comprimento de onda de 420nm; o ΔA é a variação entre a absorbância final e inicial da reação, V_t é o volume total da reação e V_s é o volume usado de amostra na reação.

Cada extração teve a atividade aferida por uma triplicata de reações compostas por 160 µL de solução tampão a 100 mM de tartarato de sódio + 20 µL de extrato enzimático + 20 µL de substrato a 1 mM, pelo acréscimo da absorbância nos comprimentos de onda de 420 nm para o ABTS. As medições de atividade tiveram como base a diferença entre a medição final da reação e aquela no momento inicial da reação, relativo à adição do substrato. As reações foram realizadas 25°C, 60 min, exceto quando discriminado. Foram realizados também testes de atividade sobre diferentes substratos enzimáticos processados por lacases. Foram testados os substratos Siringaldazina (DEDEYAN *et al.*, 2000) Iodeto (KAMESHWAR & QIN, 2017), resveratrol, medindo atividade estibeno oxidase (PEZET, PONT & HOANG-VAN, 1992) e lignina nitrada (AHMAD *et al.*, 2010).

4.1.6 Precipitação salina

No EPB com maior atividade enzimática de oxirredutases foram realizados fracionamentos por meio de adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em cinco faixas saturação: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%, de acordo com Santos *et al.* (2016). Cada ciclo é composto por adição de sal, um estágio de repouso sob refrigeração a 8°C por uma hora, e por fim, centrifugação, onde o sobrenadante é levado para o próximo ciclo de precipitação, enquanto o corpo de fundo é ressuspenso em solução tampão de extração. As centrifugações foram feitas por 15 min em centrífuga de micro tubos Interprise® a 8°C. A fração com maior atividade enzimática foi escolhida para dar segmento ao processo de isolamento das enzimas.

4.1.7 Diálise

A diálise foi feita utilizando uma membrana de diálise, onde as frações advindas da precipitação com atividade enzimática foram colocadas e vedadas através de presilhas plásticas nas extremidades. Para que o sal fosse removido das amostras, foi feita uma diálise com 3 trocas de 500 mL de solução tampão 100 mM de tartarato de sódio (pH 3,5) de 2 h cada e uma última troca em *overnight*. Após esse processo, a amostra foi levada à cromatografia de troca iônica.

4.1.8 Cromatografia de troca iônica

A coluna contendo volume de 50 mL de resina trocadora de ânions DEAE-Sephacrose *Fast Flow* foi usada para cromatografar as frações anteriormente dialisadas. A cromatografia foi iniciada com equilíbrio de três volumes de coluna com solução tampão tartarato de sódio 100 mM pH 8,0. 0,790 mL da amostra dialisada foi centrifugada a 25°C por 1 min a 14000 rpm e o sobrenadante então aplicado ao sistema ÄKTA PURE (GE)®, que eluiu as proteínas da amostra em uma lavagem de 1 volume de coluna da solução de equilíbrio e em seguida em um gradiente de NaCl (0-100%) em 10 volumes de coluna, finalizando com 1 volume de 100% do sal. As frações de 12 mL cada foram coletadas em tubos falcon de 15 mL cada. O fluxo da fase móvel pela coluna foi de 0,5 mL/min em todas as etapas da cromatografia. Alíquotas das frações foram analisadas espectrofotometricamente a 280 nm para avaliar a presença de proteínas tiveram suas atividades enzimáticas medidas.

4.1.9 SDS-PAGE

As eletroforeses em gel de poliacrilamida foram realizadas para verificar o progresso do isolamento das enzimas. Os géis de empilhamento e separação foram preparados nas concentrações de 4 e 12% respectivamente, segundo descrito em Laemmli (1970). Foram aplicadas amostras com adição da solução tamponante (0.5 M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 10% Glicerol; 5% 2-Mercaptoetanol; 0,001% de azul de bromofenol) em diferentes canaletas cada após aquecimento de 5 min a 100°C e subsequente centrifugação. A corrida foi feita a voltagem constante de 120 mV e a revelação das proteínas foi feita através da coloração com nitrato de prata.

4.1.10 Coloração com nitrato de prata em gel de poliacrilamida

Para a coloração com prata, foram empregadas duas soluções. Solução A (0,4 g de AgNO_3 em 2 mL de água deionizada) e solução B (126 μL de NaOH 10 M + 10,4 mL de água deionizada). A solução A foi vertida sobre a solução B em agitação e o volume foi ajustado com adição de água deionizada até 50 mL. Após a corrida das amostras em eletroforese (SDS-PAGE), o gel foi imerso na mistura das soluções A e B por 15 min. Depois dos 15 min passados, o gel foi lavado três vezes em água deionizada por 3 min e então foi adicionada a solução reveladora recém-preparada composta por 50 mL H_2O + 25 μL de formaldeído 37% + 25 μL ácido cítrico a 10 %, onde o gel permaneceu até que fosse possível a visualização os perfis eletroforéticos das amostras. A reação é interrompida e armazenada em solução descorante de 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

4.1.11 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada através do método de Bradford (1976). A curva padrão de quantificação de proteína foi determinada com diferentes concentrações de albumina bovina sérica. As triplicatas para a quantificação do teor proteico das amostras foram feitas em microplacas de 96 poços, com um volume total de 200 μL para cada reação, composta de 190 μL de reagente de Bradford e 10 μL da amostra testada, onde o branco substituiu o volume da amostra pela sua respectiva solução extratora.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Obtenção do fungo, resíduos e preparo de inóculo

Os resíduos/co-produtos permaneceram viáveis e sem alterações visíveis a olho nu após a secagem, autoclavagem e armazenamento. Ao fim do período de 21 dias de cultivo em meio indutor, a placa evidencia o crescimento do fungo na forma de um halo cinza que apresenta regiões mais claras e, mais notavelmente na região do inóculo (figura 1) uma coloração mais escura. Além disso, o micélio apresentou aspecto levemente aveludado.

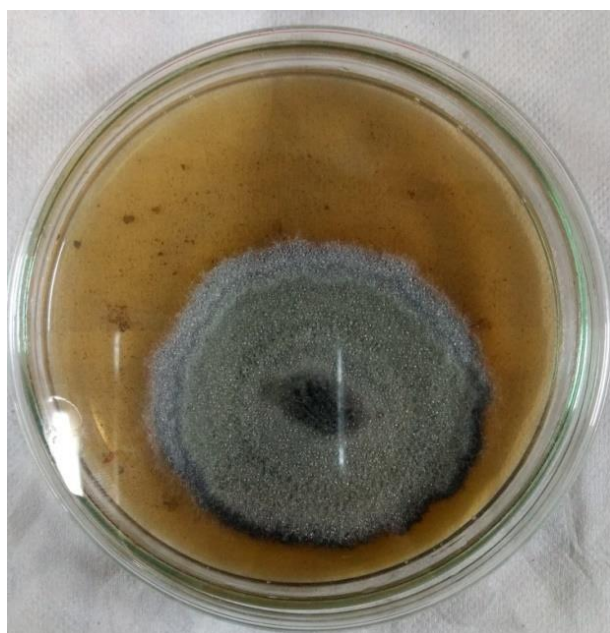


Figura 1. Placa de Petri contendo meio de cultura Batata-dextrose-ágar e 0,1 % (w/w) e micélios de *A.ricini* após 21 dias de incubação. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2 Teste em placa de oxidação do ABTS

A seguir, na figura 2, podemos visualizar as placas com os meios de crescimento contendo ABTS antes e após do crescimento do fungo.

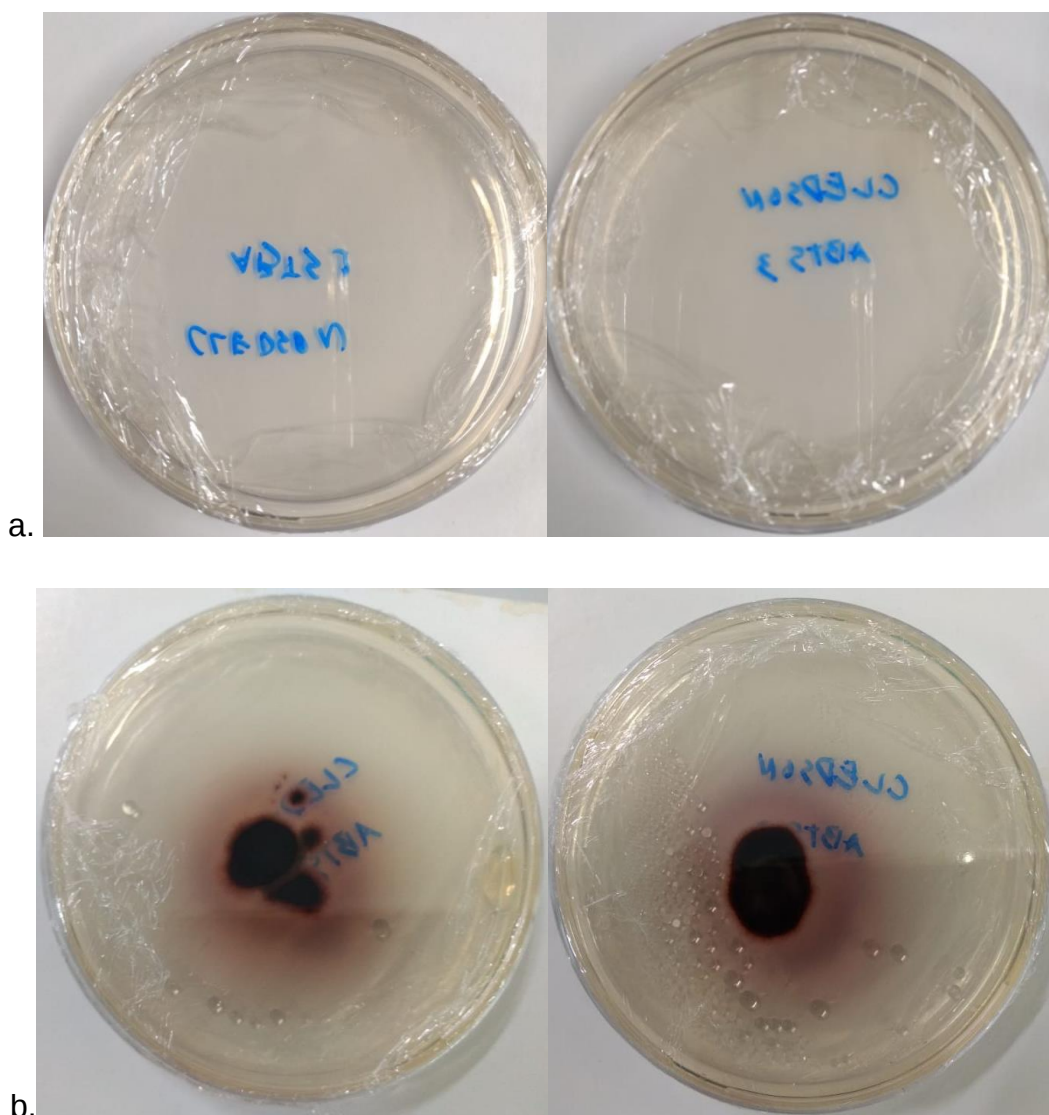


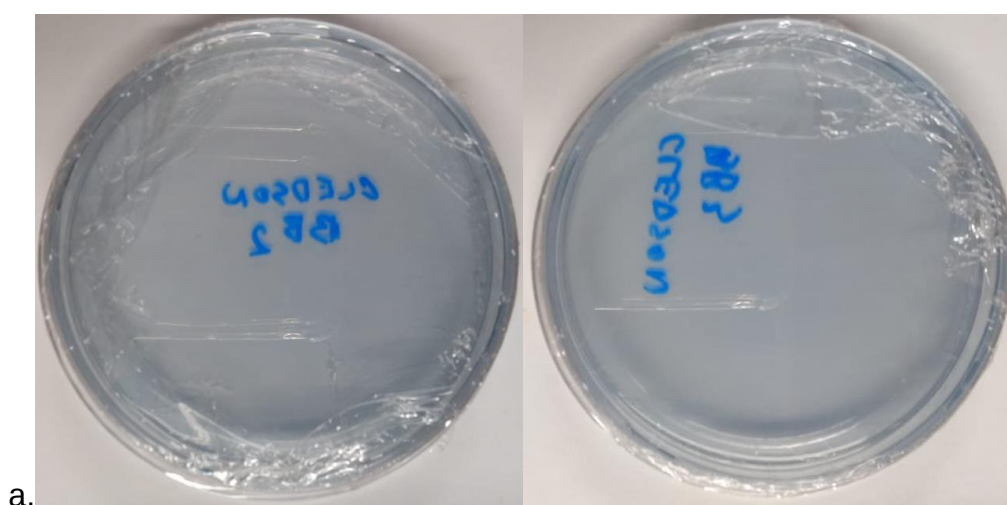
Figura 2. Teste qualitativo em placa para atividade lacase. O meio Agar Batata Dextrose contém ABTS. a. Placas antes da adição do fungo na placa. b. Placas com os fungos após 7 dias de crescimento no meio. O halo de cor púrpura ao redor do micélio é referente à oxidação do substrato e mostra produção da enzima.

Kameshwar & Qin (2017) descrevem como sinal típico de atividade lacase, nesse teste, a presença de um halo verde e um halo de cor púrpura. Entretanto, é possível encontrar sinais diferentes de produção de lacase na literatura. Patel & Bhaskaran (2020) obtiveram no teste de lacase em placa apenas um halo verde em torno do fungo *Peyronellaea pinodella* BL-3/4. O mesmo sinal de cor verde foi obtido pelas espécies *Trichoderma asperillum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus* foi obtido por Ambatkar et al. (2021). Porém, Vipotnik, Michelin & Tavares (2022) visualizaram formação do halo de cor púrpura no crescimento cepas de *Trametes versicolor*. Fernández-Remacha et al.

(2022) também encontrou nos testes em placa, um halo arroxeado proveniente da oxidação do ABTS pela enzima lacase dos fungos *Gliomastix murorum* e *Onidiobolus thromboides*. Importante salientar que existem diferenças na execução dos ensaios aqui citados, e que podem ter relação com diferenças nos resultados. A oxidação enzimática de ABTS na ausência de peróxido de hidrogênio é algo próprio de lacases, que comprova a presença de lacases verdadeiras (KUMAR *et al.*, 2016). Como pode ser observado, podemos afirmar que o fungo estudado é capaz de produzir lacases em meio gelatinoso que são capazes de oxidar o ABTS.

4.2.3 Testes de degradação de azul de Bromofenol em meio líquido e sólido

Os testes de descoloração em meio líquido não demonstrou qualquer nível de eficácia para nenhuma das substâncias testadas nas condições relatadas. A seguir, na figura 3, os registros visuais do cultivo em placa do fungo *A. ricini* em meio Agar Batata Dextrose contendo 0,02% de Azul de Bromofenol.



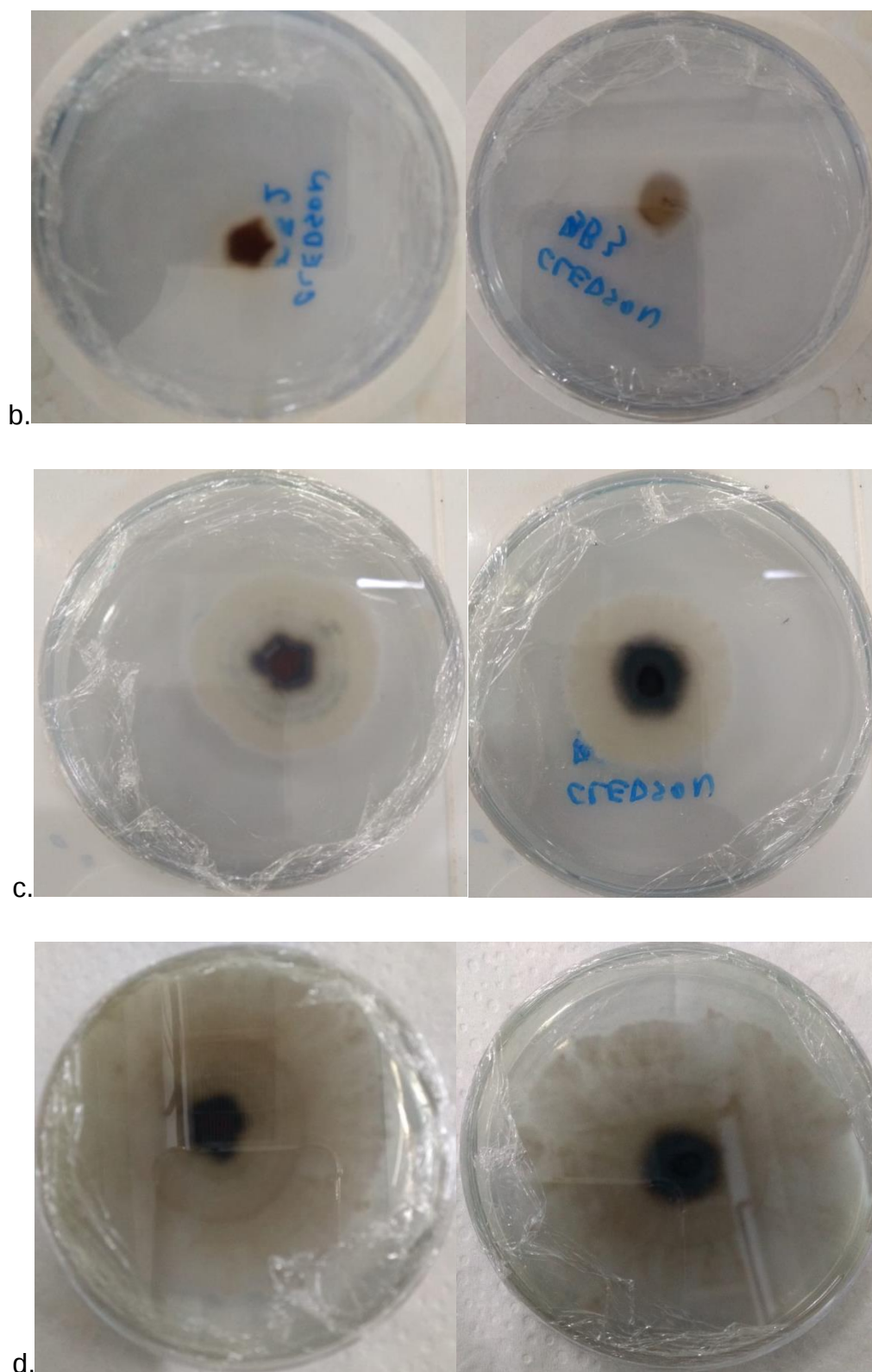


Figura 3. Teste qualitativo em placa de descoloração do azul de bromofenol. O meio Agar Batata Dextrose contém Azul de Bromofenol. a. Placas antes da adição do fungo na placa. b. Placas com os fungos após 7 dias de crescimento no meio. c. Placas após 14 dias de crescimento e d. Placas após 21 dias de crescimento. É perceptível uma gradativa diminuição da cor azul original da placa à medida que o fungo cresce.

É possível observar a clarificação do meio de coloração azul clara na medida em que há crescimento do fungo. Outros ensaios de descoloração em placa de outros corantes já foram realizados, como o cultivo de uma cepa de *Aspergillus* spp. para degradação em placa de corante Azul de Comassie (DAVE, BHARTI & MEENAXI, 2021). Tekere (2001) relata esse ensaio como um experimento qualitativo indicativo da presença de lacase, e o sinal típico é o clareamento do meio. Kumar *et al.* (2016) descreve degradação do azul de bromofenol em meio Agar Batata Dextrose como consequência do crescimento da espécie *Aspergillus flavus*, apresentando clareamento em forma de halo em torno do micélio do fungo e Singh & Singh (2010) Descreve degradação do mesmo corante para mesmo fungo.

Entretanto, nenhum dos artigos citados descreve ou demonstra de forma clara a completa descoloração no meio. É possível afirmar, através das imagens apresentadas, que o *A. ricini* é um fungo capaz de processar o Azul de Bromofenol em meio gelatinoso, que é uma característica interessante, pois indica a possibilidade de decompor corantes através da produção de enzimas, o que pode propiciar seu uso para biorremediação. O tempo necessário para descoloração completa em placa, 21 dias, também pode explicar por que não foi possível detectar degradação dos corantes testados nos ensaios em fase líquida, que duraram apenas 4 dias. São necessários mais experimentos para confirmar se é possível a descoloração do Azul de Bromofenol ou outro corante em fase líquida.

4.2.4 Seleção dos meios de cultura e do tempo de FES para a produção de oxidorreduções

Foram observados crescimentos de micélios em todos os resíduos e coprodutos testados. Em todos eles, houve algum crescimento do *A. ricini* em comparação aos resíduos não inoculados. Os melhores crescimentos do micélio com a coloração característica, acinzentado com partes esbranquiçadas, foram observados mais pronunciadamente no farelo de trigo, onde no dia 7 de incubação já podia ser observada a tomada completa do resíduo pelo fungo, algo que só foi visualizado no bagaço de cana no dia 14, embora no dia 7 já fosse possível observar algum crescimento. Sobre o pó de madeira, foi visualizada uma pequena região, na superfície do resíduo, levemente esbranquiçada, e na casca

de coco, um pequeno micélio em torno do disco de inoculação, totalmente em cinza-escuro. Tanto na madeira quanto na casca de coco só foi possível observar algum sinal de crescimento do micélio no dia 14. As extrações feitas nos dias 0, 7 e 14 foram realizadas e cada uma delas teve a atividade aparente de lacase, medida pela capacidade de oxidação do ABTS (Tabela 1).

Extrato	Tempo de incubação (Dias)	Atividade Total (U)
Farelo de Trigo	0	0,935
	7	35,41
	14	31,01
Bagaço de Cana	0	0
	7	0
	14	43,91
Pó de Madeira	0	0
	7	0
	14	0
Fibra de Coco	0	0
	7	0
	14	0

Tabela 1. Atividades totais das extrações para a presença de lacase. Os três extratos do trigo, e a extração do dia 14 em bagaço de cana foram os únicos a produzir enzimas oxidantes de ABTS. O ultimo dia de extração para o bagaço de cana apresentou a maior produção dessas enzimas.

É possível observar que apenas as fermentações sobre farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar produziram a atividade de lacase (Tabela 1). Esses extratos foram então quantificados quanto à presença de proteína. Assim, a atividade específica desses EPBs foram obtidas (Tabela 2).

Extrato	Tempo de Incubação (Dias)	AtividadeTotal (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)
Farelo de Trigo	0	0,94	6,44	0,15

	7	35,41	3,38	10,48
	14	31,01	9,83	3,15
Bagaço de Cana	0	0	0,12	0
	7	0	0,31	0
	14	43,91	0,91	48,25

Tabela 2. Atividades totais, proteínas totais e atividade específica das extrações para a presença de lacase.

Podemos constatar que apenas os cultivos sobre bagaço de cana e farelo de trigo apresentaram produção detectável de enzimas oxidantes de ABTS, o que condiz com o resultado esperado, que era obter mais enzima dos resíduos onde houvesse maior crescimento fungico. Onde não houve proliferação significativa do fungo, também não foi detectada capacidade de oxidação do ABTS, atribuindo ao *A. ricini* URM 5627 a produção da enzima. Atrelado a esse tipo de atividade, está a presença da enzima lacase, que se faz presente em microorganismos que se nutrem de matéria vegetal pela necessidade de degradar a parede celular de vegetais para acessar nutrientes. Como já é observada na natureza a presença do *A. ricini* na mamoneira e em outras espécies de plantas, é esperado que o fungo produza esse tipo de enzima. Ligninases, celulasas e hemicelulasas são enzimas importantes na desconstrução de matéria vegetal pelas suas capacidades de agir sobre seus respectivos polímeros constitutivos da parede celular dos vegetais. A presença de uma celulase já foi confirmada pelo isolamento de uma endo-1,4- β glucanase (SILVA *et al.*, 2018).

Não foi extraído teor detectável de atividade do tipo lacase, que pode ser explicada pela presença de nutrientes acessíveis até o dia 7 no resíduo. No trabalho de Silva *et al.* (2018), a celulase foi isolada após 6 dias de cultivo sobre bagaço de cana, o que indica que o fungo pode estar obtendo glicose diretamente do resíduo para seu crescimento como fonte de carbono e depois a partir da celulose do resíduo, quando os açúcares livres se esgotam. A presença de lacase pode indicar uma necessidade de buscar mais glicose e outros nutrientes à medida que sua obtenção a partir da celulose exposta não é mais suficiente e o crescimento visível do micélio sobre o bagaço do dia 7 ao dia 14 indica que a enzima oxidante de ABTS estudada nesse trabalho pode ter um papel importante no crescimento saprófito do fungo. É possível que o fungo

produza enzimas ligninolíticas para acessar mais nutrientes. A lacase é a principal enzima produzida por microorganismos na degradação de lignina, e o fato de que a enzima extraída possui capacidade de produzir ABTS^+ como produto indica que a enzima possa ser uma lacase, posto que o ABTS é o substrato mais usado no estudo de lacases. Outra evidência de que a enzima é produto de crescimento do fungo é o crescente teor de proteína à medida que o tempo avança, chegando à sua maior concentração no dia 14, o tempo que apresentou maior atividade enzimática (Tabela 2). O aumento do teor proteico pode ocorrer devido ao crescimento do fungo, bem como o aumento da produção de enzimas extracelulares.

No resíduo de trigo, no dia 0, foi detectada uma presença muito pequena de oxidação de ABTS^+ , que parece ser oriundo do próprio farelo de trigo, seja por ação enzimática, seja pela presença de substâncias químicas de maior potencial oxidante que o ABTS. No dia 7 de cultivo sobre o trigo é observado uma elevação de 69,87 vezes na atividade específica da lacase, que pode ser fruto de dois fatores. Um deles é o aumento da produção da enzima, que deve estar ligado ao crescimento do fungo e sua necessidade na busca de nutrientes no interior das células vegetais. O outro é a diminuição do teor de proteína extraída no dia 7 em relação ao dia 0, que talvez ocorra devido ao consumo de proteínas presentes no resíduo pelo fungo para seu desenvolvimento, posto que no dia 0 não há crescimento do fungo, enquanto no dia 7 é possível observar o micélio presente no resíduo inteiro.

É importante apontar que a lacase possa atuar sobre as células do trigo para facilitar, entre outras coisas, o acesso a proteínas necessárias ao seu desenvolvimento, já que no dia 7 a atividade atribuída à lacase é a maior de todos os outros cultivos sobre farelo de trigo. No dia 14, a atividade específica então sofre um decréscimo de 3,33 vezes com um aumento do teor de proteína acima do patamar do dia 0 e da diminuição de atividade de lacase. Isso pode ser explicado por uma dinâmica cíclica de produção de enzimas segundo as necessidades do fungo. O fungo consome os nutrientes mais facilmente viáveis até o momento de seu esgotamento, e então, em busca de mais nutrientes, pode produzir enzimas degradadoras de matéria lignocelulósica para expor aqueles nutrientes protegidos pela parede celular do resíduo. Os números para a atividade da suposta lacase e o teor proteico da extração podem ser referentes a

um momento de grande acesso de proteínas já liberadas pela ação de enzimas lignocelulolíticas, tornando a ação dessas enzimas, nesse momento menos necessária, explicando o declínio da oxidação do ABTS na extração. Importante lembrar que a elevação das concentrações de proteínas no extrato pode estar dificultando o acesso do ABTS ao sítio ativo da pré-suposta lacase, e a liberação de proteínas do resíduo pode induzir a produção de proteases, que podem estar agindo sobre as lacases, degradando-as, colaborando novamente para o decréscimo de sua atividade. Essa dinâmica cíclica, em tese, também explicaria a produção da enzima em grande quantidade no cultivo sobre o resíduo de cana.

Entretanto, afirmar que o ciclo composto por consumo de nutrientes até o esgotamento, e posterior produção enzimática para liberação de mais nutrientes intracelulares do resíduo, a fim de continuar o crescimento do micélio é, nesse momento, peremptório. São necessários mais estudos com relação ao desenvolvimento do fungo sobre os resíduos até o final de seu ciclo, como ensaios de capacitância, matéria seca e obtenção de dados metabólicos do fungo (BOTELLA; HERNANDEZ; WEBB, 2019). O resíduo que apresentou a maior produção de atividade atribuída à lacase, tanto nos valores absolutos quanto relativo ao teor de proteínas, foi o cultivo sobre bagaço de cana após 14 dias de cultivo, que foi usado para as tentativas de isolamento da enzima oxidante de ABTS. O extrato será a partir daqui, referenciado como EPB.

Um fato, porém, chama atenção com relação à monitoração de atividade de lacase. O ABTS é o substrato mais usado para indicar presença da enzima em amostras, porém, é o menos específico desses substratos, possuindo potencial de oxidação consideravelmente menor que outros substratos cromogênicos para localizar a mesma atividade, sendo mais susceptível à oxidação. Nenhum dos extratos com atividade oxidante de ABTS, entretanto, mostrou capacidade oxidante da siringaldazina. A siringaldazina é descrita como um substrato com maior potencial de oxidação, mais específico na pesquisa de lacases e um substrato fenólico, mais próximo, portanto, dos anéis que compõem a lignina, substrato ao qual essa enzima degrada na natureza. O ABTS não é um substrato fenólico, ele apresenta outros tipos de anéis em sua estrutura química. Contudo, muitas enzimas são identificadas como lacases em diversos trabalhos usando apenas o ABTS como sonda ao longo do isolamento e caracterização.

4.2.5 Precipitação salina

O extrato bruto foi fracionado em cinco partes, e suas atividades na produção de ABTS+ foram medidas separadamente (Tabela 3). Essa tabela mostra as relações quantitativas de atividade de cada fração para indicar onde a lacase foi concentrada.

Amostras	Atividade Total (U)
EPB	4,69
0-20%	0
20-40%	0
40-60%	0,3335
60-80%	1,093
80-100%	0

Tabela 3. Atividades totais do extrato bruto e de suas frações obtidas na precipitação salina. Apenas as frações 40-60% e 60-80% apresentaram atividade para a lacase na precipitação.

As amostras com atividade foram quantificadas quanto a seus teores de proteína, e comparadas ao extrato bruto em relação à suas atividades específicas (Tabela 4).

Amostras	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação
EPB	4,69	0,28	16,75	100%
40-60%	0,33	0,04	8,25	7,04%
60-80%	1,09	0,038	28,68	23,24%

Tabela 4. Dados de atividade, proteína, atividade específica e recuperação do extrato e das frações com atividade lacásica. Os dados mostram um enriquecimento da atividade monitorada na fração 60-80% em relação ao teor proteico, como mostrado pelos valores de atividade específica.

A fração 40-60% reteve 7,04% apenas da atividade original do extrato, enquanto a fração 60-80% reteve 23,24%, tendo praticamente a mesma quantidade de proteína (Tabela 4). A atividade específica da segunda fração é

maior que a da primeira porque embora a concentração de proteína seja praticamente a mesma, a atividade de oxidação do ABTS é maior na fração 60-80%. Isso indica que a fração mais rica na enzima estudada é a fração 60-80%, pois ela está em maior quantidade em meio ao conjunto de proteínas que compõem essa fração. A diferença de atividades em duas frações diferentes no fracionamento salino pode indicar a presença de mais de uma isoforma da mesma enzima produzida pelo fungo, posto que mesmo lacases de um mesmo organismo possam ter afinidades diferentes para diferentes substratos enzimáticos. Já foram isoladas isoformas de lacases que precipitaram em frações diferentes do *salting out* apresentando diferentes atividades na oxidação do ABTS. Embora a precipitação salina demonstre diferentes atividades para a oxidação do ABTS nas duas frações, também é possível que sejam oriundas da mesma enzima que apenas distribuiu de maneira diferente sua atividade em duas frações adjacentes no *salting out*. Isso só será possível de afirmar após o isolamento completo da(s) enzima(s). Na eletroforese em gel de poliacrilamida em condição redutora não foi possível visualizar diferenças significativas na quantidade de bandas de proteínas que compõem o extrato e suas frações, incluindo as canaletas 4 e 5, correspondentes às frações com atividade (figura 2). Foram unidas ambas as frações para expô-las ao processo de diálise, a fim de remover o sal usado na precipitação para que este não interferisse na cromatografia de troca iônica.

1 2 3 4 5 6



Figura 4. Gel de SDS-PAGE corado com nitrato de prata. As canaletas mostram o perfil proteico do extrato bruto e das frações da precipitação: 1) Extrato bruto; 2) 0-20%; 3) 20-40%; 4) 40-60%; 5) 60-80% e 6) 80-100%.

4.2.6 Diálise:

A diálise foi executada a fim de remover o sulfato de amônio. Foi feito o cálculo de atividade das frações antes e depois da diálise.

Amostra	Atividade (U)	Recuperação
40-80%	0,33	100%
Dialisado	0,19	57,58%

Tabela 5. A atividade total da amostra disponível das duas frações unidas antes (40-80%) e depois da diálise.

A diálise diminuiu a atividade total da amostra em 42,42% (Tabela 5). De alguma forma, mesmo sob resfriamento durante todo o processo, a enzima perdeu boa parte de sua atividade. É possível que a enzima seja sensível ao resfriamento, embora lacases fúngicas costumem se manter estáveis em temperaturas mais baixas. Entretanto, é sabido que algumas enzimas possam perder estabilidade após diálise. A amostra dialisada foi levada a uma cromatografia de troca iônica.

4.2.7 Cromatografia de troca iônica

As proteínas presentes na amostra foram adsorvidas, fato que foi confirmado pela liberação de diferentes sinais de proteína ao longo da lavagem e principalmente durante a aplicação do gradiente de sal (Gráfico 1). Foram desorvidas proteínas até o fim da corrida cromatográfica, eluídas em diferentes concentrações de NaCl através de um gradiente crescente. Os primeiros 6 mL coletados contém toda a atividade lacásica da cromatografia, o que corresponde a um volume menor que o volume morto da coluna. Cromatografias de trocadores fracos como a DEAE-Sepharose, embora frequentemente usados no isolamento de lacases, geralmente não são conduzidos em corridas de pHs tão ácidos quanto o usado nessa corrida. Provavelmente, a fase móvel de pH 3,5 limitou a ionização dos grupamentos ionizáveis da resina pelo excesso de H^+ em

solução. Por outro lado, o excesso de prótons pode também ter repelido a enzima também carregada muito positivamente ao ponto de expulsá-la da coluna mais rápido do que o fluxo da cromatografia permitiria usualmente.

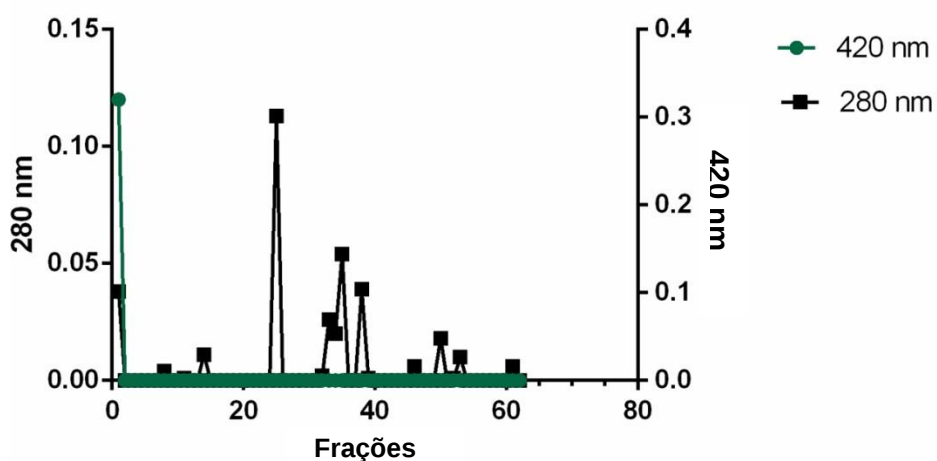


Gráfico 1. Perfil cromatográfico referente à estimativa de proteína das frações (280 nm) e suas respectivas absorbâncias de atividade (420 nm). A única fração com atividade é a primeira fração da corrida cromatográfica (F1).

Embora a enzima não tenha sido adsorvida pela coluna, sendo coletada completamente quase simultaneamente à injeção da amostra na coluna, a cromatografia foi capaz de separar diferentes proteínas (Gráfico 1). No gel de eletroforese podemos observar o perfil proteico da amostra que reteve atividade (Figura 5).

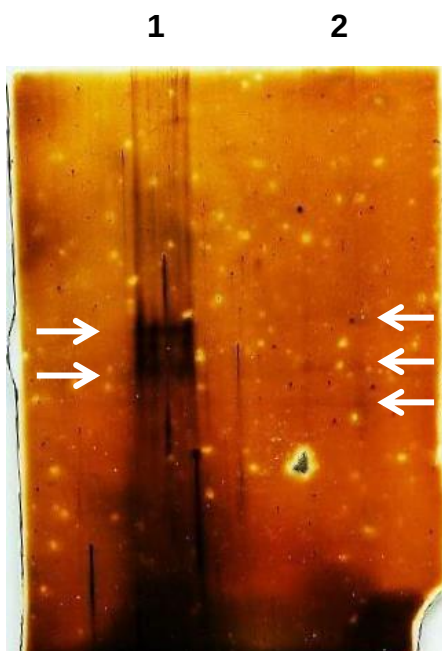


Figura 5. Gel de SDS-PAGE corado com nitrato de prata. 1) F1 com 2-mercaptoetanol e 2) Sem 2-mercaptoetanol. Na canaleta 1 é possível observar duas bandas pretas ao centro do gel bem próximas, enquanto na canaleta 2 é possível visualizar três bandas mais claras.

É esperado em géis de eletroforese que amostras expostas a agentes redutores fiquem mais marcadas em coloração com azul de comassie ou nitrato de prata, pois essas proteínas estão mais expostas à interação aos agentes de coloração devido ao rompimento de pontes dissulfeto. Entretanto apenas duas das bandas parecem possuir a mesma massa em ambos os géis, sendo a excessão a terceira banda mais baixa presente na canaleta 2 (Figura 3). A redução de ligações dissulfeto de proteínas por 2-mercaptoetanol pode fazer com que cadeias polipeptídicas se dissociem, decompondo proteínas multiméricas. A zona escura na canaleta um pode estar escondendo proteínas de baixa massa molecular que podem ser unidas por pontes dissulfeto, que quando íntegras, ajudam a sustentar a estrutura nativa de proteínas com massas mais altas, o que poderia explicar a ausência da banda mais baixa na canaleta 1.

Ainda sim, é possível reconhecer a considerável diminuição de bandas que essa fração oriunda da cromatografia apresenta em relação ao extrato bruto e as frações do *salting out*. Outro dado que aponta para a remoção de contaminantes em relação às etapas anteriores é o aumento da atividade (Tabela 6).

Amostras	Atividade (U)	Recuperação
Extrato Bruto	4,69	100%
40-80%	1,42	30,28%
Dialise	0,19	4,05%
DEAE-Sepharose	8,88	189,34%

Tabela 6. Atividades totais de cada etapa da purificação parcial da lacase. As percentagens de recuperação são calculadas a partir da atividade absoluta de extrato bruto.

A atividade total da lacase diminui a cada etapa realizada. Porém, a cromatografia produz uma amostra com atividade superior à do extrato bruto (Tabela 6). Esse efeito pode ser explicado pela remoção de algum inibidor reversível presente na amostra através da cromatografia. Esse inibidor pode ser

algum inibidor produzido pelo fungo para controlar a atividade de sua própria enzima em momentos inoportunos para sua atividade catalítica, já que as enzimas costumam ser acompanhadas de seus respectivos inibidores naturais em vários seres vivos. Existe a possibilidade da solução de extração que possui pH muito ácido extrair alguma molécula presente no resíduo da cana que atue como inibidor da lacase. Ainda tentando explicar esse salto de atividade em relação ao extrato bruto é importante chamar atenção para a presença de EDTA na solução de extração. O EDTA é uma espécie química que é capaz de complexar diferentes íons metálicos e a lacase é um tipo de enzima que possui múltiplos íons Cu^{+2} em seu sítio catalítico. É sabidamente capaz de inibir atividade lacase em testes *in vitro*. O EDTA pode estar interagindo com o sítio ativo das enzimas ou sequestrando o cobre da enzima, impedindo-as de oxidar o ABTS nas reações cromogênicas. Entretanto, é necessário apontar uma inconsistência na possibilidade da remoção do EDTA na cromatografia ser o responsável pela alta recuperação: As amostras que apresentam atividade para a lacase foram submetidas à diálise, que é relatado como procedimento suficiente para a remoção de inibidores reversíveis. É possível que o EDTA no pH da solução extratora acabe interagindo mais fortemente com o cobre na enzima, de forma que só a diálise não seja capaz de removê-lo da lacase, o que só acontece com a aplicação da amostra em uma resina de troca aniônica.

Como a membrana de diálise usada tinha poros de 30 kDa, qualquer molécula até essa massa pode ter sido eliminada da amostra, o que inclui o EDTA. É possível que alguma proteína produzida pelo próprio fungo com mais de 30 kDa seja responsável pela redução da atividade após a diálise pela sua retenção no interior da membrana e então seja removida da presença da lacase na cromatografia. Qualquer que seja a natureza do inibidor é importante salientar que inibidores enzimáticos reversíveis podem proteger suas enzimas da perda de suas estabilidades, o que ajudaria a explicar a grande recuperação obtida. No entanto, serão necessários mais estudos para explicar o ganho de atividade ao final da rota aqui proposta.

5 SEÇÃO EXPERIMENTAL II: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE ENZIMAS COAGULANTES DE LEITE

5.1 Materiais e métodos

5.1.1 Obtenção do farelo de trigo, do fungo e preparo de inóculo

O farelo de trigo usado na fermentação em estado sólido, foi obtido do Empório 4 Estrelas®. O fungo estudado é identificado como *Amphobotrys ricini* URM 5627, foi obtido da micoteca da Universidade Federal de Pernambuco. O inóculo foi preparado a partir de uma placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura ágar batata dextrose (BDA). O fungo foi cultivado a 25°C por 21 dias e armazenado sob refrigeração a 8°C por 30 dias. Em seguida, fungo foi repicado sobre a superfície do meio de cultura BDA contendo 0,1% (w/v) de lignina. Após o crescimento do micélio, a placa foi armazenada em estufa microbiológica a 25°C por 21 dias. Esses inóculos foram usados na etapa de fermentação em estado sólido (FES).

5.1.2 FES para a produção de proteases

O farelo de trigo usado foi adquirido através de compra na empresa Empório 4 Estrelas ®. Cada 10 g de farelo usados foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL e esterilizados a 121°C e 1 atm por 30 min em uma autoclave vertical. Os discos de 1,5 cm de diâmetro do meio Agar contendo o micélio foram colocados nos Erlenmeyers contendo farelo. Os Erlenmeyers foram tampados com algodões também esterilizados por autoclave e mantidos a 25°C em repouso, em estufa microbiológica por 14 dias. A extração foi realizada com a adição de solução tampão de concentração 100 mM de Tris-HCl em pH 8,0, em uma relação de 20 mL de solução para cada 10 g do substrato. Após 5 min de contato da solução extratora com o trigo, as extrações foram filtradas em filtro milipore® 0,22 µm e centrifugadas por 15 min, 25°C a 8000 x g. Os sobrenadantes foram coletados, reunidos e designados como extrato proteico bruto (EPB). O EPB teve sua atividade proteolítica mensurada através da utilização de diferentes métodos colorimétricos, utilizando substratos enzimáticos comerciais.

5.1.3 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada através do método de Bradford (1976), conforme relatado na seção III, tópico 4.1.11.

5.1.4 Quantificação de atividade para tripsina, quimotripsina e elastase 2 e atividade caseinolítica

As reações de atividade para a presença de proteases foram executadas em microtubos eppendorf® de volume de 1500 µL com volume total de reação de 500 µL segundo Pontual et al. (2012) com modificações. O extrato obtido do cultivo sobre o farelo de trigo após 14 dias teve a atividade mensurada a partir da hidrólise do substrato azocaseína. Uma triplicata de reações compostas por 100 µL de solução tampão a 100 mM de Tris-HCl contendo triton X-100 (0,1%) + 300 µL de azocaseína (0,6%) + 25 µL de extrato enzimático + 75 µL de solução tampão a 100 mM. As reações foram realizadas a 37°C por 60 min, e para encerrar as reações, foram adicionados 200 µL de ácido tricloroacético 10% (w/v). Após o encerramento, os tubos foram refrigerados a 8°C por 30 min e em seguida, centrifugados por 10 min em centrífuga de microtubos. 200 µL do sobrenadante de cada reação foram transferidos para microplaca e as absorbâncias medidas em leitora flexstation3® em comprimento de onda 366 nm. A atividade é atribuída à diferença de absorbância entre a reação e o branco, que é preparado da mesma forma que a reação, porém adicionando a solução de parada logo em seguida à adição aos demais componentes. Uma unidade de enzima é a quantidade necessária para o aumento de 0,01 de absorbância.

As atividades das enzimas tripsina, quimotripsina e elastase 2 foram investigadas com o uso dos substratos N-benzoil-D,L-arginina-pnitroanilida (BAPNA), N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-pnitroanilida (SAAPFpNA) e N-succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-pnitroanilida (SAAPLpNA), respectivamente. As reações para medir a presença das enzimas no extrato foram conduzidas em 473 µL de solução tampão pH 8,0 Tris-HCl 100 mM, 25 µL de EPB e 2 µL de BAPNA a 50 mM. Reação ocorreu a 37°C, 60 min e então foi encerrada por adição de 500 µL ácido cítrico a 20%. Reações são medidas em suas absorbâncias no comprimento de onda de 410 nm. As reações foram executadas em triplicata, sempre confrontadas com um branco.

5.1.5 Cálculo da atividade enzimática coagulante de leite

O cálculo da atividade foi feito a partir da quantidade de enzima necessária para coagular 10 mL de caseína em 40 min de reação a 37°C conforme a equação a seguir adaptada de Arima et al. (1970).

$$\text{MCA (U/mL)} = \left[\frac{(2400 \times V)}{t} \right] \times v$$

Em que “V” é o volume do leite em mL, “t” se refere ao tempo de coagulação em segundos e “v” é o volume da extração enzimática usado em mL.

5.1.6 Produção de coágulo seco e cálculo de umidade

Cada triplicata foi preparada com 0.1 mL do extrato bruto com atividade proteolítica + 1 mL de leite desnatado reconstituído Itambé®. O leite foi dissolvido à 25°C, em 10% (w/v), em uma solução de 10 mM de cloreto de cálcio e ajustado para pH 6.5 com HCl (Arima *et al.*, 1970). A triplicata do ensaio de coagulação foi confrontada com um branco que teve 0.1 mL de solução de extração no lugar da extração enzimática. Após 3 horas, a triplicata com seu controle foi centrifugada em centrífuga de microtubos por 2 min a 14000 rpm para a visualização da atividade coagulante. O sobrenadante foi separado de cada coágulo e estes foram então pesados em balança de infravermelho, que apresentou a porcentagem de água eliminada de cada coágulo, a partir do qual foram calculados os pesos dos coágulos secos.

5.1.7 Precipitação salina

O extrato bruto passou por precipitação pela adição de (NH₄)₂SO₄ em cinco faixas saturação: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%, de acordo com Santos *et al.* (2016). Cada ciclo é composto por adição de sal, repouso sob refrigeração a 8°C por uma hora e por fim, centrifugação, onde o sobrenadante é levado para o próximo ciclo de precipitação enquanto o corpo de fundo é resuspenso em solução tampão do extrato. As centrifugações foram feitas por 15 min a 14000 rpm em centrífuga de microtubos. O perfil de concentração de atividade para a proteases nas frações serviram de base para a continuidade do processo de isolamento.

5.1.8 Sistema aquoso bifásico

Foi determinada a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para o sistema aquoso bifásico a partir do fracionamento salino. A concentração da atividade de proteases nas frações norteou essa escolha. Foram executados ciclos completos de fracionamento salino como descritos na sessão anterior a fim de remover proteínas indesejadas até que a amostra atingisse a saturação de sal máxima da fração anterior àquela que atingiu 0,1 de absorbância em reação conduzida por 1 h, a 37°C. A faixa selecionada de saturação de sal foi então misturada na proporção de 1:0,5 mL de polietilenoglicol 35000 (5%). Essa mistura foi deixada em repouso por 1 h a 25°C para que em seguida, as misturas fossem centrifugadas por 15 min, 8000 xg a 25°C em centrífuga. As duas fases formadas após centrifugação foram separadas, sendo a fase superior diluída em solução tampão de extração. Cada uma das fases teve a atividade para caseinase medida e seu teor de proteína quantificado através do método de Bradford (1976).

5.1.9 SDS-PAGE

As eletroforeses em gel de poliacrilamida foram realizadas para verificar o progresso do isolamento das enzimas. Os géis de empilhamento e separação foram preparados nas concentrações de 4 e 12% respectivamente, segundo descrito em Laemmli (1970). Foram aplicadas amostras com adição da solução tamponante (0.5 M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 10% Glicerol; 5% 2- Mercaptoetanol; 0,001% de azul de bromofenol) em diferentes canaletas cada após 32 aquecimento de 5 min a 100°C e subsequente centrifugação. A corrida foi feita a voltagem constante de 90 mV e a revelação das proteínas foi feita através da coloração com nitrato de prata. As corridas foram executadas utilizando 2-mercaptoetanol como agente redutor no tampão de amostra, exceto quando indicado.

5.1.10 Coloração com nitrato de prata em gel de poliacrilamida

Foram preparadas duas soluções para a coloração com prata, uma chamada de solução A (0,4 g de AgNO_3 em 2 mL de água deionizada) e outra chamada solução B (126 μL de NaOH 10 M + 10,4 mL de água deionizada). A solução A foi

vertida sobre a solução B em agitação e o volume foi ajustado com adição de água deionizada até 50 mL. Após a corrida das amostras em eletroforese (SDS-PAGE), o gel foi imerso na mistura das soluções A e B por 15 minutos. Depois dos 15 minutos passados, o gel foi lavado três vezes em água deionizada por três minutos e então foi adicionada a solução reveladora recém-preparada composta por 50 mL H₂O + 25 µL de formaldeído 37% + 25 µL ácido cítrico a 10 %, onde o gel permaneceu até que fosse possível a visualização os perfis eletroforéticos das amostras.

5.1.11 Efeito da temperatura sobre a atividade caseinolítica

O efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica foi testado nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60 e 70°C. Foram preparadas reações contendo 300 µL de azocaseína 0,6% (w/v), 100 µL de triton X-100 a 0,1% (w/v), 80 µL de solução tampão de tris-HCl 100 mM em pH 8,0 e 20 µL de amostra. A atividade em cada temperatura foi realizada por triplicata das reações condicionados em banho-maria por 1 h, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 200 µL de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Os brancos de cada triplicata são constituídos dos mesmos elementos das reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois foram centrifugados por 10 min em centrífuga de microtubos a 14000 rpm. Foram coletados 200 µL de cada reação para leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

5.1.12 Efeito da temperatura sobre a estabilidade caseinolítica

O efeito da temperatura sobre a estabilidade proteolítica foi testado nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60 e 70°C. Foram adicionados nos tubos eppendorfs 80 µL de solução tampão de tris-HCl 100 mM em pH=8,0 e 20 µL de amostra que permaneceram na temperatura testada por 30 min. Após esse período, foram adicionados 300 µL de azocaseína 0,6% (w/v) e 100 µL de triton X-100 a 0,1% (w/v). A atividade em cada temperatura foi realizada por triplicata das reações condicionados em banho-maria por 1 h, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 200 µL de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Os brancos de

cada triplicata foram preparados da mesma forma que suas respectivas reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min em centrífuga de micro tubos a 14000 rpm. Foram coletados 200 µL de cada reação para leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

5.1.13 Efeito do pH sobre a atividade caseinolítica

O efeito do pH sobre a atividade proteolítica foi testado nos pHs 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. As soluções tampão usadas foram os tampões acetato de sódio (pHs 4 e 5), fosfato de sódio (pHs 6, 7 e 11), tris-HCl (pH 8) e glicinato de sódio (pHs 9 e 10), todos a 100 mM, exceto quando discriminado. Foram preparadas reações contendo 300 µL de azocaseína 0,6% (w/v), 100 µL de triton X-100 a 0,1% (w/v) preparado no tampão do pH testado a 500 mM, 80 µL da solução tampão no pH testado e 20 µL de amostra. A atividade em cada pH testado foi realizada por triplicata das reações condicionados em banho-maria por 1 h na temperatura de maior atividade, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 200 µL de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Os brancos de cada triplicata são constituídos dos mesmos elementos das reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min em centrífuga de micro tubos a 14000 rpm. Foram coletados 200 µL de cada reação para leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

5.1.14 Efeito do pH sobre a estabilidade caseinolítica

O efeito do pH sobre a atividade proteolítica foi testado nos pHs 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. As soluções tampão usadas foram os tampões acetato de sódio (pHs 4 e 5), fosfato de sódio (pHs 6, 7 e 11), tris-HCl (pH 8) e glicinato de sódio (pHs 9 e 10), todos a 100 mM, exceto quando discriminado. Foram adicionados nos tubos eppendorfs 80 µL de solução tampão no pH testado e 20 µL de amostra que permaneceram a 37° por 30 min. Após esse período, foram adicionados 300 µL de

azocaseína 0,6% (w/v) e 100 µL de triton X-100 a 0,1% (w/v) preparado no tampão do pH de maior atividade em concentração de 500 mM. A atividade para cada pH foi realizada por triplicata das reações condicionados em banho-maria por 1 h na temperatura de maior atividade, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 200 µL de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Os brancos de cada triplicata foram preparados da mesma forma que suas respectivas reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min em centrífuga de micro tubos a 14000 rpm. Foram coletados 200 µL de cada reação para leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

5.1.15 Inibição enzimática de proteases

O efeito de diferentes inibidores enzimáticos sobre a atividade proteolítica foi testado utilizando EDTA, Ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol, PMSF, Benzamidina e Inibidor de tripsina de girassol (SBTI). Todos os inibidores foram usados nas concentrações de 5 mM, exceto o PMSF e o SBTI, que foram utilizados a 1 mM. Foram adicionados nos tubos eppendorfs 80 µL de inibidor (80 µL de água deionizada na reação controle) e 20 µL de amostra que permaneceram a 37° por 30 min. Após esse período, foram adicionados 300 µL de azocaseína 0,6% (w/v) e 100 µL de triton X-100 a 0,1% (w/v) preparado no tampão do pH de maior atividade em concentração de 500 mM. A atividade em cada inibidor foi realizada por triplicata das reações condicionados em banho-maria por 1 h na temperatura de maior atividade, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 200 µL de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Os brancos de cada triplicata foram preparados da mesma forma que suas respectivas reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min em centrífuga de micro tubos a 14000 rpm. Foram coletados 200 µL de cada reação para leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

5.1.16 Efeito de solventes orgânicos na atividade caseinolítica

O efeito de diferentes solventes orgânicos sobre a atividade proteolítica foi investigado para os solventes: metanol, etanol, isopropanol, terc-butanol, propanona, acetonitrila e DMSO, todos a 50% (v/v). Foram adicionados nos tubos eppendorfs 80 µL do solvente (80 µL de água deionizada na reação controle) e 20 µL de amostra que permaneceram a 37° por 30 min. Após esse período, foram adicionados 300 µL de azocaseína 0,6% (w/v) e 100 µL de triton X-100 a 0,1% (w/v) preparado no tampão do pH de maior atividade em concentração de 500 mM. A atividade para cada solvente foi realizada por triplicata das reações condicionados em banho-maria por 1 h na temperatura de maior atividade, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 200 µL de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Os brancos de cada triplicata foram preparados da mesma forma que suas respectivas reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min em centrífuga de micro tubos a 14000 rpm. Foram coletados 200 µL de cada reação para leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

5.1.17 Efeito de detergentes na atividade caseinolítica

O efeito de detergentes sobre a atividade proteolítica foi investigado para 4 tensoativos: Triton X-100, tween 40 e tween 80, todos nas concentrações de 0,1% e 1% (v/v). Foram adicionados nos tubos eppendorfs 80 µL do solvente (80 µL de água deionizada na reação controle) e 20 µL de amostra que permaneceram a 37° por 30 min. Após esse período, foram adicionados 300 µL de azocaseína 0,6% (w/v) e 100 µL de triton X-100 a 0,1% (w/v) preparado no tampão do pH de maior atividade em concentração de 500 mM. A atividade para cada tensoativo testado foi realizada por triplicata das reações condicionados em banho-maria por 1 h na temperatura de maior atividade, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 200 µL de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Os brancos de cada triplicata foram preparados da mesma forma que suas respectivas reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min em centrífuga de micro tubos

a 14000 rpm. Foram coletados 200 μ L de cada reação para leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

5.1.18 Efeito de desnaturantes sobre a atividade caseinolítica

Foram investigados os efeitos da exposição da enzima a dois agentes desnaturantes em duas concentrações: tiouréia (5 mM e 500 mM) e uréia (5 mM e 5000 mM). Foram adicionados nos tubos eppendorfs 80 μ L do desnaturante (80 μ L de água deionizada na reação controle) e 20 μ L de amostra que permaneceram a 37° por 30 min. Após esse período, foram adicionados 300 μ L de azocaseína 0,6% (w/v) e 100 μ L de triton X-100 a 0,1% (w/v) preparado no tampão do pH de maior atividade em concentração de 500 mM. A atividade para cada uma das substâncias foi realizada por triplicata das reações condicionados em banho-maria por 1 h na temperatura de maior atividade, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 200 μ L de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Os brancos de cada triplicata foram preparados da mesma forma que suas respectivas reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min em centrífuga de micro tubos a 14000 rpm. Foram coletados 200 μ L de cada reação para leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

5.1.19 Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica

O efeito de diferentes íons metálicos sobre a atividade proteolítica foi testado para os íons sódio (Cloreto de sódio), potássio (Nitrato de potássio), cálcio (Cloreto de cálcio), magnésio (Cloreto de magnésio), manganês (Sulfato de manganês), zinco (Cloreto de zinco) e cobre (Sulfato de cobre), todos preparados a 10 mM. Foram adicionados nos tubos eppendorfs 80 μ L do metal dissolvido (80 μ L de água deionizada na reação controle) e 20 μ L de amostra que permaneceram a 37° por 30 min. Após esse período, foram adicionados 300 μ L de azocaseína 0,6% (w/v) e 100 μ L de triton X-100 a 0,1% (w/v) preparado no tampão do pH de maior atividade em concentração de 500 mM. A atividade em cada concentração foi realizada por triplicata das reações condicionados em banho-maria por 1 h na temperatura de

maior atividade, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 200 μL de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Os brancos de cada triplicata foram preparados da mesma forma que suas respectivas reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min em centrífuga de micro tubos a 14000 rpm. Foram coletados 200 μL de cada reação para leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

5.1.20 Teste de tolerância aos íons sódio e cálcio

Foram testados os efeitos dos íons sódio e cálcio em concentrações de 0,01 a 3 M. Foram adicionados nos tubos eppendorfs 80 μL do metal dissolvido (80 μL de água deionizada na reação controle) e 20 μL de amostra que permaneceram a 37° por 30 min. Após esse período, foram adicionados 300 μL de azocaseína 0,6% (w/v) e 100 μL de triton X-100 a 0,1% (w/v) preparado no tampão do pH de maior atividade em concentração de 500 mM. A atividade em cada concentração dos metais testados foi realizada por triplicata das reações condicionados em banho-maria por 1 h na temperatura de maior atividade, e após esse tempo, foi encerrada cada reação com adição de 200 μL de ácido tricloroacético a 10% (w/v). Os brancos de cada triplicata foram preparados da mesma forma que suas respectivas reações, com a exceção de que foram preparados com a adição do ácido tricloroacético imediatamente após a adição da enzima. Após o encerramento das reações, foram armazenadas a 8°C por 30 min e depois sofreram centrifugação por 10 min em centrífuga de micro tubos a 14000 rpm. Foram coletados 200 μL de cada reação para leitura em microplaca no comprimento de onda de 366 nm.

5.1.21 Zimografia em gel de poliácridamida com caseína e gelatina

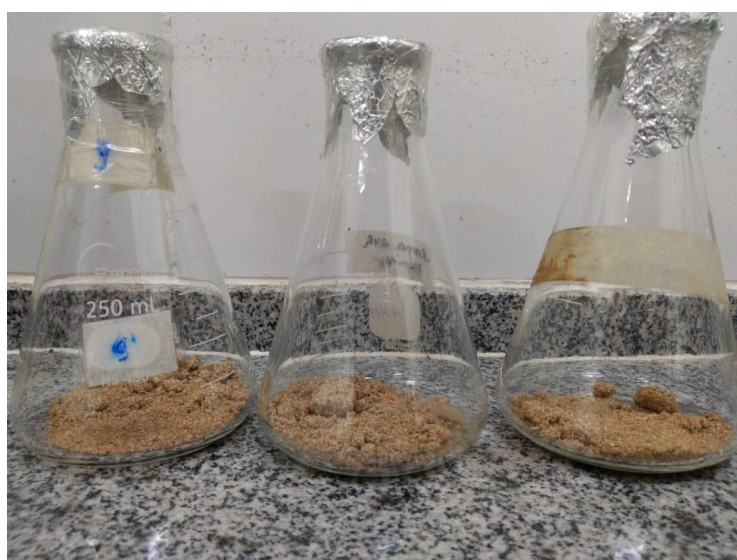
A atividade proteolítica foi testada através eletroforese em gel de poliácridamida de acordo com Laemmli (1970) com modificações, substituindo a água por uma solução de caseína ou gelatina a 0,5 %, realizando a eletroforese em gel de poliácridamida em forma nativa, com géis de empilhamento e de separação em concentrações de 4 e 12% respectivamente. Foram aplicadas amostras de 19 μL + 1

μ L de tampão de amostra (0.5 M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 36 10% Glicerol; 5% 2-Mercaptoetanol; 0,001% de azul de Bromofenol) em diferentes canaletas. A corrida foi feita a voltagem constante de 90 mV e após o fim da eletroforese, o gel foi submetido a duas lavagens de 15 min cada em solução de triton x-100 2,5%. A seguir, o gel foi mantido em tampão fosfato de sódio 50 mM pH=7,0 por 24 horas à temperatura de 40°C. Ao término desse período, o gel foi imerso em solução de comassie blue G-250 1% em *overnight*, seguido de descoloração em solução composta por 10% de ácido acético, 40% Metanol e 50% de H₂O.

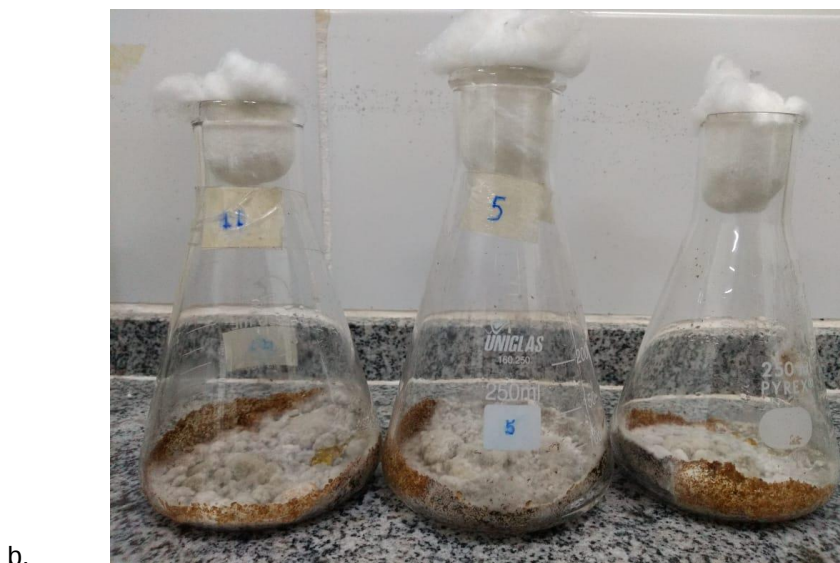
5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Obtenção do farelo de trigo, do fungo, preparo de inoculo e FES para a produção de proteases

Os fungos cresceram no meio Agar Batata Dextrose com 0,1% de lignina, e após os 21 dias de crescimento, foram inoculados no farelo de trigo para observar a produção de enzimas proteolíticas. As fotos do farelo antes e depois do crescimento do fungo podem ser observadas abaixo.



a.



b.

Figura 1. Erlenmeyers contendo 5 g de farelo de trigo seco cada. a. Antes da inoculação do fungo e b. depois de 14 dias de cultivo do fungo sobre o resíduo.

Após 14 dias, os cultivos foram retirados das estufas microbiológicas e submetidos ao processo de extração líquida com solução tampão de pH 8,0 100 mM de Tris-HCl, e após a filtração e centrifugação, foi obtido um extrato protéico bruto líquido, translúcido, de cor castanha. O extrato foi guardado em geladeira, em temperatura de 8°C até o momento de realização das análises.

5.2.2 Quantificação de atividade caseinolítica e atividades para as proteases tripsina, quimotripsina e elastase 2

A atividade total do extrato utilizando a azocaseína foi medida em 38380 U de atividade enzimática e a proteína total do extrato foi medida em 24,87 mg. Não foram encontradas atividades significativas das enzimas tripsina, quimotripsina e elastase-2. Os resultados com esses substratos permite afirmar que o fungo *A. ricini* é um produtor de enzimas proteolíticas com atividade sobre as caseínas, porém não foi possível, através desse experimento, obter maiores informações sobre o tipo de protease produzida.

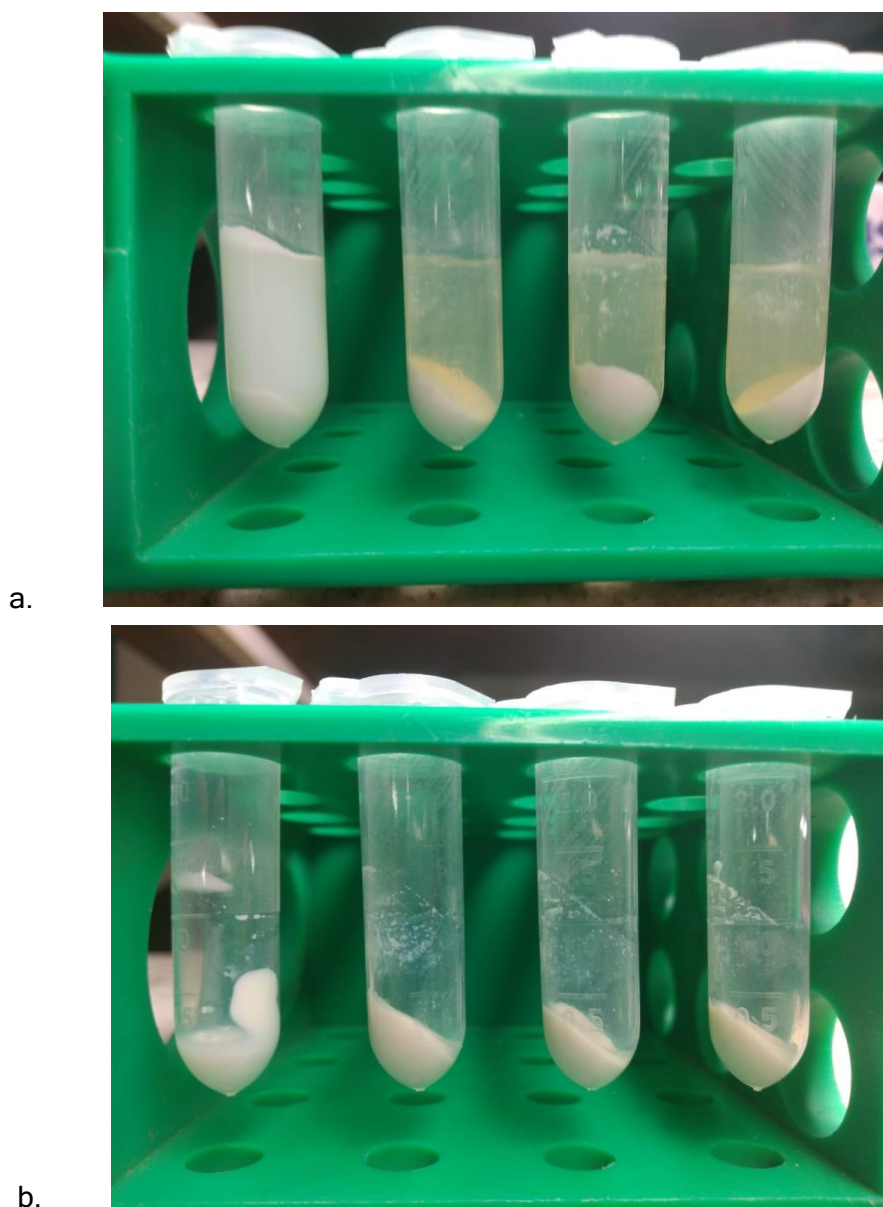
5.2.3 Cálculo da atividade enzimática coagulante de leite, produção de coágulo seco e cálculo de umidade

O cálculo de atividade da coagulação do leite, que ocorreu de forma completa em 3 horas, bem como outros dados do experimento está na tabela a seguir.

Atividade Total (mU)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (mU/mg)
711	3,886	182,96

Tabela 1. Valores de atividade coagulante de leite total, proteína total e atividade específica.

O controle negativo da reação de coagulação do leite e sua respectiva triplicata, bem como todas as amostras derivadas dessas reações, estão registradas na figura abaixo.



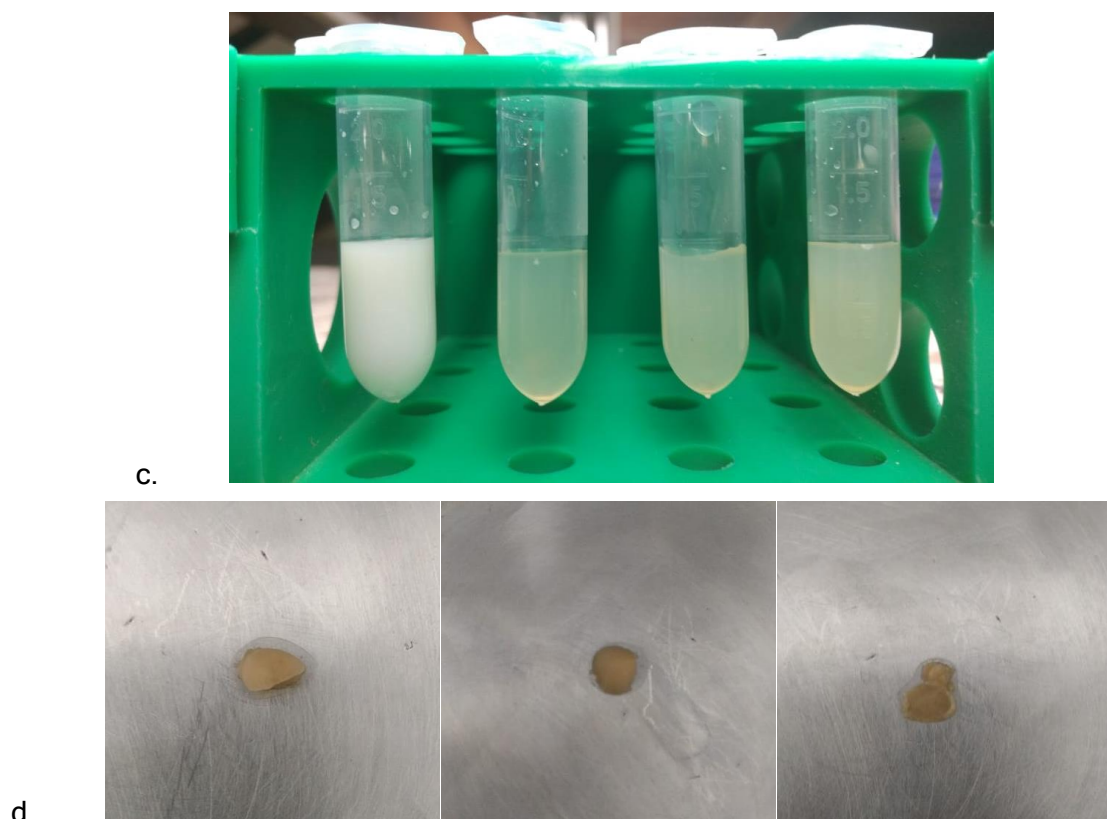


Figura 2. Fotos das etapas de produção do coágulo de leite seco. a. Branco e triplicata das reações de coagulação da esquerda para direita. b. Somente os coágulos. c. Somente os soros das reações d. Fotos dos coágulos obtidos após secagem.

Amostra	Coágulo Molhado (g)	Coágulo Seco (g)	Massa Sólida (%)	Umidade (%)
Branco	0,04	0,015	15,41	84,59
T1	0,110	0,040	36,04	63,96
T2	0,180	0,082	45,40	54,60
T3	0,164	0,074	44,85	55,15

Tabela 2. Valores de massa dos coágulos de leite antes e depois das secagens. Porcentagens de umidade e de massa sólida dos coágulos produzidos.

Os resultados relativos à produção de coágulos das proteínas do leite mostram que é possível, a partir da metodologia relatada de fermentação em estado sólido e extração enzimática, obter quantidades relevantes de proteases fungicas que podem coagular completamente o leite. Na metodologia usada nesse trabalho,

foi possível coagular 1 mL de leite com 0,1 mL de extrato, em apenas 3 horas. Também foi possível separar facilmente a fase líquida da fase sólida, para fazer o teste de umidade do coágulo e produzi-lo seco. Na Tabela 2, podemos também observar que o peso dos coágulos secos obtidos é bem maior que o peso da massa seca do branco, o que apenas confirma a eficácia das enzimas do *A. ricini* na coagulação das proteínas do leite, o que faz com que a fabricação de queijos e laticínios seja uma potencialidade concreta para o uso das enzimas do fungo.

5.2.4 Precipitação salina

Uma alíquota de 5 mL foi utilizada para o fracionamento salino do extrato bruto obtido, a fim de concentrar as atividades proteolíticas e executar uma separação prévia das proteínas do EPB. O experimento foi necessário para determinar a partir de que concentração de sulfato de amônio há uma maior precipitação das enzimas de atividade caseinolítica, informação utilizada para executar o sistema aquoso bifásico e comparar ambos procedimentos de separação de proteínas. As concentrações de sal que mais reteram atividade caseinolítica foram as frações 40-60% e 60-80%. Os dados das frações mais importantes da precipitação salina estão na tabela a seguir.

Estágio	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)
Bruto	5950	3,886	15,31	100
40-60%	1215	0,58335	20,83	20,42
60-80%	1620	0,6178	26,22	27,23

Tabela 3. Dados relativos às frações de maior atividade sobre a azocaseína. A soma da recuperação das duas frações com maior atividade é equivalente a 47,65% da atividade do extrato.

A tabela 3 mostra através de suas atividades específicas, uma importante diminuição de proteína nas frações em relação às suas respectivas atividades. A

recuperação total da atividade proteolítica do método é equivalente à 58,42% da atividade do EPB. Isso significa dizer que o restante das frações da precipitação soma apenas 10,77% da recuperação do método, permitindo inferir que a maioria das enzimas caseinolíticas precipita a partir da concentração de 40% de sal até a concentração de 80%.

5.2.5 Sistema aquoso bifásico

A partir dos resultados da precipitação salina, foi possível observar que as caseinases estão concentradas no intervalo de 40-80% de sal. Por isso, antes do sistema aquoso bifásico propriamente dito, foram removidas as duas primeiras frações do extrato, 0-20% e 20-40%, como já relatado na precipitação salina, para aumentar a probabilidade de purificação de alguma das proteases. O sobrenadante com o restante das proteínas, aquelas que precipitam na região de saturação de sal de 40-100%, foi então misturado com uma solução de PEG 35000, de forma que o sistema ficasse na proporção de 1:0,5 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /PEG 35000 5%. Após a mistura, repouso, centrifugação e separação das fases superior e inferior, foram medidas as atividades caseinolíticas de ambas as frações. A fração contendo PEG 35000 não apresentou atividade e foi desprezada. A atividade proteolítica do sistema se concentrou na fase inferior salina e os dados obtidos de experimentos com essa fração estão na tabela abaixo.

Estágio	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)
Bruto	38080	24,87	1531,16	100
ABPS	20520	5,56	3690,64	53,89

Tabela 4. Dados do extrato e da fração salina do sistema aquoso bifásico. Atividades totais, proteínas totais, atividades específicas e recuperações das amostras.

Os dados na tabela 2 permitem afirmar um relativo ganho de atividade em relação à quantidade de proteína da amostra proveniente do sistema aquoso, onde a diminuição de aproximadamente 4,47 vezes a quantidade de proteína em relação ao

extrato bruto garantiu um aumento da atividade específica de aproximadamente 2,41 vezes, mais do que obtido para as frações da precipitação, 40-60% e 60-80%, que tiveram aumentos de atividade específica de aproximadamente 1,36 e 1,71 respectivamente. A recuperação da fase inferior do sistema aquoso bifásico também é superior à recuperação das duas frações da precipitação salina juntas, 53,89%. Dessa forma, a fase salina do sistema aquoso foi escolhida para realizar os experimentos relativos à ação das enzimas caseinolíticas sobre a azocaseína.



Figura 3. SDS-PAGE corado com nitrato de prata. Na canaleta 1, temos o perfil do extrato bruto, enquanto na canaleta 2, o perfil da fase salina obtida do sistema aquoso bifásico.

Na figura 3, é possível observar que houve uma remoção significativa de proteínas após aplicação do sistema aquoso bifásico, o que se evidencia não só pela diminuição do número de bandas em relação ao extrato bruto, mas também pelo clareamento da canaleta, que pode ocorrer tanto pela remoção de proteínas quanto de pigmentos.

5.2.6 Efeito da temperatura sobre a atividade caseinolítica

Ao testar o efeito da temperatura das caseinases na fase inferior do sistema aquoso, foi obtido o seguinte gráfico:

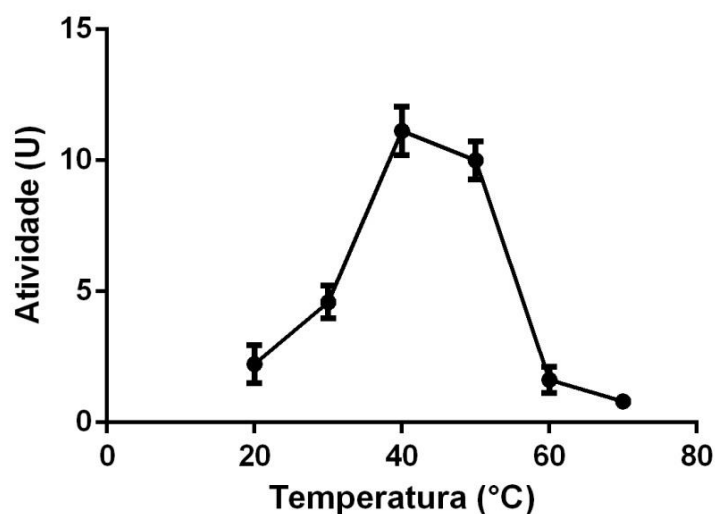


Gráfico 1. Efeito da temperatura sobre a atividade das proteases sobre a Azocaseína. As atividades sobre a azocaseína foram medidas após exposição da amostra nas temperaturas 20, 30, 40, 50, 60 e 70°C.

O ensaio mostra o efeito da atividade das proteases da amostra sobre a azocaseína executando triplicatas de reações de atividade em temperaturas diferentes. Aqui é possível observar que há um acréscimo de atividade caseinolítica até a temperatura de 40°C, que a partir daí começa a decair e chegar próxima de zero em 70°C. É possível também afirmar que entre as temperaturas de 40°C e 50°C, o processamento da caseína deve ocorrer velocidades próximas.

5.2.7 Efeito da temperatura sobre a estabilidade caseinolítica

Foram executadas reações de atividade sobre a azocaseína na temperatura de 40°C, antes encubando a enzima em diferentes temperaturas, para investigar a estabilidade dessa atividade caseinase. O gráfico abaixo exibe as informações obtidas.

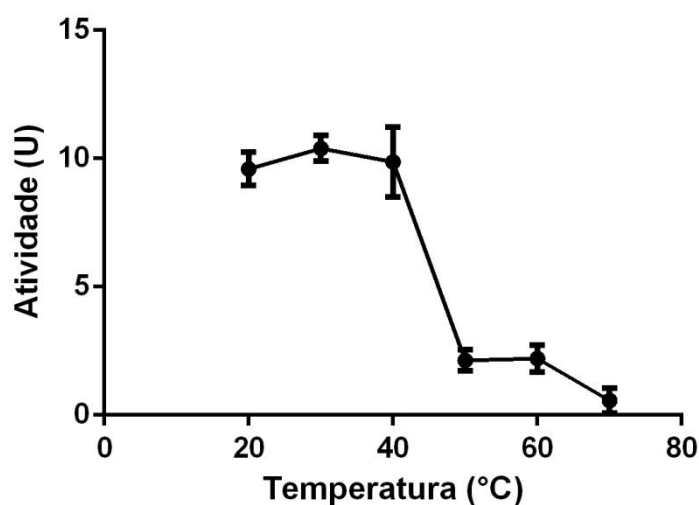


Gráfico 2. Efeito da temperatura sobre a estabilidade caseinolítica. As atividades sobre a azocaseína foram medidas após exposição da amostra nas temperaturas 20, 30, 40, 50, 60 e 70°C.

É possível notar alta estabilidade e atividade caseinase nas temperaturas de 20°C a 40°C. Porém, a atividade diminui drasticamente após a exposição da enzima a temperaturas maiores que 40°C. As enzimas parecem conservar atividade residual, ainda que baixa, nas temperaturas de 50°C a 60°C, alcançando quase zero de atividade após incubação a 70°C.

5.2.8 Efeito do pH sobre a atividade caseinolítica

Abaixo as atividades em diferentes pHs reação sobre a azocaseína:

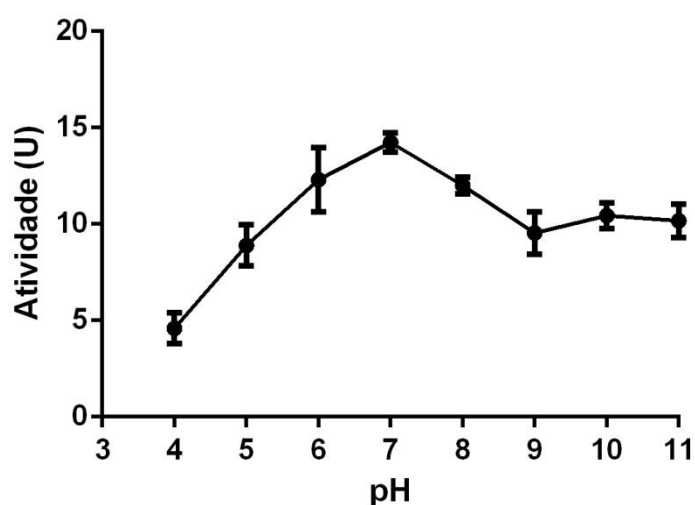


Gráfico 3. Efeito do pH sobre a atividade caseinolítica. As atividades sobre a azocaseína foram medidas em pHs inteiros no intervalo de 4 a 11. A temperatura da reação foi 40°C.

É possível observar no gráfico que as atividades aumentam à medida que o pH aumenta. Porém, os valores de atividade caseinase alcançam seu máximo no pH 7,0, ou seja, em pH neutro. A partir desse pH, há um decréscimo gradual de atividade até o pH 9,0, que cessa e estabiliza até o pH 11. Importante notar que a atividade caseinolítica é maior que 50% na maior parte do intervalo testado, de 6 a 11, o que indica uma ação em uma faixa relativamente ampla de pHs.

5.2.9 Efeito do pH sobre a estabilidade caseinolítica

A estabilidade ao pH das caseinases da amostra foi testada expondo as enzimas a pHs diferentes previamente e depois executando as reações no pH 7,0 e temperatura de 40°C. Os valores de atividade foram usados na construção do seguinte gráfico.

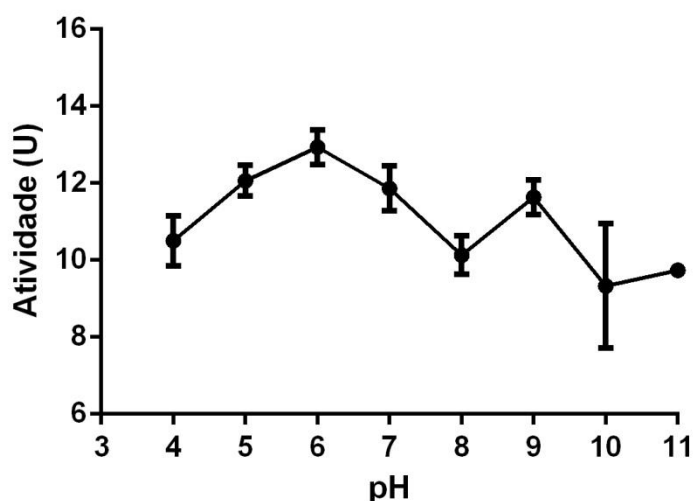


Gráfico 4. Efeito do pH sobre a atividade caseinolítica. As atividades sobre a azocaseína foram medidas após exposição da amostra em pHs inteiros no intervalo de 4 a 11. A temperatura da reação foi 40°C.

Quanto ao efeito da estabilidade ao pH das caseinases do *A. ricini*, é possível notar uma atividade residual maior após exposição ao pH 6,0. Porém, chama a atenção que, embora haja um acréscimo da atividade caseinolítica até pH 6,0 e posterior decréscimo e oscilação, a atividade residual nunca é menor que 50%, o

que permite dizer que as caseinases na amostra possuem certa estabilidade ao pH em uma ampla faixa.

5.2.10 Inibição enzimática de proteases

Foram testados os efeitos de diferentes inibidores enzimáticos sobre as caseinases parcialmente isoladas. Os resultados podem ser visualizados no gráfico abaixo.

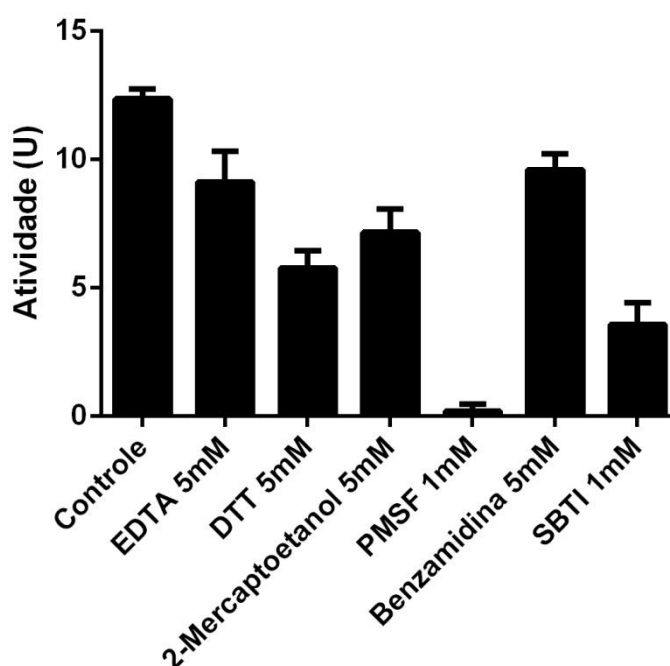


Gráfico 5. Teste de diferentes inibidores de proteases sobre atividade caseinase das enzimas do *A. ricini*. As reações foram executadas em pH 7,0 a 40°C.

Os valores das atividades das enzimas expostas aos inibidores foi sempre menor que a atividade do controle, que é uma reação sem nenhum tipo de inibição. As menores inibições são referentes à um inibidor de metaloproteases, o EDTA e um inibidor reversível de tripsinas, a Benzamidina. Isso indica que a maior parte da atividade caseinolítica não provém desses tipos de enzimas. Em seguida, os inibidores de ação intermediária foram o 2-mercaptoetanol, o ditioneitol e o SBTI. A ação dos dois primeiros, que funcionam como inibidores enzimáticos de cisteína proteases, pode também se dar pela alteração da conformação nativa das proteases, pois essas duas moléculas são agentes redutores de pontes dissulfeto, o

que pode forçar cessação desse tipo de ligação importante para a manutenção da estrutura nativa. O SBTI é um inibidor específico de tripsinas, que diminuiu de forma considerável a atividade da enzima em concentração 5 vezes menor que os outros inibidores. Entretanto, as baixas atividades em pH básico, sobre o substrato BapNa e a baixa inibição da benzamidina não corroboram que haja atividade tripsina na amostra. Existe, porém, a possibilidade de o SBTI estar agindo de forma semelhante aos agentes redutores, com algum tipo de interação entre grupos sulfidril entre a enzima e o inibidor, desnaturando a enzima ou impedindo o acesso do sítio ativo ao substrato. A inibição mais pronunciada, do PMSF, inibiu quase completamente a atividade caseinolítica, o que indica que a atividade mais relevante na degradação da caseína, seja a atividade de serinas proteases, já que esse inibidor é um inativador irreversível de serinas proteases e está em concentração 5 vezes menor que a maioria dos outros inibidores.

5.2.11 Efeito de solventes orgânicos na atividade caseinolítica

Abaixo, o gráfico de barras com os valores de atividade obtidos após exposição da enzima a diferentes solventes orgânicos:

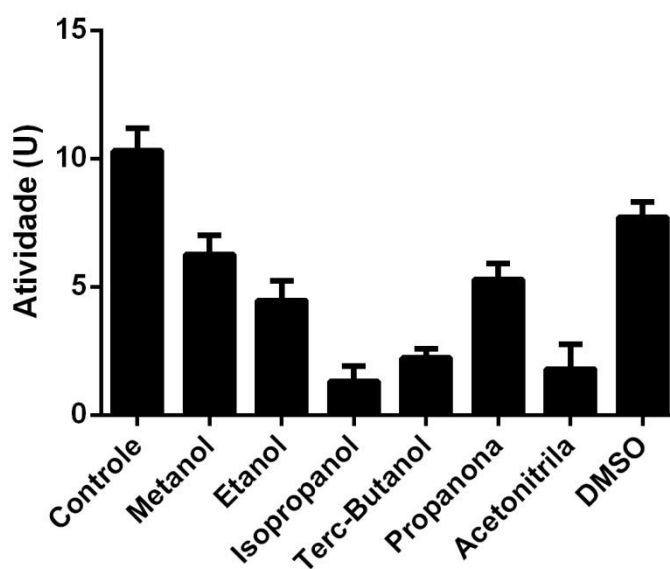


Gráfico 6. Atividades caseinolíticas em presença de diferentes solventes orgânicos. Todos os solventes testados estão na concentração de 50% (v/v).

Proteases possuem diferentes níveis de resistência a solventes orgânicos, que precisam ser medidos experimentalmente. Entretanto, é conhecida a característica de solventes orgânicos de promoverem desnaturação enzimática. No teste realizado para a caseinase do *A. ricini*, é possível perceber que a enzima parece ser mais sensível aos solventes isopropanol, terc-butanol e acetonitrila. Uma inibição intermediária pode ser encontrada para o metanol, etanol e propanona. Aparentemente, a enzima é menos sensível a álcoois não ramificados de poucos carbonos e cetonas de até três carbonos, como é a propanona. Os álcoois de três e quatro carbonos e a acetonitrila, uma nitrila de dois carbonos e um nitrogênio apresentaram maior inibição, provavelmente por desnaturação. Chama atenção porém a menor inibição ser a do dimetilsulfóxido (DMSO), que é uma substância notoriamente caotrópica, indutora de desnaturação de muitas enzimas.

5.2.12 Efeito de detergentes na atividade caseinolítica

A atividade da caseinase após exposição da enzima a diferentes detergentes está expressa no gráfico em duas concentrações diferentes.

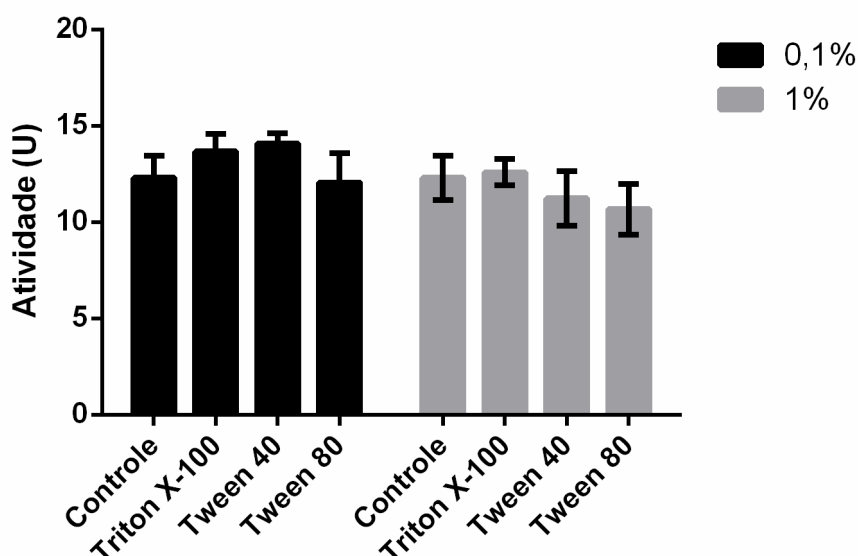


Gráfico 7. Atividades da enzima previamente exposta a três diferentes detergentes nas concentrações de 0,1 e 1% (v/v).

As caseinases não sofreram muita alteração de sua atividade quando expostas a qualquer das duas concentrações dos tensoativos testados. Na

concentração de 0,1% há um aparente aumento de atividade para os detergentes Triton X-100 e Tween 40. Tensoativos de forma geral podem desfazer membranas lipídicas e desnaturar proteínas, porém, os três tensoativos testados são neutros, não possuem carga absoluta em solução aquosa. Tensoativos iônicos tendem a ser mais agressivos para proteínas.

5.2.13 Efeito de desnaturantes sobre a atividade caseinolítica

Foram testados os efeitos de duas concentrações da tiouréia e da uréia, duas substâncias de capacidade desnaturante.

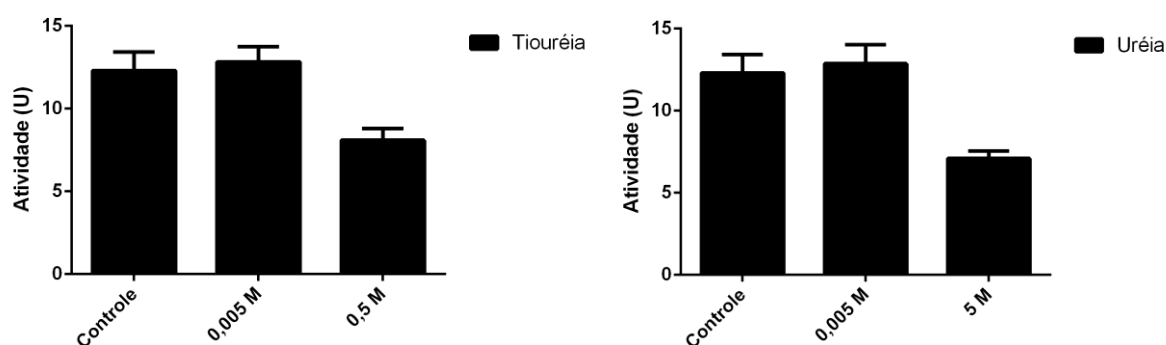


Gráfico 8. Atividade da caseinase após exposição à tioureia e à ureia em das concentrações molares diferentes.

Tanto as concentrações mais baixas da ureia como da tioureia não foram capazes de inibir atividade das serino proteases que agem sobre a caseína. As concentrações de 5 mM de ambas as moléculas parecem ter até aumentado a atividade sobre a azocaseína de forma discreta. Já as concentrações de 0,5 M de tioureia e 5 M de ureia reduziram de forma perceptível a atividade caseinolítica, provavelmente por desnaturação, já que a ureia e a tioureia, juntamente com os detergentes são considerados agentes desnaturantes por desfazer interações fracas que estabilizam as proteínas. Entretanto, outras ações sobre a enzima dão possíveis que não a da perda de estabilidade da forma nativa.

5.2.14 Teste de efeito de íons metálicos

A seguir, os dados de atividade das serino proteases caseinases frente a diferentes íons metálicos.

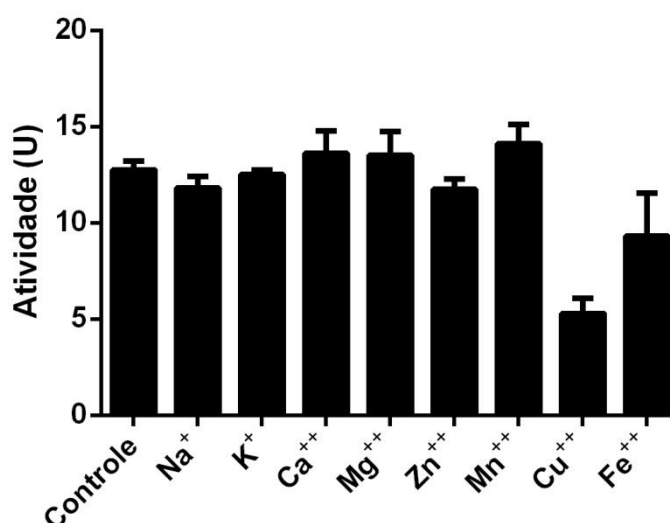


Gráfico 9. Atividades das enzimas na ausência e na presença de diferentes íons metálicos a 10 mM.

O gráfico mostra que na concentração testada, a maioria dos íons metálicos não altera muito a atividade da enzima. Vale a pena destacar o discreto ganho de atividade da enzima na presença dos íons cálcio, manganês e magnésio. Os metais a afetar de forma mais visível a atividade da enzima são o ferro (II) e principalmente, o cobre, que apresenta a maior redução da atividade da enzima entre os íons testados.

5.2.15 Teste de tolerância aos íons sódio e cálcio

A seguir, as curvas de atividade caseinolítica frente a diferentes concentrações dos íons sódio e cálcio.

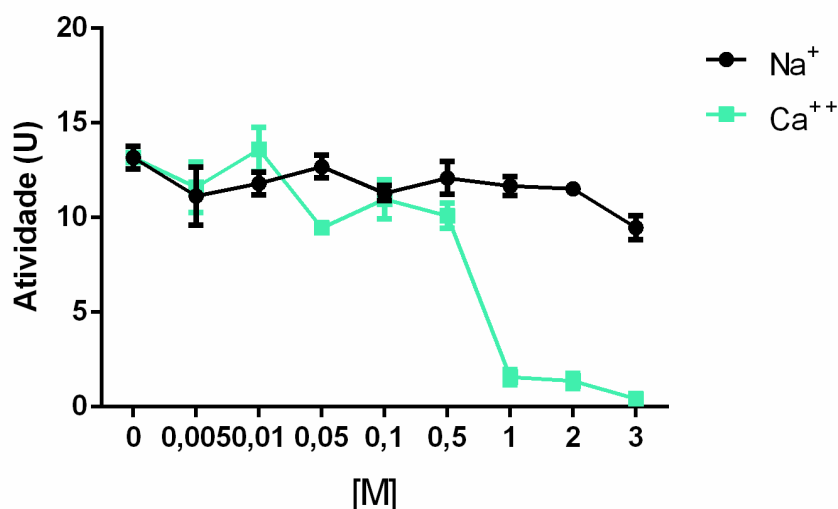


Gráfico 10. Curva de atividade caseinolítica na presença de íons cálcio e sódio.

As atividades das caseinases na presença dos íons sódio e cálcio, que estão sempre presentes no processo de fabricação de laticínios, permanecem aparentemente estáveis e em patamares próximos para ambos os metais até a concentração de 0,5 M. A partir dessa concentração, as atividades enzimáticas em presença de sódio permanecem em níveis comparáveis aos iniciais, mas a atividade em presença de cálcio cai drasticamente nas concentrações de 1 M a 3 M, indicando uma sensibilidade de alguma ordem da enzima para esse íon, sempre presente no processo de coagulação do leite. Entretanto, isso não inviabiliza a aplicação da enzima para coagulação do leite, pois o leite possui concentrações de Ca^{+2} de aproximadamente 0,03 M, o que pela curva apresentada, colocaria a enzima em uma região de alta atividade.

5.2.16 Zimografia em gel de poliácridamida com caseína e colágeno

Abaixo, dois géis impregnados de duas proteínas diferentes, o da esquerda com caseína e o da direita, com colágeno. A hidrólise das proteínas nos géis pelas proteases do *A. ricini* se evidencia pelo clareamento de uma região do gel em relação ao restante dele.

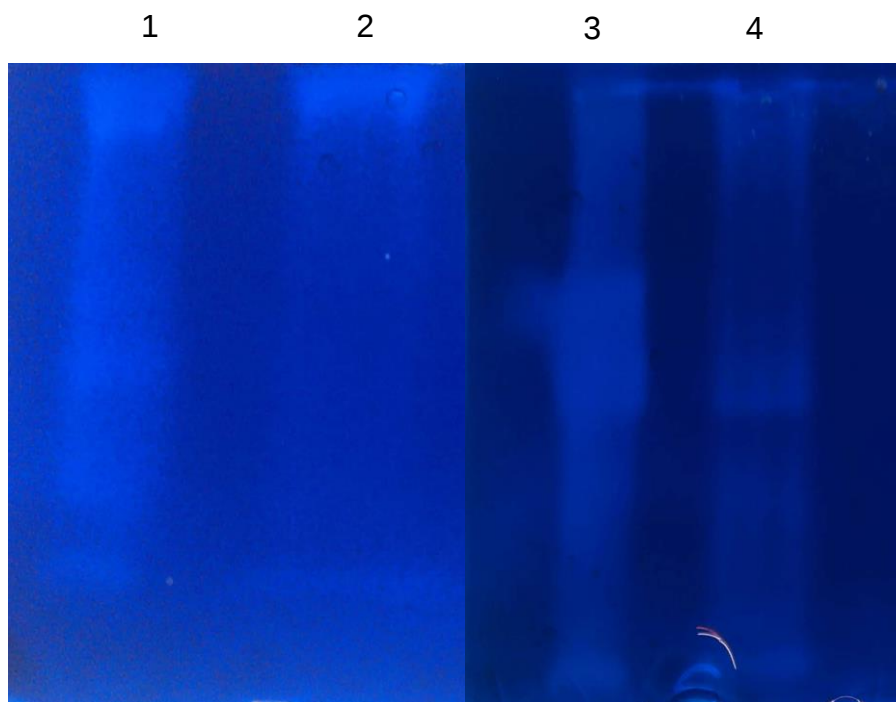


Figura 4. Zimografias das atividades proteolíticas em gel de poliacrilamida. As canaletas 1 e 2 correspondem às atividades sobre a caseína do extrato bruto e da fase salina do sistema aquoso, respectivamente. Já as canaletas 3 e 4 correspondem às atividades sobre o colágeno do extrato bruto e da fase salina do sistema aquoso, respectivamente.

É possível, em ambos os géis, visualizar que a atividade do extrato bruto é maior que a da fase inferior do sistema aquoso para as duas proteínas impregnadas nos géis. Isso corrobora com os dados de atividade sobre a azocaseína em estado líquido, que indica que pouco menos da metade da atividade proteolítica é perdida após o sistema aquoso bifásico, ainda que haja uma grande remoção de proteínas indesejadas e ganho de atividade específica. Outro fato que chama atenção é a atividade sobre o colágeno, tanto no extrato bruto quanto na fase salina, ser maior que a atividade sobre a caseína, e a clarificação da área percorrida pela amostra também possui padrões diferentes, onde a atividade sobre a caseína parece se concentrar na entrada da canaleta e na parte inferior da mesma, enquanto a atividade collagenase parece se concentrar no meio da canaleta, indicando que enzimas diferentes estão envolvidas nas duas atividades. Collagenases são enzimas conhecidas por seu emprego na fabricação de hidrolisados de colágeno para suplementação, na fabricação de gelatinas e sua capacidade cicatrizante, portanto possuem interesse biotecnológico e médico, o que lança novas possibilidades de estudo para as proteases do fungo como perspectivas futuras.

6 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

6.1 Conclusão geral

É possível concluir que o fungo *Amphobotrys ricini* é capaz de produzir lacases de forma abundante por fermentação em estado sólido utilizando um resíduo barato e abundantemente produzido pela agroindústria, o bagaço de cana de açúcar. Utilizando um insumo barato, o farelo de trigo, o fungo foi capaz de produzir de forma relevante serino proteases a partir de fermentação em estado sólido. O fungo foi capaz de produzir as lacases em meio gelatinoso e descorar o azul de bromofenol impregnado no meio de cultura, o que indica o uso potencial do fungo e das lacases para biorremediação. As proteases produzidas pelo fungo foram eficazes na coagulação das proteínas do leite integral e apresentaram estabilidade térmica de 20°C a 40°C, além de apresentar estabilidade relevante em uma ampla faixa de pHs. As caseinases processam a caseína em gel de poliacrilamida e em estado líquido. Além disso, foi confirmada a presença de proteases do fungo com capacidade de hidrolisar colágeno, através de zimografia. As caseinases podem ser aplicadas na fabricação de queijos e laticínios, enquanto as collagenases são importantes na produção de gelatinas e podem ser usados como agente cicatrizante.

6.2 Perspectivas

As perspectivas para esse trabalho são o isolamento das lacases e das caseinases encontradas, suas caracterizações e a execução dos experimentos de aplicação aqui relatados, utilizando as enzimas isoladas. Além disso, avançar no estudo das collagenases produzidas pelo fungo, isolar, caracterizar e determinar alguma aplicação ligada a essa atividade. Também é perspectiva futura a identificação das enzimas estudadas através de espectrometria de massas, sobretudo das proteases aqui estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITEE, Pandya; BHARTI, Dave; MEENAXI, Patel. Studies on Mycoremediation of Coomassie Brilliant Blue by *Aspergillus* spp. **New Innovations in Chemistry and Biochemistry** Vol. 2, p. 73-78, 2021.

AFREEN, Sumbul et al. A novel multicopper oxidase (laccase) from cyanobacteria: purification, characterization with potential in the decolorization of anthraquinonic dye. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0175144, 2017.

AHMAD, Mark et al. Development of novel assays for lignin degradation: comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. **Molecular Biosystems**, v. 6, n. 5, p. 815-821, 2010.

AI, Ming-Qiang; WANG, Fang-Fang; HUANG, Feng. Purification and characterization of a thermostable laccase from *Trametes trogii* and its ability in modification of kraft lignin. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 25, n. 8, p. 1361-1370, 2015.

ALENCAR, Viviane NS et al. Purification and characterization of fibrinolytic protease from *Streptomyces parvulus* by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.

ALIPOUR, Hamzeh et al. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 11, p. 975-981, 2016.

ALVES, Raniele Oliveira et al. Extractive fermentation for process integration of protease production by *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 and purification by PEG-Citrate Aqueous Two-Phase System. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 52, n. 1, p. 30-37, 2022.

AMBATKAR, Nikhil et al. Functional screening and adaptation of fungal cultures to industrial media for improved delignification of rice straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 155, p. 106271, 2021.

ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of na extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein expression and purification**, v. 88, n. 2, p. 214-220, 2013.

ANJANI, K.; RAOOF, M. A. Sources of resistance to *Botrytis ricini* (Godfrey) in castor germplasm. 2010.

ANJU, Kunjadia et al. Exploring the industrially important extracellular enzymes from different nematode-trapping fungi. **Int. J. of Life Sciences**, v. 6, n. 1, p. 434-440, 2018.

ASITOK, Atim et al. Overproduction of a thermo-stable halo-alkaline protease on agro-waste-based optimized medium through alternate combinatorial random mutagenesis of *Stenotrophomonas acidaminiphila*. **Biotechnology Reports**, v. 35, p. e00746, 2022.

ATALLA, M. Mabrouk et al. Screening of some marine-derived fungal isolates for lignin degrading enzymes (LDEs) production. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 1, n. 4, p. 591-9, 2010.

BADDOEI-DALFARD, Arastoo; MONEMI, Farzaneh; HASSANSHAHIAN, Mehdi. One-pot synthesis and biochemical characterization of a magnetic collagenase nanoflower and evaluation of its biotechnological applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 211, p. 112302, 2022.

BARRETO, Robert W.; EVANS, Harry C. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 21-36, 1998.

BERNAL, Suzan Prado Fernandes et al. Pharmaceutical biotechnological potential of filamentous fungi isolated from textile industry. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 7, p. 3933-3944, 2021.

BHAGWAT, Prashant K.; DANDGE, Padma B. Collagen and collagenolytic proteases: A review. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 15, p. 43-55, 2018.

BHANDARI, Sobika et al. Microbial enzymes used in bioremediation. **Journal of Chemistry**, v. 2021, 2021.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRIJWANI, Khushal; RIGDON, Anne; VADLANI, Praveen V. Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. **Enzyme Research**, v. 2010, 2010.

BONCI, Mário Mendes et al. In vitro virulence evaluation of clinical and environmental isolates of dermatophyte fungi. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e21110615699-e21110615699, 2021.

BORZANI, Walter et al. **Biotecnologia industrial-vol. 1: fundamentos**. Editora Blucher, 2001.

BOTELLA, Carolina; HERNANDEZ, Jesus Ernesto; WEBB, Colin. Dry weight model, capacitance and metabolic data as indicators of fungal biomass growth in solid state fermentation. **Food and bioproducts processing**, v. 114, p. 144-153, 2019.

BOURBONNAIS, Robert; PAICE, Michael G. Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS letters**, v. 267, n. 1, p. 99-102, 1990.

BROWN, JULIE A.; ALIC, MARGARET; GOLD, MICHAEL H. Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: activation by manganese. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 13, p. 4101-4106, 1991.

BRUNO, Mariela A. et al. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 695-701, 2010.

BUCHWALD, N. Fabritius et al. Studies in the Sclerotiniaceae. I. Taxonomy of the Sclerotiniaceae. Studies in the Sclerotiniaceae. I. **Taxonomy of the Sclerotiniaceae**. 1949.

CAÑAS, Ana I.; CAMARERO, Susana. Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 6, p. 694-705, 2010.

CARVALHO, L. O. Mamona (*Ricinus communis* L.). In: São Paulo (Estado). Secretária de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. **Manual técnico das culturas**. 2. ed. Campinas, 1997. cap. 11, p. 349-368.

CAVALCANTE, Marcelo et al. Divergência genética entre acessos de mamona em dez municípios de Alagoas. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 3, 2008.

CHAGAS, Haroldo Antunes. Caracterização de *Amphobotrys ricini*, agente causal do mofo-cinza da mamoneira (*Ricinus communis* L.), **avaliação de genótipos, controle químico e alternativo**. 2012.

CHAGAS, Haroldo Antunes et al. Avaliação de fungicidas, óleos essenciais e agentes biológicos no controle de *Amphobotrys ricini* em mamoneira (*Ricinus communis* L.). **Summa Phytopathologica**, p. 42-48, 2014.

CHAGAS, Haroldo Antunes et al. Escala diagramática para avaliação de mofo cinza (*Amphobotrys ricini*) da mamoneira (*Ricinus communis* L.). **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 164-167, 2010.

CHINMAYEE, Cirium V. et al. Production of highly active fungal milk-clotting enzyme by solid-state fermentation. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 49, n. 9, p. 858-867, 2019.

CHITPINITYOL, Supanee; CRABBE, MJ C. Chymosin and aspartic proteinases. **Food Chemistry**, v. 61, n. 4, p. 395-418, 1998.

CHOINOWSKI, Thomas et al. The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C β of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle. **Journal of molecular biology**, v. 286, n. 3, p. 809-827, 1999.

CLARK, C. A.; LORBEER, J. W. The development of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* on onion leaves as affected by exogenous nutrients and epiphytic bacteria. In: Microbiology of Aerial Plant Surfaces. **Academic Press**, 1976. p. 607-625.

COLE, L.; DEWEY, F. M.; HAWES, C. R. Immunocytochemical studies of the infection mechanisms of *Botrytis fabae* II. Host cell wall breakdown. **The New Phytologist**, v. 139, n. 4, p. 611-622, 1998.

COLLMER, Alan; KEEN, Noel T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Annual review of phytopathology**, v. 24, n. 1, p. 383-409, 1986.

COMMÉNIL, P.; BRUNET, L.; AUDRAN, J.C. The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p.1599-1607, 1997.

COMMÉNIL, P.; BELINGHERI, L.; DEHORTER, B. Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology, London**, v. 52, p. 1-14, 1998.

CORNELIUS, Dennis A.; ASMUS, Clifford V.; STERNBERG, Moshe M. **Acylation of *Mucor pusillus* microbial rennet enzyme**. U.S. Patent n. 4,362,818, 7 dez. 1982.

COUTO, Susana Rodríguez; HERRERA, José Luis Toca. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 500-513, 2006.

CHUNG, Eric; SCOTT, Susan; WANG, Juan. A state-of-art review on collagenase *Clostridium Histolyticum* and Peyronie's disease: drug profile, clinical evidence and safety outcomes. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 20, n. 6, p. 559-564, 2020.

DA SILVA, Ronivaldo Rodrigues et al. Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 8, p. 1059-1069, 2016.

DA SILVA, Ronivaldo Rodrigues et al. Biochemical and milk-clotting properties and mapping of catalytic subsites of an extracellular aspartic peptidase from basidiomycete fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Food chemistry**, v. 225, p. 45-54, 2017.

DACCÒ, C. et al. Key fungal degradation patterns, enzymes and their applications for the removal of aliphatic hydrocarbons in polluted soils: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 147, p. 104866, 2020.

DE LIMA, Rosiane de Lourdes Silva et al. Casca de mamona associada a quatro fontes de matéria orgânica para a produção de mudas de pinhão-mansão. **Ceres**, v. 58, n. 2, 2015.

DE OLIVEIRA DATOVO, Caroline; SOARES, Dartanha J. Sensitivity of field isolates of *Botryotinia ricini* to fluazinam and thiophanate-methyl. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 2, p. 205-208, 2019.

DEAN, Jeffrey FD; ERIKSSON, Karl-Erik L. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. **Holzforschung**, v. 48, p. 21-21, 1994.

DEBNATH, Rinku; SAHA, Tanima. An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 101645, 2020.

DEDEYAN, Boghos et al. Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 925-929, 2000.

DEMAIN, Arnold L.; ADRIO, Jose L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 41, 2008.

DO COUTO, Milena Tereza Torres et al. Production, extraction and characterization of a serine protease with fibrinolytic, fibrinogenolytic and thrombolytic activity obtained by *Paenibacillus graminis*. **Process Biochemistry**, v. 118, p. 335-345, 2022.

DOMARADZKA, Dorota; GUZIK, Urszula; WOJCIESZYŃSKA, Danuta. Biodegradation and biotransformation of polycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, n. 2, p. 229-239, 2015.

DOWLING, Madeline Elizabeth. Detection and Characterization of the Newly Described Species *Botrytis fragariae* Causing Gray Mold on Strawberries in the United States. 2018.

DUARTE, Ana Sofia; CORREIA, Antonio; ESTEVES, Ana Cristina. Bacterial collagenases—a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 106-126, 2016.

DUARTE NETO, José Manoel Wanderley. Purificação e caracterização de protease produzida por *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 em fermentação submersa visando aplicação biotecnológica. 2018.

EGGERT, Claudia; TEMP, Ulrike; ERIKSSON, Karl-Erik L. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. **Febs Letters**, v. 407, n. 1, p. 89-92, 1997.

FAN, Xuan et al. Development of PCR-based assays for detecting and differentiating three species of *Botrytis* infecting broad bean. **Plant Disease**, v. 99, n. 5, p. 691-698, 2015. 75

FERNÁNDEZ-REMACHA, Daniel et al. Analysis of laccase-like enzymes secreted by fungi isolated from a cave in northern Spain. **MicrobiologyOpen**, v. 11, n. 2, p. e1279, 2022.

FLETCHER, J. T. The Biology of *Botrytis*, JR Coley-Smith, K. Verhoeff, WR Jarvis (Eds.), **Academic Press**, London, New York, Toronto, Sydney and San Francisco (1980), 1981.

FOROOTANFAR, Hamid; FARAMARZI, Mohammad Ali. Insights into laccase producing organisms, fermentation states, purification strategies, and biotechnological applications. **Biotechnology progress**, v. 31, n. 6, p. 1443-1463, 2015.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In: **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. Springer, Boston, MA, 1997. p. 1-49.

FRANÇA, Raquel G. et al. Comportamento de cultivares de mamona (*Ricinus communis*) sob diferentes densidades populacionais, no estado do Tocantins. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 317-323, 2013.

GASSARA, Fatma et al. Parameter optimization for production of ligninolytic enzymes using agro-industrial wastes by response surface method. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 2, p. 343-351, 2011.

GERMANO, Sandro et al. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and microbial technology**, v. 32, n. 2, p. 246-251, 2003.

GETTEMY, Jessica M. et al. Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 569-574, 1998.

GIARDINA, Paola et al. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 3, p. 369-385, 2010.

GIBELLI, F. Projeto poliuretano de óleo de mamona e seus subprodutos. In: Câmara, G. M. S., Chiavegato, E. J. (Coord.). O agronegócio das plantas oleaginosas. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ Departamento de Produção Vegetal, 2001. cap. 10, p. 181-184.

GODFREY, George H. et al. Gray mold of Castor bean. **Journal of Agricultural Research**, v. 23, n. 9, 1923.

GOMES, José Erick Galindo et al. Biochemical and thermodynamic characteristics of a new serine protease from *Mucor subtilissimus* URM 4133. **Biotechnology Reports**, p. e00552, 2020.

GONÇALVES, R. D. Mofo cinzento da mamoneira. **O Biológico**, v. 2, n. 7, p. 232-235, 1936.

GUNJAL, Aparna B.; PATIL, Neha N.; SHINDE, Sonali S. Ligninase in Degradation of Lignocellulosic Wastes. In: **Enzymes in Degradation of the Lignocellulosic Wastes**. Springer, Cham, 2020. p. 55-70. 76

HAJJI, Mohamed et al. Gene cloning and expression of a detergent stable alkaline protease from *Aspergillus clavatus* ES1. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 1746-1752, 2010.

HEALTHCARE, G. E. Ion exchange chromatography & chromatofocusing: Principles and methods. Edition AA, **Amersham Biosciences**, v. 7, 2010.

HEINFLING, Annette et al. A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. **FEBS letters**, v. 428, n. 3, p. 141-146, 1998.

HENNEBERT, G. L. *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 183-204, 1973.

HILDÉN, Kristiina; HAKALA, Terhi K.; LUNDELL, Taina. Thermotolerant and thermostable laccases. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 8, p. 1117, 2009.

HOFFMANN, Lúcia Vieira; COUTINHO, T. de C.; DUARTE, N. D. Cultivo e análise isoenzimática de *Amphobotrys ricini*, agente causal do mofo cinzento da mamoneira. **Embrapa Algodão**, 2003.

HOCK, Ong Ghim et al. Evaluation of the plastic degradation ability of edible mushroom species based on their growth and manganese peroxidase activity. **Toxicology**, v. 16, 2020.

HOLCOMB, G. E. et al. Blight of prostrate spurge and cultivated poinsettia caused by *Amphobotrys ricini*. **Plant Disease**, v. 73, n. 1, p. 74-75, 1989.

HOLME DJ, PECK H. **Resolución de Problemas de Bioquímica**. Analítica, 1st edn. Acribia, Zaragoza, pp 114–126, 1996.

HONG, Sung-Kee et al. Occurrence of gray mold in castor bean caused by *Botrytis cinerea* and *Amphobotrys ricini* in Korea. **The Plant Pathology Journal**, v. 17, n. 6, p. 357-360, 2001.

HONIG, Stanton C. Intralesional collagenase in the treatment of Peyronie's disease. **Therapeutic Advances in Urology**, v. 6, n. 2, p. 47-53, 2014.

HORN, Svein Jarle et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2012.

INOUE, Kanako et al. Extracellular matrix of *Magnaporthe oryzae* may have a role in host adhesion during fungal penetration and is digested by matrix metalloproteinases. **Journal of General Plant Pathology**, v. 73, n. 6, p. 388-398, 2007.

JARVIS, William R. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenicity-A guide to the literature. 1977.

JIANG, Bin et al. Effective separation of prolyl endopeptidase from *Aspergillus Niger* by aqueous two phase system and its characterization and application. **International journal of biological macromolecules**, v. 169, p. 384-395, 2021.

JOHANNES, Christian; MAJCHERCZYK, Andrzej. Laccase activity tests and laccase inhibitors. **Journal of Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 193-199, 2000.

JUNTUNEN, Kari et al. **Fungal serine protease and use thereof**. U.S. Patent n. 8,609,390, 17 dez. 2013.

JUNTUNEN, Kari et al. **Variants of fungal serine protease**. U.S. Patent n. 8,945,900, 3 fev. 2015.

KAMESHWAR, Ayyappa Kumar Sista; QIN, Wensheng. Qualitative and quantitative methods for isolation and characterization of lignin-modifying enzymes secreted by microorganisms. **BioEnergy Research**, v. 10, n. 1, p. 248-266, 2017.

KARS, Ilona; VAN KAN, Jan AL. Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis*. In: **Botrytis: Biology, pathology and control**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 99-118.

KEE, Phei Er et al. Extractive fermentation of *Kytococcus sedentarius* TWHKC01 using the aqueous biphasic system for direct recovery of keratinase: ABS extractive fermentation for keratinase production and recovery. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, p. 104232, 2022.

KIMATI, H. Doenças da mamoneira. GALLI, F. **Manual de fitopatologia**, v. 2, p. 347-351, 1980.

KUMAR, A.; REDDY, P. N.; RAO, T. G. N. Host range studies of *Botrytis ricini*, the causal agent of castor grey mold. **Indian Journal of Plant Protection**, v. 35, n. 1, p. 140-141, 2007.

KUMAR, Adarsh; CHANDRA, Ram. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03170, 2020.

KUMAR, C. Ganesh; TAKAGI, Hiroshi. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology advances**, v. 17, n. 7, p. 561-594, 1999.

KUMAR, Rajesh et al. Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 125-131, 2016.

KUMARI, Moni; SHARMA, Anurag; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. **Food chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1295-1303, 2012.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANGE, Heiko; DECINA, Silvia; CRESTINI, Claudia. Oxidative upgrade of lignin—Recent routes reviewed. **European polymer journal**, v. 49, n. 6, p. 1151-1173, 2013.

LEATHAM, Gary F.; STAHMANN, Mark A. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. **Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 147-157, 1981.

LEIGHTON, T. J. et al. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 76, n. 1, p. 103-122, 1973.

LI, Xueqi et al. Applications of oxidases in modification of food molecules and colloidal systems: Laccase, peroxidase and tyrosinase. **Trends in Food Science & Technology**, 2020.

LIMA, B.V. et al. Natural infection of *Acalypha hispida* and *Jatropha podagrica* inflorescences by *Amphobotrys ricini* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, Rockhampton, v. 3, p. 5-7, 2008 .

LIMA, E. F.; ARAÚJO, AE de; BATISTA, F. A. S. Doenças e seu controle. O agronegócio da mamona no Brasil. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 190-212, 2001.

LIMA, E. F.; SOARES, J. J. Resistência de cultivares de mamoneira ao mofo cinzento causado por *Botrytis ricini*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 96-98, 1990.

LIMA, V.P.T.; LEITE, E.A.G.; BOTREL, E.P.; FRAGA, A.C.E NETO, P.C. Intensidade de ataque de mofo cinzento na mamoneira, em diferentes espaçamentos, **Biodiesel**, 2006.

MACRINI, Daclé Juliani et al. Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase: an in vitro evaluation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 715-721, 2009.

MAGALHÃES, Denise Bello et al. Colorimetric assay for lignin peroxidase activity determination using methylene blue as substrate. **Biotechnology techniques**, v. 10, n. 4, p. 273-276, 1996.

MAMO, Jermen et al. Application of Milk-Clotting Protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for Danbo Cheese Production. **Journal of Food Quality**, v. 2020, 2020.

MANSUR, Mariana et al. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2637-2646, 1997.

MAO, Liang et al. Ligninase-mediated removal of natural and synthetic estrogens from water: I. Reaction behaviors. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 2, p. 374-379, 2009.

MARTÍNKOVÁ, L. et al. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: a review. **Chemosphere**, v. 149, p. 373-382, 2016.

MASSOLA, N. S.; BEDENDO, I. P. Doenças da mamoneira (*Ricinus communis*). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas** cultivadas, v. 2, 2005.

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

MEHANDIA, Seema; SHARMA, S. C.; ARYA, Shailendra Kumar. Isolation and characterization of an alkali and thermostable laccase from a novel *Alcaligenes faecalis* and its application in decolorization of synthetic dyes. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00413, 2020.

MELO, F. de B.; BELTRÃO, NE de M.; DA SILVA, P. H. S. Cultivo da mamona (*Ricinus communis* L.) consorciada com feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Semi-Árido. 2003.

MENDES, Marta Aguiar Sabo. Fungos em plantas no Brasil. **Serviço de Produção de Informação**, 1998.

MERIEU, BENCHIHEUB EP BELAHMADI et al. Milk-clotting properties and specific hydrolysis of caseins of the acid protease extracted from *Scolymus maculatus* flowers. 2014.

MILANI, M. et al. Resistência da mamoneira (*Ricinus communis* L.) ao mofo cinzento causado por *Amphobotrys ricini*. **Embrapa Algodão-Documents (INFOTEC-A)**, 2005.

MOROZOVA, O. V. et al. Laccase-mediator systems and their applications: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 523-535, 2007.

NADAR, Shamraja S.; PAWAR, Rohini G.; RATHOD, Virendra K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International journal of biological macromolecules**, v. 101, p. 931-957, 2017.

NAGARAJA, O.; KRISHNAPPA, M. Location and transmission of *Alternaria alternata*, *Botrytis ricini* in castor (*Ricinus communis* L.). **SSRG International Journal of Agriculture and Environmental Science**, v. 3, n. 4, p. 1-5, 2016.

NEERGAARD, Paul. Seed pathology. 1979. Londres: McMillan, 1979. 839 p.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª edição. Artmed Editora, 2015.

NO, Jae Kyung et al. Inhibition of tyrosinase by green tea components. **Life sciences**, v. 65, n. 21, p. PL241-PL246, 1999.

OLAJUYIGBE, Folasade M.; FATOKUN, Cornelius O. Biochemical characterization of an extremely stable pH-versatile laccase from *Sporothrix carnii* CPF-05. **International journal of biological macromolecules**, v. 94, p. 535-543, 2017.

OLIVEIRA, Rafael Neres et al. MANEJO QUÍMICO DO MOFO-CINZENTO-DA-MAMONA CAUSADA POR *Amphobotrys ricini*. 2019.

ORELLANA, R. G.; THOMAS, C. A. Nature of predisposition of castorbeans to *Botrytis*. 1. Relation of leachable sugar and certain other biochemical constituents of capsule to varietal susceptibility. **Phytopathology**, v. 52, n. 6, p. 533-&, 1962.

PAL, Gaurav Kumar; SURESH, P. V. Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. **RSC advances**, v. 6, n. 40, p. 33763-33780, 2016.

PARK, Myung Soo et al. Fungal diversity and enzyme activity associated with sailfin sandfish egg masses in Korea. **Fungal Ecology**, v. 34, p. 1-9, 2018.

PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. **Manual de fitopatologia**, v. 1, p. 343-364, 1995.

PASZCZYŃSKI, Andrzej; CRAWFORD, Ronald L.; HUYNH, Van-Ba. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1988. p. 264-270.

PATEL, Naveen et al. Mode of action, properties, production, and application of laccase: a review. **Recent patents on biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 19-32, 2019.

PATEL, R. J.; BHASKARAN, L. Orange peel as an inducer for Laccase production in a novel fungal strain *peyronellaea pinodella* BL-3/4 and optimization of its cultural parameters by single parameter approach. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 13, n. 16, p. 1656-1667, 2020.

PAWLIK, Anna et al. Purification and characterization of laccase from *Sinorhizobium meliloti* and analysis of the lacc gene. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 138-147, 2016.

PEZET, R.; PONT, V.; HOANG-VAN, K. Enzymatic detoxication of stilbenes by *Botrytis cinerea* and inhibition by grape berries proanthocyanidins. In: **Recent advances in Botrytis research**. Proceedings of the 10th international *Botrytis* Symposium. 1992. p. 87-92.

PONTUAL, Emmanuel V. et al. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1848-1854, 2012.

RAJU, A. Bheema. Biology and Management of *Botrytis* Grey Mould of Castor (*Ricinus Communis* L.). 1999. Tese de Doutorado. ANGRAU: ACH. 80

RAMAMURTHY, V.; UPADHYAY, C. M.; KOTHARI, R. M. An optimized protocol for the preparation and application of acid protease. **Journal of biotechnology**, v. 21, n. 1-2, p. 187-195, 1991.

RANI, Sapna; POOJA, Km. Elucidation of structural and functional characteristics of collagenase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Process Biochemistry**, v. 64, p. 116-123, 2018.

RAO, Mala B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

REED, Gerald. Enzymes in food processing-2. 1975.

RIVERA-HOYOS, C. M. et al. Fungal laccases. *Fungal Biol Rev* 27: 67–82. 2013.
RODRÍGUEZ-COUTO, S. Laccases for denim bleaching: an eco-friendly alternative. *Sigma*, v. 1, p. 10-2, 2012.

SAINI, Amardeep Singh; KUMAR, Jitendra; MELO, Jose Savio. Microplate based optical biosensor for L-DOPA using tyrosinase from *Amorphophallus campanulatus*. **Analytica Chimica Acta**, v. 849, p. 50-56, 2014.

SAINI, Jitendra Kumar; SAINI, Reetu; TEWARI, Lakshmi. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 337-353, 2015.

SANTOS, C.W.V. et al. Purification and characterization of trypsin from *Luphiosilurus alexandri* pyloric cecum. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 8, p. 29-33, 2016.

SARAN, Saurabh; ISAR, Jasmine; SAXENA, Rajendra Kumar. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 70, n. 4, p. 697-699, 2007.

SHARMA, Arun Kumar et al. Isolation and screening of protease producing soil fungi. **Advances in Pharmaceutical Journal**, v. 2, n. 3, p. 100-104, 2010.

SHARMA, Babita; DANGI, Arun Kumar; SHUKLA, Pratyosh. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. **Journal of environmental management**, v. 210, p. 10-22, 2018.

SHIN, Kwang-Soo; KIM, Young Hwan; LIM, Jong-Soon. Purification and characterization of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*. **Journal of Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 503-509, 2005.

SILVA, Jeferson Araújo et al. Esporulação de *Amphobotrys ricini* em frutos de mamoneira como componente de resistência ao mofo cinzento. In: Embrapa Algodão-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA**, 3., 2008, Salvador. Energia e ricinoquímica: anais. Salvador: SEAGRI: Embrapa Algodão, 2008., 2008.

SILVA, Leda VBD et al. Torta de mamona residual e irrigação com efluente sobre crescimento e produção de algodoeiro herbáceo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 12, p. 1264-1270, 2013.

SILVA, Tatielle P. et al. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. **Bioresource technology**, v. 270, p. 263-269, 2018.

SIMÕES-ALVES, Aiany C. et al. Saturated fatty acid-enriched diet-impaired mitochondrial bioenergetics in liver from undernourished rats during critical periods of development. **Cells**, v. 8, n. 4, p. 335, 2019.

SINGH, Gursharan et al. Critical factors affecting laccase-mediated biobleaching of pulp in paper industry. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 1, p. 155-164, 2015.

SINGH, Lokendra; SINGH, Ved Pal. Biodegradation of Textile Dyes, Bromophenol Blue and Congored by Fungus *Aspergillus Flavus*. **Environ. We Int. J. Sci. Tech**, v. 5, p. 235-242, 2010.

SOARES, Dartanhã José. Gray mold of castor: a review. **Plant Pathology**, p. 219-240, 2012.

SOUZA, Paula Monteiro de et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.

STEFFEN, Kari Timo; HOFRICHTER, Martin; HATAKKA, Annele. Purification and characterization of manganese peroxidases from the litter-decomposing basidiomycetes *Agrocybe praecox* and *Stropharia coronilla*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 550-555, 2002.

TEKERE, M. et al. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 4-5, p. 420-426, 2001.

THOMAS, C. A. Nature of predisposition of castorbeans to *Botrytis*. II. Raceme compactness, internode length, position of staminate flowers, and bloom in relation to capsule susceptibility. **phytopathology**, v. 53, p. 249-251, 1963.

THOMAS, C. A.; ORELLANA, R. G. Biochemical tests indicative of reaction of castor bean to *Botrytis*. **Science**, v. 139, n. 3552, p. 334-335, 1963.

THOMAS, C. A.; ORELLANA, R. G. Phenols and pectin in relation to browning and maceration of castorbean capsules by *Botrytis*. **Journal of Phytopathology**, v. 50, n. 4, p. 359-366, 1964.

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

UPADHYAY, Pooja; SHRIVASTAVA, Rahul; AGRAWAL, Pavan Kumar. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 15, 2016.

VALLI, Khadar; WARIISHI, Hiroyuki; GOLD, Michael H. Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. **Biochemistry**, v. 29, n. 37, p. 8535-8539, 1990.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 11, p. 1305-1309, 2004.

VAN PHUONG, Nguyen et al. Identification and evaluation of enzymes gelatinase, amylase, and catalase produced by rice root endophytic bacteria isolated from Hai Duong with antimicrobial properties against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Academia Journal of**, 2021.

VIPOTNIK, Ziva; MICHELIN, Michele; TAVARES, Teresa. Biodegradation of chrysene and benzo [a] pyrene and removal of metals from naturally contaminated soil by isolated *Trametes versicolor* strain and laccase produced thereof. **Environmental Technology & Innovation**, v. 28, p. 102737, 2022.

WAHID, Abdul et al. Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and experimental botany**, v. 61, n. 3, p. 199-223, 2007.

WHITNEY, N. G.; TABER, R. A. 1st report of *Amphobotrys-ricini* infecting *Caperonia-palustris* in the united-states. **Plant Disease**, v. 70, n. 9, p. 892-892, 1986.

WHITNEY, N. Glenn. **Method for controlling *Caperonia palustris* with the fungus *Amphobotrys ricini***. U.S. Patent n. 4,909,826, 20 mar. 1990.

WONG, Dominic WS. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 174-209, 2009.

YADAV, Shikha et al. Isolation, screening and biochemical characterization of laccase producing bacteria for degradation of lignin. **Int J Educ Sci Res**, v. 1, n. 3, p. 17-21, 2014.

YAMUNA, C. et al. Morphological and molecular characterization of anamorph associated with gray mold of castor (*Ricinus communis* L.). **The indian society of oilseeds research**, p. 63-67, 2015.

YAO, Juntao et al. Rapid decolorization of azo dyes by crude manganese peroxidase from *Schizophyllum* sp. F17 in solid-state fermentation. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 18, n. 5, p. 868-877, 2013.

YIN, Xuegui et al. Breeding for Climate Resilience in Castor: Current Status, Challenges, and Opportunities. In: **Genomic Designing of Climate-Smart Oilseed Crops**. Springer, Cham, 2019. p. 441-498.

YOUN, Hong-Duk; HAH, Yung Chil; KANG, Sa-Ouk. Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 132, n. 3, p. 183-188, 1995.

YU, L. Mycoviruses in plant pathogenic fungi *Botrytis cinerea* and *Amphobotrys ricini*. Ph.D. dissertation, **Huazhong Agricultural University**, Wuhan, China, 2016.

YU, Lin et al. Importance of thermal adaptation of *Amphobotrys ricini* in its infection of Asian copperleaf (*Acalypha australis*). **Journal of General Plant Pathology**, v. 85, n. 5, p. 356-366, 2019.

ZAMBARE, Vasudeo; NILEGAONKAR, Smita; KANEKAR, Pradnya. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. **New biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 173-181, 2011.

ZHANG, Yao et al. Fermentation conditions of serine/alkaline milk-clotting enzyme production by newly isolated *Bacillus licheniformis* BL312. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 1289-1300, 2019.

ZIMBARDI, Ana LRL et al. A high redox potential laccase from *Pycnoporus sanguineus* RP15: potential application for dye decolorization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 672, 2016.

ZHOU, Lingling et al. A mycovirus modulates the endophytic and pathogenic traits of a plant associated fungus. **The ISME Journal**, v. 15, n. 7, p. 1893-1906, 2021.

ZHOU, Wenting; ZHANG, Wenxiang; CAI, Yanpeng. Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review. **Chemical Engineering Journal**, p. 126272, 2020.