



## ACESSO ABERTO

**Data de Recebimento:**

21/04/2022

**Data de Aceite:**

13/08/2022

**Data de Publicação:**

17/08/2022

**Revisor por:**Rubens Barbosa Rezende,  
Cicera Kassiana Rodrigues**\*Autor correspondente:**Romero Marcos Pedrosa Brandão  
da Costa, Romero\_brandao@  
yahoo.com.br**SELEÇÃO E PRODUÇÃO DE LACASES A PARTIR DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE FUNGOS FILAMENTOSOS**Julyanne Victória dos Santos Ferreira<sup>1</sup>; Anna Gabrielly Duarte Neves<sup>2</sup>; Juanize Matias da Silva Batista<sup>3</sup>; Romero Marcos Pedrosa Brandão da Costa<sup>4</sup>; Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>5</sup>;<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife/PE.<sup>2</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife/PE.<sup>3</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife/PE.<sup>4</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco. Rua Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, Recife/PE.<sup>5</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife/PE.**RESUMO****Citação:**FERREIRA, J. V. S et al.  
Seleção e produção de  
lacases a partir  
da fermentação em estado  
sólido de fungos  
filamentosos. **Revista  
Multidisciplinar em Saúde**,  
v. 3, n. 3, 2022. <https://doi.org/10.51161/rem/3382>

**Introdução:** As lacases são o grupo de enzimas mais amplamente estudado entre as oxidases, pois podem catalisar a oxidação de compostos fenólicos usando oxigênio molecular como aceitador de elétrons. Além disso, usando mediadores de baixo peso molecular os substratos de lacase podem ser ampliados para incluir compostos não fenólicos. As lacases são aplicadas a nível industrial em diversos setores, na remediação de diversos tipos de contaminante, na degradação de corantes sintéticos de efluentes de indústrias têxteis e sucroalcooleiras no solo, na deslignificação de compostos celulósicos, entre outros. A produção dessa classe de enzimas ocorre principalmente por fungos filamentosos. **Objetivo:** O presente trabalho objetivou selecionar e produzir a enzima lacase por meio de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*. **Material e Métodos:** Foram estudadas sete linhagens fúngicas, as quais foram reativadas da solução de óleo mineral em meio caldo glicosado e posteriormente foram inoculadas em meio Batata-Dextrose-Agar (BDA) sendo mantidas por sete dias para esporulação. Em seguida foi realizada a fermentação em estado sólido, utilizando como substrato o resíduo agroindustrial, farelo de trigo, com teor de umidade de 40% e concentração de esporos de 10<sup>7</sup> esporos/mL, a fermentação ocorreu durante 72h à 30°C. **Resultados:** Todas as linhagens fúngicas estudadas foram produtoras de lacase, porém a linhagem *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 apresentou a maior atividade enzimática de 450,429 U/mL, sendo a atividade específica para lacase desta linhagem de 268,176 U/mL. **Conclusão:** Percebe-se que o potencial desse microrganismo para produção de lacase é inédito e rendeu resultados satisfatórios quando comparado com outros estudos de diversos microrganismos encontrados na literatura.

**Palavras-chave:** *Aspergillus*; Enzimas oxidativas; Resíduos agroindustriais.

DOI: 10.51161/rem/3382

Editora IME© 2021.

Todos os direitos reservados.

## ABSTRACT

**Introduction:** Laccases are the most widely studied group of enzymes among oxidases, as they can catalyze the oxidation of phenolic compounds using molecular oxygen as an electron acceptor. Furthermore, using low molecular weight mediators the laccase substrates can be extended to include non-phenolic compounds. Laccases are applied at an industrial level in different sectors, in the remediation of different types of contaminants, in the degradation of synthetic dyes from effluents from textile and sugar-alcohol industries in the soil, in the delignification of cellulosic compounds, among others. The production of this class of enzymes occurs mainly by filamentous fungi. **Objective:** The present work aimed to select and produce the laccase enzyme by means of filamentous fungi of the genus *Aspergillus*. **Material and Methods:** Seven fungal strains were studied, which were reactivated from the mineral oil solution in glucose broth medium and later inoculated in Potato-Dextrose-Agar (PDA) medium and maintained for seven days for sporulation. Then, solid state fermentation was carried out, using as substrate the agro-industrial residue, wheat bran, with a moisture content of 40% and spore concentration of  $10^7$  spores/mL, the fermentation took place for 72 hours at 30°C. **Results:** All fungal strains studied were laccase producers, however the *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 strain showed the highest enzymatic activity of 450.429 U/mL, and the specific activity for laccase of this strain was 268.176 U/mL. **Conclusion:** It can be seen that the potential of this microorganism for laccase production is unprecedented and yielded satisfactory results when compared to other studies of various microorganisms found in the literature.

**Keywords:** *Aspergillus*; Oxidative enzymes; Agro-industrial waste.

## 1 INTRODUÇÃO

As lacases são enzimas catalisadoras pertencentes à família das oxidases multicobre, são glicoproteínas diméricas ou tetraméricas com quatro átomos de cobre por molécula. Assim, catalisam a oxidação de um elétron de quatro moléculas de substrato redutor concomitante com a redução de quatro elétrons de oxigênio molecular a água. Logo, as lacases são de natureza ecológica, pois catalisam a oxidação ambientalmente amigável de diferentes tipos de substratos aromáticos, juntamente com a redução direta do oxigênio molecular, sem formação de peróxido de hidrogênio intermediário (FONSECA *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2018).

Além disso, lacases podem catalisar a oxidação de compostos fenólicos usando oxigênio molecular como aceitador de elétrons, e usando mediadores de baixo peso molecular, substratos de lacase podem ser ampliados para incluir compostos não-fenólicos (YUAN *et al.*, 2020; MEHANDIA *et al.*, 2020).

Ademais, as lacases apresentam baixa especificidade em substratos, sendo comum a utilização de diversos tipos de resíduos agroindustriais para a sua produção, como resíduos ricos em flavonoides, cascas de frutas cítricas, farelo de soja, borra de café, monômeros de lignina e resíduos lingocelulósicos, folhas de chá usadas e cascas de cebola e kiwi, vêm sendo utilizados tanto na fermentação submersa quanto na fermentação em estado sólido (AGRAWAL, CHATURVEDI & VERMA, 2018; SHARMA *et al.*, 2017).

Dessa forma, quando é discutido o potencial de aplicação da enzima lacase constata-se a sua utilização em vários processos biotecnológicos em diferentes campos industriais, como o de papel e celulose, têxtil, biocombustível, corante, alimentício, farmacêutico, cosmético; e como biocatalisador para síntese de nanopartículas metálicas, bem como na área ambiental, sendo aplicadas em processos de biorremediação de diversos contaminantes (ARREGUI *et al.*, 2019; CHAURASIA, BHARATI & YADAVA, 2022; DEBNATH & SAHA, 2020; [UNUOFIN, OKOH & NWODO, 2019](#); [SHARMA \*et al.\*, 2020](#)).

Logo, essas enzimas são aplicadas em vários processos biotecnológicos: na remediação de contaminante, fenólicos e hidrocarbonetos aromáticos do ambiente, na degradação de corantes sintéticos de efluentes de indústrias têxteis e sucroalcooleiras no solo, na deslignificação de compostos celulósicos, no branqueamento de celulose, no tratamento de águas residuais e na desintoxicação e decomposição de poluentes e micropoluentes ambientais (JUNIOR *et al.*, 2019, SANÉ *et al.*, 2014).

A produção de lacase deu-se inicialmente por plantas, em seguida foram descobertas a produção por fungos e bactérias, entretanto, estudos mais recentes apontam que essa enzima é secretada principalmente por fungos filamentosos (LIU *et al.*, 2017). A maioria dos fungos produtores de lacases pertencem ao grupo Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota, o crescimento desses fungos diminui em condições de carência de nitrogênio e de carbono e as atividades enzimáticas aparecem como metabólitos secundários (MODAL *et al.*, 2005).

Sendo assim, o presente trabalho objetivou a seleção e produção de lacases, por meio de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, visando produzir enzimas com alto rendimento e produtividade para atender à crescente demanda industrial de forma eficiente, econômica e sustentável para uma possível aplicação na remediação de efluentes têxteis.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos e condições de cultivo

As linhagens de *Aspergillus* UCP 1274, 1276, 1279, 1281 e 1290, *Aspergillus niger* URM 5741 e *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 foram reativadas da solução de óleo mineral em meio caldo glicosado segundo a metodologia de Nascimento e colaboradores (2015). Posteriormente, os microrganismos foram inoculados em meio BDA (Batata- Dextrose- Agar) sendo mantidos por sete dias em uma estufa incubadora de BOD (Demanda Bioquímica de oxigênio) à 30°C, permitindo assim a sua esporulação.

### 2.2 Seleção de linhagens fúngicas por meio da fermentação em estado sólido

A seleção foi realizada pela maior atividade enzimática com 72h de produção em fermentação em estado sólido (FES). A condição de fermentação foi realizada segundo a metodologia de Nascimento e colaboradores (2015), modificado pela solução nutritiva de Ergun e Urek, (2017), foi utilizado como substrato fermentativo, o resíduo agroindustrial, farelo de trigo. Logo, 5 g de farelo de trigo, com a granulometria entre 2,0 mm e 0,6 mm, foi umedecido em solução nutritiva rica em sais composta de 1g de glicose; 0,5 g de extrato de levedura; 0,04 g de  $K_2HPO_4$ ; 0,05 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,005 g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,005 g de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ; 0,025 g de  $CuSO_4$  e 0,001 g de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  para cada 100 mL (ERGUN; UREK, 2017) em umidade de 40% acrescido de solução de esporos com concentração de  $10^7$  esporos/mL durante 72h à 30°C.

A extração da enzima lacase foi realizada com água destilada na proporção de 7,5 mL, para cada 1 g de substrato, posteriormente à adição de água, foram colocados em um agitador orbital a 120 rpm, durante 90 minutos em temperatura ambiente (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

### 2.3 Determinação da atividade de lacase e do teor de proteínas totais

A determinação da concentração proteica foi realizada de acordo com o método descrito por Smith e colaboradores (1985) utilizando a albumina soro bovina como padrão. Já a atividade de lacase foi determinada de acordo com a metodologia de Ergun e Urek, (2017), na qual, 50 microlitros das amostras centrifugadas foram inseridas em uma microplaca de 96 poços, em seguida foi inserido 160 microlitros de ABTS ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) 0,002 molar diluído em tampão fosfato de sódio pH 5,15 e foi encaminhado para estufa a 30°C e a leitura para a atividade de lacase foi realizada num leitor de microplaca no comprimento de onda de 405 nm. A atividade enzimática foi definida como 1 U a quantidade de enzima que transforma 1 μmol de substrato/minuto.

## 3 RESULTADOS

Observa-se na tabela abaixo que das linhagens fúngicas estudadas todas são produtoras de lacase. No entanto, as linhagens de *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 e *Aspergillus* UCP 1281, foram as que apresentaram a maior produção de atividade enzimática para lacase.

**Tabela 1** - Determinação da atividade enzimática de Lacase, após 72h de fermentação em estado sólido usando como substrato farelo de trigo.

Microrganismos	Atividade Lacase (U/mL)
<i>Aspergillus sp.</i> UCP 1274	52,466
<i>Aspergillus sp.</i> UCP 1276	324,899
<i>Aspergillus tamaritii</i> Kita UCP 1279	134,079
<i>Aspergillus sp.</i> UCP 1281	428,666
<i>Aspergillus sp.</i> UCP 1290	295,558
<i>Aspergillus niger</i> URM 5741	36,337
<i>Aspergillus serratalhadensis</i> URM 79/18	450,429

Fonte: Autor 2021

O fungo *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 teve a maior atividade de lacase no tempo de 72h de fermentação, sendo de 450,429 U/mL. Ainda em seu estudo o autor da metodologia, Ergun e Urek (2017) relatou que a máxima atividade de lacase foi produzida por *Pleurotus ostreatus* com 408 horas de fermentação em estado sólido usando como resíduo casca de batata 6708,3 U/L ± 75. Sendo o resultado da atividade de lacase produzida pelo *Aspergillus serratalhadensis* inédito e interessante visto que a fermentação também em estado sólido ocorreu em apenas 72 horas.

No trabalho de Kumar e colaboradores (2016), ele relata que a máxima produção de lacase por *Aspergillus flavus* (17,39 UI/ml) foi observada utilizando a fermentação submersa com 288 horas de cultura, sendo o resultado de produção com 72h de fermentação pelo *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 bastante superior e em um tempo de fermentação inferior.

Junior e colaboradores (2019) em seu estudo utilizou o fungo *Pleurotus sajor-caju* para a produção de lacase e com 144h de fermentação submersa e obteve a máxima atividade enzimática de lacase sendo de

130,3 U/L, no entanto ao utilizar sistemas aquosos de duas fases (SDFA) para purificação da enzima e para otimizar a produção, o autor usou diferentes concentrações de indutores (etanol e  $\text{CuSO}_4$ ) que foram capazes de aumentar em 4 vezes a atividade enzimática. Logo, a atividade enzimática máxima após a otimização foi de 539,4 U/L sendo obtida com 72h de fermentação submersa e usando 0,4 Mm de  $\text{CuSO}_4$  como indutor. Entretanto, nesse trabalho ainda não foi realizada nenhum tipo de otimização da produção nem etapas e purificação e foi obtido 450,29 U/mL em 72 horas de fermentação do fungo *A. Serratalhadensis* URM 79/18.

A fermentação em estado sólido (FES) têm inúmeras vantagens em relação à Fermentação Submersa (FS) pois é uma técnica mais simples e de menor custo, além de alta produtividade, mais circulação de oxigênio, tecnologia simples e além de se assemelhar com a habitat natural de vários microrganismos. Na FES as enzimas são produzidas pelos fungos diretamente sobre substrato insolúvel em água. Assim, as atividades metabólicas ocorrem principalmente perto da superfície do substrato e no interior dos poros e difundem-se para a matriz sólida e catalisam a degradação de macromoléculas em unidades menores. Logo, o substrato é tomado pelo fungo para servir como nutrientes. Sendo assim, pelas inúmeras vantagens apresentadas, neste trabalho foi utilizada a FES (SILVA, 2014).

As proteínas desempenham papéis extremamente importantes na maioria dos processos biológicos, atuando como enzimas (DARNEL et al., 1990). Assim, neste trabalho a produção de proteínas totais variou entre 1,487 e 7,132 mg/mL os resultados estão descritos na tabela abaixo. No entanto, as que mais se destacaram foram o *Aspergillus sp.* UCP 1276 e o UCP 1281 sendo o total de proteínas de 6,162 mg/mL e 7,132 mg/mL respectivamente.

**Tabela 2** – Determinação da concentração de proteínas totais e atividade específica para lacase produzidas pela fermentação em estado sólido dos respectivos microrganismos.

<b>Microrganismos</b>	<b>Proteína total (mg/mL)</b>	<b>Atividade específica (Lacase U/mL)</b>
<i>Aspergillus sp.</i> UCP 1274	1,6205	32,376
<i>Aspergillus sp.</i> UCP 1276	6,162	52,726
<i>Aspergillus tamarii</i> Kita UCP 1279	1,487167	90,161
<i>Aspergillus sp.</i> UCP 1281	7,132	60,104
<i>Aspergillus sp.</i> UCP 1290	2,699333	109,494
<i>Aspergillus niger</i> URM 5741	1,636333	22,206
<i>Aspergillus serratalhadensis</i> URM 79/18	1,679667	268,176

**Fonte:** Autor 2021

Observa-se que os fungos que mais produziram proteínas totais não foram os que mais produziram atividade enzimática de lacase. Pois a dosagem de proteínas totais não é específica; o que significa que os fungos que apresentaram alta dosagem de proteínas totais e baixa atividade para lacase apresentam atividades para outros grupos de enzimas, como por exemplo proteases. Sendo assim, o microrganismo selecionado foi aquele que mais produziu atividade específica enzimática para lacase o *A. serratalhadensis* URM 79/18 com 268,176 U/mL.

## 4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados todas as sete linhagens analisadas produziram a enzima lacase. No entanto, o fungo filamentosos *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 destacou-se com a atividade de 450,429 U/mL, sendo a atividade específica de lacase para essa linhagem de 268,176 U/mL. Além disso, observa-se que a linhagem em questão produziu quantidades de enzima lacase superiores aos relatos na literatura.

Entretanto, vale ressaltar que neste trabalho não foram realizadas quaisquer formas de otimização de produção nem de purificação que podem aumentar ainda mais a atividade enzimática. Portanto, conclui-se que o fungo *Aspergillus serratalhadensis* URM 79/18 é um excelente produtor para a enzima lacase, sendo necessários estudos posteriores para possível aplicação da enzima na descoloração de efluentes têxteis.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, K. CHATURVEDI, V & VERMA, P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 4, p 1-12, 2018.
- ARREGUI, L. *et al.* **Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation.** **Microb. Cell Factories**, v. 18, n.1, p. 1-33, nov. 2019.
- CHAURASIA, P. K. BHARATI, S. L & YADAVA, S. Nano-reduction of gold and silver ions: A perspective on the fate of microbial laccases as potential biocatalysts in the synthesis of metals (gold and silver) nano-particles. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, p. 100098, 2022.
- DARNELL, J. *et al.* Molecular Cell Biology. **Scientific American Books**. New York, 1990.
- DEBNATH, R. SAHA, T. **An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi.** **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101645, may. 2020.
- ERGUN, S. O; UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of Agrarian Sciences**, v. 15, n. 2, p. 273-277, jun. 2017.
- FONSECA, M. I. *et al.* Decolorization of Kraft liquor effluents and biochemical characterization of laccases from *Phlebia brevispora* BAFC 633. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 114, p. 443- 451, oct. 2015.
- JUNIOR, J. A. *et al.* Sequential degradation of raw vinasse by a laccase enzyme producing fungus *Pleurotus sajor-caju* and its ATPS purification. **Biotechnology Reports**, dec. 2019.
- KUMAR, R. *et al.* Optimization of lacase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. **Journal of genetic engineering and biotechnology**, v. 14, p.125-131, 2016.
- LIU, J. *et al.* Scalable production, fast purification, and spray drying of native *Pycnoporus* laccase and circular dichroism characterization. **J. Clean. Prod.**, v.127, p. 600- 609, 2017.
- MEHANDIA, S. *et al.* 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, 2020.

- MODAL, E. M. *et al.* Edible mushroom *Pleurotus sajor caju* production on washed and supplemented sugar cane bagasse. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 2, p. 127-132, 2005.
- NASCIMENTO, T. J. *et al.* Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor subullissimus* UCP 1262 in solid-state fermentation. **Scientific Research Publishing**, v. 3, p. 81-91, sep. 2015.
- SANÉ, S. *et al.* Using planktonic microorganisms to supply the unpurified multi-copper oxidases laccase and copper efflux oxidases at a biofuel cell cathode. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 231–238, april. 2014.
- SHARMA, A. *et al.* Flavonoid-rich agro-industrial residues for enhanced bacterial laccase production by submerged and solid-state fermentation. **3 Biotech.**, v. 7, n. 3, 2017.
- SHARMA, B. *et al.* Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 210, p. 10-22, 2018.
- SHARMA, D. *et al.* **Greener approach for pulp and paper industry by Xylanase and Laccase. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, 101604, 2020.
- SILVA, O. S. **Produção de proteases por *Aspergillus* spp e purificação em sistema de duas fases aquosas.** 2014, 92 f. Dissertação (mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco (Ufrpe), Recife.
- SMITH, PAUL K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, oct. 1985.
- UNUOFIN, J. O., OKOH, A. I., NWODOA, U.U. Utilization of agroindustrial wastes for the production of laccase by *Achromobacter xylosoxidans* HWN16 and *Bordetella bronchiseptica* HSO16. **Journal of Environmental Management**, v. 231, p. 222-231, 2019.
- YUAN. H. *et al.* Enhanced decolourization efficiency of textile dye Reactive Blue 19 in a horizontal rotating reactor using strips of BNC- immobilized laccase: Optimization of conditions and comparison of decolourization efficiency. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, jan. 2020.