

## **Um estudo sobre os microrganismos produtores de Polifenoloxidase PPO e seus possíveis métodos de extração**

**Daniela Carolina Ernst**

*Aluna na Especialização em Biotecnologia  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul- UERGS  
[daniela-ernst@uergs.edu.br](mailto:daniela-ernst@uergs.edu.br)*

**Me. Marlene Guevara dos Santos**

*Docente e Orientadora na Especialização em Biotecnologia  
Universidade do Estado do Rio Grande do Sul-- UERGS  
[marlene-santos@uergs.edu.br](mailto:marlene-santos@uergs.edu.br)*

**Dr. Fábio Luís Maciel**

*Docente da UERGS, co-orientador na Especialização em Biotecnologia  
Universidade do Estado do Rio Grande do Sul - UERGS  
[fabio.maciel@uergs.edu.br](mailto:fabio.maciel@uergs.edu.br)*

**Resumo:** A enzima polifenoloxidase (PPO ou PFO – EC 1.10.3.1) é amplamente encontrada na natureza, sendo um metabólito produzido por animais, vegetais e microrganismos (fungos e bactérias). O interesse em pesquisar formas de obtê-la baseia-se em sua relevância biotecnológica, pois enzimas deste grupo são responsáveis pela degradação da lignina e outros polímeros complexos e têm se mostrado importantes na defesa contra patógenos, assim como sua aplicação na formação de biossensores. Para viabilizar a utilização dessa enzima, ela deve ser extraída e purificada. Os processos de extração e purificação da PPO foram ao longo do tempo amplamente pesquisados, utilizando diferentes métodos, tais como: a precipitação de sal, partição trifásica, extração aquosa em duas fases, extração micelar inversa e técnicas cromatográficas. O objetivo desta revisão é apresentar um estudo sobre microrganismos identificados produtores de PPO e os possíveis métodos de extração e purificação da enzima.

**Palavras-chave:** extração, purificação, polifenoloxidase, enzimas.

**Abstract:** The enzyme polyphenol oxidase (PPO or PFO - EC 1.10.3.1) is widely found in nature, being a metabolite produced by animals, plants, and micro-organisms (fungi and bacteria). The interest in researching ways to obtain it is based on its biotechnological relevance because enzymes of this group are responsible for the degradation of lignin and other complex polymers and have been shown to be important in the defense against pathogens, as well as its application in the formation of biosensors. To enable the use of this enzyme, it must be extracted and purified. The extraction and purification processes of PPO have been widely researched over time, using different methods such as salt precipitation, three-phase partitioning, two-phase aqueous extraction, reverse micellar extraction, and chromatographic techniques. The aim of this review is to present a study on identified microorganisms producing PPO and the possible methods of extraction and purification of the enzyme.

**Keywords:** extraction, purification, polyphenol oxidase, enzymes

## 1. Introdução

Há 110 anos, o primeiro relatório sobre a identificação e caracterização da polifenol oxidase, enzima conhecida pelo nome comum de tirosinase, foi publicado por Bertrand (1896). Quarenta e dois anos depois, um procedimento para seu isolamento em grande escala foi publicado por Keilin e Mann (1938) e também por Kubowitz (1938). Graças a esses esforços para pesquisar a enzima, foi possível desenvolver o conhecimento mais detalhado das propriedades da PPO. Nesses primeiros trabalhos, a presença de cobre no sítio ativo era clara e as semelhanças com a hemocianina eram evidentes. Já em 1956, Mason discutiu a estrutura enzimática e as possíveis funções da PPO. Em 1966, Mason sugeriu que era necessário determinar o número de átomos de cobre no sítio ativo, a natureza das isoenzimas PPO e a natureza das atividades da catecolase e cresolase, e se eram devidas à mesma estrutura da PPO. O estudo destas hipóteses foi bem-sucedido, mas ainda persistem dúvidas sobre as atividades da catecolase e da cresolase, embora esteja bastante claro que ambas as atividades são devidas a uma única enzima.

A polifenoloxidase (PPO ou PFO; registro CAS EC 1.10.3.1 - 1,2 benzenodiol: oxigênio óxido-redutase), pode ser nomeada de diferentes formas: tirosinase, polifenolase, fenolase, catecoloxidase, cresolase ou catecolase. Esse grupo de enzimas está associado à classe das oxidorreductases, envolvidas em processos que catalisam reações de oxirredução, tendo o substrato como doador de hidrogênio ou elétron, da mesma forma que os compostos fenólicos. Como são oriundas de diversas fontes bioquímicas, as atividades enzimáticas diferem de acordo com o substrato específico (Simpson *et al.* 1997). O mecanismo de ação da enzima pode ser exemplificado a partir de duas reações: quando na presença de uma molécula de oxigênio, a PPO catalisa a hidroxilação de um monofenol e produzirá um difenol, que dará origem a uma reação de oxidação com redução das moléculas de hidrogênio do difenol e produção será da quinina. De acordo com Diwakar *et al* (2015), o local ativo de uma enzima segue transações de met, oxi e deox de forma cíclica durante a reação de catálise (Diwakar *et al* 2015; Mishra & Gautam, 2016).

Ela tem sido vista como uma enzima vantajosa e de amplo interesse, pois está envolvida em diferentes processos catalíticos e metabólicos na natureza, tanto nos vegetais, como nos microrganismos, principalmente em fungos, cianobactérias e em alguns animais (Mendonça & Guerra, 2003).

Dentre as vantagens, destacamos sua capacidade de agir na degradação da lignina e na oxidação do ácido indolacético, além de desempenhar com sucesso ação de defesa contra agentes patológicos em diferentes cultivares, estando relacionada com resistência a doenças.

Também é necessário destacar a importância comercial da PPO, por ser aplicada na produção de produtos em substituição a componentes químicos, uma vez que estas moléculas são biodegradáveis e utilizam condições amenas de catálise, dependendo do menor gasto energético, sendo, portanto, matéria-prima ecológica, aliado ao fato de ser obtida com controle eficiente dos processos de extração, purificação e aplicação, apresentando alto rendimento, elevada especificidade e estereosseletividade (Monteiro, 2009). Além de diminuir os riscos ocupacionais e ambientais, dentre outros. Mesmo assim, ainda existem alguns empecilhos, em especial os relacionados aos custos de produção e recuperação enzimática, que dificultam a catálise assistida quando se pensa em produção enzimática em larga escala.

Essa metaloproteína foi identificada na membrana tilacóide, lúmen, mitocôndria, peroxissomas, cianobactérias e cloroplasto das células vegetais (Batista *et al.*, 2014). Nas plantas, esses compostos atuam principalmente como agentes de defesa em resposta a estresses causados aos frutos e vegetais, conferindo-lhes adstringência, coloração, sabor e aroma. Considerando esse cenário, podemos definir as PPOs como um grupo de compostos de substâncias diversificadas, que possuem ao menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila, ou a outros grupos como ésteres, glicosídeos, entre outros, sendo os ácidos fenólicos (cafeeico, clorogênico, ferúlico, gálico, p-cumárico), os flavonoides (antocianinas, flavanas, flavonas, flavonóis, isoflavonas) e os taninos os mais importantes (Escarpa; Gonzalez, 2001).

Contudo, é imprescindível destacar que as características enzimáticas podem ser alteradas através de técnicas de engenharia de proteínas, ou engenharia enzimática, conhecidas como técnicas de DNA recombinante. As enzimas extraídas de microrganismos têm sua capacidade enzimática potencializada a partir das transferências de informações genéticas para outro organismo hospedeiro, cultivado sob as melhores condições. Essas técnicas têm sido utilizadas com sucesso em outras enzimas, no sentido de ampliar a tolerância dos biocatalisadores, valores de pH extremos e solventes orgânicos, além de características específicas da própria catálise (Novozymes, 2003). O que permite tornar o processo de purificação em grande escala e a redução do número de etapas mais efetivas, e assim aumentar o rendimento de extração, auxiliando na redução de custos de produção.

Mesmo que a enzima já tenha sido amplamente descrita e algumas metodologias de extração e purificação reportadas (Mayer, 2006; Diwakar, 2015; Kamal et al., 2015; Yoruk e Marshall, 2003; Queiroz et al., 2008; Mishra e Gautam, 2016), foi identificada uma lacuna significativa a respeito da identificação e caracterização de microrganismos produtores de PPO, assim como a de uma descrição detalhada dos métodos empregados na extração e purificação de PPO a partir desses microrganismos.

Seja por opção dos autores ou pela quantidade estabelecida de páginas impostas por algumas revistas, a maior parte dos trabalhos visitados, para a escrita deste artigo, fez a descrição de fontes, das suas análises e de mecanismos e algumas propriedades físico-químicas, caracterização molecular, genotípica da PPO, e até mesmo seus dados quantitativos de apoio, sem, contudo, apresentarem uma descrição apurada dos processos de extração e purificação. Dessa maneira, o presente artigo busca apurar pesquisas relacionadas à produção e à extração da PPO a partir de microrganismos, assim como apresentar possíveis métodos de extração e purificação.

## **2. Microrganismos produtores de PPO**

Como dito anteriormente, as enzimas PPO têm sido pesquisadas e revistas com frequência, e entre as revisões gerais cabe destacar a realizada por Steffens et al. (1994), por ainda ser considerada uma das mais completas realizadas sobre a PPO. Além disso, foram publicadas revisões de aspectos específicos da bioquímica da PPO. Nas plantas, a enzima foi discutida por Yoruk e Marshall (2003), mas grande parte de sua revisão abrange diferentes possibilidades de extração e purificação, tendo se tornado trabalho de referência para as pesquisas em microrganismos e assim, utilizado em outros estudos.

O mecanismo de reação da tirosinase em plantas e microrganismos foi discutido detalhadamente por Lerch (1995), Sanchez-Ferrer et al. (1995), os quais apresentam descrições da presença de PPO em diferentes tipos de organismos (bactérias, fungos, plantas e mamíferos). Ainda no mesmo estudo, os autores enfatizam a importância da enzima na melanogênese, ou seja, no processo de pigmentação das estruturas externas dos microrganismos.

É um mecanismo de defesa em resposta à exposição à luz; em organismos humanos, a melanogênese é seguida pelo rápido recrutamento de células imunológicas. Tanto a pigmentação quanto a resposta imune podem ser reguladas por interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Nos fungos, o papel da melanina está relacionado à diferenciação dos órgãos reprodutivos e à

formação de esporos, à virulência de fungos patogênicos e à proteção dos tecidos após lesões (Gadd *et al.*, 1980; Bell & Wheeler 1986). Além disso, a tirosinase é responsável pelo escurecimento enzimático indesejado de frutas e vegetais (Martinez & Whitaker, 1995) que ocorre durante a senescência ou danos no momento do manuseio pós-colheita, o que torna extremamente importante a identificação de novos inibidores da tirosinase. No entanto, além dessa função no escurecimento indesejado, a atividade da tirosinase é necessária em outros casos (passas, cacau, folhas de chá fermentadas), em que ela produz organolépticos distintos.

Existem diferentes fontes de extração de PPO quando relacionadas a frutos e folhas de diferentes espécies de plantas. As análises da literatura deixam claro que as PPOs são bastante diversas, tanto em suas propriedades quanto em sua distribuição. Jaenicke e Decker (2003) apontam que: "provavelmente não existe uma única tirosinase: as enzimas encontradas em animais, plantas e fungos são diferentes com relação a suas sequências, tamanho, glicosilação, ação e ativação". Ao discutir a respeito da árvore filogenética da PPO, Wichers *et al.* (2003) concluem que as tirosinases (PPOs) se organizam em grupos de plantas superiores, animais vertebrados, fungos e bactérias - as homologias dentro desses grupos são consideravelmente maiores do que entre eles. Entretanto, as PPOs têm pelo menos uma coisa em comum: todas elas têm em seu local ativo um centro de cobre dinuclear, no qual o cobre trivalente está ligado a resíduos de histidina, e essa estrutura é altamente conservada.

Alguns estudos apontam que, de acordo com o nível de maturidade de alguns frutos, modifica-se a quantidade de PPO presente, como, por exemplo, na Solanaceae '*solanum lycocarpum*', também conhecida como lobeira, fruta-do-lobo ou guarambá. Em diferentes níveis de maturidade dos frutos, observaram-se níveis mais altos de PPO em frutos não maduros do que os frutos maduros (Batista *et al.*, 2014). Tal fato pode ser explicado a partir de outras pesquisas que identificaram, durante o processo de maturação, a destruição da membrana tilacóide, responsável por metabolizar a maior parte das proteínas e enzimas. Resultados semelhantes foram identificados para o fungo basidiomiceto *Lactarius pergamenus*, ou seja, os níveis de PPO foram diminuindo com a maturação dos corpos de frutificação (Tsivinska *et al.*, 2015).

Na mesma direção, foi realizada uma revisão da tirosinase fúngica, a partir de cogumelos comestíveis, incluindo uma lista de inibidores, propriedades da enzima e seu uso potencial para fins clínicos, publicada por Seo *et al.* em 2003. Importante destacar que as pesquisas envolvendo cogumelos comestíveis para uso terapêutico têm crescido exponencialmente nos últimos anos, devido, não exclusivamente, mas principalmente, à tentativa de redução de efeitos colaterais causados por medicamentos convencionais.

Os cogumelos são facilmente obtidos em quantidades relativamente grandes e baratas. Historicamente, as pesquisas com cogumelos comestíveis acontecem desde 1895, quando o cogumelo *Russula nigricans* foi identificado, observou-se que sua polpa ficava vermelha e depois preta, se exposta ao ar (Bourquelot et al 1895). As pesquisas foram iniciadas na tentativa de descobrir os mecanismos envolvidos, ou seja, o principal responsável pela mudança de cor da PPO. Essa enzima foi posteriormente identificada como tirosinase, cujo sítio ativo contém um cluster de cobre binuclear no cogumelo comum (*Agaricus bisporus*), assim como na tirosinase do melanoma maligno humano, ou seja, pesquisas com cogumelos comestíveis têm mostrado potencial para criação de alternativas viáveis, para o tratamento de neoplasias malignas (Yuran et al 2022). São reconhecidos como candidatos potenciais para a extração de tirosinase e sua aplicação em estudos clínicos. Tal situação pode tornar as tirosinas fúngicas populares entre os pesquisadores, ampliando sua disponibilidade comercial e viabilizando estudos visando a sua maior aplicabilidade.

Adicionalmente, no setor alimentar, o escurecimento fúngico que afeta o cogumelo *Agaricus bisporus*, *Pleurotus Ostreatus* entre outros, ainda apresenta significativa importância econômica, tendo em vista que sua coloração modifica-se e torna-se menos atraente para as prateleiras dos supermercados e consumo. Ademais, os mecanismos subjacentes do escurecimento enzimático nesse organismo foram estudados por Jolivet et al. (1998), com foco no envolvimento da tirosinase nesse processo.

Em relação às tirosinases fúngicas e suas aplicações em bioengenharia e biotecnologia, cabe destacar a pesquisa realizada por Halalouili et al. (2006), a qual aborda em profundidade a maioria dos aspectos dessas PPOs e serve como base para outras pesquisas com microrganismos até os dias atuais.

As diferenças encontradas entre as PPOS de plantas e fungos sugerem que as mesmas podem ser classificadas como metaloenzimas que contêm um centro de cobre triplo, homóloga à hemoglobina. A hemocianina transporta oxigênio em moluscos e apresenta dois sítios N-terminal que contêm o centro de cobre e um domínio C-terminal menor, conectado por um ligante alfa-helicoidal. Marusk et al. (2006) presumem que o mesmo deva ocorrer com a polifenol oxidase de plantas e fungos, embora a estrutura de uma polifenol oxidase contendo o domínio C-terminal não tenha sido determinada.

Os pesquisadores demonstraram que várias características estruturais importantes são conservadas nos domínios N-terminais das polifenol oxidases de várias plantas e fungos. O que pode ser considerado um marco indicativo do início da região de ligação que conecta os domínios N-terminal e C-terminal. Os alinhamentos de sequência e previsões de estrutura

secundária do trabalho indicam que os domínios C-terminais das polifenol oxidases provavelmente são semelhantes em estrutura terciária aos da hemocianina. Importante destacar que a hemocianina transporta oxigênio e atua na defesa imunológica (Marusek et al., 2006).

Para os fungos, a localização da PPO não é totalmente clara. Em geral, ela parece ser uma enzima citoplasmática. Entretanto, uma PPO de *Pycnoporus*, super expressa em *Aspergillus niger*, pode ser direcionada para o meio de crescimento extracelular (Halaouili et al., 2006). Uma PPO adicional está presente no micélio de *Pycnoporus sanguineus*, que tem uma atividade de tirosinase (Halaouili et al., 2005). Pelo menos em alguns casos, a PPO fúngica está associada à parede celular, ocorrendo aparentemente na matriz extracelular (Rast et al., 2003). Outros fungos apresentam comportamento semelhante, tais como *Lactarius pergamenus*; *Entomocorticium sp.*, *Trametes versicolor*, e *Polyporus vicolor*, por produzirem PPO como uma fração extracelular (Tshivinska et al., 2015, Valiev et al., 2009, Lacki e Duvnjak, 1999). Os *Entomocorticium sp.*, apresentam propensão à produção de celulose extracelular assim como PPO (Valiev et al., 2009). Diferentemente do *Aspergillus nidulans*, que apresenta capacidade de produção intracelular do pigmento melanina mediada pela PPO (Bull and Carter, 1973).

Os pesos moleculares da PPO fúngica apresentam uma diversidade considerável. Parte dessa diversidade é genética, conforme indicado pelo agrupamento na árvore filogenética da enzima (Halaouili et al., 2006), e parte pode ser atribuída a artefatos que surgem durante o isolamento da enzima. Essa questão é discutida por Halaouili et al. (2006).

A maior parte das enzimas PPO extraídas de fungos ainda não foi estudada em termos mais aprofundados de extração e purificação, apresentando potencial para futuros estudos estratégicos para bioprospecção, pois seus processos fermentativos associados aos fungos podem ser amplamente aplicáveis na indústria biotecnológica, por não serem facilmente contaminados, possuírem baixo custo de obtenção e rapidez nos processos de purificação.

Diferentemente do que acontece com os fungos, ainda não existem estudos robustos acerca da caracterização da PPO em bactérias, embora o sequenciamento do genoma tenha sugerido que os genes que codificam essas atividades estejam amplamente distribuídos. A atividade da lacase foi descrita pela primeira vez em uma bactéria nos estudos de Givaudan et al. (1993) realizados em *Azospirillum lipoferum*. Recentemente, a atividade da lacase foi descrita por Solano et al. (2000) em outros microrganismos, como *Marinomonas mediterranea*, por Martins et al. (2002) em *Bacillus subtilis*, e por Grass et al. (2001) em *Escherichia coli*.

As tirosinases bacterianas foram descritas pela primeira vez em *Streptomyces* e associadas à síntese de melanina nesse gênero (Huber et al 1985). A atividade da tirosinase também foi associada ao processo de melanização em *Sinorhizobium meliloti* (Mercado et al. 1993) e em *M. mediterranea* (Lopez et al. 2004). Pelo menos em *Streptomyces* e *M. mediterranea*, ainda de acordo com os supracitados autores, inspirados em estudo de Tseng et al. (1990), os genes da tirosinase estão presentes em um operon junto com um segundo gene envolvido na transferência de cobre para a apo tirosinase.

Os estudos de Sánchez et al (1997) identificaram a bactéria marinha melanogênica *M. mediterranea* como sendo o primeiro procarioto que expressou duas PPOs diferentes: uma tirosinase envolvida na síntese de melanina, que é fortemente ativada in vitro pelo dodecil sulfato de sódio (SDS), e a outra uma lacase ligada à membrana, cuja função fisiológica ainda é incerta (Solano et al, 2000).

Após essas pesquisas, ainda foram obtidas evidências da existência de tirosinases e lacases em alguns outros gêneros de bactérias, como, por exemplo, a atividade da lacase descrita em estudos envolvendo *Streptomyces* (Arias et al, 2003), (Endo et al, 2003) e *S. meliloti*, realizadas por (Castro et al, 2002), cuja atividade de tirosinase foi descrita anteriormente nos estudos de Huber e Lerch, em 1985, e Mercado et al (1993). No entanto, não há dados sobre a possível vantagem fisiológica de expressar duas PPOs que estão tão intimamente relacionadas em termos de especificidade de substrato (Hernandez et al, 2005).

Em relação aos processos fermentativos bacterianos, essas apresentam processo mais rápido quando comparado com a fermentação fúngica, como acontece, por exemplo, com as bactérias termofílicas *Thermomicrobium roseum*, *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sp*, que foram estudadas para a produção de PPO e identificada sua presença intracelular (Guray e Sanlı-Mohamed, 2013). Contudo, esses microrganismos precisam de uma etapa adicional, tendo em vista que a enzima está localizada intracelularmente. Nos artigos consultados, referentes a esses microrganismos com essas conformações enzimáticas, foi escolhida a ruptura celular como caminho de extração da enzima através de métodos como maceração, sonicação também conhecida como ultrassom (Guray & Sanlı-Mohamed, 2013), agitação de alta velocidade com as esferas de ballotine, e moagem com areia (Bull e Carter, 1973).

Através do estudo realizado por Hernandez et al (2005) com a bactéria *Ralstonia solanacearum* foi possível perceber que vários genes supostamente poderiam codificar a polifenoloxidase. Dessa maneira, os pesquisadores empenharam esforços para detectar todos

os tipos de atividades da PPO, inclusive atividades de lacase, cresolase e catecol oxidase, em extratos celulares desse microrganismo.

As condições para os ensaios de PPO foram otimizadas para o substrato fenólico, o pH e a concentração de dodecil sulfato de sódio (SDS), comprovando que três PPOs diferentes podem ser expressas. Os genes que codificam as enzimas foram correlacionados de forma inequívoca com as atividades enzimáticas detectadas pela geração de mutações nulas nos genes usando mutagênese de inserção com um plasmídeo suicida e estimulando as alterações nos níveis de atividades enzimáticas em comparação com os níveis na cepa do tipo selvagem. Neste estudo, verificou-se que a proteína codificada pelo locus RSp1530 é uma proteína de cobre múltiplo com atividade de lacase. Dois outros genes - RSc0337 e RSc1501 - codificam proteínas de cobre não azuladas que exibem homologia com tirosinases.

O produto do RSc0337 tem forte atividade de tirosina hidroxilase, e foi demonstrado que essa enzima está envolvida na síntese de melanina por *R. solanacearum*. O produto do gene RSc1501 é uma enzima que mostra clara preferência pela oxidação de o-difenóis. A caracterização preliminar dos mutantes obtidos indicou que as PPOs expressas por *R. solanacearum*, podem participar da resistência a compostos fenólicos, uma vez que os mutantes apresentaram maior sensibilidade à l-tirosina do que a cepa do tipo selvagem. Esses resultados sugerem uma possível função no processo patogênico para evitar os mecanismos de resistência das plantas que envolvem a participação de compostos fenólicos.

Em relação aos meios de cultura, o mais utilizado em processos fermentativos de fungos e bactérias, é o extrato de levedura-glicose, por ser um excelente estimulante para o crescimento bacteriano, como exposto no *Quadro Síntese I* abaixo descrito.

A presença de minerais como cobre, ferro e sais de manganês, foi observada e constatada com efeitos positivos tanto na produção quanto na fermentação de PPO (Diwakar et al, 2012; Bull e Carter, 1973). Cabe também salientar a importância do local de extração da enzima, se intra ou extracelular, a sua localização definirá qual técnica de extração e purificação será utilizada. Com o passar do tempo, novas técnicas de aproveitamento de material de descarte têm sido desenvolvidas, assim como maneiras de modificar biogeneticamente essas moléculas, tornando a produção/extração e fermentação de PPO um processo mais acessível.

*Quadro Síntese 1. Meios de fermentação para produção de PPO*

Microorganismo produtos	Tipo do meio	Localização da PPO	Referência
<i>Entomocorticium sp</i>	Meio de extrato de levedura-glicose	Extracelular	(Valiev et al., 2009)
<i>Trametes versicolor</i>	Meio de extrato de levedura-glicose	Extracelular	(Lacki and Duvnjak, 1999)
<i>Polyporus zler vicolor</i>	Meio de extrato de levedura-glicose	Extracelular	(Dion, 2012)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Glucose-nitrato-meios de sal	Intracelular	(Bull and Carter, 1973)
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Extrato de levedura -Triptona média	Intracelular	(Givaudan et al., 1993)
<i>Bacillus sp.</i>	Extrato de tostado Triptona média	Intracelular	(Guray and Sanli-Mohamed, 2013)

Fonte: Panadare et al 2018

## 2.1 O papel da PPO na patogenicidade dos fungos e nas respostas de defesa

A indução da PPO em fungos é muito menos estudada do que a indução da PPO em plantas. A infecção do fungo *Agaricus bisporus* com *Pseudomonas tolaasii* leva à descoloração do píleo (chapéu). Essa descoloração é acompanhada pela indução da PPO fúngica (Soler-Rivas et al., 2000). O mesmo efeito pode ser induzido pelo tratamento de espaços fúngicos com extratos contendo a toxina bacteriana tolaasina ou com tolaasina purificada. A indução da atividade da PPO pode ser atribuída à conversão de uma PPO latente, em uma forma ativa contendo como resultado do tratamento com extratos parcialmente purificados, enquanto a adição de tolaasina pura induziu à transcrição de um gene que codifica a PPO.

Assim, o tratamento com o extrato bacteriano teve um efeito duplo: modificação pós-traducional da PPO e indução da formação de mRNA. Nesse estágio, não está claro se o aumento do conteúdo de PPO no fungo após a infecção é parte de uma resposta de defesa ou simplesmente o resultado da interrupção do metabolismo celular no hospedeiro.

As semelhanças com os processos de indução de PPO em plantas são claras, mas são necessários estudos adicionais com urgência quando relacionados a microrganismos. Em relação à melanina fúngica na patogênese, esta foi analisada por Jacobson (2000). Além

da função protetora da melanina, ela é aparentemente necessária nas paredes celulares do apressório para que possam desenvolver o potencial osmótico necessário para romper as paredes celulares do hospedeiro.

Essa ideia é apoiada pela observação de que os mutantes de *Magnaporthe grisea*, também conhecido como fungo da brusone do arroz, sem melanina, não conseguem desenvolver um alto potencial osmótico. Embora a revisão de Jacobson se concentre na importância da melanina em infecções fúngicas e doenças humanas, as implicações para as interações entre fungos e plantas são óbvias.

Uma função interessante da PPO fúngica emerge de um estudo de interações fúngicas (Score et al., 1997), que destaca experimentos nos quais diferentes espécies de fungos cresceram juntos em culturas puras ou mistas em placas de Petri. Nesta experiência, foi demonstrada a formação de peroxidase e PPO.

A formação de peroxidase, lacase e tirosinase foi acompanhada no meio. Embora esses tenham sido experimentos qualitativos, os resultados indicaram que alguns dos fungos, inclusive o *Trichoderma sp.*, liberaram PPO quando cresceram em conjunto com outra espécie de fungo, embora a atividade da PPO não tenha sido detectada especificamente na zona de interação. No entanto, o fato de a tirosinase ter sido liberada no meio é interessante. O fato de as enzimas não terem sido isoladas ou quantificadas talvez justifique algumas ressalvas quanto à sua recuperação e purificação.

### **3. Extração, Recuperação e Purificação de PPO**

As técnicas de purificação de enzimas são comuns às de todas as demais proteínas. No caso específico da PPO, é fundamental considerar que qualquer técnica de purificação empregada deve, além de permitir recuperar a proteína numa forma mais pura, proporcionar a obtenção da proteína na forma ativa. Em outras palavras, a enzima não pode perder sua atividade. Os diferentes procedimentos, amplamente empregados na purificação das enzimas, podem ser agrupados com base na característica da proteína que serve como base para a separação.

Em relação às possibilidades de extração, Nadar *et al* (2017) apontam o emprego bem sucedido de purificação parcial, através da partição do processo em três fases: extração aquosa em duas fases, extração assistida por surfactantes, assim como a cromatografia, sem, contudo, não citam no artigo qual tipo de cromatografia foi empregada para extração e purificação da enzima. Tal metodologia, em associação a novas ferramentas que podem intensificar algumas etapas desses processos, tais como a utilização de operações unitárias

como a do ultrassom em escala de bancada, têm demonstrado eficácia na melhora do rendimento e na atividade da enzima em questão (Niphadkar & Rathod, 2015).

Importante destacar que aproximadamente 60% das enzimas industriais são produzidas por fungos filamentosos, 24% por bactérias, 4% por leveduras e os 10% restantes por animais e plantas (Raveedran et al, 2021). Destes estimativos de produção, 50% são absorvidos pela indústria alimentícia, sendo essa a maior empregadora de biomoléculas em seus processos de produção (Sachan, 2018).

Neste sentido, a produção de enzimas como a PPO, extraída a partir de microrganismos é vantajosa, levando-se em conta que maiores rendimentos são obtidos em menor tempo, menor volume residual é gerado e a produção/extração da enzima não fica à mercê da sazonalidade. Outra vantagem importante relaciona-se com o substrato, que pode ser de origem agroindustrial, além da possibilidade, como mencionado anteriormente no texto, de utilizar técnicas de bioengenharia de DNA recombinante para estimular/favorecer sua produção, melhorando aspectos tanto químicos quanto fisiológicos das enzimas, potencializando seu rendimento (Adrio; Demian, 2010). Outra contribuição significativa da enzima relaciona-se com a facilidade na purificação, tendo em vista que ela é secretada pela própria bactéria ou fungo, apresentando-se na porção extracelular, o que facilita e diminui os custos na obtenção do bioproduto. Como mencionado anteriormente, em alguns microrganismos a PPO é mantida na porção intracelular e, assim, requer mais empenho nos processos para extração e purificação, o que ocasiona aumento nos custos de produção.

Dessa maneira, torna-se imprescindível desenvolver e pesquisar diferentes métodos, que visem à diminuição dos custos de extração, para além dos métodos básicos, como precipitação por solvente (Guray e Sanlı-Mohamed, 2013) e precipitação baseada em pI (Cheng et al., 2014), mas também métodos como eletroforese em disco (Tsvinska et al., 2015), podem ajudar a determinar as isoformas da enzima. A maioria dos métodos listados aqui é explicada abaixo em termos de sua eficiência de extração de PPO.

Nas extrações de PPO à fonte fresca, geralmente, mas não exclusivamente, a enzima é coletada e homogeneizada com tampões como fosfato e acetato na faixa de pH de 5 a 7. Esses extratos podem ser utilizados posteriormente na aplicação de diferentes métodos. Uma exceção a isso foi observada no estudo de extração de PPO realizado por Batista et al. (2014), no qual o uso de fonte seca, em vez de fonte fresca, foi estudado para a extração de PPO e não foi observada nenhuma diminuição significativa na atividade da enzima após a secagem (Batista et al., 2014).

Quanto à presença de fenóis, identificaram-se dificuldades na atividade da enzima e no processo de purificação por ligação irreversível. A adição de removedores, tais quais

fenil como polivinilpirrolidona (PVP) ou ácido ascórbico, é geralmente realizada (Batista et al., 2014, Sojo et al., 1998). A solubilidade das enzimas, especialmente as ligadas à membrana, pode ser aumentada pela adição de surfactantes como SDS em uma concentração muito baixa. O uso de SDS pode ser considerado como um bom ativador da PPO (Cheema e Sommerhalter, 2015). Em alguns casos, a adição de inibidores de serina protease e agentes quelantes como o EDTA foram utilizados buscando evitar a degradação da enzima (Chazarra et al., 1996).

### **3.1 Precipitação**

A precipitação é um processo de separação com o objetivo de diminuir a solubilidade do meio para obtenção de um precipitado que não tenha suas características biomoleculares alteradas, sendo assim possível realizar posteriormente a ressolubilização da amostra, com o mínimo de perdas (Kilikian & Pessoa Jr, 2020).

Dentre as etapas envolvidas, três desempenham papel fundamental e precisam ser descritas. A primeira relaciona-se com o agente precipitante, tendo em vista que este está invariavelmente ligado ao tipo de processo que será realizado e também à temperatura de trabalho, faixa de pH. Uma vez adicionado ao meio, deve ser retirado ao final do processo. É possível combinar os agentes e obter propriedades diferenciadas para a solução/suspensão. O segundo fator relaciona-se com a formação de agregados, pois depende diretamente da natureza da biomolécula que se pretende recuperar: proteínas, carboidratos, lipídios e nucleotídeos. O terceiro fator relaciona-se com a separação e/ou remoção do produto de interesse (precipitado); para essa ação, pode-se fazer uso de diferentes técnicas: centrifugação, filtração de fluxo transversal, decantação, combinadas ou não em sequência com a cromatografia, ou esta sendo utilizada somente após a ressolubilização do precipitado (Kilikian & Pessoa Jr, 2020).

A separação de biomoléculas por precipitação é extremamente vantajosa, tendo em vista que utiliza equipamentos simples no quesito operacional, principalmente quando operados em regime contínuo, e envolve agentes precipitantes de baixo custo operacional, tais como: sais, álcoois, acetonas e polímeros. Contudo, existem outros tipos de agentes promotores da precipitação (sais neutros, polímeros não iônicos, calor, polietrólitos, precipitação isoelétrica, sais metálicos e solventes orgânicos).

Esses, de igual modo, apresentam vantagens e desvantagens, como pela variação de temperatura (aquecimento e resfriamento), ajuste de pH e adição de reagentes bioespecíficos como na imunoprecipitação. Organizamos em modelo de quadro síntese essas informações,

de maneira a evidenciar as vantagens e desvantagens desses tipos de separação e que podem ser aplicados às PPOs.

Quadro Síntese II - Principais métodos de precipitação de proteínas

Agente de precipitação	Precipitantes	Princípio	Vantagens	Desvantagens
Sais neutros (salting out)	Sulfato de amônio, magnésio, sódio, Acetato de Amônio, Cloreto de Magnésio, Citrato de Sódio	Interações hidrofóbicas pela redução da camada de hidratação da proteína	Uso universal a baixo custo. Sais podem estabilizar contra desnaturação, ou proteólise e contaminação microbiana	Corrosivo. Liberação de amônia em pH alcalino.
Temperatura	Calor	Interações hidrofóbicas e interferência das moléculas de água nas ligações de hidrogênio	Baixo custo Simples, atuando junto com pH, sais e solventes	Risco de desnaturação
Precipitação isoelétrica	ácidos minerais (fosfóricos, clorídrico, sulfúrico) Ácido Acético	Neutralização da carga global da proteína pela alteração do pH do meio	Uso de pequenas quantidades de precipitante	Risco de desnaturação
Sais metálicos	Manganês, ferro heme gás carbônico, Zinco, Cádmio (ligam-se aos ácidos carboxílicos e compostos nitrogenados)  Chumbo, Magnésio, Bário, Cálcio (Ligam-se somente a ácidos carboxílicos)  Mercúrio e prata (ligam-se aos grupos sulfidríla)	Formação de complexos	Uso de pequenas quantidades de precipitante	Risco de desnaturação

Solventes orgânicos	Metanol, Etanol, Acetona, n- propanol, i-ropanol, 2-metoxietanol, Eteres	Redução da constante dielétrica do meio, aumentando as interações eletrostáticas intermoleculares	Facilidade de reciclagem Facilidade na remoção do precipitado, propriedades bactericidas.	Risco de desnaturação; Inflamável e explosivo
Polímeros	Polietilenoglicol (PEG)	exclusão da proteína da fase aquosa, reduzindo a quantidade de água disponível para a solvatação da proteína	Uso em pequenas quantidades de precipitante que propicia efeito estabilizante	aumento da viscosidade do meio

Fonte: Adaptado Pessoa et al (2020).

A partir do quadro, podemos constatar que a diferenciação na temperatura está diretamente relacionada à solubilidade da biomolécula no meio, podendo ser mais ou menos sensível à perturbação térmica.

### 3.2 Solventes Orgânicos

Os solventes orgânicos, como acetona e etanol, são mais comumente usados para precipitar as proteínas (Cheng et al., 2014). Esse método é usado diretamente no homogenato. Embora a adição de solvente orgânico dissolva as enzimas ligadas à membrana, elas tendem a impor mudanças conformacionais na estrutura da proteína. Essas precipitações geralmente são realizadas em temperaturas muito baixas, em torno de -20 °C (Bravo & Osório, 2016). A mudança na porcentagem de solvente também pode ser usada para a separação de diferentes tipos de proteínas.

Cheng et al (2014) descobriram que a adição de 50% de acetona ou 60% de etanol separa as espiras (proteínas em massa) da PPO e da amilase (Cheng et al., 2014). O precipitado obtido por acetona resfriada é geralmente denominado pó de acetona, o qual restaura o precipitado por um longo período (Sknchez-Ferrer et al., 1990). Em relação às vantagens, podemos apontar a facilidade de reciclagem, facilidade na remoção do precipitado, além de apresentarem propriedades bactericidas interessantes. Contudo, sua principal desvantagem relaciona-se com o fato de ser altamente inflamável e explosiva,

demandando mais cuidados e controle em escala de bancada.

### 3.3 Precipitação com Sais

Em processos de extração de sais, adicionados sais neutros a uma solução, o que ocasiona o aumento da força iônica (concentração de íons) ao sistema. Quando adicionamos pequenas quantidades de sais a uma solução contendo proteínas, as cargas derivadas da dissociação do sal passam a interagir com as moléculas proteicas, diminuindo a interação entre elas. Como resultado, temos um aumento da solubilidade da proteína em questão, no meio aquoso. A esse fenômeno, damos o nome de *salting-in*. Pois, em condições de elevada força iônica, a partir da adição de quantidades significativas de sal, temos o efeito contrário, *salting-out*: a água apresenta poder significativo de solvatação, passando a interagir com os dois compostos: as proteínas e os íons provenientes da dissolução do sal. Contudo, a água apresenta mais facilidade de solvatação quando relacionada a partículas menores (os íons). As moléculas da água, neste processo de interação, deixam a estrutura proteica. Como consequência, teremos maior interação proteína-proteína, diminuição da solubilidade em meio aquoso e a precipitação dessas proteínas. Processo extremamente relevante, quando se pretende realizar separação de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para a precipitação apresenta-se diferente para cada proteína (Hyde *et al*, 2017).

### 3.4 Precipitação com sulfato de amônio

Baseado no efeito de *salting out*, a precipitação com sulfato de amônio apresenta íons carregados que competem pela água de hidratação das regiões hidrofílicas das proteínas. Todas as proteínas têm segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos em sua superfície. Em um extrato aquoso, a adição de sal em quantidades excessivas aumenta a tensão superficial, e cresce a interação hidrofóbica das proteínas e as precipitações. Esse fenômeno, como anteriormente citado, é chamado de efeito "salting out". O sal de sulfato de amônio é o mais comumente usado para a precipitação de proteínas (Panadare & Rathod, 2017 a, Panadare & Rathod, 2017b, Nader et al., 2017).

A quantidade de sal necessária para a precipitação de proteínas específicas depende diretamente do peso molecular da proteína. Esse método não é usado para a separação de diferentes tipos de proteínas. Além disso, muitos pesquisadores preferem realizar a extração baseada em Triton X-100 ou Triton X-114 antes de aplicar a precipitação de sal para remover os fenóis da fonte (Derardja *et al.*, 2017). Dentre as vantagens deste processo, podemos citar a melhora da longevidade da enzima. Embora o processo de precipitação de sal provoque mudanças conformacionais na proteína, ele não a desnatura, por isso podemos usar frações enriquecidas das proteínas de interesse no início do processo de purificação. Portanto, ele geralmente é realizado em temperaturas mais baixas, até 4 °C (Orenes-Pinero *et al.*, 2006, Nunez-Delicado *et al.*, 2003), e a atividade de uma enzima pode ser valorizada pela adição de SDS às proteínas extraídas após sua recuperação por meio de diálise (Orenes-Pinero *et al.*, 2006).

### **3.5 Separação de fase induzida por temperatura (TIPS)**

Durante a fase aquosa, a adição de iônicos ou não iônicos, para além de uma concentração crítica, demonstra a tendência de formação de micelas. Estas têm um núcleo hidrofóbico que extrai grande parte dos fenóis, taninos, lipídios e proteínas não polares (Liu *et al.*, 2015; Chazarra *et al.*, 1996). Em baixas temperaturas (até 4 °C), quando em sua concentração micelar crítica (CMC) dos surfactantes, estes são solubilizados em uma solução aquosa, e a formação de micelas é induzida à medida em que a temperatura aumenta até 37 °C (Zaini *et al.*, 2013).

Ainda que outros métodos de extração possam proporcionar alta pureza da enzima, a TIPS foi uma etapa essencial, pois aumenta a estabilidade da PPO extraída ao remover a quantidade máxima de fenóis. Em especial, tratando-se da PPO ligada à membrana, a parte hidrofóbica do surfactante não iônico remove as moléculas de lipídios da membrana, o que pode vir a liberar as proteínas hidrofílicas. Observou-se que a TIPS é uma metodologia fácil de operar, pois consome menos tempo (Chazarra *et al.*, 1996; Nunez-Delicado *et al.*, 2003). Em relação à separação baseada em surfactantes, essa também pode ser realizada sem que se altere a temperatura e adotando a extração reversa. Como pode ser observado, a TIPS é um processo eficiente, embora ainda precise ser mais estudado, em especial aplicada em termos de cinética, otimização de temperatura, escalabilidade e recuperação de surfactantes e polifenóis.

### **3.6 Partição de três fases (TPP)**

A extração por partição em três fases (TPP) tem sido utilizada tanto para extrair, quanto para concentrar e purificar proteínas das mais diferentes origens: bactérias, fungos, vegetais e animais. (Dennison & Lovrien, 1997; Dennison et al., 2000; Sharma, Gupta, 2001; Yakhnin et al., 1998). O processo pode ser caracterizado pela sua capacidade de combinação de vários princípios de extração, tais como: precipitação salina convencional (salting-out), precipitação isoelétrica (Bell et al., 1983), precipitação por co-solvente (Conn, 1980); pressão osmótica (Lehninger, 1990) e cosmotrópica (Sharma, Gupta, 2001). Neste sentido, podemos considerar a partição de três fases como um método amplamente conhecido, tendo em vista as vantagens que apresenta, é fácil de ser aplicado, econômico e escalonável, ou seja, pode realizar simultaneamente a extração e a purificação de muitas biomoléculas: proteínas, óleos, pigmentos e inibidores (Panadare & Rathod, 2017).

O método caracteriza-se pela formação de três fases na adição de sais, como sulfato de amônio e álcool solúvel em água, como o t-butanol, ao extrato aquoso. Embora o TPP tenha sido preferido por muitos pesquisadores para a purificação e extração de muitas enzimas de interesse biotecnológico (Nadar et al, 2017), existem poucos trabalhos disponíveis na literatura que descrevem a utilização do TPP para a extração de PPO em microrganismos. Contudo, Niphadkar et al. (2015) optaram pela extração de PPO por TPP e sua intensificação de processo usando ultrassom. O autor mencionou que a aplicação de ultrassom permite aumentar a pureza e a recuperação da enzima, assim como reduz o tempo do processo de 40 minutos para 5 minutos (Niphadkar e Rathod, 2015), fato que poderia ser adaptado quando aplicado em microrganismos.

Considerando os estudos realizados por pesquisadores em TPP para a extração de outros compostos, há um amplo escopo de pesquisa em que diferentes sais e solventes podem ser explorados para a extração máxima de PPO. Além disso, estudos cinéticos, termodinâmicos e de aumento de escala da extração de PPO assistida por TPP podem ser realizados para esclarecer a eficácia do processo.

### **3.7 Separação em Duas Fases Aquosas (S DFA- A TPS/ S DFA)**

O processo de separação aquosa de duas partes (ATPS/S DFA) tem sido aplicado há cerca de setenta anos na purificação de produtos obtidos em células animais, vegetais, microbianas e fúngicas, na separação de vírus, organelas e ácidos nucleicos, com destaque para a aplicação e purificação de enzimas, antibióticos e ácidos orgânicos (Pibernart 2022). Esse processo inclui uma combinação de polímeros solúveis em água, sais-polímero ou

sal-álcool para formar duas fases diferentes (Vaidya et al., 2006; Sojo et al., 1998).

Ainda de acordo com a Pibernat (2022), proteínas são altamente sensíveis à desnaturação, podendo, desta maneira, ser purificadas em sistemas constituídos por duas fases aquosas imiscíveis (ATPS/SDFA) através de uma partição diferenciada da molécula alvo e das possíveis impurezas encontradas entre as fases líquidas. Para a autora, o elevado teor de água, 75 % a 80% em massa, garante a manutenção das propriedades biológicas da proteína (Pibernat, 2022).

Semelhante à TPP, a extração aquosa em duas fases é um método escalonável. Suas principais vantagens devem-se a ser fácil de operar e conhecida pela sua capacidade de realizar extração e purificação simultaneamente (Nadar et al., 2017), além da capacidade de operacionalização contínua em larga escala. Mantendo-se a temperatura ambiente, possibilitam manter a solução em meio a polímeros e sais que protegem a molécula contra a desnaturação. Outra vantagem refere-se à possibilidade de eliminação de algumas etapas do processo de purificação para moléculas intracelulares, pois permite a extração de células e seus fragmentos simultaneamente ao fracionamento das proteínas e outras moléculas que possam estar envolvidas.

No caso da extração de PPO por ATPS/SDFA, geralmente utiliza-se uma combinação de polietilenoglicol (PEG) com peso molecular de 8.000 ou 15.000 Da e sais de fosfato. Geralmente quatro grupos de sistemas de duas fases aquosas imiscíveis podem ser consideradas: a) Sistema Formado por dois polímeros não iônicos : Polietilenoglicol (PEG)/ Dextrana (dx), PEG/Ficoll; metilcelulose/hidroxipropildextrana; Sistemas formados por um polieletrólito é um polímero não iônico: Sulfato de Dextrana de sódio/carboximetilcelulose de sódio/metilcelulose; Sistemas Formados por dois polieletrólitos: sulfato dextrana de sódio/PPG, carboximetildextrana de sódio, carboximetildextrana de sódio/ carboximetilcelulose de sódio; Sistema formado por um polímero não iônico e um composto de baixa massa molar: PPG/Fosfato de potássio, PEG/Fosfato de potássio, metoxipolietilenoglicol/fosfato de potássio, PPG/glicose, Peg/Sulfato de magnésio.

O PEG é utilizado por ser considerado mais vantajoso em termos de inflamabilidade, volatilidade, toxicidade e custo do que os solventes orgânicos (Niphadkar et al., 2015). Contudo, alguns aspectos precisam ser levados em consideração, em especial quando relacionados às propriedades físicoquímicas diferenciais da molécula, das impurezas e das porcentagem de polímero e sal, além do peso molecular do polímero, do pH e do pré-tratamento, tendo em vista que as moléculas se excedem nas fases formadas. Quando utilizada a PEG, observou-se que a extração máxima de PPO foi obtida na concentração de

sal de fosfato de 5-18% e 14-28,5%, respectivamente (Bravo e Osório, 2016; Babu et al., 2008). Niphadkar et al. (2015a) purificaram a PPO de resíduos de casca de batata por cromatografia de filtração em gel usando Sephadex G-100 após ATPS e observaram um aumento na pureza de 4,5 a 12,4 vezes (Niphadkar et al., 2015b). Além disso, a pureza superior e a recuperação da atividade da PPO obtida com o uso do ATPS demonstraram a boa eficiência do método, que pode ser aprimorada com a combinação de outros métodos para extração de PPO em microrganismos.

### **3.8 Purificação cromatográfica**

Cromatografia são técnicas de separação de substâncias de uma mistura baseada na interação relativa dos componentes com uma fase sólida (fase estacionária) na coluna, e uma fase móvel (eluente/solvente) no tampão. Os componentes que interagem mais fortemente com a fase sólida ficam retidos, ou são elucidos mais lentamente da coluna em função do tamanho, pH, força iônica do tampão e coletados em frações distintas. Os métodos cromatográficos são geralmente considerados caros e complicados; de fato, eles servem para um alto grau de purificação, ficando restritos a pesquisas de bancadas dos laboratórios. A seleção dos métodos apropriados entre a variedade de métodos cromatográficos depende do tipo de enzima, das impurezas, da carga, do tamanho da molécula e da pureza do extrato.

Elas podem ser divididas em: cromatografia por gel filtração (ou exclusão molecular) para identificar a diferença entre tamanho das proteínas; cromatografia por troca iônica, que permite identificar as diferenças entre carga das proteínas; cromatografia de hidrofobicidade, que permite perceber as diferenças na composição em regiões hidrofóbicas da proteínas; e a cromatografia por afinidade utiliza moléculas que fazem interações moleculares específicas com a proteína de interesse.

Pesquisadores geralmente usam cromatografia líquida para extração de PPO em microrganismos, tais como: cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), cromatografia de troca iônica (IEC), cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) e a cromatografia de filtração em gel (GFC) para a purificação da PPO obtida através de várias diferentes fontes, sejam estas vegetais, animais, por fungos ou bactérias. O uso de mais de uma operação cromatográfica pode ser empregado para melhorar a dobra de purificação. Para a eluição de uma enzima adsorvida, geralmente utiliza-se o tampão fosfato, tris HCl ou solução de cloreto de sódio dentro da faixa de pH de 6,5 a 7,5 em etapas ou gradiente linear. Dentre as vantagens da utilização dessa técnica, aponta-se sua capacidade de separar diferentes constituintes presentes em matrizes complexas e, em teoria, permitir análise qualitativa e

quantitativa de cada componente da mistura (amostra),

O uso eficiente dessa cromatografia é geralmente obtido após o pré-tratamento do extrato bruto. Portanto, os pesquisadores podem aplicar métodos de extração como precipitação de sulfato de amônio, ATPS ou TIPS antes de adotar a cromatografia (Zaini et al., 2013; Niphadkar et al., 2015; Lin et al., 2016). Além disso, operações unitárias, como a ultrafiltração, foram utilizadas em diferentes trabalhos para minimizar o volume de carga (Derardja et al., 2017). Observa-se que a aplicação da cromatografia é muito eficiente para obter alta pureza de uma enzima.

Em alguns trabalhos como os de Zaini (2013) e Derardja (2017) foi empregada a cromatografia líquida de proteínas rápidas (FPLC) em coluna de alto desempenho para uma purificação eficiente, mas isso aumenta o custo da enzima (Zaini *et al.*, 2013; Derardja *et al.*, 2017). O emprego da cromatografia com volume de carga muito baixo e etapas mínimas, juntamente com o estudo de aumento de escala apoiado por modelagem matemática, pode ser estudado ainda mais para se obter uma purificação eficiente da PPO.

#### **4. Recuperação e Purificação**

De acordo com Pibernat (2022), diversos são os fatores que precisam ser considerados para a definição dos métodos de extração, recuperação e purificação de uma molécula. Esses fatores relacionam-se com qual será a aplicação final da molécula alvo, as características físico-químicas e as impurezas dos componentes presentes ou não no meio de cultura, fatores que podem ser determinantes para o processo.

Antes mesmo de estabelecer as etapas envolvidas nos processos de recuperação e purificação, torna-se imprescindível definir metodologias analíticas que possam fornecer informações precisas para a qualificação da molécula, tais como medidas de atividade biológicas, químicas e etc. Ou seja, as metodologias são normalmente definidas com base na atividade e na purificação da enzima, concentração de proteína, presença ou não de contaminantes, bem como o interesse na aplicação final da molécula. Esse conjunto de técnicas é de fundamental importância para o desenvolvimento do processo, pois ajudam a identificar quais operações unitárias serão utilizadas e se as mesmas são eficientes tanto para o isolamento da molécula quanto para definir o percentual de recuperação (Kilikian & Pessoa, 2020).

Como acima mencionado, o monitoramento da eficiência de recuperação da atividade enzimática e de enriquecimento da atividade específica permite escolher a melhor estratégia

de purificação, e tem como objetivo: alto rendimento e atividade específica (maior recuperação e enriquecimento); menor número de etapas durante a purificação e metodologia com menor custo benefício. Neste sentido, o ajuste de parâmetros nas condições afetam invariavelmente a eficiência da purificação, ou seja o pH tampão, concentração de sais, carga da coluna, tamanho do poro da resina de gel filtração.

O método de Lowry foi proposto primeiramente por Wu em 1922 sendo o mais utilizado para a determinação de proteínas (LOWRY, 1951), podendo ser utilizado em relação a enzima PPO. O método se baseia numa mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin Ciocalteu) que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre e produz um composto em absorção máxima de 750 nm. Esse método caracteriza-se por ser altamente sensível, apresentando uma melhor exatidão em relação a outros métodos, pois consome uma menor quantidade de amostras e a depender do não estará suscetível a alguns tipos de interferentes (Zaia, 1998). Apesar de apresentar vantagens significativas expressas anteriormente, ou seja a precisão em relação a outros métodos, o mesmo apresenta algumas desvantagens, tais como um longo tempo de análise, possui absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas e segue a lei de Lambert-Beer apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas (LOWRY, 1951). Alguns autores, podem optar por modificar alguma etapa do processo, a exemplo disso, temos os trabalhos de Morrissey e Wolterine (1989) que adicionaram oxalato de sódio reduzindo assim os erros na determinação da concentração de proteína em que havia interferência do cálcio, o oxalato de sódio é um quelante de cálcio (MORRISSEY e WOLTERINE, 1989). Outros autores, como Dawson e Heatlie (1984) comprovaram em suas pesquisas, que outro possível interferente do método de Lowry seria a luz. Como as absorbâncias foram consistentemente mais elevadas em amostras que foram expostas diretamente à luz natural, concluíram assim, que o ensaio pode ser fotossensível. Apesar de qualquer ressalva ou interferentes, o método de Lowry é um dos mais utilizados para quantificação de proteínas, podendo ser utilizado com sucesso com as enzimas PPOs.

## **5. Atividade Enzimática**

Pibernat (2022) aponta que a atividade enzimática pode ser mensurada e determinada através de um substrato convertido em um determinado produto dentro de uma unidade de tempo. Com a intenção de padronizar a maneira como a atividade enzimática pode ser mensurada, a Comissão Internacional de Bioquímica, estabeleceu recomendações

relacionadas à unidade 1 katal (kat) é a quantidade de enzima que converte 1 mol de substrato formando 1 mol de produto/segundo. Sendo a unidade enzimática (UI) a quantidade de enzima necessária para catalisar a transformação de 1 mmol de substrato/minuto em condições padrões de reação. Ainda de acordo com a supracitada autora, a atividade específica é a atividade enzimática dividida pela massa de proteínas.

Algumas condições importantes relacionam-se para que a atividade enzimática, para que elas (enzimas) possam atuar na sua máxima capacidade de atividade catalítica. Relacionam-se com temperatura ideal, tendo em vista que o aumento da mesma também aumenta a velocidade de uma reação, devido a vibração das moléculas reagentes, o que acaba por favorecer o encontro da enzima com o substrato. Contudo, faz-se importante destacar que temperaturas muito elevadas podem prejudicar a estrutura tridimensional da enzima, ocasionando sua desnaturação. Outro fator que pode contribuir para a mudança de conformação nativa estrutural das enzimas, relaciona-se com o pH. Tendo em vista que cada enzima possui um valor específico de pH ótimo. Os cofatores também desempenham papel fundamental, tendo em vista que muitas enzimas precisam de outras moléculas e proteínas para garantir sua atividade catalítica (Robinson, 2015 **apud** Pibernat 2022), com maior número de íons envolvidos, pode-se aumentar a sua própria atividade enzimática. Em relação aos inibidores, estes caracterizam-se como compostos capazes de inibir a ação de catálise de algumas enzimas, influenciando, direta ou indiretamente no sítio ativo destas enzimas, contudo a inibição pode ser reversível e nesse caso específica caracterizada como competitiva, ou seja os inibidores podem competir pelo sítio ativo por similaridade estrutural, e não competitiva quando o inibidor se liga a outro sítio que não o ativo, não ocasionando o bloqueio do sítio ativo de ligação ao substrato, mas, inibindo a reação subsequente. Incompetitiva quando o inibidor se ligar ao complexo enzima-substrato.

## 6. Conclusão

As enzimas são moléculas de grande interesse comercial, tendo em vista seu amplo campo de atuação biotecnologia. Na mesma direção, o potencial bioquímico dos microrganismos tem se tornado cada vez mais interessante como fonte de extração enzimática com aplicações em praticamente todos os setores industriais. As enzimas extraídas e purificadas a partir de microrganismos podem ser amplamente utilizadas em diferentes setores, entre eles o fármaco, através do desenvolvimento de novas drogas,

antibióticos, agentes tumorais, e imunossupressores.

A compreensão da engenharia enzimática a partir de microrganismos, aliada aos estudos *in silico* poderiam colaborar com o aumento do número de enzimas industriais, e a melhoria das mesmas, tendo em vista que grande parte das enzimas comercializadas são engenhariadas através de tecnologias de DNA recombinante. Como apresentado nesta escrita, percebemos uma grande biodiversidade ainda a ser explorada para a descoberta de diferentes métodos de extração, purificação e identificação de enzimas a partir de microrganismos.

Qualquer uma das bactérias ou fungos apresentados anteriormente no texto, possuem capacidade de crescimento e desenvolvimento, e podem ser utilizadas como condutores, na produção de organismos transgênicos de interesse econômico, como agentes de processamento alimentício entre outros (Pereira et al, 2012).

As bactérias produtoras de PPO podem ser utilizadas como biorremediadores de ambientes contaminados, permitindo a remoção ou redução de níveis de poluentes, gerando através de processos metabólicos complexos, outros subprodutos de interesse comercial (Gaylarde, 2005). Dentre as vantagens observadas, podemos citar baixo custo de produção, alta produtividade, estabilidade a temperaturas extremas, especificidades, pH ou outras condições fisiológicas fazem com que as bactérias produtoras de PPO sejam alternativas interessantes na busca de novos bioprodutos, em especial as bactérias com alta capacidade de produção de antimicrobianos.

Como potencial de novos estudos de bioprodutos, a indução da PPO em fungos é muito menos estudada do que a indução da PPO em bactérias, e seus processos merecem mais aprofundamento, tendo em vista que a PPO fúngica tem capacidade de interações fúngicas, ou seja, existe a possibilidade de diferentes espécies de fungos crescerem juntas em culturas puras ou mistas em placas de petri, produzindo peroxidase e PPO (Score et al., 1997). Ainda em relação aos fungos, é preciso destacar o crescente aumento nas pesquisas com cogumelos comestíveis para uso terapêutico, devido a sua facilidade de obtenção, se como na tirosinase do melanoma maligno humano, ou seja, pesquisas com cogumelos comestíveis têm mostrado potencial para criação de alternativas viáveis, para o tratamento de neoplasias malignas (Yuran et al 2022). São candidatos para a extração de tirosinase e sua aplicação em estudos clínicos.

Em relação aos métodos de extração e purificação, a precipitação por Sais Orgânicos, apresentam-se como opção interessante, baixo custo, tendo em vista que os sais estabilizam contra a desnaturação, proteólise e previnem a contaminação microbiana.

## REFERÊNCIAS;

1. Adrio, J.; Demain, A.L. (2014). Microbial Enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, v4, n.1, p.117-139.
2. Alan M. Hyde, Susan L. Zultanski, Jacob H. Waldman, Yong-Li Zhong, Michael Shevlin, and Feng Peng *Organic Process Research & Development* 2017 21 (9), 1355-1370
3. Arias, M. E., M. Arenas, J. Rodriguez, J. Soliveri, A. S. Ball, and M. Hernandez. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1953-1958.
4. Conn, E. E.; Stumpf, P. K. 1980. *Introdução à bioquímica* São Paulo: Edgard Blücher, p.500.
5. Bravo, K., Osorio, E., 2016. Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruit. *Food Chem.* 197, 185–190
6. Batista, K.A., Batista, G.L.A., Alves, G.L., Fernandes, K.F., 2014. Extraction, partial purification and characterization of polyphenol oxidase from *Solanum lycocarpum* fruits. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 102, 211–217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.02.017>.
7. Bertrand, G., 1896. Sur une nouvelle oxydase, ou ferment soluble oxydant, d'origine végétale. *Compte. Rend. Acad. Sci. Paris* 122, 1215–1217
8. Bell, A. A.; Wheeler, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1986, 24, 411–451. [Crossref], Google Scholar There is no corresponding record for this reference.
9. Bell, D. J.; Hoare, M.; Dunnill, P. 1983. The formation of protein precipitates and their centrifugal recovery. *Adv. Biochem. Eng., Berlin*, v.26, p.1-72.
10. Bull, A.T., Carter, L.A., 1973. The isolation of tyrosinase from *Aspergillus nidulans*, its kinetic and molecular properties and some consideration of its activity in vivo. *J. Gen. Microb.* 75, 61–73.
11. Burton, S.G., 2003. Laccases and polyphenol oxidases in organic synthesis – a review. *Current Org. Chem.* 7, 1317–1331.
12. Castro-Sowinski, S., G. Martinez-Drets, and Y. Okon. 2002. Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209:119-125.
13. Chazarra, S., Cabanes, J.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F. 1997. Kinetic study of the suicide inactivation of latent polyphenoloxidase from iceberg lettuce (*Lactuca sativa*) induced by 4-tert-butylcatechol in the presence of SDS. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1339, p.297-303.
14. Chazarra, S., Cabanes, J.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F. 1997. Kinetic study of the suicide inactivation of latent polyphenoloxidase from iceberg lettuce (*Lactuca sativa*) induced by 4-tert-butylcatechol in the presence of SDS. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1339, p.297-303.
15. Cheng, S., Zhang, Y.F., Zeng, Z.Q., Lin, J., Zhang, Y.W., Ni, H., Li, H.H., 2014. Screening, separating, and completely recovering polyphenol oxidases and other

biochemicals from

16. sweet potato wastewater in starch production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1745–1753. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6034-7>.
17. Cheema, S., & Sommerhalter, M. (2015). Characterization of polyphenol oxidase activity in Ataulfo mango. *Food Chemistry*, 171, 382-387.
18. Chitarra, M. I. F. Chitarra, A. B. (2005). Pós-Colheita De Frutas E Hortaliças. 2. Ed. Lavras: Universidade Federal De Lavras, P. 688
19. D.C.Panadare,V.K.Rathod,Extractionofperoxidasefrombittergourd(Momordica charantia) by three phase partitioning with dimethyl carbonate (DMC) as organic phase, *Process Biochem.* 61 (2017) 195–201.
20. Derardja, A., Kampatsikas, M.P.I., Barket, M., Rompel, A., 2017. Purification and characterization of latent polyphenol oxidase from apricot (*Prunus armeniaca* L.). *J. Agric. Food Chem.* 65, 8203–8212
21. Demain, A. L.; Adrio, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol Biotechnol*,v. 38, n. 1, p. 41-55, Jan 2008.
22. Dennison, C.; Lovrient, R. 1997. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expression Purif.*, Orlando, v.11, p.149-161.
23. Dennison, C.; Moolman, L.; Pillary, C. S.; Meinesz, R. E. 2000. t-Butanol: nature's gift for protein isolation. *S. Afr. J. Sci.*, Pretoria, v.96, p.159-160.
24. Dhanashree Panadare, Virendra K. Rathod, Extraction and purification of polyphenol oxidase: A review, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 14, 2018, Pages 431-437, ISSN 1878-8181, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.010>.
25. Diwakar, S.K., Naik, G., Mishra, S.K., (2015). Polyphenol Oxidase Enzyme: A Review. In: Dwivwdi, Kumar, A. (Eds.), *Transdisciplinary Environmental Issues*. Lap Lambert Academic Publishing, Pp. 39–88.
26. D.M. Rast, D. Baumgarten, C. Mayer, G.O. Hollenstein. (2003) Cell wall-associated enzymes in fungi *Phytochemistry*, 64 , pp. 339-366
27. Endo, K., Y. Hayashi, T. Hibi, K. Hosono, T. Beppu, and K. Ueda. 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.* 133:671-677. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]
28. Escarpa, A.; Gonzalez, M. C. (2001) An Overview Of Analytical Chemistry Of Phenolic Compounds In Foods. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, V. 31, N. 2, P. 57-139.
29. Givaudan, A., A. Effose, D. Faure, P. Potier, M.-L. Bouillant, and R. Bally. 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 108:205-210.
30. Grass, G., and C. Rensing. 2001. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286:902-908.
31. Gaylarde, C.C.; Bellinaso, M. L.; Manfio, G. P. 2005. Biorremediação. *Biotecnologia Ciência & Desen-volvimento*, v.34, p. 36-43.
32. Gadd, G. W. Melanin production and differentiation in batch cultures of the polymorphic fungus. *FEMS Microbiol. Lett.*1980, 9, 237–240.[Crossref], Google ScholarThere is no corresponding record for this reference.
33. Ghosh, S.; Kuisiene, N.; Cheeptham, N. 2017 The Cave Microbiome As A Source For Drug Discovery: Reality Or Pipe Dream?. *Biochemical Pharmacology*, V. 134, P. 18-34.

34. Guray, M.Z., Sanlı-Mohamed, G., 2013. A new thermophilic polyphenol oxidase from *Bacillus* sp. partial purification and biochemical characterisation. *J. Proteins Proteom.* 4, 11–20.
35. Halaouili, S., Asther, M., Kruus, K., Guo, L., Hamdi, M., Sigoillot, J.-C., et al., 2005. Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *J. Appl. Microbiol.* 98, 332–343
36. Halalouili, S., Record, E., Casalot, L., Hamdi, M., Sigoillot, C., Asther, M., et al., 2006. Cloning and characterization of a tyrosinase gene from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus* and overproduction of the recombinant protein in *Aspergillus niger*. *Appl. Gen. Mol. Biotechnol.* 70, 580–589.
37. Halaouili, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M., Lomascolo, A., 2006. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* 100, 219–232
38. Hernández-Romero D, Solano F, Sanchez-Amat A. Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Nov;71(11):6808-15. doi: 10.1128/AEM.71.11.6808-6815.2005. PMID: 16269713; PMCID: PMC1287666.
39. Huber, M., and K. Lerch. 1985. Primary structure of tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Biochemistry* 24:6038-6044.
40. Jacobson, E.S., 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 708–717
41. Jaenicke, E., Decker, H., 2003. Tyrosinases from crustaceans form hexamers. *Biochem. J.* 371, 515–523.
42. Keilin, D., Mann, T., 1938. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 125, 187–205.
43. Kilikian, B. V; Pessoa Jr. 2020. Purificação de produtos biotecnológicos: Operações e processos com aplicação industrial. Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial. São Paulo: Blucher.
44. Lacki, K. and Duvnjak, Z. (1999), Stability of a polyphenol oxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the presence of canola meal. *Acta Biotechnol.*, 19: 91-100. <https://doi.org/10.1002/abio.370190202>
45. Lehninger, A.L. *Princípios De Bioquímica* São Paulo: Sarvier, 1990. P.57, P.108, P.127-152.
46. Lerch, K., 1995. Tyrosinase: molecular and active-site structure. In: Lee, C.Y., Whitaker, J.R. (Eds.), *Enzymatic Browning and its Prevention*, ACS Symposium Series 600. American Chemical Society, Washington, DC.
47. Lin, H., Wee, A., Ng, R., Wong, C.W., 2016. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from chinese parsley (*Coriandrum sativum*). *Food Sci.*
48. Lopez-Serrano, D., F. Solano, and A. Sanchez-Amat. 2004. Identification of an operon involved in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Gene* 342:179-187.
49. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L; Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p; 265-276.
50. Mason, H.S., 1966. Preliminary remarks on polyphenoloxidase. In: Peisach, J., Aisen, P., Blumberg, W.E. (Eds.), *The Biochemistry of Copper*. Academic Press, New York, pp. 339–341
51. Mayer, A.M., Harel, E., 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18, 193–215

52. Mayer, A.M., 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry* 67, 2318–2331.
53. Martins, L. O., C. M. Soares, M. M. Pereira, M. Teixeira, T. Costa, G. H. Jones, and A. O. Henriques. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* 277:18849-18859.
54. Martinez, M. V.; Whitaker, J. R. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.* 1995, 6, 195–200.[Crossref], Google ScholarThere is no corresponding record for this reference.
55. Marusek, C.M., Trobough, N.M., Flurkey, W.H., Inlow, J.K., 2006. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Chem.* 100, 108–123.
56. Mendonça, S. C. Guerra, N. B. (2003) Métodos Físicos E Químicos Empregados No Controle Do Escurecimento Enzimático De Vegetais. *Boletim Sbcta, Campinas, V. 37, N. 2, P. 113-116.*
57. Mercado-Blanco, J., F. Garcia, M. Fernandez-Lopez, and J. Olivares. 1993. Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b: cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene mepA. *J. Bacteriol.* 175:5403-5410.
58. Mercado-Blanco, J., F. Garcia, M. Fernandez-Lopez, and J. Olivares. 1993. Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b: cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene mepA. *J. Bacteriol.* 175:5403-5410.
59. Mishra, B.B., Gautam, S., 2016. Polyphenol oxidases: biochemical and molecular characterization, distribution, role and its control. *Enzym. Eng.* 5, 1–9. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6674.1000141>.
60. Monteiro, Do Nascimento Silva. (2009) Aplicações Industriais Da Biotecnologia Enzimática. *Revista Processos Químicos, V 3, N 5, P 9-29.*
61. Morrissey, T. B.; Woltering, E. A. 1989. Sodium oxalate corrects calcium interference in Lowry Protein Assay. *Journal of Surgical Research*, n. 47, p. 273 – 275.
62. Nadar, S.S., Pawar, R.G., Rathod, V.K., 2017. Recent advances in enzyme extraction strategies: a comprehensive review. *Int. J. Biol. Macromol.* 101, 931–957.
63. Nicolas, J. J. Richard-Forget, F.C.; Goupy, P.M.; Amiot, M.J.; Aubert, S.Y. (1994) Enzymatic Browning Reactions In Apple And Apple Products. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, V. 34, N. 2, P. 109-157.
64. Niphadkar, S.S., Rathod, V.K., (2015). Ultrasound-Assisted Three-Phase Partitioning Of Polyphenol Oxidase From Potato Peel (*Solanum Tuberosum*). *Biotechnol. Prog.* 31, 1340–1347. [Http://Dx.Doi.Org/10.1002/Btpr.2139](http://Dx.Doi.Org/10.1002/Btpr.2139).
65. Niphadkar, S.S., Vetal, M.D., Rathod, V.K., (2015). Purification And Characterization Of Polyphenol Oxidase From Waste Potato Peel By Aqueous Two-Phase Extraction. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 45, 632–649. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10826068.2014.940970](http://Dx.Doi.Org/10.1080/10826068.2014.940970).
66. Nishioka, K. Particulate tyrosinase of human malignant melanoma. Solubilization, purification following trypsin treatment, and characterization. *Eur. J. Biochem.* 1978, 85, 137–146.[Crossref], Google ScholarThere is no corresponding record for this reference.

67. Núñez-Delicado, E., Sojo, M. M., García-Carmona, F., & Sánchez-Ferrer, A. (2003). Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 2058-2063.
68. Orenes-Pinero, E., Garcia- Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A., 2006. Latent polyphenol oxidase from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*): purification. *J. Sci. Food Agric.* 2178, 2172–2178
69. Pibernat, C., C. .2022. Recuperação e purificação de Bioprodutos, In Santos, F.; Kern, A.L.; Boeira, J.M.; Dellagostin, O. **Bioprocessos e Biotecnologia**. Rio de Janeiro. Freitas Bastos.
70. Pereira, A.R.B; Freitas, D.A.F. 2012. Uso de microrganismos para a Biorremediação de ambientes impactados. *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental* (e-ISSN:2236-1170), v(6), nº6, p.975-1006.
71. Queiroz, C., Lopes, M.L., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L., 2008. Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food Rev. Int.* 24, 361–375. <http://dx.doi.org/10.1080/87559120802089332>.
72. Rast, D.M., Baumgarten, D., Mayer, C., Hollenstein, G.O., 2003. Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry* 64, 339–366
73. Raveendran, A. V., Jayadevan, R., & Sashidharan, S. (2021). Long COVID: an overview. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 15(3), 869-875.
74. Sachan, P. L., Singh, M., Patel, M. L., & Sachan, R. (2018). A study on cervical cancer screening using pap smear test and clinical correlation. *Asia-Pacific journal of oncology nursing*, 5(3), 337-341.
75. Sanchez-Amat, A., and F. Solano. 1997. A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp. shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240:787-792.
76. Sánchez-Ferrer, A., Rodríguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F., Garcia- Carmona, F., 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1247, 1–11
77. Sharma, S.; Gupta, M. N. 2001. Purification of phospholipase D from *Dacus carota* by three-phase partitioning and its characterization. *Protein Expression Purif.*, v.21, p.310-316, 2001.
78. Seo, S.-Y., Sharma, V.K., Sharma, N., 2003. Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2837–2853
79. Schoot–Uiterkamp, A. J. M.; Mason, H. S. **Magnetic dipole–dipole coupled Cu(II) pairs in nitric oxide–treated tyrosinase: A structural relationship between the active sites of tyrosinase and hemocyanin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1973, 70, 993–996. Google Scholar There is no corresponding record for this reference.
80. Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D., 1994. Polyphenol oxidase. In: Ellis, B.E. et al. (Eds.), *Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Plenum Press, New York, pp. 275–312
81. Simpson, E. M., Linder, C. C., Sargent, E. E., Davisson, M. T., Mobraaten, L. E., & Sharp, J. J. (1997). Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nature genetics*, 16(1), 19–27. <https://doi.org/10.1038/ng0597-19>
82. Sknchez-ferrer, A., Bru, R., Garcia-carmona, F., 1990. Partial purification of a thylakoid bound enzyme using phase partitioning. *Anal. Biochem.* 282, 279–282.

83. Score, A.J., Palfreyman, J.W., White, N.A., 1997. Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. *Int. Biodeter. Biodegr.* 39, 225–233
84. Solano, F., P. Lucas-Elio, E. Fernández, and A. Sanchez-Amat. 2000. *Marinomonas mediterranea* MMB-1 transposon mutagenesis: isolation of a multipotent polyphenol oxidase mutant. *J. Bacteriol.* 182:3754-3760.
85. Sojo, M.M., Nun, E., Garcı, F., 1998. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food.* 46, 4924–4930.
86. Tsivinska, M. V. Isolation and properties of polyphenol oxidase from basidiocarps of *Lactarius pergamenus* Fr. (Fr.) fungi [Текст] / М. V. Tsivinska, V. O. Antonyuk, R. S. Stoika // Укр. біохім. журн = The Ukrainian Biochemical Journal : Науково-теоретичний журнал. - 2015. - Том 87, N 2. - С. 56-65 . - ISSN 0201-8470
87. Vaidya, B.K., Suthar, H.K., Kasture, S., Nene, S., 2006. Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system. *Biochem. Eng. J.* 28, 161–166
88. Keilin, D., Mann, T., 1938. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 125, 187–205.
89. Kubowitz, F., 1938. Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxidase und des Hämocyanin. *Biochem. Z.* 299, 32–57
90. Wichers, H.J., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C.F.M., Biancone, G., Hoerberichts, F.A., et al., 2003. Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 336–341
91. Wu, H.; *J. Biol. Chem.* 1922, 51, 33.
92. Raveendran,S; Parameswaran, B; Beevi Ummalyama,S; Abraham, C; Kuruvilla Mathew, A; Madhavan, A; Pandey, A. (2018) Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technol.Biotechnol.*, v.56, n.1, p.16-30.
93. Tseng, H. C., H.C.C.K. Ling, B. J. Hsu, W. M. Leu, Y. H. Lee, S. J. Chiou, N. T. Hu, and C. W. Chen. 1990. The melanin operon of *Streptomyces antibioticus*: expression and use as a marker in gram negative bacteria. *Gene* 86: 123-128.
94. Valiev, A., Ogel, Z.B. & Klepzig, K.D. Analysis of cellulase and polyphenol oxidase production by southern pine beetle associated fungi. *Symbiosis* 49, 37–42 (2009). <https://doi.org/10.1007/s13199-009-0007-0>
95. Wichers, H.J., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C.F.M., Biancone, G., Hoerberichts, F.A., et al., 2003. Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 336–341.
96. Yakhnin, A. V.; Vinokurov, L. M.; Surin, A. K.; Alalhov, Y. B.1998. Green fluorescent protein purification by organic extraction. *Protein Expression Purif., Orlando*, v.14, p.382-386.
97. Yoruk, R., Marshall, M.M.R., 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. Food Biochem.* 27, 361–422. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.2003.tb00289.x>.
98. Zaia, D. A. M.; Zaia, C. T. B. V.; Lichtig, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.
99. Zaini, N.A.M., Osman, A., Hamid, A.A., Ebrahimpour, A., Saari, N., 2013. Purification and characterization of membrane-bound polyphenoloxidase (mPPO)

from Snake fruit [*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss]. *Food Chem.* 136, 407–414.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.034>.