



PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE OBTIDA DE CULTURA SUBMERSA DE *Pleurotus ostreatus*.

Lenita Brunetto Bruniera*

Raúl J.H. Castro-Gómez**

José Marcos Gontijo Mandarino***

Teresa Césare Vidaurre* ***

RESUMO

A solução de enzima bruta obtida das culturas de *Pleurotus ostreatus* foi purificada utilizando fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em Sephadex G-75. A temperatura ótima, o pH e a estabilidade térmica da enzima foram determinados em solução semi purificada. A atividade inicial da enzima sofreu redução da ordem de 38,3 % depois de 10 minutos de incubação a 50° C. Nas temperaturas de 20 e 30° C a perda de atividade foi da ordem de 0,1 e 0,3 respectivamente. Após 20 min de incubação a enzima conservada nestas temperaturas demonstrou uma estabilização na sua atividade. O máximo de atividade observado foi nos pH 5,0 e 9,0, indicando a presença de duas isoenzimas. As isoenzimas foram separadas pelo processo eletroforético em gel de poliacrilamida.

Termos para indexação: *Pleurotus ostreatus*, lacase, cultura submersa, purificação, caracterização.

ABSTRACT

The crude enzyme solution obtained from the submerge culture of *Pleurotus ostreatus* was purified by ammonium sulfate fractionation and Sephadex G-75 column chromatography. Optimal temperature, pH and thermostability were determined on the semi-purified enzyme. Enzyme activity was reduced by 38,3% after 10 min incubation at 50°C. At 20° and 30°C activity was reduced by 0,1 and 0,3% respectively, but remained constant after 20 min incubation. Maximum activity was obtained at pH 5,0 to 6,0 and at 9,0, indicating the presence of two isozymes. The isozymes were separated by polyacrylamide gel electrophoresis.

Key Words: *Pleurotus ostreatus*, laccase, submerged culture, purification, characterization

* Farm. Bioq., Docente de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Estudos Superiores de Londrina (CESULON), Mestre em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos (TAM), Caixa Postal: 6001, CEP: 86051-970 Londrina, Paraná.

** Eng. Alim., Dr., Dep. TAM, UEL

*** Farm. Bioq., M.Sc, EMBRAPA- Soja, Caixa Postal 231, CEP: 86001-970, Londrina, Paraná

**** Eng. Alim., Dr., Dep. TAM, UEL

INTRODUÇÃO

A **lacase** é uma polifenol oxidase capaz de degradar a lignina a carboxilatos de baixo peso molecular. A lignina é um polímero aromático altamente complexo muito resistente à degradação, sendo responsável, em grande parte, pela dificuldade em se degradar a celulose e hemicelulose componentes dos resíduos lignocelulósicos.(4).

Apesar de apresentar resistência à conversão, a lignina pode ser degradada por certos microrganismos específicos (2,4,16,18,...). A degradação de compostos lignocelulósicos é realizada principalmente por fungos superiores (5,7). Existem duas classes de fungos capazes de degradar a lignina: Ascomicetos e os Basidiomicetos. Estes últimos são fungos que degradam tanto a lignina quanto os polissacarídeos dos compostos lignocelulósicos. Ambas as classes são capazes de produzir enzimas extracelulares que oxidam compostos fenólicos, inclusive aqueles presentes na molécula da lignina. A degradação da lignina por estes fungos parece ser simultânea à da celulose (2,5).

A maioria dos cogumelos comestíveis são basidiomicetos, inclusive o *Pleurotus ostreatus* que faz parte da família *Agaricaceae* (3,19).

Os fungos representam a principal fonte de obtenção da enzima **lacase**, que também pode ser extraída do látex de árvores da espécie *Rhus* que crescem na China e Japão.(8,11)

A **lacase do *Pleurotus ostreatus*** é uma difenol oxidase que utiliza como substrato guaiacol e catecol. Tanto a lacase intracelular (ascomicetos) quanto a extracelular (*Rhus*, *Pleurotus ostreatus*) são glicoproteínas cujo conteúdo em carboidratos varia de uma espécie para outra. A porção glicosídica pode representar até 45% do peso molecular, que para a lacase do *Pleurotus ostreatus* é de 59.000. Não existem dados relatando a possível função da porção glicosídica na atividade da lacase. Esta enzima também possui íons cobre que são essenciais para a sua atividade catalítica (11).

No isolamento da lacase obtida de fungos é necessário, primeiramente, cultivá-los em meio líquido próprio ao seu desenvolvimento e, após alguns dias de cultivo, separar o micélio do fungo através de filtração. A enzima presente no filtrado pode ser separada mediante uma purificação com sulfato de amônio, purificação através de cromatografia em coluna e caracterização por eletroforese em gel de poliacrilamida (17).

A eletroforese em gel de poliacrilamida é provavelmente a técnica mais versátil e útil para a análise e separação de macromoléculas. Através dessa técnica pode-se separar as proteínas presentes numa mistura, com base na carga elétrica e mobilidade (peso molecular) das mesmas no gel (9).

O isolamento e caracterização da lacase do *Pleurotus ostreatus*. é particularmente interessante porque pode contribuir na busca de um método eficiente para o pré tratamento de resíduos lignocelulósicos.

O objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar a enzima lacase do *Pleurotus ostreatus* produzida em fermentação submersa. Os parâmetros estudados foram: estabilidade térmica, pH ótimo de ação da enzima, efeito da temperatura sobre

a atividade enzimática e caracterização final através da eletroforese em gel de poliacrilamida.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo do Fungo

O microrganismo *Pleurotus ostreatus* obtido do laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina foi cultivado em frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidade contendo 100 ml de um meio líquido, cuja composição foi similar àquela descrita por HUMFELD e SUGIHARA (10).

Após sua esterilização a 121°C, 15 min, o meio foi resfriado e inoculado com 0,25 cm² de micélio previamente cultivado em placa de petri contendo ágar batata dextrose à 28°C por 96 horas. Após a inoculação, os frascos foram incubados a 28°C por 7 a 9 dias sob agitação constante de 200 rpm. A fonte de nitrogênio utilizada foi levedura de destilaria *Saccharomyces cerevisiae*.

Purificação da Enzima

Para a purificação parcial da solução de enzima bruta, determinou-se a concentração de sulfato de amônio onde ocorria a maior precipitação da fração enzimática ativa.

Em 195 ml de solução de enzima bruta adicionou-se sulfato de amônio partindo-se da concentração de 20% até atingir-se 100%. Após cada adição do sal e precipitação completa, as soluções eram centrifugadas a 15.600 g, 0°C por 10 min. Durante o período de precipitação as soluções foram mantidas a 4°C.

A atividade enzimática e concentração proteica dos precipitados e sobrenadantes foram determinadas nos diferentes tratamentos com sulfato de amônio. Para determinação da concentração proteica utilizou-se o método de Lowry (15). Na determinação da atividade enzimática adotou-se o método utilizado por FAHRAEUS e REINHAMMAR (8). O Substrato utilizado foi o catecol na concentração de 1 mg/ml em tampão acetato 0,1M, pH 5,0 como substrato. A reação enzimática que resulta na oxidação do catecol com variação na absorbância foi determinada no tempo 0 e após 15 min de reação, com ajuda de um colorímetro a 440 nm. O resultado foi expresso em termos de Atividade Total (Δ D.O./min em 100ml de solução de enzima).

Fracionamento com Sulfato de Amônio

Realizou-se em 150 ml de solução de enzima bruta, uma precipitação prévia com sulfato de amônio 40% em banho de gelo, com vistas a precipitar outras proteínas. Como pode ser observado na tabela 1, não há atividade da enzima lacase no precipitado resultante da adição de 40% de sulfato de amônio. Após este procedimento a solução foi centrifugada a 15.600 g, 0°C por 15 min. O sobrenadante foi submetido a uma nova

saturação com sulfato de amônio agora a 60%. Esta solução permaneceu sob refrigeração por uma noite. Após este período foi centrifugada sob as mesmas condições anteriormente descritas. O precipitado obtido foi ressuspendido em 8 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 6,0. Após diálise de 24 horas em 3 litros deste mesmo tampão a amostra foi congelada por uma noite, no dia seguinte descongelada e filtrada. O filtrado obtido foi aplicado em coluna cromatográfica de Sephadex G-75 equilibrada com tampão fosfato 0,1M, pH 6,0. Em todas as etapas determinou-se a concentração proteica e atividade enzimática das frações. No eluente da coluna cromatográfica foram feitas leituras espectrofotométricas com auxílio de um espectrofotômetro a 280 nm, para isolamento da fração com atividade enzimática. (segundo a adaptação da técnica descrita por de FAHRAEUS e REINHAMMAR), (8).

Caracterização da Enzima

Efeito da Temperatura sobre a Atividade Enzimática

Para avaliar-se o efeito da temperatura sobre a atividade enzimática utilizaram-se as seguintes temperaturas: 0°C, 10°C, 20°C, 30°C, 40°C e 50°C. Em 6 tubos de ensaio (duplicata) contendo o substrato da enzima em tampão acetato 0,1M, pH 5,0 acrescentou-se a enzima e determinou-se espectrofotometricamente a sua atividade no tempo 0 e após 15 min de incubação nas diferentes temperaturas testadas.

Estabilidade Térmica da Enzima

Para determinação da estabilidade térmica da enzima foram utilizadas as seguintes temperaturas: 20°C, 30°C e 50°C. Três tubos de ensaio (duplicata) contendo 1 ml de enzima foram incubados nas diferentes temperaturas testadas. A cada 5 min até no máximo 30 min, foram feitas tomadas de amostra e determinada a atividade enzimática.

Efeito do pH na Atividade Enzimática

No estudo do efeito do pH sobre a atividade enzimática foram utilizados os seguintes tampões: Tampão acetato 0,1M, pH 4,0 e pH 5,0; tampão fosfato 0,1M pH 6,0; tampão citrato-fosfato 0,1M pH 7,0; tampão glicina 0,1M pH 8,0; tampão glicina-hidróxido de sódio 0,1M pH 9,0 e pH 10,0. A atividade da enzima foi determinada no tempo 0 e após 15 min, na presença dos diferentes tampões utilizados.

Eletroforese

A eletroforese da fração enzimática foi realizada em gel de poliácridamida utilizando placas eletroforéticas.

A técnica baseou-se nos trabalhos de KIRK et al (12) e KNECHT et al (13), com algumas adaptações. As soluções foram preparadas de acordo com DAVIS (6), constando de modificações necessárias à eletroforese em questão. O tampão de corrida, a solução reveladora e o preparo da amostra foram baseados nas técnicas descritas por ALFENAS et al (1).



Preparo do Gel:

O gel separador 10% foi preparado a partir de uma solução estoque de acrilamida 28% (p/v) e N,N-metileno bisacrilamida 0,8% (p/v). No preparo do gel concentrador utilizou-se uma solução estoque de acrilamida 10% (p/v) e bisacrilamida 2,5% (p/v). O gel separador contendo tampão tris-HCl pH 6,2 e persulfato de amônio 0,02% foi polimerizado com adição de TEMED 0,04% (v/v). O tempo de polimerização foi cerca de 10 min. O gel concentrador contendo o mesmo tampão, porém com pH 4,5 e sacarose 40%, foi também polimerizado com persulfato de amônio (0,01 %) e TEMED. O tempo de polimerização foi de aproximadamente 2 min.

Aplicação da Amostra:

A amostra constituída de 0,5 ml de enzima purificada e 0,5 ml de uma solução contendo 5,0 ml de glicerol e 2ml de azul de bromofenol foi aplicada nos "poços" com auxílio de uma micropipeta nas seguintes proporções: 100 e 150 ul.

Condições do Processo eletroforético:

A eletroforese foi realizada em sistema vertical da LKB. O tampão de corrida utilizado foi o trizma-ácido cítrico pH 6,2 . (1). O sistema foi mantido a 4 C. Utilizou-se uma voltagem de 100V até a amostra atingir o gel separador e 200V a partir deste ponto até o final do processo, que durou 7 horas e meia.

Revelação do Gel:

Decorrido o tempo necessário para completar o processo, o gel foi retirado da placa, lavado com água destilada e transferido para uma cuba contendo 200 ml de uma solução reveladora constituída de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 6,8, catecol 0,015% (p/v) e ácido sulfanílico 0,05% (p/v). Após permanecer 2 horas nesta solução, a 37°C, o gel foi retirado analisado e fotografado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados resultantes do fracionamento do extrato bruto da enzima com sulfato de amônio encontram-se na tabela 1:

TABELA 1: Fracionamento do extrato bruto da enzima com sulfato de amônio de 20 a 100% de saturação

Amostra	volume (ml)	Proteínas Solúveis (mg/ml)	Δ D.O/min/vol.sol.	At. Específica Δ DO/min/mg prot
EB*	195	1.807,56	99,47	0,0550
S20	200	1.556,00	96,20	0,0610
P20	8	178,88	0,48	0,0030
S30	196	1.324,96	83,60	0,0630
P30	8	5,52	0,00	0,0000
S40	195	1.318,20	79,90	0,0610
P40	5	6,90	0,00	0,0000
S50	188	1.279,88	65,20	0,0510
P50	5	24,20	0,41	0,0160
S60	187	1.050,94	5,50	0,0050
P60	5	36,40	2,50	0,0680
S70	180	826,20	0,50	0,0006
P70	5	48,20	0,01	0,0002
S80	175	770,00	0,00	0,0000
P80	5	35,01	0,03	0,0008
S90	170	623,90	0,00	0,0000
P90	5	61,00	0,03	0,0005
S100	165	491,70	0,00	0,0000
P100	5	51,65	0,04	0,0007

*EB: Enzima Bruta

S: Sobrenadante

P: Precipitado

Observando-se a tabela 1, conclui-se que a concentração ideal de sulfato de amônio para precipitar a enzima ativa foi de 60%. Saturações com 20 a 40% do sal não foram suficientes para precipitação. Observa-se ainda que quando utilizou-se 50% de sulfato de amônio, parte da enzima com atividade foi precipitada e que concentrações superiores à ideal (60%) não foram necessárias para precipitações posteriores da enzima.

Fracionamento com Sulfato de Amônio

TABELA 2: Separação da Enzima Lacase com sulfato de amônio

Amostra	Volume (ml)	Proteínas Solúveis (mg/ml)	Δ DO/ml n/vol. solução	Atividade Específica Δ DO/min/mg prot.	Grau de Purificação	Rendimento de Atividade (%)
Extrato	150,0	851,10	91,50	0,1075	1,00	100,00
Sobrenadante (60%)	135,0	230,58	5,40	0,0234	0,2176	5,9
Precipitado (60%) ressuspenso	8,0	10,41	5,56	0,5335	4,96	6,06
Amostra Eluída/ Sephadex G 75	21,0	8,30	11,29	1,3602	12,65	12,34

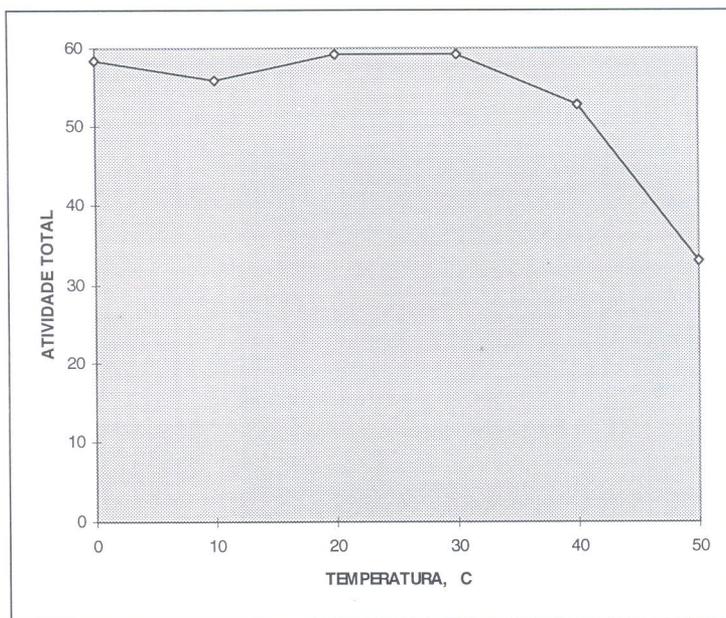
A atividade específica e o grau de purificação refletem a eficiência do processo de fracionamento na purificação da enzima obtida das culturas de Pleurotus ostreatus. O fracionamento da enzima bruta utilizando sulfato de amônio, diálise e cromatografia em Sephadex G-75 mostrou-se adequado para a purificação da enzima. Com este processo obteve-se um grau de purificação da enzima de 12,65 vezes e um rendimento de atividade de 12,34%.

Caracterização da Enzima

Efeito da Temperatura sobre a Atividade Enzimática

TABELA 3: Efeito da Temperatura sobre a Atividade da Enzima em Tampão Acetato 0,1M, pH 5,0

Temperatura (°C)	Atividade Total (DDO/min em 100ml solução)
0	58,50
10	55,90
20	59,13
30	59,29
40	52,82
50	32,94



Atividade total: D.O./min (100 ml de solução)

Tampão acetato 0,1 M, pH 5,0

FIGURA 1: Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática



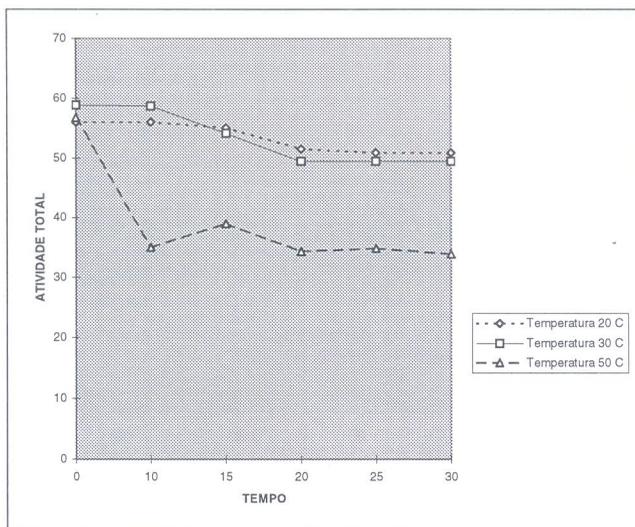
A temperatura ótima de ação da enzima situa-se numa faixa entre 20° e 30 °C. Entretanto, a partir de 40°C inicia-se a sua inativação.

Estabilidade Térmica da Enzima

TABELA 4: Estabilidade Térmica da Enzima em Tampão Acetato 0,1M, pH 5,0

Tempo (min)	Temp.=20°C At. Total*	Temp.=30°C At. Total*	Temp.=50°C At. Total*
0	56,10	58,90	56,81
10	56,05	58,77	35,06
15	55,13	54,19	39,00
20	51,57	49,51	34,86
25	50,96	49,51	34,86
30	50,96	49,51	33,90

Atividade Total*: DO/min em 100ml solução de enzima



Atividade total: D.O/ min (100 ml de solução)

Tampão acetato 0,1 M, pH 5,0

FIGURA 2: Estabilidade Térmica da Enzima.

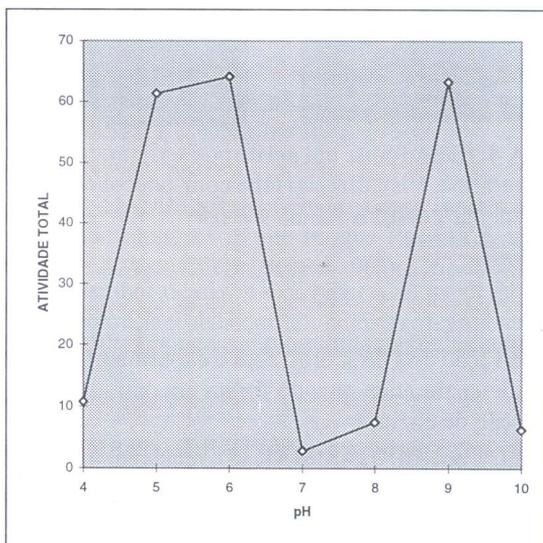


A enzima mostrou uma baixa estabilidade térmica quando incubada à temperatura de 50°C e uma melhor estabilidade quando incubada a 20 e 30°C. Estas características indicam que aplicação da enzima deverá ser limitada à faixa de temperatura entre 20 e 30°C, não sendo aconselhável sua utilização à temperaturas superiores.

Efeito do pH sobre a Atividade Enzimática

TABELA 5: Efeito do pH sobre a Atividade Enzimática

pH	Atividade Total (Δ DO/min em 100ml solução)
4,0	10,79
5,0	61,36
6,0	64,20
7,0	2,88
8,0	7,52
9,0	63,29
10,0	6,26



Temperatura: 20° C

Atividade total: D.O./min (100 ml de solução)

FIGURA 3: Efeito do pH sobre a Atividade Enzimática.

Observou-se a existência de dois picos de atividade máxima, o primeiro na faixa de pH entre 5,0 - 6,0 e o segundo em pH 9,0. Isto poderia indicar a presença de duas frações da mesma enzima (isoenzimas) com pHs de ação distintos.

Eletofórese

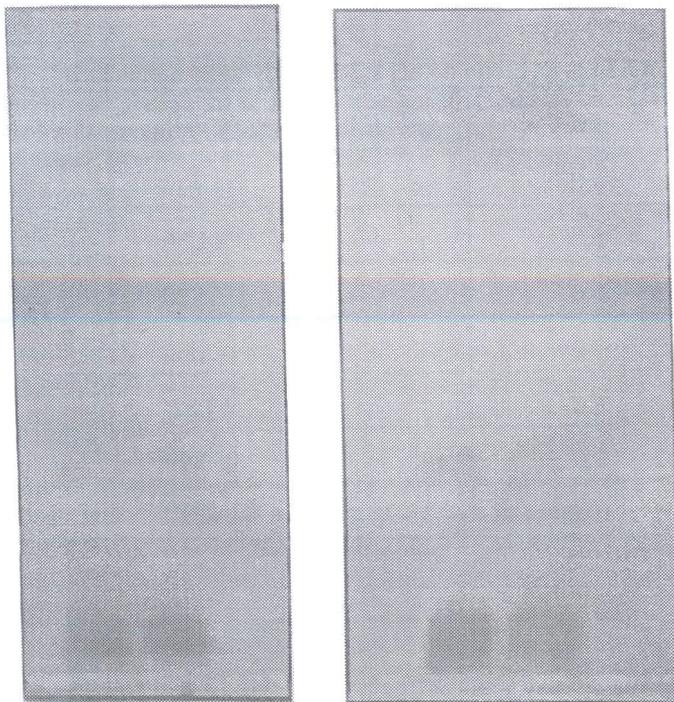


FIGURA 4: Eletofórese em gel de poliacrilamida da fração enzimática eluída da coluna cromatográfica. Visualização feita com catecol/ácido sulfanílico. Mobilidade Eletofóretica → Banda 1 = 0,1 e Banda 2 = 0,4

Duas bandas foram observadas após revelação, indicando a presença de duas enzimas, ou ainda, duas frações da mesma enzima com mobilidade eletofóretica e peso molecular distintos.

Esta observação está de acordo com o experimento onde foi estudada a relação entre pH e atividade enzimática quando foram encontrados dois pHs ótimos de ação para a mesma solução de enzima.

FAHRAEUS & REINHAMMAR (8), relataram a existência de duas formas da lacase produzida pelo basidiomiceto *Polyporus versicolor*: Lacase A e Lacase B, que foram isoladas por um processo cromatográfico utilizando resina trocadora de íons (Sephadex DEAE A 50), sendo que cada uma destas formas apresentaram frações distintas com pH isoelétrico e peso molecular diferentes. Uma vez que este processo de cromatografia não foi realizado neste trabalho, as bandas que apareceram na eletofórese podem ser frações enzimáticas de uma mesma forma da lacase (isoenzimas).



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, K.C.; PETERS, E.; BRUNE, W. et al. (1991). Eletróforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais, Viçosa, 1991, 241p.
- BISARIA, R.; MADAN, M. (1983). Mushrooms: potencial proteins source from cellulosic residues, **Enzyme Microb. Technol.**, Stoneham, USA, v.5, 1983, p.251-259.
- CHANG, S.T.; MILLES, P.G. (1984). A new look at cultivated mushrooms. **Bioscience**, 34(6) Washington, USA, p.358-362, 1984.
- CRAWFORD, D.L. (1981). Microbial conversions of a lignin to useful chemicals using degrading Streptomyces. **Biotechnol. Bioeng. Symp.**, New York, v.11, 1981, p.275-291.
- CRAWFORD, R.; CRAWFORD, D.L. (1984). Recent advances in studies of the mechanisms of microbial degradation of lignins. **Enzyme Microb. Technol.**, Stoneham, USA, v. 6, 1984, p. 434-442.
- DAVIS, B.J. (1964). Disc Electrophoresis: Method and application to human serum proteins. **N.Y. Acad. Sci.**, New York, v.121, 1964, p.404-427.
- ERIKSSON, K.E. (1986). History and future of microbial delignification. Sweden: Swedish, Pulp and Paper Research Institute, 1986.
- FAHRAEUS, G.; REINHAMMAR, B. (1967). Large scale production and purification of laccase from cultures of the fungus Polyporus versicolor and some properties of laccase A. **Acta Chem. Scand.**, 9(2):2367-2378, Denmark, 1967.
- FREIFELDER, G. (1979). Técnicas de bioquímica y biología molecular, Ed Reverté, 1979.
- HUMFELD, H.; SUGIHARA, T.F. (1949). Mushrooms mycelium production by submerged propagation. **Food Technology**, Chicago, USA, 1949, p.355-356.
- KERTES, D. (1966). Biochemistry of copper. Copper of Polyphenol oxidase, Ac. Press., N.Y., 1966



- KIRK, T. K.; CROAN, S.; TIEN, M. (1986). Production of multiple ligninases by Phanerochaete crysosporium: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. **Enzyme Microb. Technol.**, Stoneham, USA, v.8, 1986, p. 27-32.
- KNECHT, D.A.; DIMOND, R.L. ET AL. (1984). Antigenic determinants shared by lysosomal proteins of Dictyostelium discoideum. **The Journal of Biological Chemistry**, 259(16):10633-10640, Baltimore, USA, 1984.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T 4. **Nature**, France, v.227, 1970, p.680-685.
- LOWRY, D. H.; ROSEBROUGH; FAAR, A.L. et al.(1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. **J. Biological Chem.**, Baltimore, USA, v.193, 1951, p.265-275.
- ROUAU, X.; ODIER, E. (1986). Production of extracellular enzyme by the white-rot fungus Dichomitus squalens in cellulose-containing liquid culture. **Enzyme Microb. Technol.**, Stoneham, USA, v. 8, 1986, p.22-26.
- SANNIA, G.; GIARDINA, P.; LUNA, M. et al. (1986). Laccase from Pleurotus ostreatus. **Biotech.Letters**, 11(8): 797-800, Kew, England, 1986.
- VICUÑA, R. (1988). Bacterial degradation of lignin., **Enzyme Microb. Technol.**, Stoneham, USA, v.10, 1988, p. 646-655.
- ZADRAZIL, F.; GRABBE, K. (1983). Edible Mushrooms. **Biotechnology**, v.3, 1983, p.146-187.