

MINISTÉRIO DE EDUCAÇÃO E DESPORTO – MEC  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS LACASES DE *PYCNOPORUS*  
*SANGUINEUS*

Aluna: Telma Alves Garcia  
Orientador: Dr. Cirano José Ulhoa  
Co-orientadora: Dra. Mariângela Fontes Santiago

BRASÍLIA – DF  
ABRIL/2006

Telma Alves Garcia

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS LACASES DE *PYCNOPORUS*  
*SANGUINEUS*

Tese apresentada ao Departamento de  
Biologia Celular, do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade de Brasília,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Doutor em Biologia Molecular.

BRASÍLIA – DF  
2006

Telma Alves Garcia

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS LACASES DE *PYCNOPORUS*  
*SANGUINEUS*

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa  
Orientador

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho  
(titular)

Prof. Dr. Carlos Roberto Félix  
(titular)

Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein  
(titular)

Profa. Dra. Kátia Flávia Fernandes da Silva  
(titular)

Profa. Dra. Eliana Ferreira Noronha  
(suplente)

Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara  
(suplente)

**Se eu pudesse deixar algum presente a você ...**

... Deixaria aceso o sentimento de amar a vida  
dos seres humanos.

A consciência de aprender tudo o que foi  
ensinado pelo tempo afora.

Lembraria dos erros que foram cometidos para que  
não mais se repetissem.

Deixaria para você, se pudesse, o respeito

àquilo que é indispensável:

Além do pão; o trabalho.

Além do trabalho; a ação.

E quando mais tudo faltasse, um segredo:

o de buscar no interior de si mesmo

a resposta e a força para encontrar

a saída.

Mahatma Gandhi.

## DEDICATÓRIA

*Ao Humberto e ao Hebert, meus filhos amados, a quem procurarei sempre mostrar o caminho do bem, com bons exemplos, valorizando a sabedoria e a dignidade humana.*

*Ao meu esposo Hélio, na convicção de que, apesar das dificuldades, valeu a pena, pois a satisfação pessoal é essencial na relação humana.*

*Aos meus pais minha admiração pelo exemplo de dedicação, pelo carinho e confiança sempre.*

*A vocês, todo o meu amor e muito obrigada!*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília que possibilitou através do Departamento de Biologia Molecular a realização deste doutorado.

À Universidade Federal de Goiás, e à Faculdade de Farmácia pela concessão de afastamento para realização deste curso de pós-graduação.

À CAPES pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de PICDT.

À Prof<sup>a</sup> Mariângela Fontes Santiago pelo apoio desde a elaboração do projeto inicial e pelos ensinamentos sobre tratamento de efluentes.

Às alunas de iniciação científica: Ana Beatriz, Maria Júlia e Renata.

À Prof<sup>a</sup> Kátia Flávia Fernandes do Laboratório de Química de Proteínas da UFG, pelo incentivo e ensinamentos sobre imobilização de biomoléculas.

Aos professores e alunos do laboratório de Biologia Molecular da UFG pelo apoio no registro fotográfico do que foi necessário.

Aos professores do curso de doutorado, pelos ensinamentos transmitidos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Cirano José Ulhoa pela importante orientação, dedicação, compreensão e paciência em ingressar-me em uma área de conhecimento até então quase que desconhecida, possibilitando-me um crescimento profissional.

Ao Hélio, meu esposo e aos meus dois filhos, Humberto e Hebert, pela compreensão nos momentos de ausência, “mesmo quando presente fisicamente”.

À amiga Maria Teresa, incentivadora sempre, desde a sugestão para o contato com o orientador até o momento final deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Goiás, citados aqui em ordem alfabética para não cometer injustiça: Andrei, Cibele, Cristine, Fausto, Fernando, Raquel, Regiane, Rhalcia, Roberto, Sejana, Sonaide, Valdirene e Vanessa, pela convivência harmoniosa e cercada de companheirismo.

À minha família, alicerce de toda essa caminhada.

A Deus, grande responsável por mais esta vitória.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Lacase	1
1.2. Lacases fúngicas	3
1.3. O fungo <i>Pycnoporus sanguineus</i>	4
1.4. Produção de lacases	5
1.5. Estrutura e função das lacases	9
1.6. Purificação	13
1.7. Aplicações biotecnológicas das lacases	16
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Meios de cultura	22
3.2. Origem e manutenção dos fungos	24
3.2.1. Avaliação do efeito da temperatura no crescimento do fungo	25
3.3. Descoloração de corantes	25
3.4. Produção de lacase	25
3.5. Determinação da biomassa	26

3.6. Ensaio enzimático para atividade de lacase	26
3.7. Dosagem de proteínas totais	27
3.8. Eletroforese desnaturante (SDS – PAGE)	28
3.9. Coloração com nitrato de prata	28
3.10. Determinação da atividade de lacase e m gel de poliacrilamida após eletroforese em condições desnaturantes	29
3.11. Purificação de lacase de <i>P. sanguineus</i>	29
3.11.1. Cromatografia em coluna de interação hidrofóbica 1	29
3.11.2. Cromatografia em coluna de interação hidrofóbica 2	30
3.11.3. Cromatografia em coluna de interação hidrofóbica 3	30
3.12. Caracterização bioquímica das lacases de <i>P. sanguineus</i>	31
3.12.1. Determinação do pH ótimo	31
3.12.2. Determinação da temperatura ótima	31
3.12.3. Determinação da termoestabilidade	31
3.12.4. Determinação das constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ )	31
3.12.5. Efeito de íons metálicos e outros compostos na atividade de lacase	32
3.12.6. Estudo da ação da lacase purificada sobre diferentes substratos	32
3.13. Determinação da massa molecular	32
3.14. Imobilização da lacase	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Efeito da temperatura no crescimento e na produção de lacase por <i>P. sanguineus</i>	34
4.2. Descoloração de corantes	34
4.3. Produção de lacase por <i>P. sanguineus</i>	36
4.4. Purificação da lacase produzida por <i>P. sanguineus</i>	42
4.5. Caracterização	49
4.5.1. Massa molecular	49

4.5.2. Análise espectrofotométrica da lacase purificada	51
4.5.3. Efeito do pH na atividade da lacase	53
4.5.4. Efeito da temperatura na atividade da lacase	57
4.5.5. Efeito da temperatura na estabilidade térmica da lacase	58
4.5.6. Determinação de $K_m$ e $V_{max}$	63
4.5.7. Especificidade por substratos	67
4.5.8. Efeito de íons metálicos e outros compostos na atividade de lacase	69
4.6. Imobilização da enzima Lac 2	72
5. CONCLUSÃO	73
6. PERSPECTIVAS	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
8. ANEXOS	89

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Reação de oxidação da seringaldazina até formação da correspondente quinona. 13
- Figura 2. Ação do fungo *P. sanguineus* sobre diferentes corantes utilizados na indústria farmacêutica. 36
- Figura 3. Produção de lacase por *P. sanguineus* em diferentes meios e momentos de indução com 2,5- xilidina. 38
- Figura 4. Pigmentação do meio de cultivo de *P. sanguineus* 41
- Figura 5. Cinética de crescimento do *P. sanguineus* e atividade específica de lacase. 42
- Figura 6. Perfil cromatográfico do sobrenadante da cultura de *P. sanguineus* aplicado a uma coluna de interação hidrofóbica, Phenyl Sepharose HP tendo como sal eluente o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . 44
- Figura 7. Gel de atividade corado com ABTS 45
- Figura 8. Perfil cromatográfico da fração Lac 2 obtida na primeira etapa cromatográfica, aplicada a uma coluna de interação hidrofóbica, Phenyl Sepharose HP tendo como sal eluente o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . 46
- Figura 9. Perfil cromatográfico da fração Lac 2 obtida na primeira etapa cromatográfica, aplicada a uma coluna de interação hidrofóbica, Phenyl Sepharose HP tendo como sal eluente o NaCl. 47
- Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (12 %), sob condições desnaturantes, de amostras de *P. sanguineus*. 48
- Figura 11. Determinação da massa molecular de Lac 1 e Lac 2 por meio de cromatografia de filtração em gel em coluna Sephacryl S-200. 50
- Figura 12. Determinação da massa molecular das enzimas Lac 1 e Lac 2 por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes. 51
- Figura 13. Espectro de absorção visível-ultravioleta da Lac 2 de *P. sanguineus*. 53

Figura 14. Efeito do pH na atividade de Lac 1 e Lac 2 de <i>P. sanguineus</i> utilizando seringaldazina como substrato.	54
Figura 15. Influência do pH na atividade de Lac 2 de <i>P. sanguineus</i> utilizando diferentes substratos.	56
Figura 16. Influência da temperatura na atividade das lacases produzidas por <i>P. sanguineus</i> .	57
Figura 17. Termoestabilidade de Lac 1 e Lac 2 após pré-incubação a 50 °C por 5 horas.	59
Figura 18. Termoestabilidade de Lac 2 após pré-incubação a 50 e 80 °C por 5 horas.	60
Figura 19. Termoestabilidade de Lac 2 após pré-incubação a 50 °C por 48 horas.	61
Figura 20. Termoestabilidade de Lac 1 e Lac 2 de após pré-incubação por 2 horas a 30, 50, 60, 70 e 80 °C.	62
Figura 21. Determinação das constantes cinéticas $k_m$ e $v_{max}$ , da Lac 1 de <i>P. sanguineus</i> na oxidação da seringaldazina	65
Figura 22. Determinação das constantes cinéticas $k_m$ e $v_{max}$ , da Lac 2 de <i>P. sanguineus</i> na oxidação de seringaldazina.	65
Figura 23. Determinação das constantes cinéticas $k_m$ e $v_{max}$ , da Lac 2 de <i>P. sanguineus</i> na oxidação de ABTS.	66
Figura 24. Determinação das constantes cinéticas $k_m$ e $v_{max}$ , da Lac 2 de <i>P. sanguineus</i> na oxidação de guaiacol.	66
Figura 25. Espectros de absorção na região ultravioleta-visível de diferentes compostos fenólicos, mostrando o efeito da enzima Lac 2 de <i>P. sanguineus</i> em diferentes substratos	67

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Exemplos de indutores para produção de lacase fúngica	7
Tabela 2. Exemplos de patentes envolvendo o emprego de lacase	18
Tabela 3. Características dos corantes utilizados no estudo	35
Tabela 4. Efeito dos componentes do MPL na produção de lacase por <i>P. sanguineus</i>	39
Tabela 5. Resumo das etapas de purificação da lacase Lac 2 produzida por <i>P. sanguineus</i> induzida por 2,5 – xilidina.	48
Tabela 6. Constantes cinéticas de Lac 2 na oxidação de diferentes substratos.	64
Tabela 7. Efeito de diferentes compostos sobre a atividade de lacases produzidas por <i>P. sanguineus</i> .	69
Tabela 8. Variáveis para otimização da condição de imobilização de Lac 2 em PANIG	72

## RESUMO

O fungo *Pycnoporus sanguineus* foi eficiente na descoloração de alguns corantes empregados na indústria farmacêutica. Os resultados obtidos indicam que o *P. sanguineus* e principalmente as lacases produzidas por este fungo apresentam grande potencial para aplicações biotecnológicas. Para a produção de lacase (EC 1.10.3.2, p-difenol:dioxigênio oxidoreductase) o fungo foi cultivado em meio contendo 2,5- xilidina e cobre como indutores. Duas isoformas da enzima (Lac 1 e Lac 2) foram identificadas e separadas através de cromatografia de interação hidrofóbica. As enzimas Lac 1 e Lac 2 apresentaram uma massa molecular de 79,7 kDa e 68,1 kDa, respectivamente. As duas isoformas apresentaram características bioquímicas diferentes. A enzima Lac 1, contendo menor atividade específica, foi parcialmente purificada. Usando seringaldazina como substrato a enzima apresentou um pH ótimo de 4,8, temperatura ótima de 25-30 °C e  $K_m$  de 10,3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . A enzima mostrou baixa estabilidade à temperatura de 50 °C, mantendo apenas 10% da atividade após 5 horas de incubação. A enzima Lac 2, contendo maior atividade específica, foi purificada com um rendimento final de 13,9 %. Usando seringaldazina como substrato a enzima apresentou um pH ótimo de 4,2, temperatura ótima de 50 °C e  $K_m$  de 8,3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . A enzima mostrou alta estabilidade a temperatura de 50 °C, mantendo 100 % da atividade após 5 horas de incubação. Ambas as enzimas foram inibidas por azida sódica e fluoreto de sódio.

## ABSTRACT

Fungus *Pycnoporus sanguineus* was efficient in the discoloration of some dyes used in the pharmaceutical industry. Ours results indicated that the *P. sanguineus* and mainly laccases produced by this fungus presents great potential for biotechnological applications. For the production of laccase (EC 1.10.3.2, p-diphenol:dioxigen oxidoreductase) this fungus was cultivated in medium containing 2,5- xyldine and copper as inducer. Two isoforms of the enzyme (Lac 1 and Lac 2) had been identified and separated through chromatography on hydrophobic interaction. The enzymes Lac 1 and Lac 2 had presented a molecular mass of 68.1 kDa and 79.7 kDa, respectively. The two isoforms presented different biochemical characteristics. The enzyme Lac 1, with lower specific activity, was partially purified. Using syringaldazine as substrate the enzyme showed pH optima of 4.8, temperature optima of 25-30 °C and  $K_m$  of 10.3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . The enzyme showed low stability at temperature of 50 °C, keeping only 10% of the activity, after 5 hours of incubation. The enzyme Lac 2, with higher specific activity, was purified with a final yield of 13.9 %. Using syringaldazine as substrate the enzyme presented one pH optima of 4.2, temperature optima of 50 °C and  $K_m$  of 8.3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . The enzyme showed high stability at temperature of 50 °C, keeping 100% of the activity even after 5 hours of incubation. Both enzymes were inhibited by sodium azide and sodium fluoride.

**ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

abs	Absorbância
ABTS	Sal diamônio 2,2' – azino – bis (3 – etilbenzotriazolina – 6 – sulfônico)
AV	Àcido violúrico
CI	Codex Index
2, 6 DMP	2, 6 dimetoxifenol
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPR	Ressonância eletrônica paramagnética
HAA	Ácido 3 – hidroxiantranílico
HBT	1 - hidroxibenzotriazol
HIC	Cromatografia de interação hidrofóbica
MM	Marcador de massa molecular
LiP	Lignina peroxidase
MnP	Manganês peroxidase
MPL	Meio de produção de lacase
nm	Nanômetro
PANI	Polianilina
PANIG	Polianilina ativada com glutaraldeído
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilssulfato de sódio
V	Volt

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Lacase

A primeira descrição da enzima lacase foi feita em 1883 por Yoshida (Yoshida, H. 1883 citado por Mayer & Staples 2002) originada de uma árvore japonesa *Rhus vernicifera* e em 1985 foi caracterizada como uma oxidase contendo metal por Bertrand (Bertrand 1985, citado por Mayer & Staples 2002). A distribuição de lacase é bastante ampla sendo reconhecidos dois grupos principais, as lacases extraídas de plantas superiores e as produzidas por fungos, apresentando estes grupos claras diferenças (Harvey & Walker, 1999), mas há também relatos da presença de lacase em bactérias (Claus & Filip 1997).

Lacases, p-difenol:dioxigênio oxidoreductase (EC 1.10.3.2), fazem parte de um grupo de enzimas denominadas enzimas multicobre, que inclui entre outras ácido ascórbico oxidase e ceruloplasmina (Mayer & Staples 2002). Oxidoreductases são enzimas que catalisam processos de oxidação e redução, e constituem um grupo que compreende quase um quarto de todas as enzimas conhecidas, entre as quais estão lacases e peroxidases.

Lacase é uma polifenol oxidase que atua sobre uma variedade de doadores de hidrogênio aromáticos (Leonowicz *et al.* 2001) e também espécies inorgânicas, incluindo íons  $Mn^{+2}$  (Bollag & Leonowicz 1984). As fenol oxidases são proteínas contendo cobre com uma característica comum de serem capazes de oxidar compostos aromáticos, tendo como acceptor terminal de elétrons o oxigênio molecular (Mayer 1987).

A enzima lacase catalisa a remoção de um elétron e um próton de grupos hidroxifenólicos ou amino-aromáticos formando seus respectivos radicais livres. Além disso, a lacase que contém em seu sítio ativo 4 átomos de cobre, não somente oxida ácidos fenólicos e metoxifenólicos, mas também os descarboxila e ataca seus grupos metoxila através de desmetilação ou desmetoxilação (Leonowicz *et al.* 2001). O mecanismo geral de atuação das lacases é a oxidação do substrato através da abstração de um elétron de um composto fenólico gerando um radical fenoxila (Higuchi, 1990).

- a)  $2 \text{ (Cu [II] )} - \text{ lacase} + \text{ fenol} \rightarrow 2 \text{ (Cu [I] )} - \text{ lacase} + \text{ radical fenolato} + 2 \text{ H}^+$   
 b)  $2 \text{ (Cu [I] )} - \text{ lacase} + \text{ O}_2 + 2 \text{ H}^+ \rightarrow 2 \text{ (Cu [III] )} - \text{ lacase} + \text{ H}_2\text{O}$

O ciclo catalítico da lacase compreende três passos principais: a) redução do cobre tipo 1 pelo substrato; b) transferência interna de elétrons do cobre tipo 1 para os cobres tipo 2 e 3; c) redução de oxigênio molecular para água através de sua interação com os cobres de tipo 2 e 3 (Gianfreda *et al.* 1999).

De uma maneira geral a lacase reduz o oxigênio molecular à água e promove simultaneamente a oxidação de vários substratos aromáticos. Lacases fúngicas tipicamente catalisam a oxidação de difenóis simples como hidroquinona e catecol, assim como vários metoxifenóis (guaiacol, 2,6 – DMP) e aminas aromáticas (Thurston 1994). Essas enzimas não catalisam a oxidação de tirosina que é o único substrato específico para tirosinase enquanto que a seringaldazina (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído azina) é considerado um substrato específico para lacase, desde que o peróxido de hidrogênio seja totalmente eliminado, uma vez que este composto é também oxidado pela enzima manganês peroxidase (MnP), enzima produzida por muitos basidiomicetos lignolíticos (Mayer & Staples 2002).

A lacase tem um potencial redox mais baixo que lignina peroxidase (LiP) e MnP e por isso oxida somente fragmentos fenólicos de lignina. O emprego de mediadores apropriados pode aumentar consideravelmente o espectro de substratos oxidados pela lacase, possibilitando a oxidação de compostos não-fenólicos (Bourbonnais & Paice 1990, Eggert *et al.* 1996a). Diversos compostos têm sido utilizados com este propósito, podendo-se citar entre os mais comuns o sal diamônio 2,2' – azino – bis (3 – etilbenzotriazolina – 6 – sulfônico) (ABTS), 1 – hidroxibenzotriazol (HBT), ácido violúrico (AV) e ácido – 3 hidroxiantranílico (HAA) (Fabbrini *et al.* 2002). Segundo Pozdnyakova e colaboradores (2004) a lacase amarela é capaz de oxidar compostos não fenólicos mesmo na ausência de mediadores, sendo postulado que este tipo de lacase pode conter mediadores endógenos, derivados da lignina.

Apesar dos vários estudos já realizados, as funções biológicas da lacase nos organismos produtores ainda não estão muito claras. Em fungos há relatos sobre sua participação no rápido crescimento celular, controle da patogenicidade (Leonowicz *et al.* 2001), controle de virulência (Mayer & Staples 2002), pigmentação de esporos (Leonowicz *et al.* 2001, Mayer & Staples 2002), diferenciação sexual (Aisemberg *et al.*

1989), esporulação (Thurston 1994) e degradação de lignina (Eggert *et al.* 1996a). Lacases originadas de plantas são relatadas como importantes no processo de recuperação de lesões e síntese de lignina (Bao *et al.* 1993). O papel da lacase na degradação da lignina ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que esta degradação pode ocorrer mesmo na ausência de LiP e MnP (Eggert *et al.* 1996a, Leonowicz *et al.* 2001, Mayer & Staples 2002). Sabe-se também que ela está envolvida tanto na polimerização como na despolimerização da lignina (Thurston 1994).

## 1.2. Lacases fúngicas

Lacases fúngicas têm sido encontradas em diferentes gêneros de ascomicetos, alguns deuteromicetos e principalmente basidiomicetos, particularmente aqueles associados com madeira deteriorada ou em estágio terminal de decomposição (Wood 1980, citado por Souza *et al.* 2004). Os melhores produtores de lacase são basidiomicetos pertencentes ao grupo dos fungos de decomposição branca, eficientes degradadores de madeira (Thurston 1994, Mayer & Staples 2002). Quase todos esses fungos produzem MnP e lacase, mas somente alguns produzem LiP (Hatakka, 1994). O sistema de degradação de materiais ligninocelulósicos envolve uma série de reações, apresentando essas enzimas, diferentes papéis na degradação da lignina. A lacase oxida os anéis fenólicos em radicais fenoxílicos. Essas enzimas são amplamente estudadas por suas aplicações industriais e ambientais. Na última década vários trabalhos de fungos produtores de lacase têm sido publicados. No anexo 1 apresentamos uma lista dos fungos produtores de lacase citados em trabalhos de purificação na última década (1995-2005).

Entre os basidiomicetos, membros do gênero *Pycnoporus* têm se mostrado como produtores de várias enzimas de aplicações industriais como xilanase e  $\beta$ -glicosidase (Esposito *et al.* 1993), invertase (Quiroga *et al.* 1995) e  $\alpha$ -amilase (De Almeida Siqueira *et al.* 1997). Este gênero se mostra bastante interessante por produzir lacase como a principal enzima lignolítica (Eggert *et al.* 1996b), o que pode em alguns casos, dispensar etapas de purificação para uso em processos biotecnológicos (Lomascolo *et al.* 2002). Entre as 20 espécies de *Pycnoporus* estudadas por Lomascolo e colaboradores (2002), a maior atividade de lacase

induzida por ácido ferúlico foi detectada em uma linhagem de *P. sanguineus*. Ainda no mesmo trabalho foi observada uma maior produção de lacase entre as linhagens de *P. sanguineus* originárias de regiões tropicais e subtropicais.

As lacases fúngicas podem ser induzidas ou constitutivas, de acordo com suas diferentes rotas de síntese. As lacases induzidas são dependentes de fatores como condições de nutrição, temperatura, pH, aeração entre outros, para a sua expressão (Xiao *et al.* 2003).

A grande maioria dos trabalhos publicados refere-se à lacase extracelular de fungos basidiomicetos (Leonowicz *et al.* 2001), havendo pouco estudo sobre lacases intracelulares (Nagai *et al.* 2003).

### **1.3. O fungo *Pycnoporus sanguineus***

O fungo utilizado neste estudo foi o *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fries) Murrill, um basidiomiceto da família Polyporaceae (Nobles 1965 citado por Esposito *et al.* 1993), a mesma do *Trametes versicolor* e do *Phanerochaete chrysosporium*, fungos lignolíticos bastante estudados principalmente pela produção de lacase e LiP e MnP, respectivamente. O *P. sanguineus* é um fungo amplamente distribuído na natureza sendo encontrado em regiões de clima mais ameno e em florestas tropicais como a floresta amazônica (Esposito *et al.* 1993). É conhecido popularmente como orelha-de-pau, sendo encontrado em madeira, onde se fixam e se alimentam. É capaz de hidrolisar os polissacarídeos da parede celular e também a lignina de materiais celulósicos (Teixeira *et al.* 1997), sendo chamado de fungo de decomposição branca (*white rot*). Dados da literatura mostram que este fungo é um eficiente produtor de lacase (Herpöel *et al.* 2000), mas ainda há relativamente poucos trabalhos sobre purificação e caracterização (Esposito *et al.* 1993, Eggert *et al.* 1996b, Pointing *et al.* 2000, Vikineswary *et al.* 2006). Para Esposito e colaboradores (1993) este fungo produz além de lacase, LiP e MnP, quando crescido em meio contendo extrato de malte. Segundo Pointing e colaboradores (2000), este fungo produz a lacase como única fenol oxidase, o mesmo sendo relatado por Muzariri e colaboradores (2001). Outros fungos do gênero, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pycnoporus coccineus* produzem apenas lacase como principal enzima do sistema lignolítico (Eggert *et al.* 1996a; Jaouani *et al.* 2005). Entretanto, devemos considerar a

composição do meio e as condições de cultivo utilizado em cada estudo, podendo estes fungos requerer condições ainda não identificadas, que favoreçam a expressão de outras enzimas do sistema lignolítico.

Apesar do número ainda limitado de publicações envolvendo este fungo, há uma tendência crescente de seu emprego em processos biotecnológicos. *P. sanguineus* já foi utilizado com sucesso na descoloração de efluente Kraft (Duran *et al.* 1991, Esposito *et al.* 1993) e na descoloração de diferentes corantes (Pointing & Vrijmoed 2000). O mais recente relato de utilização deste fungo foi na fermentação de resíduos agroindustriais (Vikineswary *et al.* 2006), sendo obtidos bons resultados quanto ao crescimento do fungo e produção de lacase para três diferentes resíduos avaliados.

#### 1.4. Produção de lacases

Diversos fatores influenciam a produção de lacase, podendo-se citar entre outros a composição do meio de crescimento, tempo de cultivo, pH, razão carbono/nitrogênio, temperatura e aeração. Vários grupos de pesquisadores procuram aperfeiçoar as condições de crescimento e de produção de lacase tanto por métodos convencionais e/ou estatísticos, fazendo-se a combinação de diferentes fatores capazes de interferir na produção enzimática (Ikehata *et al.* 2004).

O tempo de incubação pode ser considerado um fator crítico para a detecção da lacase no meio de cultivo. Muitos basidiomicetos produzem esta enzima após 2 ou 3 dias de crescimento (Jodaan & Leukes 2003) e têm um tempo bastante variável durante o qual a enzima continua a ser produzida. Por este motivo a pesquisa para isolamento de organismos produtores de lacase e outras fenoloxidasas deve ser realizada com um monitoramento constante da produção.

Outro fator importante é a agitação ou não do meio durante a produção da enzima. Enquanto que para *Phlebia radiata* a agitação reprimiu a produção de lacase (Niku-Paavola *et al.* 1990), para *P. sanguineus* CY788 os melhores resultados foram obtidos com agitação (Pointing *et al.* 2000).

Os níveis de carbono e de nitrogênio presentes no meio de crescimento do fungo são fatores de extrema importância para a produção de lacase e cujos valores ótimos são bastante variáveis, dependendo do microrganismo em estudo.

Especificamente para o *P. sanguineus* CY788 foi mostrado que a melhor produção de lacase se deu em meios contendo altos níveis de carbono e baixos níveis de nitrogênio (Pointing *et al.* 2000). De maneira oposta, a produção de lacase por outros fungos como, por exemplo, *P. cinnabarinus*, *T. versicolor* e *Trametes gallica* (Eggert *et al.* 1996b, Galhaup *et al.* 2002, Dong *et al.* 2005) foi aumentada em culturas com altos níveis de nitrogênio.

Através da comparação de diversos meios de cultura e condições de crescimento do fungo, Dong e colaboradores (2005) mostraram que a composição do meio e o modo de incubação, se estático ou em agitação, influenciou diretamente na expressão gênica, resultando em diferentes padrões de isoenzimas de lacase. A produção de diferentes isoformas de lacase sob diferentes condições de cultivo tem sido descrita para diversos fungos de decomposição branca. Como exemplo pode-se citar *Trametes villosa* que apresentou pelo menos três isoformas e *Pleurotus ostreatus* quatro isoformas (Leonowicz *et al.* 2001). O padrão de isoformas pode ou não ser alterado por um indutor (Eggert *et al.* 1996b). Pointing e colaboradores (2000) obtiveram a produção de diferentes isoformas dependendo do indutor adicionado ao meio de cultivo do *P. sanguineus* CY788. De forma semelhante o padrão de produção de isoformas pelo *Pleurotus pulmonarius* foi diretamente influenciado pela composição do meio, especificamente carbono e glicose, bem como a presença ou não de indutor (Souza *et al.* 2004). Por outro lado, a presença de indutor não modificou a produção de isoformas por *Pleurotus eryngii* (Muñoz *et al.* 1997).

Como as aplicações biotecnológicas requerem grande quantidade de enzima, e normalmente lacases extracelulares são produzidas em pequenas quantidades (Souza *et al.* 2004), para melhorar a produção de lacase, vários indutores têm sido utilizados, destacando-se compostos aromáticos ou fenólicos relacionados à lignina ou derivados da lignina. Bons resultados obtidos com alguns compostos têm estimulado pesquisas para a produção de lacase em larga escala, considerando a vasta aplicabilidade industrial e ambiental desta enzima. Não existe um ótimo indutor de lacase comum a todos os fungos, havendo grande variação do indutor de acordo com o fungo estudado. Na tabela 1 estão citados os principais indutores de lacase estudados nos últimos anos.

Tabela 1. Exemplos de indutores para produção de lacase fúngica

Composto	Referência
Aminoácidos	Dong <i>et al.</i> (2005); Levin & Forchiassin (2001); Dhawan & Kuhad (2002)
Biotina	Dhawan & Kuhad (2002)
CuSO <sub>4</sub> (Cu <sup>++</sup> )	Klonowska <i>et al.</i> (2001), Galhaup & Haltrich (2001), Galhaup <i>et al.</i> (2002), Levin <i>et al.</i> (2002), Saparrat <i>et al.</i> (2002a), Iyer & Chattoo (2003), Chen <i>et al.</i> (2004), Jaouani <i>et al.</i> (2005)
Ácido 3,4-dimetoxicinâmico	Sethuraman <i>et al.</i> (1999)
Guaiacol	Koroljova-Skorovogat'ko <i>et al.</i> (1998), Lee <i>et al.</i> (1999), Souza <i>et al.</i> (2004)
Etanol	Lee <i>et al.</i> (1999), Dekker <i>et al.</i> (2001), Lomascolo <i>et al.</i> (2003), Jaouani <i>et al.</i> (2005)
Brometo de etídio	Dhawan <i>et al.</i> (2003)
Cafeína	Souza <i>et al.</i> (2004)
Ácido caféico	Koroljova-Skorovogat'ko <i>et al.</i> (1998); Souza <i>et al.</i> (2004)
Ácido gálico	Lee <i>et al.</i> (1999), Souza <i>et al.</i> (2004)
Ácido benzóico	Souza <i>et al.</i> (2004)
Ácido p-cumárico	Souza <i>et al.</i> (2004)
Ácido tânico	Souza <i>et al.</i> (2004)
Ácido ferúlico	Sigoillot <i>et al.</i> (1999), Herpöel <i>et al.</i> (2000), Lomascolo <i>et al.</i> (2002 e 2003), Xiao <i>et al.</i> (2003), Farnet <i>et al.</i> (2004), Souza <i>et al.</i> (2004)
4-hidroxibenzaldeído	Lo <i>et al.</i> (2001)
Ácido p-hidroxibenzóico	Klonowska <i>et al.</i> (2001), Klonowska <i>et al.</i> (2002)
Riboflavina	Dhawan & Kuhad (2002)
Tween 80	Pointing <i>et al.</i> (2000), Lomascolo <i>et al.</i> (2002); Giese <i>et al.</i> (2004)
Ácido vanílico	Muñoz <i>et al.</i> (1997), Souza <i>et al.</i> (2004)
Vanilina	Pérez <i>et al.</i> (1996), Lo <i>et al.</i> (2001), Xiao <i>et al.</i> (2003), Souza <i>et al.</i> (2004)
Álcool veratrílico	Muñoz <i>et al.</i> (1997), Perié <i>et al.</i> (1998), Vasconcelos <i>et al.</i> (2000), Dekker & Barbosa (2001), Dekker <i>et al.</i> (2001), Couto <i>et al.</i> (2003), Souza <i>et al.</i> (2004), Arana-Cuenca <i>et al.</i> (2004)
Resíduos agrícolas diversos	Rodríguez <i>et al.</i> (1997), Arora & Gill (2000), Hatvani & Mécs (2001), Lorenzo <i>et al.</i> (2002), Vikineswary <i>et al.</i> (2006)
Farelos diversos	Lomascolo <i>et al.</i> (2002), Souza & Peralta (2003), Souza <i>et al.</i> (2004), Moldes <i>et al.</i> (2004)
Lignina	Dong <i>et al.</i> (2005)
Ácido siríngico	Xiao <i>et al.</i> (2003), Souza <i>et al.</i> (2004)
Seringaldazina	Koroljova-Skorovogat'ko <i>et al.</i> (1998), Souza <i>et al.</i> (2004)
2,5-xilidina	Eggert <i>et al.</i> (1996b), Muñoz <i>et al.</i> (1997), Perié <i>et al.</i> (1998), Lee <i>et al.</i> (1999), Pikard <i>et al.</i> (1999), Pointing <i>et al.</i> (2000), Min <i>et al.</i> (2001), Lomascolo <i>et al.</i> (2002), Antorini <i>et al.</i> (2002), Jung <i>et al.</i> (2002), Couto <i>et al.</i> (2003), Ryan <i>et al.</i> (2003), Souza <i>et al.</i> (2004), Jaouani <i>et al.</i> (2005)
Kraft lignin; efluente kraft	Xiao <i>et al.</i> (2003), Esposito <i>et al.</i> (1993).

Os indutores acima mencionados foram testados para diversos fungos e em diferentes condições de cultivo. Pointing e colaboradores (2000) e Lomascolo e colaboradores (2002) avaliaram o efeito de Tween 80, um surfactante, e de 2,5-xilidina na produção de lacase por diferentes linhagens do fungo *P. sanguineus*, mostrando que a 2,5-xilidina é um bom indutor. O efeito estimulante da 2,5-xilidina foi descrito primeiramente por Fahraeus e colaboradores em 1958 (citado por Leonowicz *et al.* 2001) e é um dos indutores de lacase mais citados.

O Tween 80 é um surfactante não-iônico, pouco tóxico para as membranas biológicas que tem sido descrito como um estimulante da secreção de enzimas lignolíticas (Asther *et al.* 1987 citado por Lomascolo *et al.* 2002), mas seu uso tem apresentado resultados bem diversos como indutor de enzimas fúngicas permitindo dizer que o mecanismo de ação do Tween-80 parece ser diferente para cada microrganismo (Giese *et al.* 2004).

A utilização de cobre como indutor e regulador de lacase tem sido explorada por alguns autores, apresentando em algumas situações resultados satisfatórios como os obtidos, por exemplo, por Iyer e Chattoo (2003) que tiveram a atividade de lacase de *Magnaporthe grisea* aumentada 8 vezes pela adição de 0,4 mmol.L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub> ao meio de cultivo. Há vários trabalhos em que o cobre está presente no meio de cultivo utilizado, mas não há referência quanto ao efeito indutor do mesmo sobre a produção da lacase.

O uso de substratos sólidos naturais, especialmente resíduos agrícolas ligninocelulósicos para o crescimento de fungos tem sido bastante estudado nos últimos anos, especialmente para a produção de lacase, LiP e MnP. Os principais estímulos para o emprego destes substratos são, a redução imediata de custos, o aproveitamento destes resíduos e os promissores resultados já obtidos no aumento da produção destas enzimas (Pickard *et al.* 1999, Couto *et al.* 2002, Hatvani & Mecs 2002, Fenice *et al.* 2003, Vikineswary *et al.* 2006). A distribuição tropical do *P. sanguineus* o torna particularmente interessante para estudos de biotransformação de resíduos agrícolas comumente produzidos nas regiões tropicais, como por exemplo, bagaço de cana nas regiões produtoras de álcool e açúcar. Vikineswary e colaboradores (2006) apresentaram recentemente um trabalho otimizando a produção e recuperação de lacase por *P. sanguineus* CY788 na fermentação de três diferentes resíduos agrícolas, sendo os resultados bastante promissores.

Os fungos de decomposição branca respondem de maneiras distintas frente aos supostos indutores de lacase e também apresentam diferenças na regulação da transcrição de genes o que pode refletir diferentes funções fisiológicas para lacases fúngicas. A amplificação e clonagem de genes de isoenzimas de lacase de diversos fungos têm possibilitado conhecer melhor o papel individual de cada isoenzima (Necochea *et al.* 2005).

Estudos de expressão de lacase em sistemas heterólogos, tais como leveduras e bactérias, têm sido feitos com objetivo de aumentar a produção da enzima e também aumentar sua atividade catalítica e estabilidade. Como exemplo pode-se citar a expressão de lacase de *Melanocarpus albomyces* em *Trichoderma reesei* (Kiiskinen *et al.* 2004) e lacα de *T. versicolor* em *Saccharomyces cerevisiae* (Necochea *et al.* 2005). Ambos os sistemas de expressão apresentaram um bom rendimento, mantendo praticamente as mesmas características bioquímicas da enzima nativa.

Outra questão que tem sido estudada é o efeito de interações interespecíficas entre fungos de decomposição branca e outros microrganismos na atividade de lacase. Em recente trabalho Baldrian (2004b) obteve um aumento de mais de quarenta vezes na atividade de lacase pela adição de *Trichoderma harzianum* a culturas de *T. versicolor*.

### **1.5. Estrutura e função das lacases**

Lacases fúngicas, notadamente de fungos de decomposição branca, são produzidas tipicamente como isoenzimas que oligomerizam para formar complexos multiméricos, tanto de forma constitutiva como induzida (Eggert *et al.* 1996b, Saparrat *et al.* 2002a, Claus, 2004).

Segundo Claus (2004), a massa molecular de cada monômero varia de 50 a 100 kDa, tendo estas enzimas como característica importante, a presença de carboidratos covalentemente ligados (10 – 45 %) que podem contribuir para a alta estabilidade da enzima. Para Thurston (1994), os carboidratos presentes em lacases fúngicas podem corresponder a 15 – 20 % de sua massa total. Há uma grande variação no grau de glicosilação das lacases e também controvérsias sobre a relação entre a glicosilação e presença de isoformas. Em alguns estudos, a diferença na

extensão de glicosilação da enzima parece ser responsável pela presença de múltiplas isoformas, como sugerido para as três isoformas de lacase de *Ganoderma lucidum* (Ko *et al.* 2001) e como descrito para lacase B do basidiomiceto *Trametes* sp. AH28-2 (Xiao *et al.* 2004), mas para Palonen e colaboradores (2003) esta não seria a justificativa para a presença de oito isoformas na lacase produzida por *Mauginiella* sp. pois a deglicosilação praticamente não modificou o padrão isoelétrico da enzima.

Segundo Mayer & Staples (2002), do ponto de vista evolucionário, a lacase é uma enzima bastante antiga e a ligação da atividade enzimática associada a três diferentes sítios de cobre é um processo evolucionário muito precoce. A atividade catalítica das lacases está relacionada à presença de quatro átomos de cobre por unidade de proteína, sendo os mesmos denominados de acordo com suas características espectrofotométricas (Claus 2004; Leontievsky *et al.* 1997a):

Cobre tipo 1: apresenta absorvância em torno de 600 nm, sendo detectável em EPR. Confere típica coloração azul às enzimas multicobre que resulta da intensa absorção eletrônica causada pela ligação covalente entre cobre e cisteína. Ligados a este átomo de cobre estão duas histidinas e uma cisteína como ligantes conservados, e um ligante variável que pode ser metionina em bactérias e leucina ou fenilalanina em lacases fúngicas (Claus 2004). Discute-se bastante sobre a influência deste último ligante no potencial de oxidação da enzima e conseqüentemente na regulação da atividade da mesma (Kumar *et al.* 2003). O cobre tipo 1 é o local do sítio ativo da enzima onde ocorre a oxidação do substrato (Claus 2004).

Cobre tipo 2: não é detectável espectrofotometricamente e revela propriedades paramagnéticas em estudos de EPR. Localiza-se próximo ao cobre tipo 3 e está ligado a duas histidinas. Funciona como acceptor de um elétron (Min *et al.* 2001).

Cobre tipo 3: este sítio é formado por um par de átomos de cobre que apresenta uma fraca absorvância no UV próximo (330 nm) e nenhum sinal em EPR, por estarem antiferromagneticamente acoplados por meio de uma ponte de ligação hidroxila (Claus 2004). Ligados aos átomos de cobre tipo 3 estão seis moléculas de histidina. Funcionam como acceptor de dois elétrons (Min *et al.* 2001).

A oxidação de substratos pela lacase é catalisada pelo cobre tipo 1 sendo os elétrons destes substratos redutores transferidos posteriormente para o centro trinuclear formado pelos átomos de cobre tipo 2 e 3, que estão fortemente unidos, formando um sítio para onde os elétrons são encaminhados levando à redução do oxigênio molecular e liberação da água (Claus 2004). Thurston (1994) propôs que os íons cobre estão fortemente ligados na lacase, sendo o cobre tipo 2 relativamente instável. Para Nagai e colaboradores (2002), íons de cobre tipo 2 podem ser removidos pelos procedimentos experimentais, inclusive durante as etapas de purificação. Segundo Gianfreda *et al.* 1999, os átomos de cobre diferem entre si pelo seu estado de oxidação. Esta reação de oxidação gera radicais livres que podem sofrer reações enzimáticas (Reinhammar & Malmstrom, 1981 citado por Thurston 1994) ou não-enzimáticas (Claus 2004). Considerando o interesse biotecnológico desta enzima, duas reações não-enzimáticas podem ser destacadas: o *cross-linking* de monômeros, em que a oxidação de compostos fenólicos e anilinas por lacase geram radicais que reagem entre si para formar dímeros, oligômeros ou polímeros e assim, no solo, xenobióticos fenólicos e aminas aromáticas podem se ligar à matriz orgânica; a outra reação é a clivagem de anéis aromáticos que possibilita a degradação de xenobióticos como corantes sintéticos e nitroaromáticos (Durán & Esposito 2000, Claus *et al.* 2002).

A espectroscopia combinada com cristalografia, dicroísmo circular magnético e raios-X têm possibilitado uma descrição detalhada do sítio ativo da lacase. O fato das lacases muitas vezes apresentarem múltiplas isoformas dificulta, ou acrescenta etapas de purificação até obtenção de material apto à cristalografia (Antorini *et al.* 2002), pois esta técnica requer amostras absolutamente purificadas, com carga homogênea, ou seja, não pode haver a presença de isoformas de diferentes pl na amostra a ser cristalizada. Nos últimos anos algumas lacases foram cristalizadas (Necochea *et al.* 2005) inclusive isoenzimas de *P. cinnabarinus* (Antorini *et al.* 2002).

Segundo Mayer & Staples (2002), a estrutura do sítio ativo parece bem conservada nas lacases fúngicas, mas há uma grande diversidade quanto ao restante da estrutura da proteína e quanto ao seu conteúdo de açúcares. Estudos de alinhamento da seqüência de aminoácidos de diversas lacases identificaram 4 regiões conservadas como específicas de lacases (L1 – L4), sendo que os 12 aminoácidos ligantes dos átomos de cobre encontram-se nestas regiões (Kumar *et al.* 2003; Necochea *et al.* 2005).

Trabalhos recentes sobre lacases fúngicas de diferentes origens têm mostrado divergências no número de átomos de cobre e em seu espectro característico (Xiao *et al.* 2003). Edens e colaboradores (1999) mencionaram a ocorrência das seqüências típicas de aminoácidos para os três sítios de cobre em lacase de *Gaeumannomyces graminis* apesar de não apresentar o característico pico de absorção próximo a 600 nm.

O cobre tipo 3 está ausente nas duas lacases de *Pleurotus florida* (Das *et al.* 2001) e na lacase de *P. eryngii* (Muñoz *et al.* 1997). Há outros relatos de enzimas denominadas lacase que não apresentam a típica absorção próximo a 600 nm, indicando ausência do cobre tipo 1, sendo estas denominadas de lacase branca (Palmieri *et al.* 1997) ou lacase amarela (Leontievsky *et al.* 1997a). Para Mayer & Staples (2002), estas enzimas não deveriam ser consideradas lacases porque nas mesmas o cobre encontra-se na forma reduzida. A lacase branca estudada por Palmieri e colaboradores (1997) não apresentou os típicos quatro átomos de cobre, mas sim um átomo de cobre, dois de zinco e um de ferro, enquanto que a lacase citada por Min e colaboradores (2001) apresentou íons de zinco, cobre e manganês. O fungo *Pleurotus ostreatus* D1, quando cultivado em meio sólido (Pozdnyakova *et al.* 2004) produziu uma lacase amarela que difere da lacase azul quanto à ausência do pico próximo a 600 nm, o espectro de EPR e o espectro de dicroísmo circular (DC), mas que por outro lado, além de atuar sobre substratos tipicamente estudados para lacase, é capaz de oxidar compostos não fenólicos mesmo na ausência de mediadores. Resultado semelhante já havia sido relatado por Leontievsky e colaboradores (1997b) para lacase do fungo *Panus tigrinus* quando este foi cultivado em meio sólido rico em lignina, sugerindo que a lacase amarela seja o resultado de uma modificação da lacase azul pelos produtos originados da degradação da lignina.

Entre a diversidade de compostos oxidados pela lacase, a oxidação da seringaldazina na ausência de  $H_2O_2$  é típica para identificação de lacase. A seringaldazina é um substrato fenólico dimetoxilado apresentando em sua estrutura dois átomos de nitrogênio ligados por uma dupla ligação, caracterizando assim um composto azo. A reação com a seringaldazina gera inicialmente um radical livre. Em seguida ocorre a liberação do segundo elétron através de ação enzimática e/ou desprotonação, formando uma quinona de coloração púrpura intensa e que aparentemente não é propensa à polimerização (Thurston 1994), figura 1.

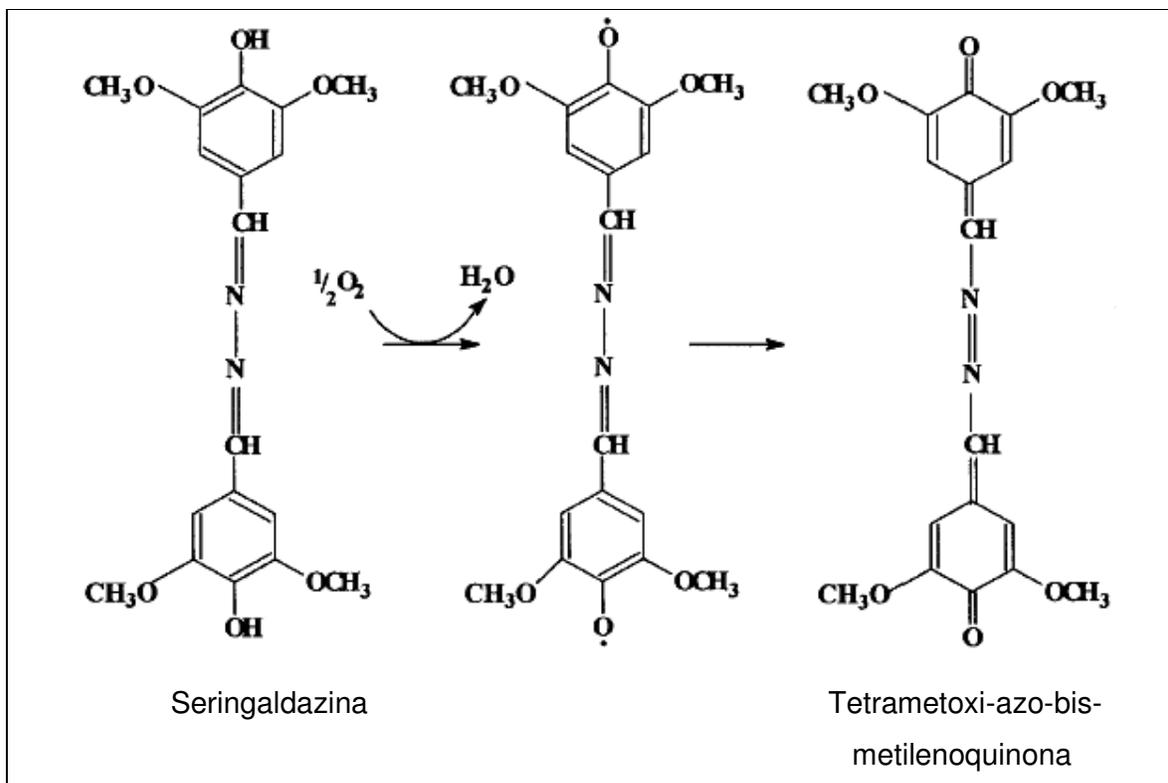


Figura 1. Reação de oxidação da seringaldazina até formação da correspondente quinona. Fonte: Sanchez-Amat & Solano, 1997.

## 1.6. Purificação

A lacase é uma enzima com características bastante variáveis, mesmo quando originária de microrganismos do mesmo gênero. Extremamente variáveis também são os procedimentos utilizados para purificação desta enzima. Analisando os trabalhos publicados na última década envolvendo purificação de lacase fúngica observa-se inicialmente que, na maioria das vezes, este processo requer 2 ou mais etapas de purificação, sendo mais comum 2 a 4 etapas envolvendo procedimentos cromatográficos diversos, bem como precipitação principalmente por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e também ultrafiltração.

Entre as técnicas cromatográficas utilizadas há um predomínio da cromatografia de troca iônica, especificamente troca de ânions. O segundo tipo de

cromatografia mais citado é a de filtração em gel, seguida pela cromatografia de interação hidrofóbica (HIC).

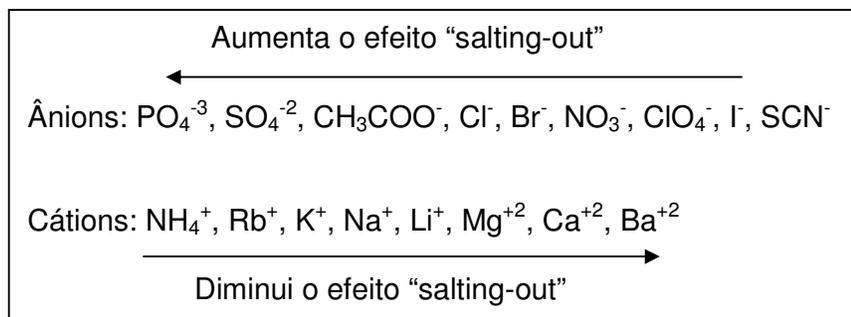
Na maioria das situações, o mesmo método cromatográfico é repetido variando a condição de eluição da coluna o que pode, em alguns casos, resultar em uma grande diferença no perfil cromatográfico entre as etapas. Para exemplificar pode-se citar a purificação de lacase de *Dichomitus squalens* onde se empregou uma coluna de DEAE-sepharose e em seguida, as frações ativas desta etapa foram aplicadas repetidamente em uma coluna Mono Q HR, em condições diferentes, sendo que na primeira passagem através desta coluna apenas um pico de atividade foi detectado e na segunda houve a separação de dois picos bem distintos que corresponderam a duas isoformas (Perié *et al.* 1998).

Entre as lacases já purificadas e descritas observa-se uma grande variedade quanto a suas características bioquímicas como massa molecular, pH ótimo, especificidade de substrato, entre outras. Variáveis também são aspectos como sua localização extra ou intracelular, natureza monomérica ou multimérica, conteúdo de cobre, quantidade e composição de carboidratos (Thurston 1994). No anexo 1 apresentamos uma tabela com as principais características das lacases fúngicas purificadas na última década.

Uma grande variedade de técnicas de purificação de proteínas está disponível, havendo um predomínio das diferentes técnicas cromatográficas, devido ao seu alto poder de resolução. A cromatografia por interação hidrofóbica (HIC) tem sido utilizada com sucesso no fracionamento e purificação de proteínas e outras biomoléculas (Queiroz *et al.* 2001). Neste tipo de cromatografia a separação das proteínas depende de sua hidrofobicidade, sendo a separação promovida através de interações hidrofóbicas entre ligantes hidrofóbicos e regiões não-polares na superfície das proteínas. Nesta técnica a adsorção é aumentada com o aumento da concentração de sal na fase móvel e a eluição favorecida pela diminuição da concentração de sal do eluente (Melander & Horváth, 1977 citado por Queiroz *et al.* 2001). As interações ocorridas na HIC são mais fracas que as observadas na cromatografia por afinidade, cromatografia de troca iônica ou cromatografia de fase reversa e por isso a HIC provoca um dano estrutural mínimo e conseqüentemente consegue manter melhor a atividade biológica da molécula que está sendo purificada.

O número de aminoácidos hidrofóbicos, suas diferentes distribuições e hidrofobicidade são características de cada proteína, e esta variação da hidrofobicidade possibilita que estas biomoléculas sejam fracionadas através da HIC.

A influência de diferentes sais na interação hidrofóbica segue a série de Hofmeister (liotrópica) para a precipitação de proteínas de soluções aquosas (Påhlman *et al.* 1977 e Roe 1989 citados por Queiroz *et al.* 2001):



A retenção de proteínas em HIC depende tanto da fase estacionária como das características da fase móvel tais como tipo e concentração do sal, pH e temperatura. Para Rippel e Szepesy (1994), a mudança do tipo de sal no eluente resulta em significantes alterações não somente na retenção geral das proteínas, mas influencia também na seletividade das separações. O uso de alta concentração de sal no tampão de equilíbrio promove a interação ligante-proteína resultando conseqüentemente em maior retenção da proteína. Em geral o aumento no pH da fase móvel (9 -10) diminui as interações hidrofóbicas entre proteínas e ligantes hidrofóbicos devido ao aumento de hidrofilicidade promovido pela mudança na carga da proteína, ocorrendo o inverso quando há diminuição do pH (Porath *et al.* 1973 citado por Queiroz *et al.* 2001). Quanto ao efeito da temperatura na HIC, usualmente o aumento na temperatura aumenta a retenção de proteínas enquanto o resfriamento promove a eluição das mesmas (Hjertén *et al.* 1974, citado por Queiroz *et al.* 2001). Além destas considerações quanto à fase móvel, o tipo de fase estacionária é outro parâmetro muito importante para o sucesso do procedimento cromatográfico. Os ligantes mais utilizados em HIC são alcanos de cadeias lineares e grupos aromáticos simples, como fenil, sendo que este ligante utiliza um misto de interações hidrofóbicas que podem ser usadas para obter interessantes resultados em HIC (Tomaz & Queiroz 2004). O uso de HIC é mencionado em cerca de 25 % dos trabalhos sobre purificação

de lacase divulgados nos últimos 10 anos, sendo que apenas em dois casos o grupo aromático da coluna não era fenil. O sal mais utilizado como eluente nestes trabalhos foi o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e em seguida o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

### **1.7. Aplicações biotecnológicas das lacases**

Lacase e outras polifenol oxidases similares podem ser usadas, na forma nativa ou imobilizada, em vários processos biotecnológicos. A lacase apresenta um importante papel na degradação da lignina, segundo e altamente recalcitrante biopolímero mais abundante na natureza após a celulose. Desta forma esta enzima apresenta uma considerável aplicação não só na indústria papeleira e de polpa, mas também em diversos processos que se baseiam na utilização de materiais ligninocelulósicos (Bourbonnais & Paice 1996, Mayer & Staples 2002), como agente branqueador natural para indústria têxtil e papeleira (Jordaan *et al.* 2004), na produção de etanol através do emprego de microrganismos engenheirados (Mayer & Staples 2002), na indústria alimentícia onde seu emprego é diversificado como, por exemplo, na produção de bebidas sendo empregado como agente estabilizante de vinhos, sucos de frutas e de cerveja (Minussi *et al.* 2002) e na indústria de panificação como melhorador do “flavor” do produto (Minussi *et al.* 2002). Há um crescente desenvolvimento de biosensores contendo lacase para imunoensaio como o desenvolvido por Bauer e colaboradores (1999) para distinção entre morfina e codeína em amostras de drogas, biosensores para determinação de glicose (Wollenberg *et al.* 1986), de aminas aromáticas (Simkus & Laurinavicius 1995) e de compostos fenólicos (Freire *et al.* 2001, Timur *et al.* 2004), sendo estes últimos muito importantes para o controle ambiental. Encontra-se também na literatura a ação de lacase especificamente sobre alguns grupos de fármacos como hormônios, por exemplo (Tsutsumi *et al.* 2001).

O uso de enzimas para o tratamento ou remoção de poluentes ambientais tem interesse crescente por causa da alta eficiência e seletividade, além de reações ambientalmente saudáveis. Diversos corantes, principalmente pertencentes aos grupos químicos azo e antraquinona são extensivamente usados em várias aplicações industriais como, por exemplo, têxteis, alimentos, medicamentos e brinquedos. Uma quantidade considerável destes corantes é lançada nas estações de

tratamento das indústrias, mas na maioria das vezes os tratamentos convencionais são incapazes de remover completamente esses corantes que são lançados nos leitos dos rios, levando a uma alteração da biota aquática (Young & Yu 1997). Vários processos biotecnológicos têm sido propostos, sendo que o emprego de fungos de decomposição branca tem apresentado bons resultados na degradação de vários compostos xenobióticos, sob condições aeróbicas (Pointing 2001). Desde os anos 80 a habilidade dos fungos para descolorir corantes azo tem sido registrada sendo que, na maioria dos estudos, relaciona-se este evento à ação de LiP e MnP. Trabalhos mais recentes têm demonstrado a descoloração mediada por lacase, inclusive utilizando o fungo *P. sanguineus* (Esposito *et al.* 1993, Pointing & Vrijmoed 2000). Para Thurston (1994) O desenvolvimento de processos baseados no emprego de lacase para remoção de corantes de efluentes industriais é promissor uma vez que esta enzima é capaz de degradar corantes de diversas estruturas químicas. Lacase de *P. coccineus* teve um promissor resultado no tratamento do escuro efluente oriundo da produção de óleo de oliva (Jaouani *et al.* 2005). As lacases, bem como as peroxidases fúngicas extracelulares destacam-se entre as enzimas estudadas para este fim por serem consideradas de fácil separação e purificação, bem como a facilidade para produção em biorreatores (Ikehata *et al.* 2004). Lacase pode ser considerada mais interessante para processos de descontaminação de leitos de água, por exemplo, uma vez que não requer a adição de peróxido de hidrogênio como as peroxidases, e geralmente atuam sobre uma gama maior de substratos que a tirosinase (D'Annibale *et al.* 2000).

Têm-se ainda relatos na literatura sobre o emprego de lacase na degradação de pesticidas ou inseticidas (Amitai *et al.* 1998) e também seu uso para síntese orgânica como, por exemplo, na síntese enzimática de vimblastina, uma importante droga anti-câncer, a partir de precursores presentes em larga quantidade em plantas (Fritz-Langhals *et al.* 1998, Jodaan & Leukes 2003). Diante desta ampla aplicabilidade pode-se dizer que forte habilidade da lacase para transformar compostos aromáticos a torna um importante instrumento para aplicações biotecnológicas. Uma clara demonstração do emprego real da enzima lacase em diferentes processos é o registro junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) de diversas patentes envolvendo o seu emprego, como pode ser exemplificado na tabela 2.

Tabela 2. Exemplos de patentes envolvendo o emprego de lacase

Processo	Depósito	País de origem	Título
PI9206013-7	18/05/1992	Alemanha	Processo para deslignificação de material contendo lignocelulose, alvejamento e tratamento de águas residuais por meio de lacases com eficiência melhorada
PI9509394-0	18/10/1995	Dinamarca	Processo para proporcionar um aspecto alvejado na densidade de coloração da superfície de tecido tingido
PI9814332-8	17/12/1998	Dinamarca	Processo e sistema para remoção de corante em excesso de tecido ou de fio recém fabricado estampado ou tingido, e, uso de componentes
PI0002329-9	30/05/2000	Brasil	Processo de tratamento de tratamento de efluente papelero Kraft E1 pelo sistema de enzima-mediador: lacase - hidroxamatos
PI0004038-0	06/09/2000	Estados Unidos	Produção de aromas naturais por lacase
PI0004323-0	14/09/2000	Brasil	Biossensor amperométrico para determinação de compostos fenólicos – eletrodo de materiais carbonáceos com lacase imobilizada
PI0100576-6	09/02/2001	Brasil	Biossensores amperométricos multicomponente para determinação simultânea de compostos fenólicos

Fonte: INPI (<http://www.inpi.gov.br>)

O uso de lacase para transformar compostos tóxicos em metabólitos seguros pode ser uma alternativa viável para reduzir a poluição ambiental, mas há vários fatores que limitam esta aplicação para enzimas livres, pois estas podem ser desativadas ou desnaturadas quando submetidas às severas condições encontradas nos solos ou efluentes. As imobilizações de enzimas em diversos suportes através de processos físicos ou químicos podem minimizar estas limitações, tornando-as mais estáveis e aplicáveis por um maior período de tempo (Gianfreda *et al.* 1999). Encontram-se na literatura estudos utilizando a enzima lacase livre ou imobilizada, para descoloração de diferentes corantes (Pointing & Vrijmoed 2000, Duran & Esposito 2000). Para alguns pesquisadores a imobilização de enzimas para emprego no tratamento de efluentes é um procedimento absolutamente necessário (Peralta-Zamora *et al.* 2003).

Um grande número de suportes tem sido utilizado para imobilização de enzimas, havendo um predomínio dos suportes orgânicos, sejam naturais ou sintéticos, em relação aos inorgânicos (Fernandes 2000). Recentemente a classe de polímeros chamados polímeros condutivos tem recebido bastante atenção e vem sendo utilizado como suporte para imobilização de enzimas. Entre estes a polianilina (PANI) tem se destacado por ser um suporte que apresenta boa estabilidade, sua síntese que pode se dar através de métodos eletroquímicos e químicos, é simples, extremamente barata e com rendimento muito bom (Fernandes *et al.* 2003).

Considerando a grande aplicabilidade da enzima lacase e a maior compreensão do seu papel fisiológico, fungos produtores desta enzima têm sido atualmente alvo de muita atenção, uma vez que a produção de lacase geralmente excede a de LiP e MnP (Pointing *et al.* 2000). A maioria dos estudos descritos na literatura tem utilizado linhagens fúngicas oriundas de áreas temperadas, enquanto que os fungos tropicais têm recebido comparativamente pouca atenção (Pointing *et al.* 2000). Entretanto o *P. sanguineus* é um bom produtor de lacase de regiões tropicais, candidato ao emprego em processos biotecnológicos em que se requer lacase.

Segundo Okino e colaboradores (2000), a habilidade para descolorir corantes poliméricos está correlacionada com a degradação de xenobióticos e, em um amplo estudo envolvendo 116 espécies brasileiras de basidiomicetos de florestas tropicais, estavam incluídas 6 linhagens de *P. sanguineus*, dos quais 5 se mostraram eficientes degradadores de guaicol e de um corante polimérico (remazol brilhante blue R

(RBBR)), alguns apresentando somente atividade de lacase e outros de lacase e peroxidase.

A ampla gama de substratos sobre os quais a lacase pode atuar é uma característica que direciona para o emprego da mesma na biorremediação de ambientes complexos como, por exemplo, o efluente de indústrias farmacêuticas, que apresenta uma composição bastante variável em função da sazonalidade de produção que implica conseqüentemente em uma mudança na composição do efluente gerado. Esta variação dificulta o tratamento biológico deste efluente.

Diante do que foi exposto é de grande importância que se encontrem novas fontes de lacase com propriedades industrialmente aceitáveis como maior estabilidade térmica, maior resistência a extremos de pH, maior tempo de armazenamento entre outras. Igualmente importante é o desenvolvimento de processos de produção e purificação economicamente viáveis para estas fontes.

## 2. OBJETIVOS

A atuação da enzima lacase sobre uma diversidade de substratos, aliada às vantagens de seu emprego quando comparada a outras fenoloxidasas a torna uma enzima em potencial para aplicações biotecnológicas diversas. Apesar dos fungos do gênero *Pycnoporus* serem considerados bons produtores de lacase, há relativamente poucos trabalhos sobre os mesmos, em especial o *P. sanguineus*. Considerando estes aspectos o presente trabalho teve como objetivo o seguinte:

- ❖ Avaliar “in vivo” a ação do fungo *P. sanguineus* (CCT-4518) sobre corantes utilizados na indústria farmacêutica;
- ❖ Avaliar a produção de lacase pelo *P. sanguineus* em diferentes meios de cultivo;
- ❖ Purificar e caracterizar lacases produzidas pelo fungo *P. sanguineus*;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Enzimologia (ICB/UFG), contando com o apoio técnico dos Laboratórios de Química de Proteínas (ICB/UFG) e de Enzimologia (FF/UFG).

#### 3.1. Meios de cultura

Meio ágar batata dextrose (BDA)

Glicose	2,0 % (p/v)
Agar	1,5 % (p/v)
Caldo de batata cozida	20,0 % (v/v)

pH  $6,0 \pm 0,2$ , à temperatura ambiente ( $28^{\circ} \text{C}$ )

Meio de produção de lacase (MPL)

Extrato de malte	1,25 % (p/v)
Tween 80	0,10 % (p/v)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0005 % (p/v)
2,5 – xilidina	0,4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

pH  $5,0 \pm 0,2$ , à temperatura ambiente ( $28^{\circ} \text{C}$ )

## Meio YMA

Extrato de malte	0,30 % (p/v)
Extrato de levedura	0,30 % (p/v)
Glicose	1,00 % (p/v)
Peptona	0,50 % (p/v)
2,5 – xilidina	0,4 mmol.L <sup>-1</sup>

pH 5,0 ± 0,2, à temperatura ambiente (28 ° C)

## Meio modificado de Herpöel (2000)

Maltose	2,00 % (p/v)
Sulfato de amônia	0,132 % (p/v)
Tartarato de sódio	0,27 % (p/v)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,133 % (p/v)
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01 % (p/v)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 % (p/v)
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,007 % (p/v)
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0047 % (p/v)
MnSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0035 % (p/v)
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0007 % (p/v)
Extrato de levedura	0,10 % (p/v)
Tween 80	0,10 % (p/v)
2,5 – xilidina	0,4 mmol.L <sup>-1</sup>

pH 5,0 ± 0,2, à temperatura ambiente (28 ° C)

## Meio modificado de Pointing (2000)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,00 (g/L)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,10 (g/L)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50 (g/L)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,00 (mg/L)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,00 (mg/L)
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5,00 (mg/L)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,10 (mg/L)
NaCl	10,0 (mg/L)
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,00 (mg/L)
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	0,10 (mg/L)
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,10 (mg/L)
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,10 (mg/L)
Tiamina.HCl	1,00 (mg/L)
Glicose	8,00 (g/L)
Tartarato de amônio	2,4 mmol.L <sup>-1</sup>
2,5 – xilidina	0,4 mmol.L <sup>-1</sup>

pH 5,0 ± 0,2, à temperatura ambiente (28 °C)

Todos os meios de cultura foram autoclavados a 120 °C, durante 15 minutos. Para induzir a produção de lacase, 2,5 – xilidina (Sigma Chemical Company) na concentração de 50 mg/L, previamente filtrada em membrana millipore “Millex” foi adicionada aos meios já autoclavados, no momento do inóculo ou após 24 horas de incubação.

### 3.2. Origem e manutenção dos fungos

A linhagem de *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 (Linnaeus ex Fries) Murrill utilizada neste trabalho foi obtida junto à Fundação André Tosello em Campinas/SP.

O fungo foi mantido em meio BDA, no escuro, à temperatura ambiente por 10 dias, armazenado a 4 °C e repicado mensalmente para a manutenção das culturas.

Para a obtenção de esporos as culturas foram crescidas por 5 dias a 37 °C, no escuro.

### **3.2.1. Avaliação do efeito da temperatura no crescimento do fungo**

Para investigar o efeito da temperatura no crescimento do fungo em meio sólido, o *P. sanguineus* foi crescido em placas com BDA, ao abrigo da luz, em estufas com temperatura de 28, 37, 46 e 55 °C, sendo o tamanho das colônias medido diariamente, como um indicador da taxa de crescimento. Os testes foram feitos em triplicata.

### **3.3. Descoloração de corantes**

Placas de 5,5 cm de diâmetro contendo 10 mL de meio BDA acrescido de 0,02 % de cada corante individualmente (FD & C yellow n. 6, Food Blue 1, Ponceau 4R e Remazol brilhante laranja) foram inoculadas com um disco de ágar com 7 mm retirado da região de crescimento mais recente do fungo em meio BDA. As culturas foram mantidas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, sendo o crescimento do fungo e descoloração do meio observados visualmente e medidos diariamente por um período de 20 dias. O descoramento de toda a placa foi considerado como 100 % de descoloração. Como controle do crescimento do fungo, foi feito o inóculo em placas contendo apenas BDA. Os experimentos foram realizados em triplicata. (Jarosz-Wilkolazka *et al.* 2002; Dias *et al.* 2003).

### **3.4. Produção de lacase**

Frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL do meio de cultura MPL foram inoculados com  $1 \times 10^7$  esporos . mL<sup>-1</sup> de *P. sanguineus* e incubados a 28 °C, sob agitação constante de 150 rpm, por 72 horas. O material de cultivo foi filtrado a vácuo em papel de filtro sendo o sobrenadante congelado em seguida e posteriormente

descongelado, novamente filtrado para retirada de material precipitado (Galhaup *et al.* 2002) e em seguida dialisado (“cut off” 12 – 16 kDa) contra água destilada por 6 horas. As amostras assim obtidas foram estocadas a - 20 °C e utilizadas para purificação, sendo previamente centrifugadas para retirada de qualquer precipitado.

Diversos outros meios de cultura foram utilizados a fim de comparar a produção de lacase nos mesmos, mas mantendo as mesmas condições de cultivo. Nos experimentos de cinética de produção da lacase as amostras foram coletadas nos tempos de 12, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

### **3.5. Determinação da biomassa**

A biomassa de *P. sanguineus* foi determinada em intervalos específicos de tempo através da filtração a vácuo do micélio em papel de filtro, seguida da lavagem do micélio com água destilada e secagem do mesmo em estufa a 80 °C até peso constante. As determinações foram feitas em triplicata, utilizando o meio MPL.

### **3.6. Ensaio enzimático para atividade de lacase**

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do substrato, sendo essa oxidação acompanhada por 5 a 10 minutos. Utilizando a seringaldazina (Sigma Chemical Company) como substrato, o ensaio consistiu em acrescentar a 840 µl de tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 5,0, 60 µl da enzima previamente diluída em água quando necessário, sendo a reação iniciada pela adição de 100 µl de seringaldazina 1 mmol.L<sup>-1</sup> (preparada em etanol absoluto). A reação aconteceu a uma temperatura de 25 – 30 °C, sendo a oxidação do substrato acompanhada espectrofotometricamente a 525 nm. O  $\epsilon_{525}$  da seringaldazina é 65.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Leonowicz & Grzywnowicz 1981).

Quando o substrato utilizado foi o ABTS (Sigma Chemical Company), acrescentou-se a 860 µl de tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 5,0, 40 µl da enzima previamente diluída em água quando necessário, sendo a reação iniciada pela adição de 100 µl de ABTS 5 mmol.L<sup>-1</sup>. A reação aconteceu a uma temperatura de 25 – 30 °C, sendo a oxidação do substrato acompanhada

espectrofotometricamente a 420 nm. O  $\epsilon_{420}$  do ABTS é  $36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Bourbonnais & Paice 1990). Em alguns experimentos o extrato bruto foi pré-incubado com a enzima catalase por 30 minutos, antes do ensaio para atividade enzimática, a fim de eliminar qualquer peróxido de hidrogênio endógeno que pudesse estar presente.

Ao utilizar o guaiacol (Sigma Chemical Company) como substrato, acrescentou-se a 700  $\mu\text{l}$  de tampão citrato fosfato  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 4,4, 200  $\mu\text{l}$  da enzima, sendo a reação iniciada pela adição de 100  $\mu\text{l}$  de guaiacol  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ . A reação aconteceu a uma temperatura de  $25 - 30 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo a oxidação do substrato acompanhada espectrofotometricamente a 470 nm. O  $\epsilon_{470}$  do guaiacol é  $12.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Nagai *et al.* 2002).

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto.

A atividade de lacase foi calculada de acordo com a seguinte fórmula (Leonowicz & Grzywnowicz 1981):

$$A = \frac{10^6 \Delta E}{\epsilon \Delta t} \quad \text{onde: } \epsilon = \text{coeficiente de extinção molar de cada substrato, conforme dados da literatura;}$$

$\Delta E$  = aumento na absorvância no comprimento de onda específico;

$\Delta t$  = tempo de reação em minutos;

Todas as determinações de atividade enzimática foram realizadas em triplicata, utilizando previamente dialisado contra água destilada.

### 3.7. Dosagem de proteínas totais

As concentrações de proteínas nas amostras foram determinadas de acordo com o método colorimétrico descrito por Bradford e colaboradores (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA – Sigma) como padrão. Amostras de 100  $\mu\text{l}$  foram misturadas a 1 mL da solução de Bradford. Após 15 minutos de incubação à

temperatura ambiente, leu-se a absorvância das amostras a 595 nm. Os ensaios foram feitos sempre em triplicata.

### **3.8. Eletroforese desnaturante (SDS – PAGE)**

O perfil de proteínas secretadas e o grau de pureza obtido durante as etapas de purificação foram avaliados através de gel de poliacrilamida a 12%, em condições desnaturantes (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). As amostras foram liofilizadas e ressuspensas em tampão de amostra desnaturante [tampão Tris-HCl 1M pH 6,8 – 1,2 % (v/v) ;  $\beta$ -mercaptoetanol – 1 % (v/v); SDS – 0,4 % (p/v); glicerol - 10 % (v/v); azul de bromofenol – 0,02 % (p/v)], fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em um sistema de eletroforese (Hoefer mini VE system – Amsterdam Pharmacia Biotech), sendo conduzida à temperatura ambiente com uma voltagem inicial de 80 V durante a corrida no gel concentrador e depois de 100 V até o final da corrida cromatográfica.

Os padrões de proteínas (Fermentas Life Sciences) utilizados para estimar a massa molecular da enzima lacase em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) tinham as seguintes massas: 200 kDa, 150 kDa, 120 kDa, 100 kDa, 85 kDa, 70 kDa, 60 kDa, 50 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 15 kDa e 10 kDa.

### **3.9. Coloração com nitrato de prata**

Após a corrida eletroforética o gel foi corado para proteínas, utilizando-se o método de coloração descrito por Blum e colaboradores (1987). O gel foi colocado em solução fixadora [metanol p.a. 50 % (v/v), ácido acético p.a. 12 % (v/v)] por no mínimo 1 hora. Foram realizadas 3 lavagens de 20 minutos com solução de etanol a 50 % (v/v), seguida por uma incubação em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v) durante exatamente 1 minuto. Na seqüência do processo de coloração o gel foi lavado por 3 vezes com água destilada, durante 20 segundos, depois incubado numa solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v) contendo 0,1 % (v/v) de formaldeído (37 %), por 20 minutos. Na etapa seguinte fez-se a lavagem com água destilada por 2 vezes, durante 2 minutos e finalmente o gel foi colocado na solução reveladora contendo

48mL de carbonato de sódio 6 % (p/v), 50 µl de formaldeído (37 %) e 2 mL de tiosulfato de sódio a 0,02 % (p/v), até o aparecimento das bandas de proteínas. A coloração foi interrompida por meio de uma solução contendo metanol p.a. 50 % (v/v) e ácido acético p.a. 12 % (v/v). Todas as etapas foram realizadas sob agitação.

### **3.10. Determinação da atividade de lacase em gel de poliacrilamida após eletroforese em condições desnaturantes**

Para determinação da atividade de lacase em gel de poliacrilamida (12 %), fez-se o mesmo procedimento do item 3.8. exceto que, após a diluição da amostra com o tampão, a mesma não foi fervida. A corrida cromatográfica aconteceu nas mesmas condições descritas anteriormente e, após o término da mesma procedeu-se a renaturação da enzima através da incubação do gel por 45 minutos com o tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> nos pH 6,5, 5,5 e 4,5, a 4 °C sendo a troca efetuada a cada 15 minutos. Após a renaturação o gel foi corado com uma solução de ABTS (0,5 mmol.L<sup>-1</sup>) em tampão acetato 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 4,5 (Gonçalves & Steiner 1996, modificado).

### **3.11. Purificação de lacase de *P. sanguineus***

Todas as etapas cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente.

#### **3.11.1. Cromatografia em coluna de interação hidrofóbica 1**

10 ml do sobrenadante de cultura de *P. sanguineus* obtido como descrito no item 3.4. e contendo aproximadamente 23 mg de proteínas, foi adicionado de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> até uma concentração final de 2 mol.L<sup>-1</sup> e aplicado numa coluna Phenyl Sepharose High Performance (1,0 cm x 17,0 cm) (Amershan Pharmacia Biotech) equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 5,0 contendo 2 mol.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com fluxo de 2 mL.min<sup>-1</sup>. Equilibrou-se a coluna com 80 mL do mesmo tampão e as proteínas adsorvidas foram eluídas com um gradiente decrescente de 2 a 0 mol.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e posteriormente com 100 mL de tampão acetato de sódio

50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 5,0. Frações de 1,0 mL foram coletadas e utilizadas para a determinação de proteína a 280 nm e atividade de lacase. As frações com atividade de lacase foram reunidas, dialisadas contra água e aplicadas a uma segunda coluna cromatográfica.

### **3.11.2. Cromatografia em coluna de interação hidrofóbica 2**

As frações correspondentes ao segundo pico de atividade de lacase obtidas na etapa anterior foram reunidas, adicionadas de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> até uma concentração final de 1 mol.L<sup>-1</sup>, ajustadas para pH 5,0 e aplicadas novamente em uma coluna Phenyl Sepharose High Performance (1,0 cm x 17,0 cm) equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 5,0 contendo 1 mol.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com fluxo de 2 mL.min<sup>-1</sup>. Equilibrou-se a coluna com 80 mL do mesmo tampão e as proteínas adsorvidas à matriz foram eluídas com um gradiente decrescente de 1 a 0 mol.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e posteriormente com 100 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 5,0. Frações de 2,0 mL foram coletadas e utilizadas para a determinação de proteína a 280 nm e atividade de lacase. As frações com atividade de lacase foram dialisadas contra água e armazenadas a -20°C.

### **3.11.3. Cromatografia em coluna de interação hidrofóbica 3**

As frações correspondentes ao segundo pico de atividade de lacase obtidas na primeira etapa cromatográfica (3.11.1.) foram reunidas, adicionadas de NaCl até uma concentração final de 10 %, ajustadas para pH 5,0 e aplicadas novamente em uma coluna Phenyl Sepharose High Performance (1,0 cm x 17,0 cm) equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 5,0 contendo 10% de NaCl em um fluxo de 2 mL.min<sup>-1</sup>. Equilibrou-se a coluna com 80 mL do mesmo tampão e em seguida aplicou-se um gradiente decrescente de 10 a 0 % de NaCl e posteriormente 100 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 5,0. Frações de 2,0 mL foram coletadas e utilizadas para a determinação de proteína a 280 nm e atividade de lacase. As frações com atividade de lacase foram dialisadas contra água e armazenadas a -20°C.

### **3.12. Caracterização bioquímica das lacases de *P. sanguineus***

Utilizou-se como substrato para a maioria dos ensaios a seringaldazina. Quando outro substrato foi usado, fez-se a menção do mesmo.

#### **3.12.1. Determinação do pH ótimo**

Na determinação do melhor pH para a atividade das lacases, a reação foi realizada utilizando-se os tampões glicina/HCl para pH de 2,0 a 2,4 e citrato-fosfato para valores de pH que variaram de 2,6 a 7,0. As misturas de reação e as condições de ensaio foram idênticas às descritas no item 3.6 sendo que, para a fração purificada, fez-se a determinação do pH ótimo para diferentes substratos.

#### **3.12.2. Determinação da temperatura ótima**

Para se determinar a temperatura ótima para atividade das enzimas incubou-se o tampão e à parte, o substrato, por 10 minutos, nas diversas temperaturas que variaram de 15 a 70 °C, com intervalos de 5 °C. A atividade enzimática foi realizada em triplicata, de acordo com o protocolo descrito no item 3.6., nas diferentes temperaturas, usando como substrato a seringaldazina.

#### **3.12.3. Determinação da termoestabilidade**

O efeito da temperatura na estabilidade das lacases estudadas foi determinado, após pré-incubação das enzimas Lac 1 e Lac 2 a 30, 50, 60, 70 ou 80 °C, por um período variável de 15 minutos a 48 horas dependendo do estudo a ser feito, e da enzima a ser avaliada.

#### **3.12.4. Determinação das constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ )**

Para obtenção dos valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  os ensaios de atividade enzimática foram realizados utilizando-se concentrações crescentes dos substratos seringaldazina, ABTS e guaiacol, nas concentrações de 0,005 a 0,05 mmol.L<sup>-1</sup>; 0,025

a  $0,35 \text{ mmol.L}^{-1}$  e  $0,25$  a  $4,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , respectivamente. Os ensaios foram feitos em triplicata e a velocidade de reação expressa em  $\mu\text{mol}$  de substrato oxidado por minuto.

Os cálculos dos valores das constantes foram realizados através da equação de Michaelis-Menten, utilizando-se o programa Curve Expert 1.2.

### **3.12.5. Efeito de íons metálicos e outros compostos na atividade de lacase**

Para estudar o efeito de diversos compostos sobre a atividade das lacases fez-se a pré-incubação das enzimas por 5 minutos com os seguintes compostos:  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NaF}$ , 2-mercaptoetanol, L-cisteína, SDS, EDTA e DMSO. Após o período de incubação acrescentou-se ABTS e transcorridos 5 minutos de reação fez-se a leitura das absorbâncias. Simultaneamente foram feitos controles sem a adição destes compostos e suas atividades foram definidas como tendo o valor de 100%. A fim de descartar uma possível interação os diversos compostos e o substrato utilizado, fez-se um controle contendo tampão, substrato e o composto estudado. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.12.6. Estudo da ação da lacase purificada sobre diferentes substratos**

Medidas espectrofotométricas da oxidação de substratos pela lacase foram realizadas à temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  com diferentes substratos em concentrações que variaram entre  $1$  e  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , em tampão citrato fosfato  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ , exceto para seringaldazina que o procedimento foi semelhante ao ensaio enzimático constante do item 3.6. Utilizou-se para estes ensaios um espectrofotômetro modelo Bio Cary, 50 UV-visible spectrophotometer, Varian.

### **3.13. Determinação da massa molecular**

A determinação da massa molecular das lacases produzidas por *P. sanguineus* foi realizada através de SDS-PAGE conforme descrito no item 3.8., e também através de filtração em gel em uma coluna Sephacryl S-200 (Amershan Pharmacia Biotech), equilibrada com tampão acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 5,0,

contendo  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl. A coluna foi calibrada com as seguintes proteínas padrão (Sigma Chemical Company):  $\beta$ -amilase (200 kDa), Albumina bovina (66 kDa) e Tripsinogênio (24 kDa), sendo seu volume vazio determinado através do Blue Dextran (2000 kDa). A coluna foi eluída com um fluxo de  $20 \text{ mL.h}^{-1}$ , sendo coletadas frações de 1 mL. A massa molecular foi calculada a partir da mobilidade versus massa molecular dos marcadores de proteína.

### 3.14. Imobilização da lacase

A fração de Lac 2 obtida na primeira etapa cromatográfica (item 3.11.1.) foi imobilizada covalentemente em polianilina ativada com glutaraldeído (PANIG). A ativação da polianilina foi feita usando uma solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v) preparada em tampão fosfato  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 6,0, sendo o material mantido sob refluxo por 2 horas (Olsson & Ögren 1989 citado por Fernandes *et al.* 2003). A condição geral de imobilização foi a seguinte: a 0,005 g de PANIG adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  da amostra e 900  $\mu\text{l}$  de tampão acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 5,0 e colocou-se sob “agitação circular” por 20 minutos. Em seguida o material foi centrifugado a 12.000 rpm/15 min para separar o material imobilizado do sobrenadante. O material imobilizado foi então lavado por 3 vezes com 1 mL de tampão acetato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 5,0 e centrifugado a 12.000 rpm/15 min.

A fim de verificar o efeito do tempo neste processo variou-se o tempo de imobilização de 20 a 40 minutos. A influência do pH foi avaliada através da variação do pH entre 3,0 e 8,0 usando tampão acetato de sódio para pHs 3 – 5 e tampão fosfato para pHs 6 – 8. O melhor volume para imobilização foi definido após testes com 40, 100 e 200  $\mu\text{l}$  de amostra, sempre com um volume final de 1 mL de amostra diluída no tampão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Efeito da temperatura no crescimento e na produção de lacase por *P. sanguineus*

Após avaliação diária do crescimento do fungo em placas contendo BDA verificou-se que o melhor crescimento se deu a 37 °C onde toda a placa foi recoberta após 5 dias. A 28 °C o tempo necessário foi de 7 dias para que toda a placa fosse colonizada e a 46 °C foram necessários 8 dias. A temperatura de 55 °C inibiu completamente o crescimento do *P. sanguineus*. Dados semelhantes foram encontrados em meio líquido, onde o melhor crescimento se deu a 37 °C, porém a produção de lacase foi melhor a 28 °C. Estes dados sugerem que não existe uma relação direta entre o crescimento do fungo e a produção de lacase.

### 4.2. Descoloração de corantes

Os corantes azo são geralmente resistentes à degradação por microrganismos aeróbios e sua degradação anaeróbia leva à formação de aminas aromáticas carcinogênicas (Torres *et al.* 2003). Chung e Stevens (1993, citado por Martins *et al.* 2003) afirmaram que o mecanismo oxidativo dos fungos pode evitar a formação de anilinas tóxicas formadas pela clivagem dos corantes feita por outros microrganismos como as bactérias.

Quatro corantes pertencentes ao grupo azo, utilizados na indústria farmacêutica e/ou alimentícia, foram avaliados quanto ao seu efeito no crescimento do fungo *P. sanguineus* e sua capacidade de descoloração. Algumas características destes corantes estão listadas na tabela 3.

Tabela 3. Características dos corantes utilizados no estudo

Corante	FD & C yellow n. 6	Food blue 1	Ponceau 4R	Remazol brilhante laranja
Característica				
Sinônimos	Sunset yellow FCF  Alabaster n. 3	Brilhante blue FCF	New coccine  Food red n. 102  Brilliant scarlet 4R	-
Estrutura molecular	$C_{16}H_{10}N_2O_7S_2$ Na	$C_{37}H_{34}N_2$ $Na_2O_9S_2$	$C_{20}H_{11}N_2$ $Na_3O_{10}S_3$	$C_{20}H_{18}N_3$ $Na_2O_{11}S_3$
Grupo químico	Azo	Azo	Azo	Azo
Cl	15985	42090	16255	
$\lambda_{max}$	480 nm	630 nm	480 nm	494 nm

Comparando-se o crescimento fúngico nas placas contendo corantes com o das placas controle, contendo apenas BDA, concluiu-se que nenhum dos corantes testados inibiu o crescimento de *P. sanguineus*. A observação visual dos halos de descoloramento nas placas mostrou que os quatro corantes azo foram total ou parcialmente descolorados no período de avaliação (Figura 2). Não foi notada adsorção ao micélio para nenhum dos corantes testados, sugerindo que o processo de descoloração está relacionado com uma atividade fúngica.

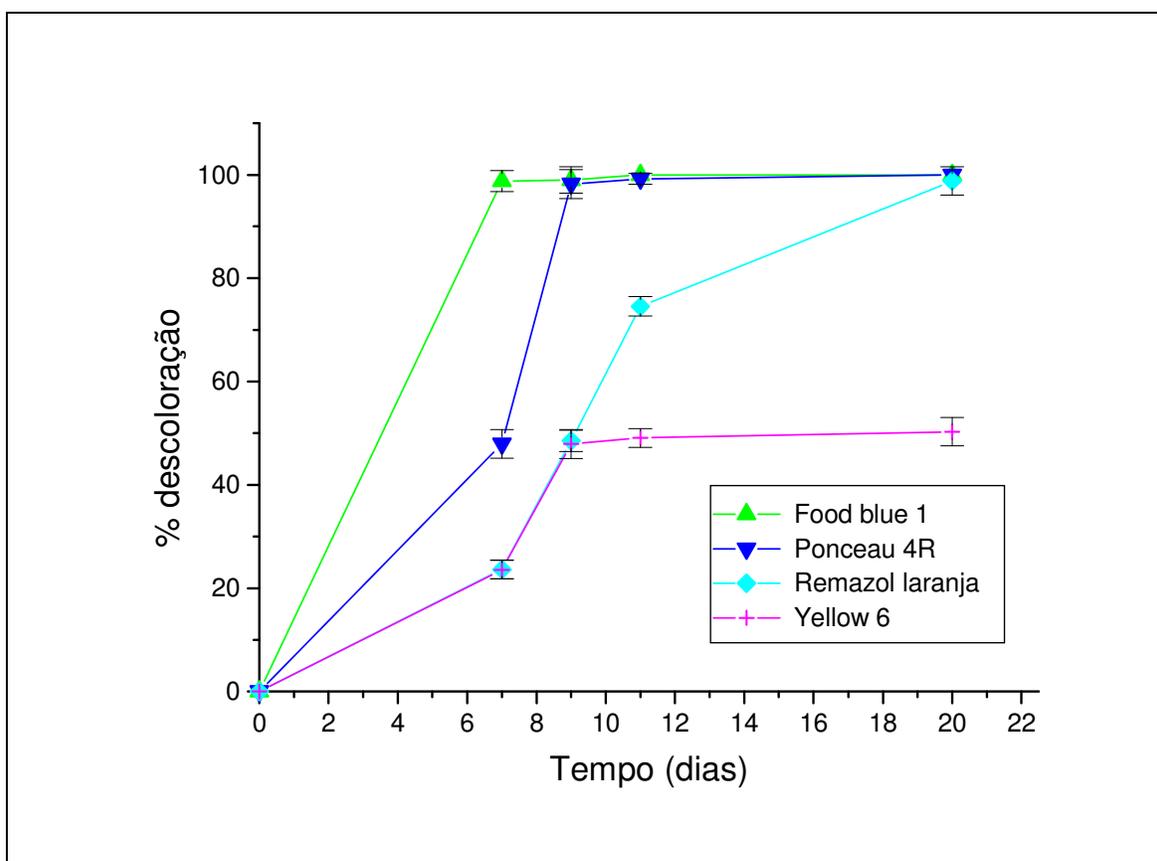


Figura 2. Ação do fungo *P. sanguineus* sobre diferentes corantes utilizados na indústria farmacêutica; teste em placa.

#### 4.3. Produção de lacase por *P. sanguineus*

O crescimento do fungo em meio líquido se deu sob agitação, pois, estudos anteriores mostraram que o crescimento e a produção de lacase por *P. sanguineus* CY788 foi melhor em culturas submetidas à agitação do que naquelas mantidas na condição estática (Pointing *et al.* 2000).

Com o objetivo de determinar o melhor meio de produção de lacase e também o melhor momento de indução, o fungo foi crescido em 4 diferentes meios de cultivo e a 2,5 - xilidina, conhecido indutor de lacase (Eggert *et al.* 1996a), foi adicionada no momento do inóculo ou após 24 horas de crescimento para todos os meios estudados. Após 96 horas de crescimento o material foi filtrado e o sobrenadante foi

avaliado quanto à atividade de lacase (Figura 3). A maior atividade foi obtida quando o *P. sanguineus* foi crescido no meio MPL com a indução ocorrendo no momento do inóculo. Observou-se que a composição do meio influenciou fortemente a produção da lacase e que o momento da indução não seguiu um padrão para todos os meios estudados, devendo ser avaliado para cada meio, o melhor momento para adição do indutor. Farnet e colaboradores (2004) utilizaram um meio de cultivo bastante parecido com MPL, exceto a 2,5 - xilidina, que foi substituída por ácido ferúlico. Lomascolo e colaboradores (2002) utilizaram 2,5-xilidina (100 g/L), Tween 80 (0,1 %) e farelo de milho (0,5 %) para enriquecer o meio de cultivo para *P. sanguineus* G05, obtendo nestas condições apenas a atividade de lacase, e nenhuma atividade de LiP e MnP, concordando com o que foi observado neste trabalho.

O uso de catalase em alguns experimentos para determinação de atividade como descrito no item 3.6. não levou a qualquer alteração nos resultados obtidos sem a adição da mesma, sugerindo desta forma que o extrato bruto produzido pelo *P. sanguineus* nas condições deste estudo não contém peroxidases como LiP e MnP (Mayer & Staples 2002) uma vez que estas enzimas são capazes de atuar sobre os substratos utilizados neste trabalho apenas na presença de peróxido de hidrogênio. Resultado semelhante foi encontrado por Pointing e colaboradores (2000) para *P. sanguineus* CY788, mesmo quando crescido em condições favoráveis à produção de peroxidases por *P. chrysosporium*.

Apesar dos diversos trabalhos existentes sobre lacase, fica difícil uma comparação direta entre os dados da literatura porque vários procedimentos para o ensaio de atividade enzimática têm sido propostos por diferentes grupos de pesquisadores (Ikehata *et al.* 2004), por isso, não foram feitas comparações quanto à produção de lacase do *P. sanguineus* com os dados da literatura.

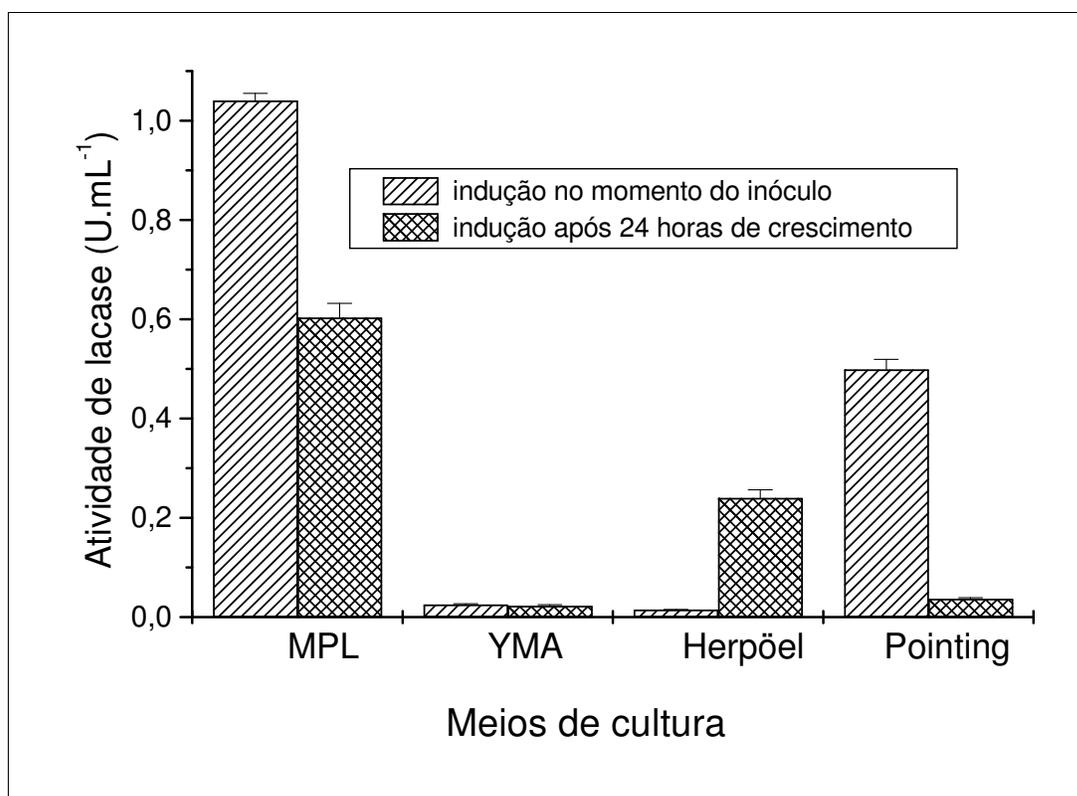


Figura 3. Produção de lacase por *P. sanguineus* em diferentes meios e momentos de indução com 2,5- xilidina, após 96 h de cultivo a 28 °C sob agitação de 150 rpm.

Como o MPL com indução no momento do inóculo mostrou-se o melhor para obtenção da lacase, estudou-se o efeito de seus componentes através de uma avaliação em que cada componente foi adicionado ao composto básico do meio, o extrato de malte - EM (Tabela 4). Este foi o meio de escolha para a produção de lacase para os estudos subseqüentes.

Tabela 4. Efeito dos componentes do MPL na produção de lacase por *P. sanguineus* após 96 de crescimento a 28 °C sob agitação de 150 rpm.

<b>Meio de produção<sup>a</sup></b>	<b>Atividade<sup>b</sup> (U.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Proteína<sup>b</sup> (mg. mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atividade<sup>b</sup> específica (U. mg<sup>-1</sup>)</b>
EM (Extrato de Malte)	0,045 ± 0,002	0,96 ± 0,084	0,047 ± 0,001
EM + CuSO <sub>4</sub>	0,057 ± 0,002	0,39 ± 0,035	0,146 ± 0,003
EM + Tween 80	0,022 ± 0,001	1,29 ± 0,240	0,017 ± 0,001
EM + Tween 80 + CuSO <sub>4</sub>	0,080 ± 0,002	1,38 ± 0,042	0,058 ± 0,001
EM + Tween 80 + CuSO <sub>4</sub> + xilidina (MPL)	1,089 ± 0,013	2,52 ± 0,084	0,432 ± 0,002

<sup>a</sup> EM – 1,25 %; Tween 80 – 0,1 %; CuSO<sub>4</sub> – 0,0005 %; 2,5 – xilidina – 0,4 mmol.L<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> Dados obtidos sobre a amostra previamente dialisada contra água destilada.

Nas condições utilizadas observou-se que a adição somente de CuSO<sub>4</sub> ao EM estimulou fracamente a atividade de lacase e triplicou a atividade específica. Este aumento foi bem inferior aos registrados por Iyer e Chattoo (2003) onde a adição de 0,4 mmol.L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub> aumentou oito vezes a produção da enzima pelo fungo *M. grisea* e por Saparrat e colaboradores (2002a) cujo aumento observado foi de 500 vezes na atividade de lacase de *Corioloripis rigida* na presença de CuSO<sub>4</sub>.

A adição apenas de Tween 80 ao meio contendo somente EM levou a uma diminuição na produção de lacase. Em outro estudo envolvendo a produção de lacase por *P. sanguineus* CY788 (Pointing *et al.* 2000) Tween 80 aumentou em 3 vezes a produção de lacase constitutiva, mas diminuiu a indução da produção de lacase pela 2,5 – xilidina. A combinação de Tween 80 e CuSO<sub>4</sub> resultou em um aumento na produção de lacase e levou a uma atividade específica um pouco maior que a observada somente com EM, porém menor que a obtida pela adição apenas de CuSO<sub>4</sub>. Este resultado está de acordo com os dados obtidos por Stutzenberg (1992), que mostraram um significativo aumento na secreção de proteínas quando utilizaram Tween 80.

A adição de  $400 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de 2,5 - xilidina ao meio contendo  $\text{CuSO}_4$  e Tween 80 resultou em um aumento expressivo na produção de lacase, aumentando cerca de 14 vezes em relação ao mesmo meio sem este indutor. Observou-se também um considerável aumento da atividade específica quando o *P. sanguineus* foi crescido na presença de 2,5 – xilidina. Este efeito indutor foi observado em diversos outros trabalhos com fungos lignolíticos. A adição de 2,5 – xilidina aumentou a atividade de lacase 50 vezes para *P. sanguineus* CY788 (Pointing *et al.* 2000), 9 vezes para *P. cinnabarinus* (Eggert *et al.* 1996b) e 160 vezes para culturas de *T. versicolor* (Fahraeus *et al.* 1958, citado por Leonowicz *et al.* 2001). Vários outros fungos degradadores de lignina como *Fomes annosum*, *Pholiota mutabilis*, *P. ostreatus* (Agematu *et al.* 1993) e *P. radiata* (Rogalski & Leonowicz 1992) também tiveram a produção de lacase aumentada por este composto. Por outro lado, dados da literatura mostram que outros fungos como, por exemplo, *Challara paradoxa* CH 32 (Robles *et al.* 2002) e *P. pulmonarius* (Souza *et al.* 2004), não responderam a indução por 2,5-xilidina.

A menor indução observada neste estudo em relação aos dados relatados por Pointing e colaboradores (2000), para *P. sanguineus* CY788, pode ter sido em função da maior concentração de indutor utilizada, uma vez que o mesmo apresenta efeitos tóxicos para o fungo (Eggert *et al.* 1996b, Pointing *et al.* 2000) ou pela diferença na composição geral do meio de crescimento do fungo que foi mais complexo no trabalho mencionado acima.

No estudo realizado por Esposito e colaboradores (1993), *P. sanguineus* UEC-2050 foi crescido em um meio contendo EM e, contrariamente ao que foi observado neste estudo, eles identificaram atividade de MnP no meio de crescimento. Isto mostra que diferentes linhagens de uma mesma espécie podem apresentar um perfil de proteínas diferenciado, mesmo quando crescido sob as mesmas condições, pois no presente estudo, mesmo quando crescido somente em EM, não foi identificada a presença de peroxidases no meio.

Outro experimento realizado envolvendo a produção de lacase foi a cinética de crescimento do *P. sanguineus* em meio MPL. O extrato bruto produzido pelo fungo *P. sanguineus*, tornou-se pigmentado com o passar do tempo, sendo o aumento da pigmentação de cor alaranjado-avermelhada coincidente com a produção crescente de lacase (Figura 4). Resultados semelhantes foram descritos na produção de lacase por *Tetraploa aristata* (Saparrat *et al.* 2002b) e de *P. coccineus* (Jaouani *et al.* 2005).

Estudos anteriores indicam que a lacase está envolvida no processo de melanização de fungos como, por exemplo, em *G. graminis* var. *tritici* e provavelmente em outras espécies (Edens *et al.* 1999).



Figura 4. Pigmentação do meio de cultivo de *P. sanguineus* crescido em MPL por 24, 48, 72 e 96 horas, a 28 °C sob agitação de 150 rpm.

Os resultados da avaliação da produção de biomassa e atividade de lacase estão representados na figura 5. A atividade foi detectada após 48 horas de cultivo alcançando um pico máximo de atividade em 72 horas, e o aumento da biomassa não resultou em maior atividade de lacase. Dados semelhantes foram encontrados para outros fungos como *M. grisea* (Iyer & Chattoo 2003) e *Cyathus bulleri* (Vasdev *et al.* 2005).

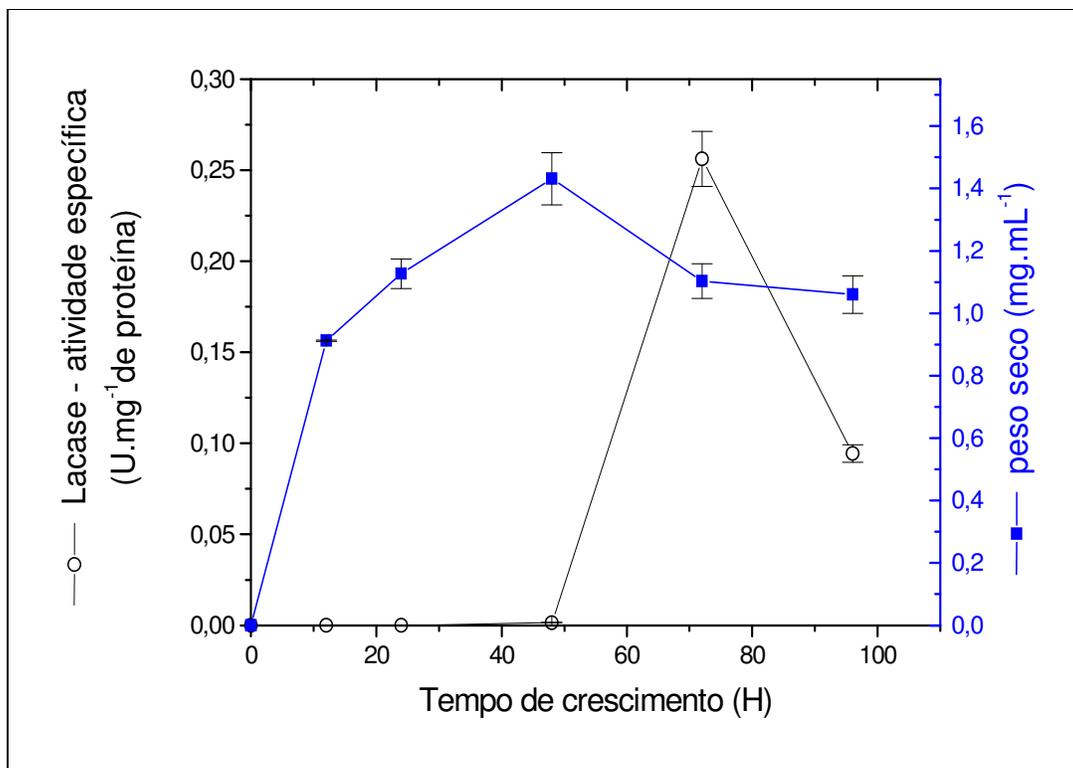


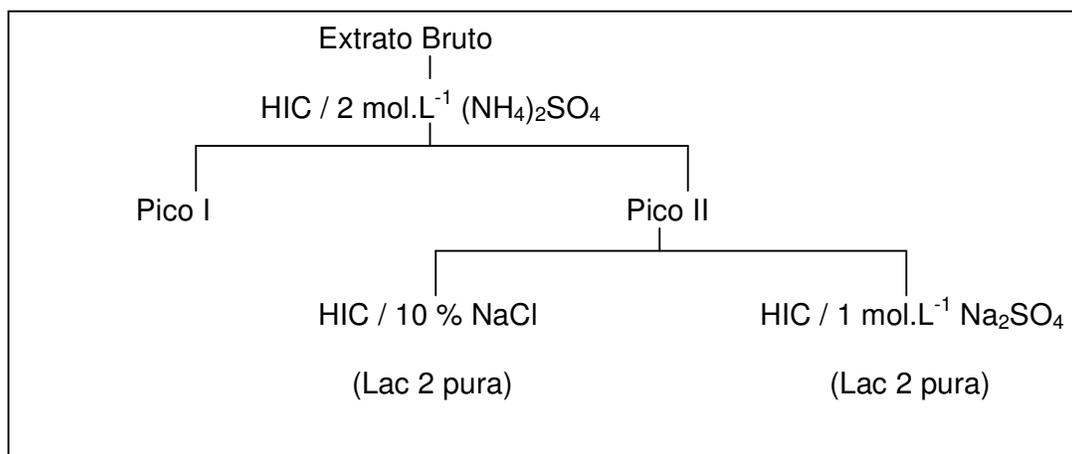
Figura 5. Cinética de crescimento e atividade específica de lacase de *P. sanguineus* a 28 °C sob agitação de 150 rpm.

#### 4.4. Purificação da lacase produzida por *P. sanguineus*

A purificação de enzimas requer o monitoramento de proteínas e atividade enzimática em todas as etapas cromatográficas, o que representa grande trabalho e custo para o estudo de enzimas como a lacase que, em muitos casos, requer várias etapas. Dekker e colaboradores (2000) desenvolveram um método simples e econômico, baseado na técnica de zimograma, para um ensaio rápido de detecção de lacase. Ao longo deste trabalho, diversos processos cromatográficos foram testados até alcançar o grau de pureza desejada, o que resultou em inúmeros ensaios para detecção da lacase. Visando reduzir o custo uma vez que os substratos como ABTS e seringaldazina têm valor elevado, e também minimizar o trabalho, as corridas cromatográficas foram monitoradas a partir de um teste em tubo, com volumes mínimos de cada componente do ensaio e avaliação visual. A partir deste

ensaio qualitativo, as frações nas quais se identificou lacase, bem como as frações próximas a estas foram submetidas ao ensaio enzimático normal, quantitativo.

O processo de purificação desta enzima se deu em duas etapas cromatográficas, ambas de interação hidrofóbica, havendo a variação do sal utilizado para eluição das amostras. A primeira etapa possibilitou a separação de duas isoformas e na etapa seguinte a fração de maior atividade específica foi purificada, havendo duas rotas alternativas para alcançar este objetivo, como mostrado abaixo:



O sobrenadante do meio de cultura do *P. sanguineus* foi coletado após 72 horas de crescimento, dialisado e submetido aos experimentos para purificação. A amostra foi aplicada a uma coluna de interação hidrofóbica equilibrada com tampão acetato de sódio contendo 2 mol.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 6). Durante esta primeira etapa cromatográfica o pigmento escuro presente no extrato bruto foi retido em parte pela resina e o restante eluído após o gradiente. Frações com atividade de lacase eluíram em uma concentração de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entre 0,75 e 0,15 mol.L<sup>-1</sup>, formando dois picos claramente definidos. A primeira fração (Lac 1) foi eluída em uma concentração de 0,75 - 0,50 mol.L<sup>-1</sup> de sal e a segunda fração (Lac 2) de 0,30 - 0,15 mol.L<sup>-1</sup>. A separação dos dois picos de atividade de lacase através de HIC foi possível com a concentração de 2 mol.L<sup>-1</sup> de sal, sendo que, em concentrações mais baixas não foi possível este fracionamento, confirmando assim a importância da força iônica na separação das duas formas de lacase. Resultado semelhante foi observado por Tomaz e Queiroz (1999) no fracionamento de celulases.

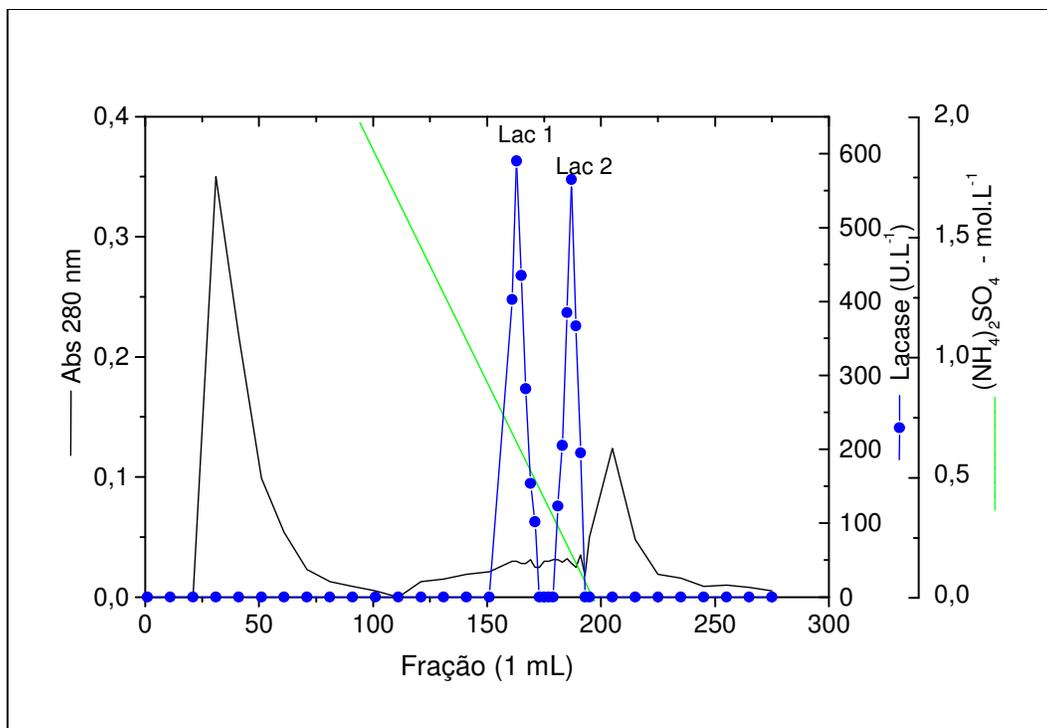


Figura 6. Perfil cromatográfico do sobrenadante da cultura de *P. sanguineus* (23 mg de proteína) aplicado a uma coluna de interação hidrofóbica, Phenyl Sepharose HP tendo como sal eluente o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , fluxo de 2 mL/min. Frações de 1 mL foram coletadas.

O fungo *P. sanguineus* produziu, nas condições deste estudo e durante o crescimento por 72 horas, duas isoenzimas. Através do gel de atividade (Figura 7) observa-se que as duas isoformas apresentam um padrão de migração muito próximo estando por isso representadas no extrato bruto (EB), por uma única banda larga. A produção de várias isoenzimas é característica comum para a maioria das lacase fúngicas descritas na literatura (Leonowicz *et al.* 2001, Mayer & Staples 2002). Em outro estudo sobre produção de lacase por *P. sanguineus* CY788 (Pointing *et al.* 2000) foram detectadas duas isoformas quando o fungo cresceu na presença de glicose e apenas uma quando o meio foi suplementado com substrato lignocelulolítico. No estudo realizado por Lomascolo e colaboradores (2002) uma linhagem de *P. sanguineus* G05 oriunda da China apresentou apenas uma isoforma de lacase, na presença do mesmo indutor utilizado neste trabalho. Outros fungos pertencentes ao gênero *Pycnoporus* também apresentaram somente uma lacase nas

condições estudadas, *P. cinnabarinus* (Eggert *et al.* 1996b) e *P. coccineus* (Jaouani *et al.* 2005).

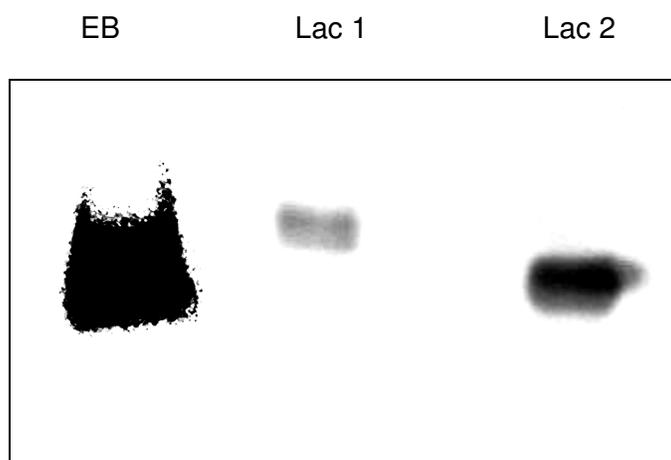


Figura 7. Gel de atividade corado com ABTS: Extrato bruto (EB - 0,3  $\mu\text{g}$  de proteínas); Lac 1 ( 0,5  $\mu\text{g}$  de proteínas); Lac 2 ( 0,3  $\mu\text{g}$  de proteínas).

Observa-se através da figura 7 que a enzima Lac 1 tem menor afinidade para ABTS que Lac 2 pois, apesar da maior quantidade de proteína aplicada no gel ela cora-se menos intensamente que Lac 2.

O material correspondente ao segundo pico (Lac 2) obtido na primeira etapa cromatográfica foi aplicado novamente na mesma coluna de interação hidrofóbica, alterando o sal eluente para  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  1  $\text{mol.L}^{-1}$ . Houve um pico único com atividade enzimática que eluiu em uma concentração de sal entre 0,30 - 0,18  $\text{mol.L}^{-1}$ , correspondendo à fração de lacase pura denominada Lac 2 (Figura 8).

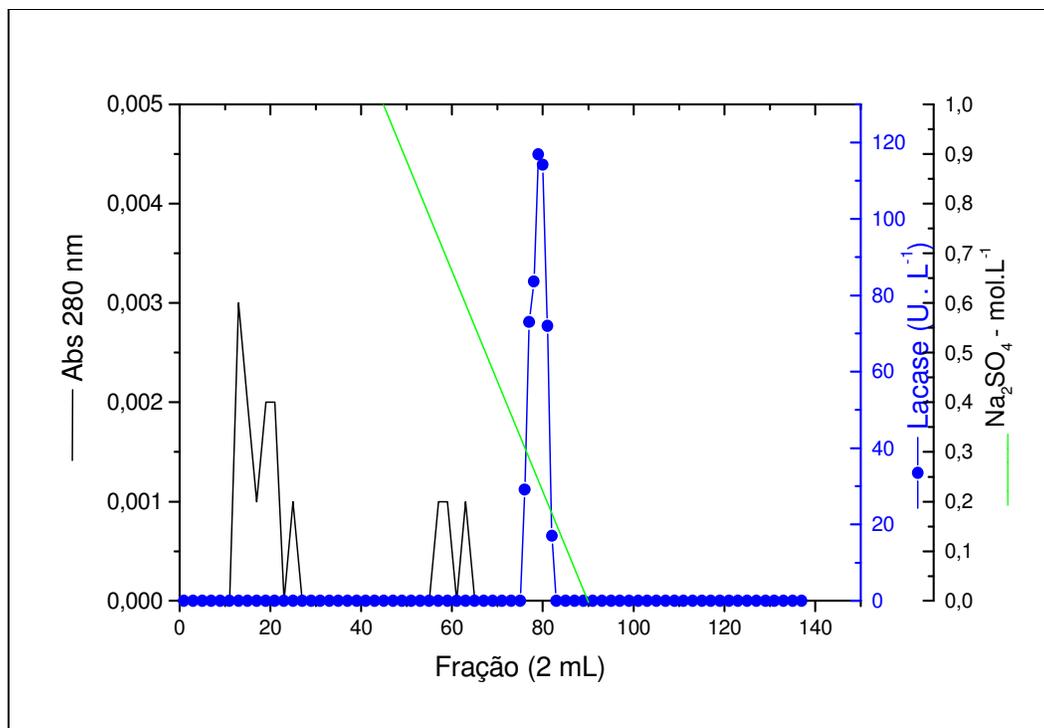


Figura 8. Perfil cromatográfico da fração Lac 2 obtida na primeira etapa cromatográfica (aproximadamente 0,15 mg de proteína), aplicada a uma coluna de interação hidrofóbica, Phenyl Sepharose HP tendo como sal eluente o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , fluxo de 2 mL/min. Frações de 2 mL foram coletadas.

Outro procedimento cromatográfico que também resultou na purificação da enzima Lac 2 foi substituir, na segunda etapa, o sal da fase móvel de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para  $\text{NaCl}$ . Nesta última opção a enzima não se ligou à matriz, sendo eluída imediatamente após o início da passagem do tampão contendo 10 % de  $\text{NaCl}$  (Figura 9).

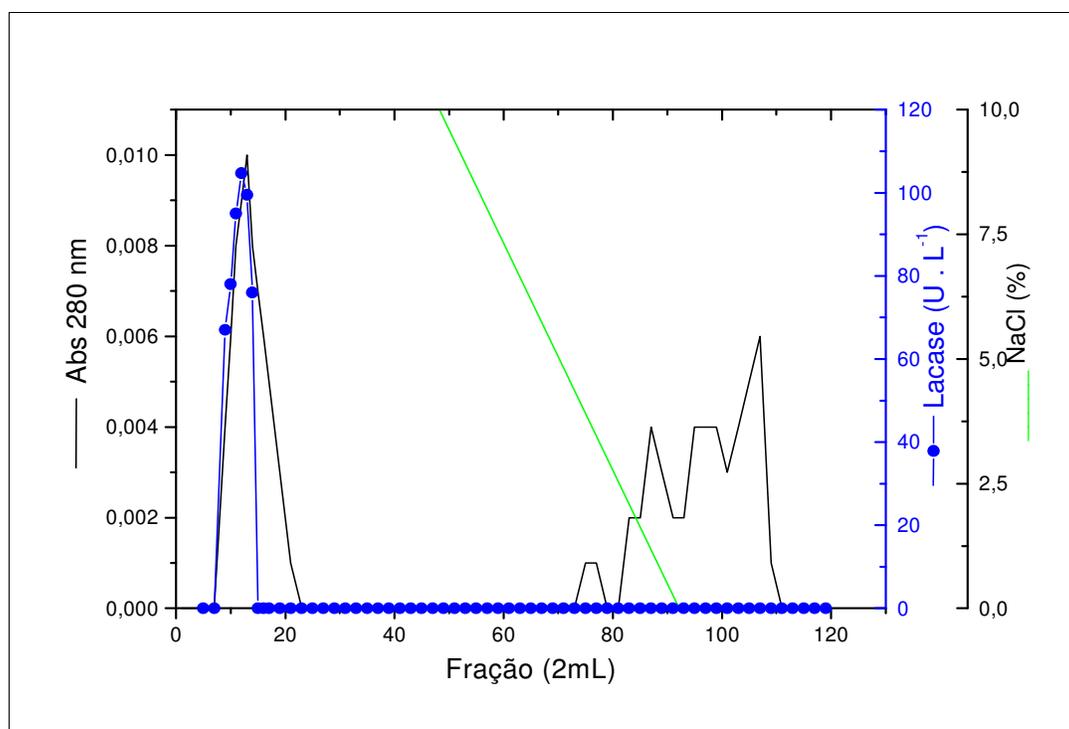


Figura 9. Perfil cromatográfico da fração Lac 2 obtida na primeira etapa cromatográfica (aproximadamente 0,018 mg), aplicada a uma coluna de interação hidrofóbica, Phenyl Sepharose HP tendo como sal eluente o NaCl, fluxo de 2 mL/min. Frações de 2 mL foram coletadas.

A retenção e seletividade de proteínas em HIC são dependentes da natureza química do sal utilizado para promover a ligação (Oscarsson & Kårsnäs 1998) e, durante a segunda etapa para purificação da lacase de *P. sanguineus* este efeito foi observado ao utilizar NaCl, que tem baixa habilidade para favorecer interações hidrofóbicas ou  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  que promove uma alta retenção de enzimas, uma vez que este está no início da série liotrópica. Apesar de ambos os procedimentos resultarem praticamente no mesmo grau de pureza, o uso de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  promoveu um rendimento melhor sendo por isso adotado para obtenção da Lac 2. Utilizando este procedimento de purificação obteve-se um rendimento de 13,9 %, com um fator de purificação de 54,1 e atividade específica de  $20 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  (Tabela 5). A enzima purificada migrou como uma única banda em SDS-PAGE (Figura 10).

Tabela 5. Resumo das etapas de purificação da lacase Lac 2 produzida por *P. sanguineus* induzida por 2,5 – xilidina.

Etapa	Volume <sup>a</sup> (mL)	Proteína (mg. mL <sup>-1</sup> )	Atividade (U. mL <sup>-1</sup> )	Atividade específica (U. mg <sup>-1</sup> )	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	10	2,3	0,86	0,37	1	100
Phenyl Sephrose (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	0,029	0,27	9,3	25,1	31,4
Phenyl Sephrose Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3	0,006	0,12	20	54,1	13,9

<sup>a</sup> volume aplicado a uma coluna

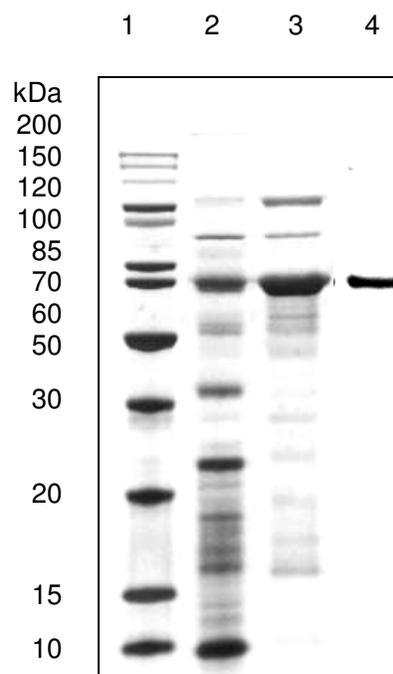


Figura 10. Eletroforese em gel de poli-acrilamida (12 %), sob condições desnaturantes, de amostras de *P. sanguineus*. Amostras – colunas: 1 – marcadores de massa molecular; 2 – extrato bruto (3 µg de proteínas); 3 – eluato da 1ª coluna de interação hidrofóbica (frações correspondentes à Lac 2) (0,8 µg de proteínas); 4 – eluato da 2ª coluna de interação hidrofóbica – Lac 2 (0,4 µg de proteínas). Coloração com nitrato de prata.

## 4.5. Caracterização

A caracterização de Lac 1 foi feita com a enzima parcialmente purificada enquanto que para Lac 2 utilizou-se a enzima purificada.

### 4.5.1. Massa molecular

A massa molecular das duas isoenzimas foi determinada por filtração em gel (Figura 11) e por SDS-PAGE (Figura 12). Os valores encontrados foram de 79,7 e 72,8 kDa para Lac1 e de 68,1 e 69,0 kDa para a Lac 2, utilizando filtração em gel e SDS-PAGE, respectivamente. Os valores de massa molecular encontrados para as enzimas desnaturadas e não desnaturadas são próximos indicando a natureza monomérica destas duas enzimas. A massa molecular das lacases de *P. sanguineus* foi consistente com os valores da maioria das lacases fúngicas descritas na literatura, que variam entre 60 e 80 kDa (Thurston 1994). Pointing e colaboradores (2000) através de análise em gel de atividade detectaram 2 isoformas de lacase com massa molecular de aproximadamente 65 kDa, quando *P. sanguineus* CY788 foi cultivado na presença de glicose. Outro trabalho descrito por Lomascolo e colaboradores (2002) obtiveram para *P. sanguineus* G05 uma isoforma de aproximadamente 70 kDa (SDS-PAGE).

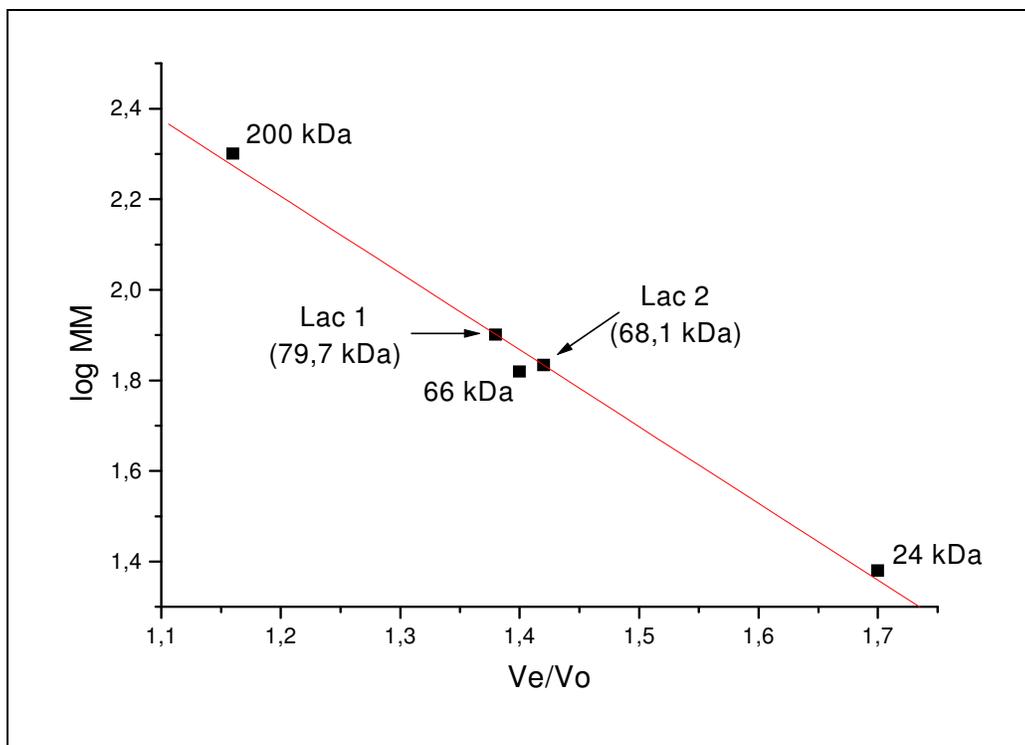


Figura 11. Determinação da massa molecular de Lac 1 e Lac 2 por meio de cromatografia de filtração em gel em coluna Sephacryl S-200. Massa molecular dos marcadores utilizados: 200 kDa, 66 kDa e 24 kDa.  $V_e$  – volume de eluição da proteína;  $V_o$  – volume vazio da coluna.

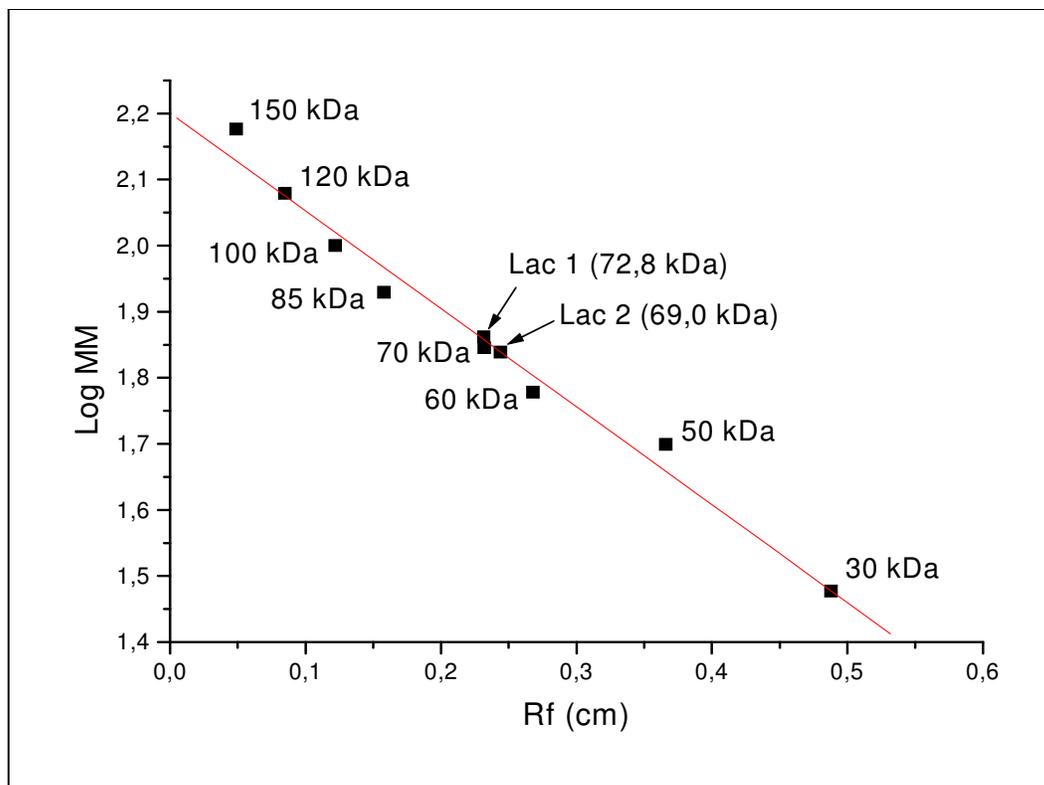


Figura 12. Determinação da massa molecular das enzimas Lac 1 e Lac 2 por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (12 %) sob condições desnaturantes, corado com nitrato de prata. Massa molecular dos marcadores utilizados: 150 kDa; 120 kDa; 100 kDa; 85 kDa; 70 kDa; 60 kDa; 50 kDa; 30 kDa. Rf – razão entre a distância percorrida pela proteína e o tamanho do gel.

#### 4.5.2. Análise espectrofotométrica da lacase purificada

Apesar da lacase purificada de *P. sanguineus* não apresentar coloração azul, típica para a maioria das lacases fúngicas, inclusive a de *P. cinnabarinus* (Eggert *et al.* 1996b), seu espectro de absorção ultravioleta-visível mostrou os picos de absorção característicos para lacase: a 280 e 620 nm e um ombro próximo a 330 nm (Figura13). O pico próximo a 600 nm é típico para o cobre tipo 1 enquanto que o “shoulder” próximo a 330 nm sugere a presença do par de cobre tipo 3 bi nuclear (Eggert *et al.* 1996b). O aumento da absorbância próximo a 600 nm mostrou-se mais difuso que a maioria dos espectros apresentados na literatura, mas isto não indica

ausência do cobre tipo 1 pois, segundo Baldrian (2004a), a ausência deste pico na região espectral azul pode ser devido ao baixo coeficiente de extinção para o cobre tipo 1 localizado na proteína. A lacase estudada por Baldrian (2004a) foi de *Daedalea quercina* que não apresentou o pico de absorbância a 600 nm, assim como o relatado por Edens e colaboradores (1999) para lacase de *G. graminis* que, apesar de não exibir o característico pico de absorção próximo a 600 nm teve a presença do cobre tipo 1 confirmada através de outra técnica, “inductively coupled plasma spectroscopy” e de estudo da seqüência de genes. Dong & Zang (2004) também relataram a ausência dos dois picos característicos no espectro das duas lacases de *T. gallica*, embora as mesmas tivessem apresentado 3,86 moléculas de cobre por molécula de proteína e uma fraca coloração azul. Segundo Chefetz e colaboradores (1998) a lacase de *Chaetomiun thermophilium* também teve um pico de absorbância muito pequeno a 604 nm.

Outro dado que reforça a presença do cobre tipo 1 na enzima Lac 2 é a razão das absorbâncias 280/610 nm. A enzima Lac 2 teve uma razão igual a 20, resultado semelhante ao encontrado por DAS e colaboradores (2001) para a isoforma L<sub>2</sub> de *P. florida*, e muito próximo ao encontrado por Schneider e colaboradores (1999) e por Xiao e colaboradores (2004), ambos com o valor de 21. Esta razão é tipicamente 15 – 20 para lacases azuis e reflete o balanço entre a absorbância do cobre tipo 1 a 610 nm e a combinação das absorbâncias de triptofano e resíduos de aminoácidos aromáticos da proteína a 280 nm (Malkin *et al.* 1969, citado por Leontievsky *et al.* 1997).

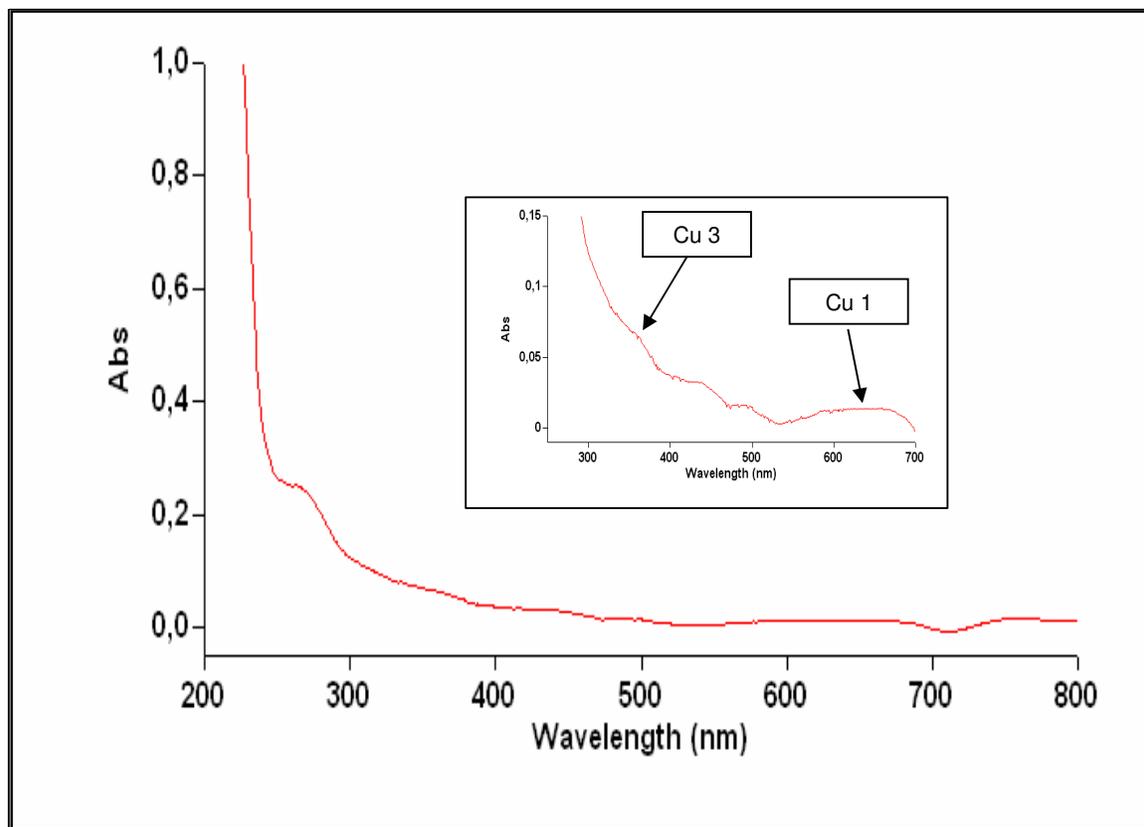


Figura 13. Espectro de absorção na região visível-ultravioleta da Lac 2 de *P. sanguineus* (0,064 mg). Em destaque o mesmo espectro com menor escala para mostrar os característicos picos de absorção para lacase.

#### 4.5.3. Efeito do pH na atividade da lacase

A avaliação da influência do pH na atividade das lacases de *P. sanguineus* foi verificada em tampão glicina/HCl e citrato-fosfato na faixa de 2,0 a 7,0. Utilizando como substrato a seringaldazina o pH ótimo foi de 4,8 para Lac 1 e 4,2 para Lac 2 (Figura 14). Lac 1 apresentou uma pequena mudança na taxa de oxidação da seringaldazina entre pH 4,2 e 5,0. Esta enzima manteve praticamente 90 % de sua atividade máxima neste intervalo de pH, ocorrendo um decréscimo da atividade imediatamente abaixo ou acima destes pHs. Para Lac 2 a faixa ótima de atividade encontrada foi entre pH 4,0 e 4,6 nos quais apresentou respectivamente 80 e 88 % da

atividade máxima. Segundo Fukushima e Kirk (1995), é freqüente ocorrer diferenças no pH ótimo de isoenzimas de lacase produzida pelo mesmo organismo.

A faixa de pH em que as duas enzimas estudadas apresentaram boa atividade foi estreita, assemelhando-se ao perfil observado para lacase de um fungo da família Chaetomiaceae (Saito *et al.* 2003). A maioria das lacases descritas apresenta pH ótimo maior que os apresentados por Lac 1 e Lac 2 para oxidação da seringaldazina (Schneider *et al.* 1999, Robles *et al.* 2002, Hakala *et al.* 2005), mas os resultados observados para lacases do *P. sanguineus*, principalmente Lac 2, são muito próximos aos observados para *P. cinnabarinus* (Record *et al.* 2002) e *Cerrena maxima* (Koroleva *et al.* 2001).

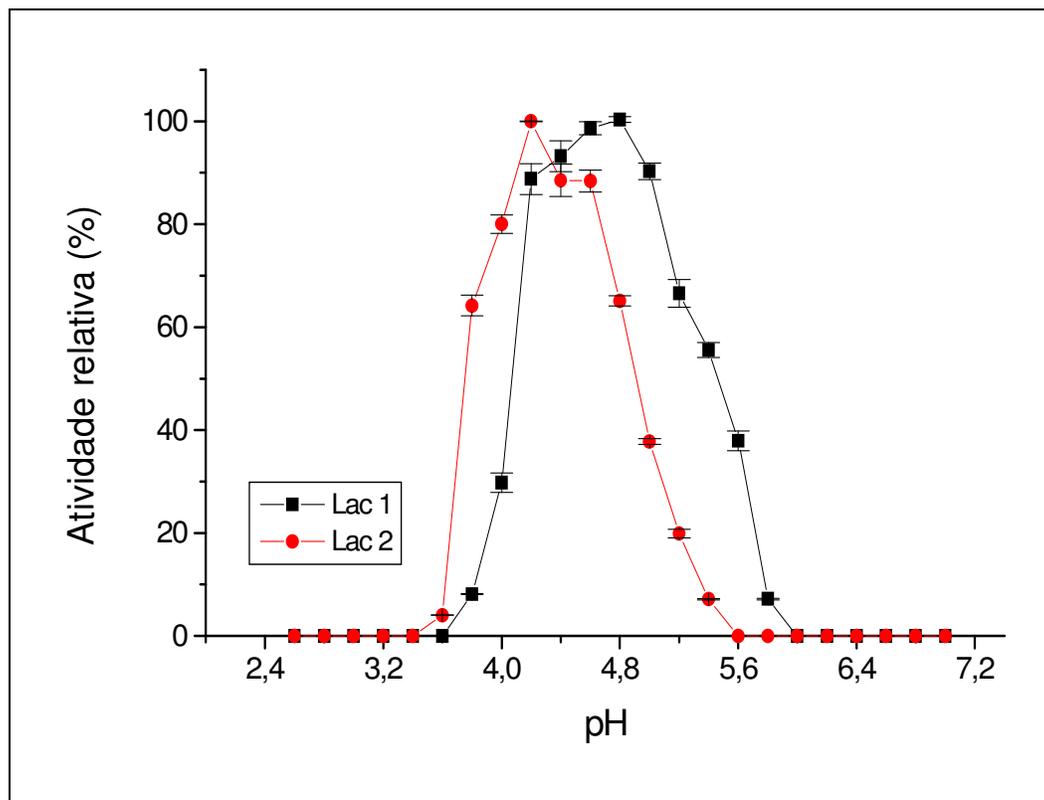


Figura 14. Efeito do pH na atividade de Lac 1 e Lac 2 de *P. sanguineus* utilizando seringaldazina como substrato.

Para a enzima Lac 2 estudou-se também a influência do pH utilizando ABTS e guaiacol como substratos, variando o pH de 2,0 a 7,0 (Figura 15). Esta enzima

apresentou um pH ótimo de 3,2 para ABTS, de 4,2 para seringaldazina e de 4,4 para guaiacol.

Os valores descritos para este parâmetro são bastante variáveis, mas como outras lacases fúngicas, o pH ótimo para oxidação de ABTS encontrou-se em uma faixa de pH mais ácida que para outros substratos (Das *et al.* 2001; Souza & Peralta 2003; Farnet *et al.* 2004). O pH ótimo para ABTS foi muito próximo ao obtido por Pointing e colaboradores (2000) para *P. sanguineus* CY788 (3,0), por Jaouani e colaboradores (2005) para *P. coccineus* (3,5), por Nagai e colaboradores (2003) para *L. edodes* (3,0) e por Kiiskinen e Fischer (2002) para lacase de *M. albomyces* (3,5). As lacases de *T. gallica* apresentaram pH ótimo ainda mais ácido do que os de Lac 2 para ABTS (2,2).

O pH ótimo para oxidação do guaiacol foi próximo ao apresentado por várias lacases de diferentes fungos como a lacase de *P. cinnabarinus* (Eggert *et al.* 1996b) com pH ótimo de 4,0 e a de *Trametes* sp. (Xiao *et al.* 2003) de 4,5 para este substrato. Por outro lado os resultados aqui obtidos estão bem abaixo dos relatados por outros trabalhos (Schneider *et al.* 1999, Kiiskinen *et al.* 2002, Robles *et al.* 2002), indicando que há uma grande diferença entre as lacases fúngicas, na oxidação dos diferentes substratos.

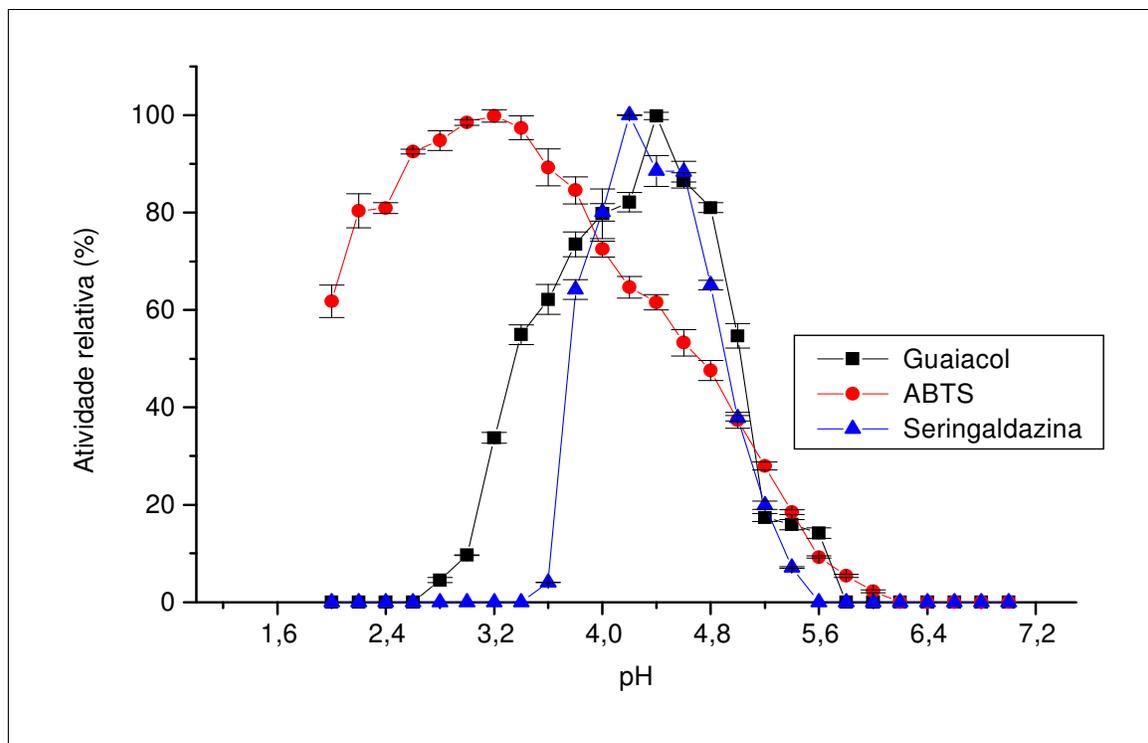


Figura 15. Influência do pH na atividade da Lac 2 de *P. sanguineus* utilizando diferentes substratos.

Segundo Xu (1997) e Kiiskinen e colaboradores (2002), a diferença no pH ótimo para ABTS e substratos fenólicos é típica para lacases e reflete a diferença no mecanismo de oxidação dependendo do substrato. O formato de sino para curva de pH é típico para oxidação de compostos fenólicos, como foi observado para guaiacol e seringaldazina (Xu 1997). Para ABTS a curva obtida foi “monotônica”, ou seja, aquela em que a velocidade de reação diminui com o aumento do pH o que, segundo Galhaup e colaboradores (2002), é característico para substratos não fenólicos. Diferentemente da oxidação de compostos fenólicos em que há a formação de quinonas, a oxidação do ABTS não é dependente de pH em uma faixa de 2 a 11 e a mesma processo em uma única etapa, resultando no radical (ABTS + •) (Hüning *et al.* 1964 citado por Johannes & Majcherczyk 2000).

Observa-se que Lac 2 praticamente não apresentou atividade em pH acima de 6 com nenhum dos três substratos testados, coincidindo com o observado para lacase de *Mauginiella* sp. (Palonen *et al.* 2003).

#### 4.5.4. Efeito da temperatura na atividade da lacase

A temperatura ótima de Lac 1 foi de 25-30 °C (Figura 16), coincidindo com a da lacase de *Challara paradoxa* CH 32 (Robles *et al.* 2002) e de *M. grisea* (Iyer & Chattoo 2003). Esta enzima exibiu um bom nível de atividade em temperaturas baixas (20 e 35 °C), como a lacase de *T. versicolor* e UD4 (Jodaan & Leukes, 2003).

A temperatura ótima de Lac 2 foi de 50 °C, próxima ou igual à encontrada para várias outras lacases fúngicas como, por exemplo, de *Aspergillus nidulans* (Scherer & Fischer 1998), L<sub>2</sub> de *P. florida* (DAS *et al.* 2001), de *Trametes pubescens* (Galhaup *et al.* 2002), Lac 2 de *P. pulmonarius* (Souza & Peralta 2003), Lac A de *Trametes* sp. (Xiao *et al.* 2003). Para o gênero *Pycnoporus* a melhor temperatura foi ainda superior para *P. cinnabarinus* (65 – 70 °C) e *P. coccineus* (60 °C) (Record *et al.* 2002 e Jaouani *et al.* 2005).

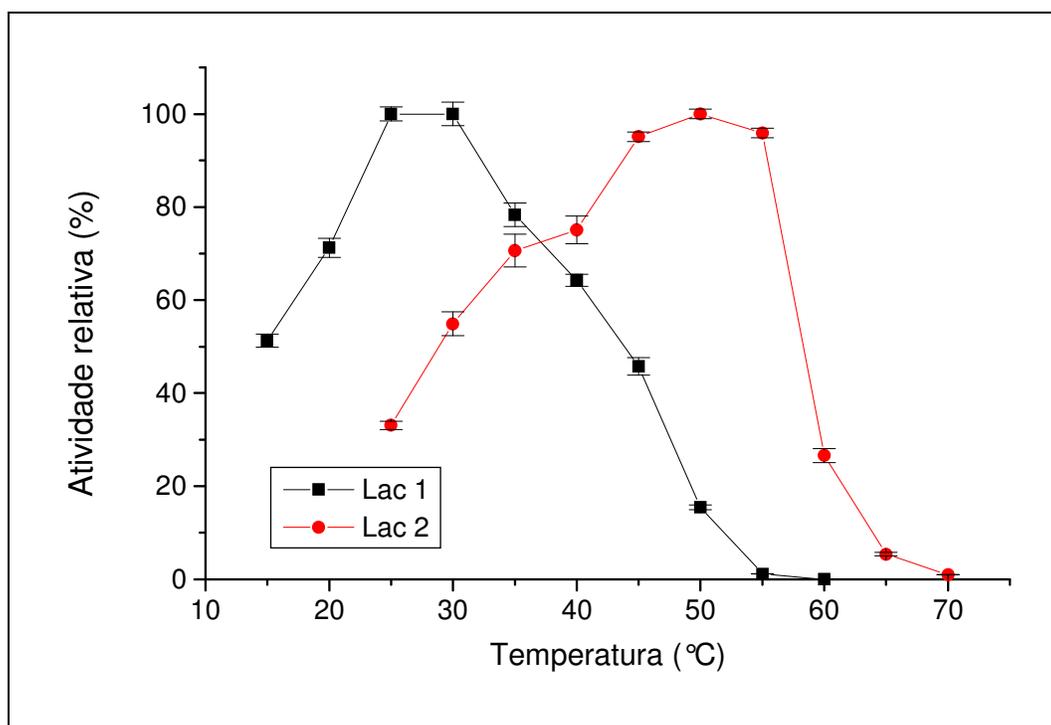


Figura 16. Influência da temperatura na atividade das lacases produzidas por *P. sanguineus*.

#### 4.5.5. Efeito da temperatura na estabilidade térmica da lacase

A influência da temperatura na estabilidade das lacases em estudo foi verificada após pré-incubação da enzima por um período variável de 15 minutos a 48 horas em temperaturas que variaram entre 15 e 80 °C conforme demonstrado nas figuras 17 a 20.

Os resultados apresentados mostram claramente que a enzima purificada Lac 2 apresenta uma estabilidade térmica bem superior a Lac 1, mas, comparando com os dados da literatura constata-se que Lac 1 foi um pouco mais estável que a lacase de *P. sanguineus* CY788 (Pointing *et al.* 2000). Enquanto a lacase estudada por Pointing e colaboradores (2000) apresentou uma perda rápida de atividade quando incubada por períodos relativamente curtos de tempo em temperaturas acima de 35 °C, quando mantida a 30 °C por um período de 2 horas, Lac 1 manteve praticamente 100 % da atividade inicial e conservou mais que 70 % da atividade mesmo quando mantida por 60 minutos a 50 °C (Figura 16). Apesar de apresentar a mesma temperatura ótima que a lacase de *M. grisea* (Iyer & Chattoo 2003), Lac 1 foi mais estável, apresentando uma atividade residual de 71 % após incubação a 50 °C por 1 hora contra aproximadamente 55 % da lacase de *M. grisea*. A inativação completa de Lac 1 se deu quando a mesma foi incubada por 2 horas em temperatura superior a 70 °C enquanto que para lacase de *M. grisea* esta inativação se deu após 1 hora de incubação em temperatura superior a 60 °C.

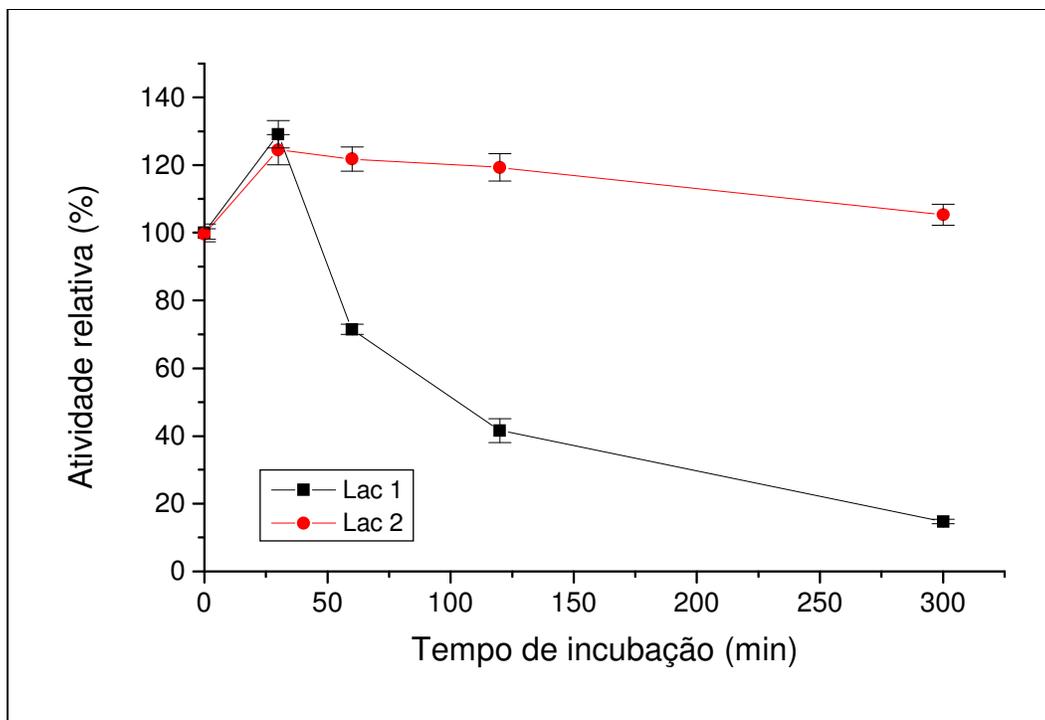


Figura 17. Termostabilidade de Lac 1 e Lac 2 após pré-incubação a 50 °C por 5 horas.

Os resultados obtidos por Lomascolo e colaboradores (2002) estão mais próximos aos observados para Lac 2 no que se refere à estabilidade térmica, mostrando-se esta ainda um pouco mais estável uma vez que a lacase de *P. sanguineus* G05 por eles estudada foi quase completamente inativada quando pré-incubada a 80 °C por 80 minutos enquanto que Lac 2 ainda manteve aproximadamente 10 % da atividade inicial quando mantida nestas mesmas condições (Figura 18). Após 60 minutos nesta mesma temperatura Lac 2 ainda manteve 20 % de atividade, mostrando-se mais termostável que a lacase de *P. coccineus* (Jaouani *et al.* 2005) que foi quase totalmente inativada e a de *P. cinnabarinus* (Eggert *et al.* 1996b) que foi completamente inativada nestas condições. Quando pré-incubada a 50 °C por 8 horas a lacase de *P. coccineus* (Jaouani *et al.* 2005) manteve aproximadamente 60 % da atividade inicial enquanto que Lac 2 não apresentou qualquer redução de atividade no mesmo período (Figura 19).

Alta termostabilidade não é uma característica muito comum para lacases fúngicas (Kiiskinen *et al.* 2002), apesar de serem comparativamente mais

termoestáveis que LiP e MnP (Sigoillot *et al.* 1999), mas após 24 e 48 horas de incubação a 50 °C a enzima Lac 2 ainda conservou respectivamente 93% e 76 % de sua atividade inicial (Figura 19), mostrando uma termoestabilidade ainda maior que a mencionada para lacase dos fungos termofílicos *C. thermophilum* (Chefetz *et al.* 1998) e *M. albomyces* (Kiiskinen *et al.* 2002) que apresentaram nesta temperatura  $t_{1/2}$  de 12 h e 50 h respectivamente. Enzimas apresentando boa termoestabilidade apresentam potencial aplicação em processos que requerem agitação mecânica ou para o tratamento de efluentes aquecidos como os gerados por indústrias têxteis, por exemplo (Dias *et al.* 2003, Jodaan & Leukes 2003).

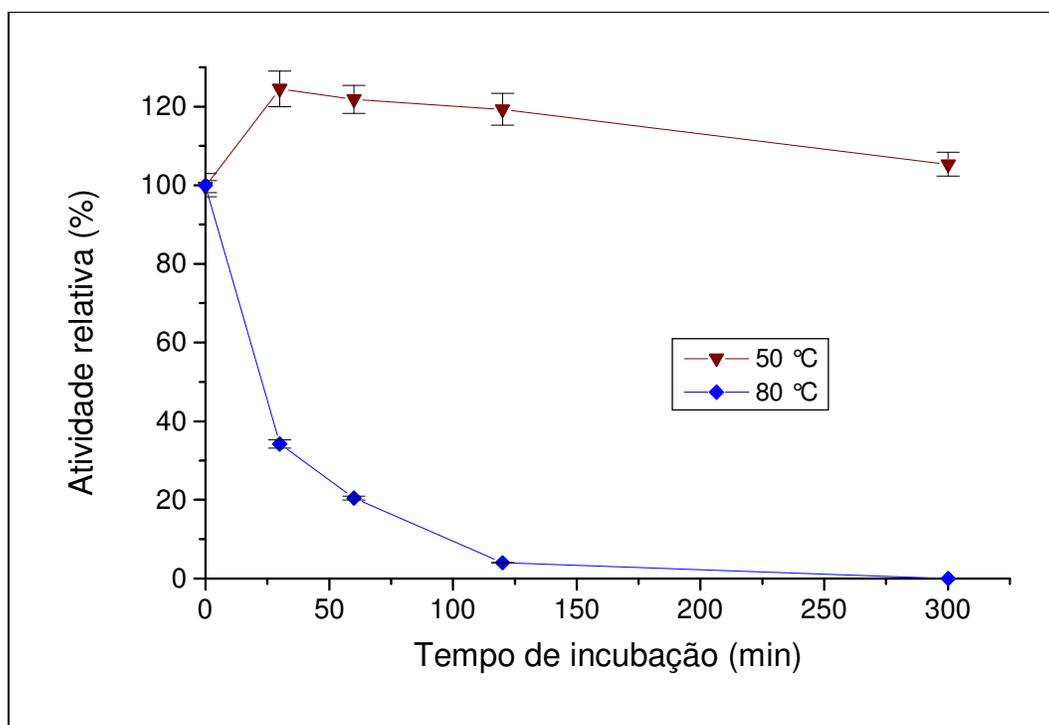


Figura 18. Termoestabilidade de Lac 2 após pré-incubação a 50 e 80 °C por 5 horas.

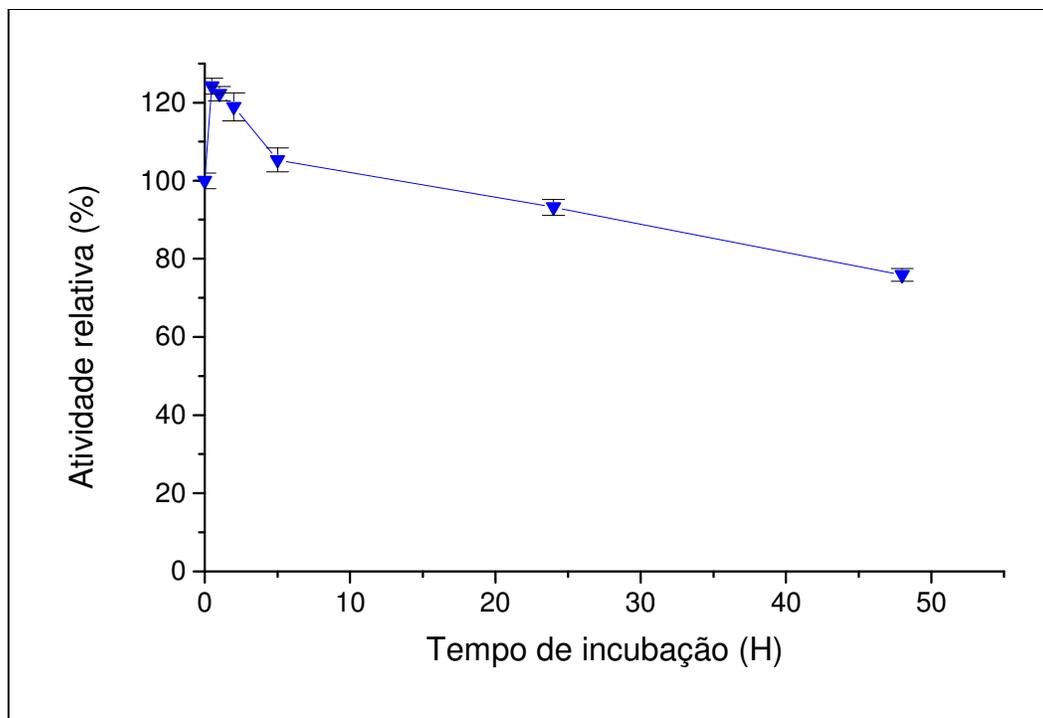


Figura 19. Termostabilidade de Lac 2 de *P. sanguineus* após pré-incubação a 50 °C por 48 horas.

Outro estudo relacionado à estabilidade térmica consistiu de pré-incubar as enzimas Lac 1 e Lac 2 por 2 horas em diferentes temperaturas (Figura 20). Quando mantida a 60 °C por 2 horas, Lac 2 ainda conservou 80 % de sua atividade enquanto Lac 1 apenas 20 %. A 70 °C neste mesmo tempo de incubação Lac 2 ainda apresentava quase 40 % de atividade e Lac 1 já havia sido totalmente inativada. Lacase de *P. cinnabarinus* foi inativada a 80 °C em 1 hora (Eggert *et al.* 1996b) enquanto que Lac 2, ainda apresentava 20 % de atividade, sendo inativada após mais de 2 horas a 80 °C. Após 20 minutos de incubação a 80 °C Lac 2 ainda apresentou 50 % de sua atividade inicial enquanto que para *T. pubescens* (Galhaup *et al.* 2002)  $t_{1/2}$  foi de 3,7 minutos a 70 °C, para *Peniophora* sp  $t_{1/2}$  foi de 15 minutos a 70 °C (Niku-Paavola *et al.* 2004) e para *D. quercina*  $t_{1/2}$  a 65 °C foi de 28 minutos em pH 5,0 e de 6 minutos em pH 3,0 (Baldrian 2004a). A lacase de *Marasmius quercophilus* (Dedeyan *et al.* 2000) foi totalmente inativada dentro de 15 minutos na temperatura de 80 a 90 °C.

Outra característica interessante foi a ativação térmica observada para Lac 2 que apresentou maior atividade quando incubada por 2 horas a 50 °C. Também a incubação em temperaturas mais altas resultou em atividade mais alta para lacase de *Phellinus ribis* (Min *et al.* 2001), de *M. albomyces* (Kiiskinen *et al.* 2002) e de *T. pubescens* (Galhaup *et al.* 2002). Esta ativação térmica pode ser decorrente de mudanças estruturais, desdobramentos que podem estar resultando em maior exposição do sítio ativo da enzima ou ainda porque o aumento de temperatura pode estar promovendo o desligamento de compostos que estejam “bloqueando ou dificultando” o acesso ao sítio ativo da enzima. Este fenômeno não foi observado em outros estudos com fungos do gênero *Pycnoporus*.

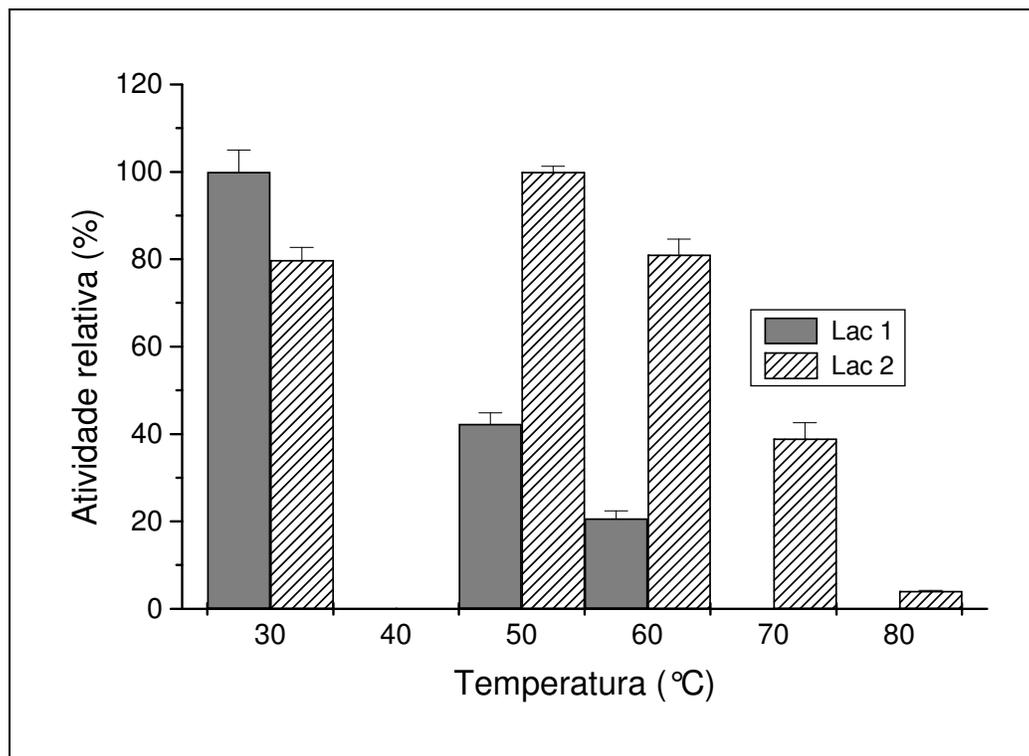


Figura 20. Termoestabilidade de Lac 1 e Lac 2 de *P. sanguineus* após pré-incubação por 2 horas a 30, 50, 60, 70 e 80 °C.

Segundo Pointing e colaboradores (2000), a lacase de *P. sanguineus* CY788 foi muito estável a 4 °C, não sofrendo perda significativa de atividade por mais que 8 horas nesta temperatura. A enzima Lac 2 de *P. sanguineus* aqui estudada foi capaz

de ser armazenada nesta temperatura por um tempo bem maior que a lacase mencionada acima, não apresentando perda significativa de atividade após 1 semana e quando mantida por 8 semanas nestas condições, ainda apresentou mais que 80 % da atividade inicial.

Diante dos resultados envolvendo temperatura acima apresentados, pode-se concluir que Lac 2 é estável até 70 °C, por um período de 120 minutos, e bastante estável quando mantida a 50 °C, mostrando-se assim maior termoestabilidade que várias outras lacases já descritas na literatura.

#### 4.5.6. Determinação de $K_m$ e $V_{max}$

O efeito da concentração de seringaldazina na velocidade de oxidação deste substrato pelas enzimas Lac 1 e Lac 2 foi determinado conforme exposto nas figuras 21 e 22 respectivamente, enquanto que as figuras 23 e 24 mostram o efeito da concentração de ABTS e guaiacol para Lac 2. As concentrações de seringaldazina, ABTS e guaiacol variaram de 0,005 a 0,05 mmol.L<sup>-1</sup>; 0,025 a 0,35 mmol.L<sup>-1</sup> e 0,25 a 4,5 mmol.L<sup>-1</sup> respectivamente. Os ensaios foram feitos a 25 – 30 °C, no pH ótimo previamente estabelecido para cada substrato. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  estimados pelo método de regressão não linear, através da equação de Michaelis-Menten foram respectivamente 10,3 µmol.L<sup>-1</sup> e 151,3 µmol de substrato oxidado . min<sup>-1</sup> para Lac 1, utilizando como substrato a seringaldazina e os resultados para Lac 2 estão dispostos na tabela 6.

Os valores de  $K_m$  para seringaldazina de ambas as lacases de *P. sanguineus* são próximos ao encontrado para lacase do fungo da família Chaetomiaceae (9 µM) (Saito *et al.* 2003), e mais baixo que de outras lacases como por exemplo de *Rigidoporus lignosus* (40 µmol.L<sup>-1</sup>) (Cambria *et al.* 2000), *Coriolus hirsutus* (142,7 µmol.L<sup>-1</sup>) (Shin & Lee 2000), *P. pulmonarius* (12 µmol.L<sup>-1</sup>) (Souza & Peralta 2003) e *D. quercina* (131 µmol.L<sup>-1</sup>) (Baldrian 2004a), mas no entanto é mais alto que os valores obtidos para lacase de *T. pubescens* (6,0 µmol.L<sup>-1</sup>) (Galhaup *et al.* 2002) e de *M. quercophilus* (4,2 µmol.L<sup>-1</sup>) (Farnet *et al.* 2004).

A enzima Lac 2 apresentou uma menor afinidade quando se utilizou ABTS como substrato (58,01 µmol.L<sup>-1</sup>), que a lacase de *P. coccineus* (36 µmol.L<sup>-1</sup>) (Jaouani *et al.* 2005) e resultado praticamente igual ao observado para *P.*

*cinnabarinus* ( $55 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (Record *et al.* 2002). A afinidade de Lac 2 para o guaiacol foi um pouco menor que a observada para *P. cinnabarinus* que apresentou um  $K_m$  de  $330 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Schliephacke *et al.* 2000). Valores de  $K_m$  bem mais altos ( $800 - 900 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) têm sido descritos para outras lacases fúngicas (Kiiskinen *et al.* 2002 e 2004) para este substrato.

Tabela 6. Constantes cinéticas de Lac 2 na oxidação de diferentes substratos.

	$K_m$ ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\mu \text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$V_{\text{max}}/K_m$
Seringaldazina	8,3	194,9	23,4
ABTS	58,0	238,4	4,1
Guaiacol	369,6	14,7	0,04

A ordem de afinidade para Lac 2 frente aos três substratos utilizados estão de acordo com a observada em diversos outros estudos, seringaldazina > ABTS >> guaiacol (Chefetz *et al.* 1998; Souza & Peralta 2003; Kiiskinen *et al.* 2004; Xiao *et al.* 2004). A enzima Lac 2, apresentou maior afinidade e eficiência ( $V_{\text{max}}/K_m$ ) com seringaldazina e maior atividade ( $V_{\text{max}}$ ) com ABTS. Guaiacol, um fenol monometoxilado, foi o substrato que apresentou os piores resultados. A maior atividade para oxidação do ABTS tem sido relatada para muitas lacases fúngicas. Segundo Eggert e colaboradores (1996b) lacase de *P. cinnabarinus* e de *C. hirsutus* apresentaram mais alta atividade com ABTS que com guaiacol, o mesmo ocorrendo com lacase de *Trichophyton rubrum* (Jung *et al.* 2002). Lacase de *M. albomyces*, de forma semelhante à observada para Lac 2, foi mais ativa contra ABTS, seguido por seringaldazina, 2,6-DMP e por último guaiacol (Kiiskinen *et al.* 2002).

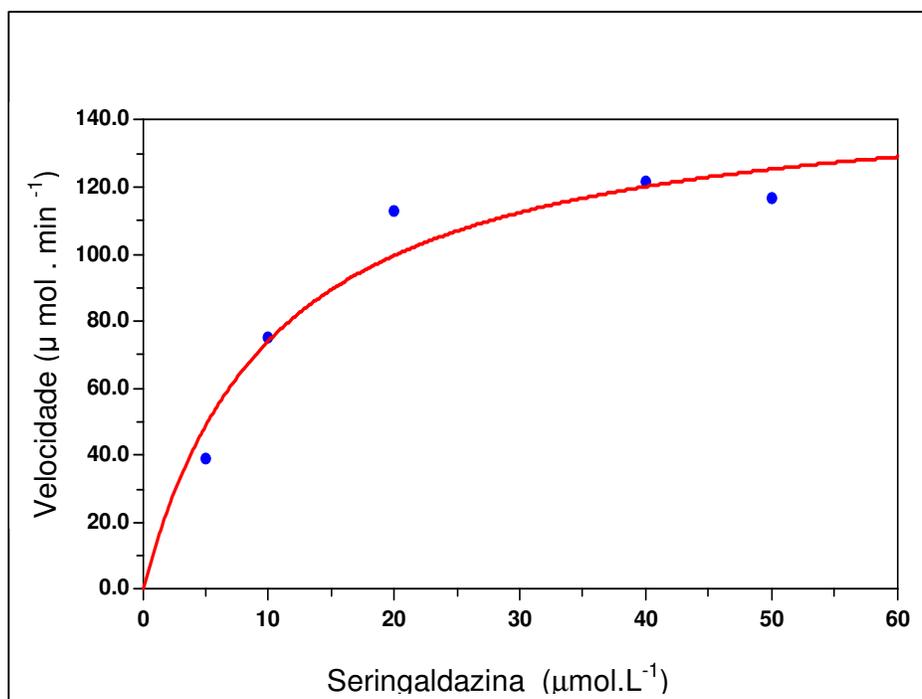


Figura 21. Determinação das constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{max}$ , da Lac 1 de *P. sanguineus* na oxidação de seringaldazina.

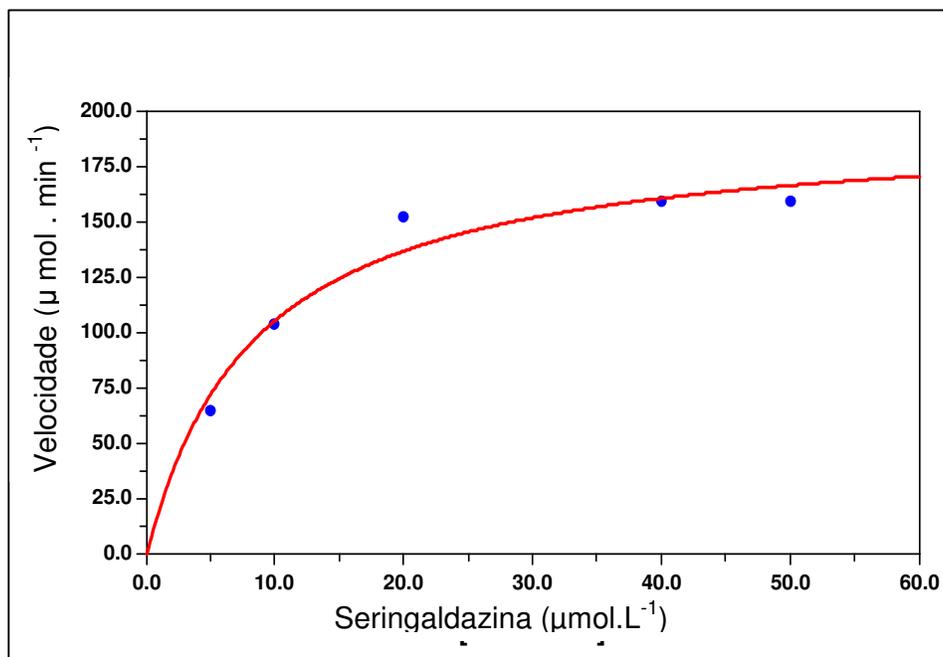


Figura 22. Determinação das constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{max}$ , da Lac 2 de *P. sanguineus* na oxidação de seringaldazina.

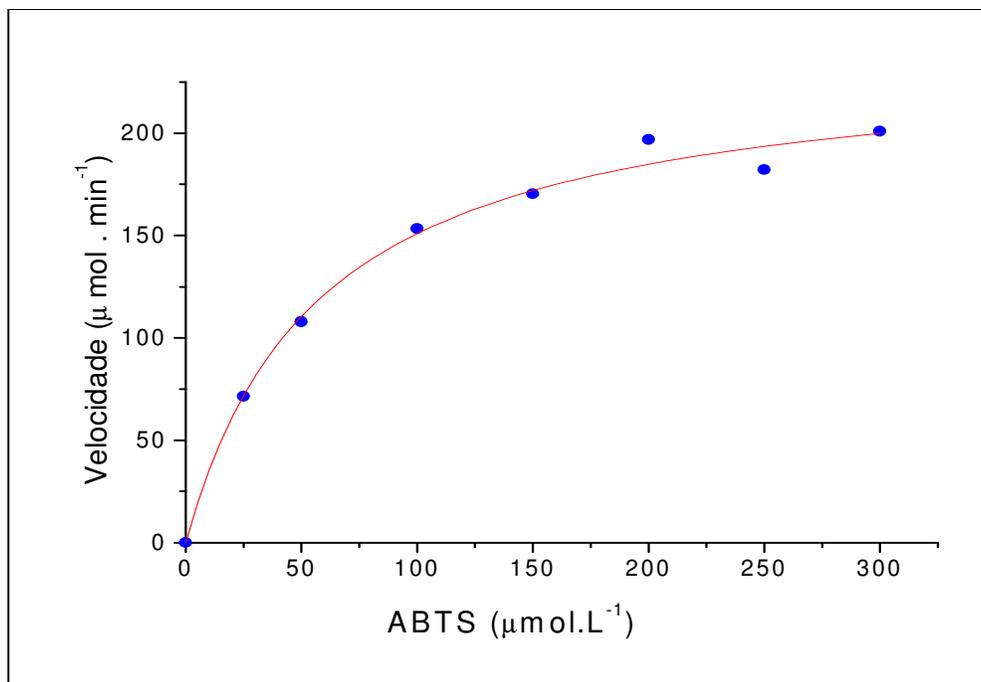


Figura 23. Determinação das constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{max}$ , da Lac 2 de *P. sanguineus* na oxidação de ABTS.

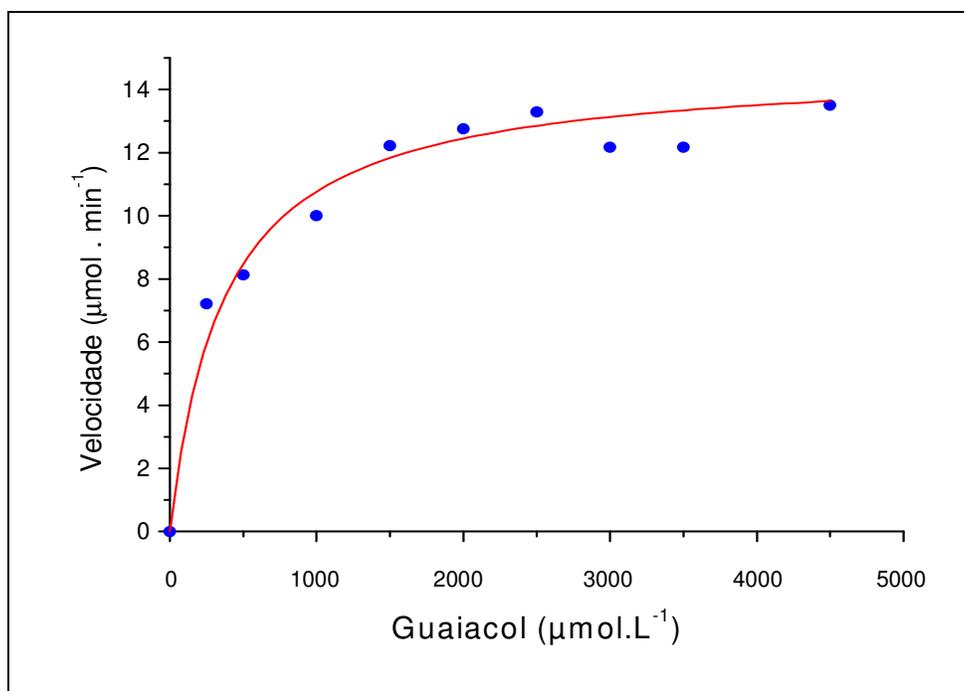


Figura 24. Determinação das constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{max}$ , da Lac 2 de *P. sanguineus* na oxidação de guaiacol.

#### 4.5.7. Especificidade por substratos

A especificidade por substratos da enzima Lac 2 foi avaliada através da mudança no espectro de absorção dos diferentes substratos utilizados. A oxidação foi detectada pela formação de produtos com picos de absorbância nos comprimentos de onda específicos (Figura 25). Atuação sobre uma ampla gama de substratos é característica comum às lacases fúngicas (Thurston 1994, Galhaup *et al.* 2002) e, concordando com esta afirmação, Lac 2 de *P. sanguineus* oxidou vários compostos incluindo mono-metoxifenóis (guaiacol), dimetoxifenóis (2,6-DMP, seringaldazina), ABTS, e amina aromática (o-dianisidina). A enzima Lac 2 não foi capaz de atuar sobre a tirosina, substrato específico para tirosinase comprovando que a enzima purificada não pertence ao grupo de tirosinase (Kiiskinen *et al.* 2002, Robles *et al.* 2002). Não houve também oxidação do fenol, vanilina e ácido gálico. Em trabalhos semelhantes, a oxidação do fenol e da tirosina também não foi observada (Robles *et al.* 2002, Saparrat *et al.* 2002a, Vasdev *et al.* 2005).

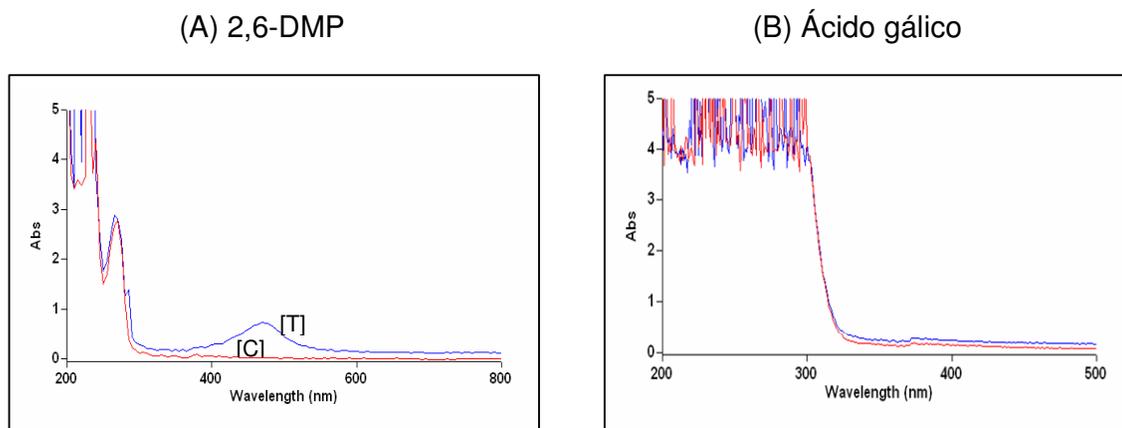
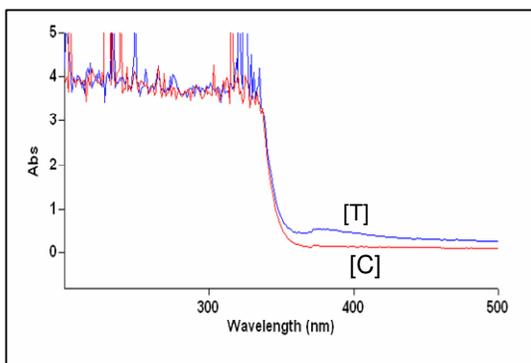
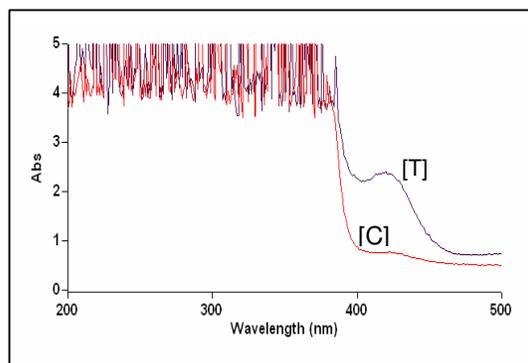


Figura 25. Espectros de absorção na região ultravioleta-visível de diferentes compostos fenólicos, mostrando o efeito da enzima Lac 2 de *P. sanguineus* em diferentes substratos - (A) 2,6 - DMP; (B) Ácido gálico; (C) O-dianisidina; (D) ABTS; (E) Vanilina; (F) Seringaldazina; (G) Fenol; (H) Tirosina; (I) Guaiacol. [T] Teste; [C] Controle.

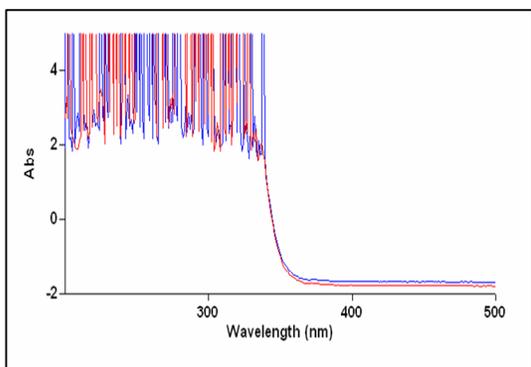
(C) O-dianisidina



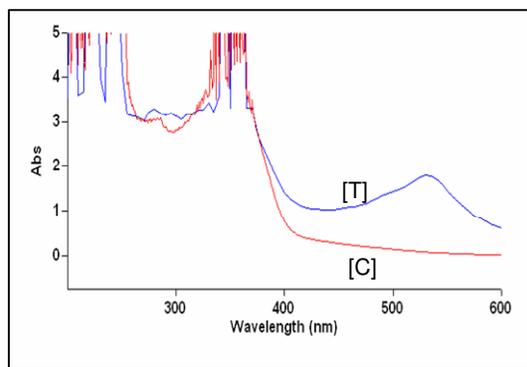
(D) ABTS



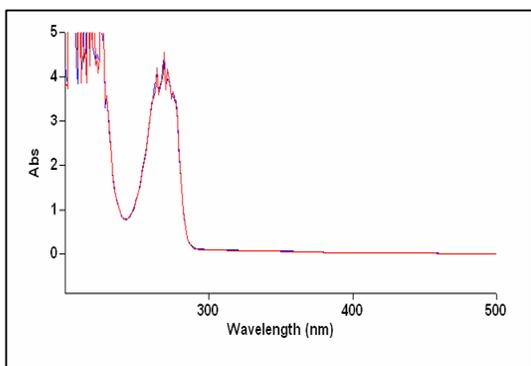
(E) Vanilina



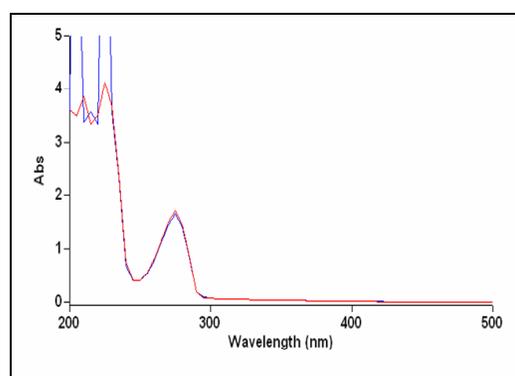
(F) Seringaldazina



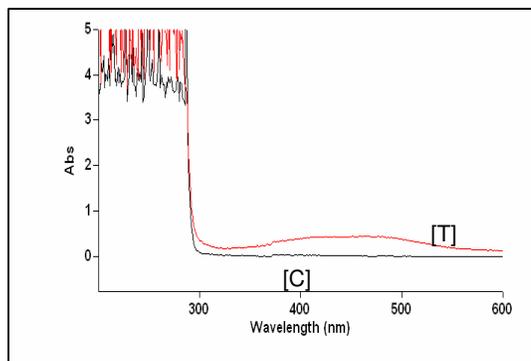
(G) Fenol



(H) Tirosina



## (I) Guaiacol



#### 4.5.8. Efeito de íons metálicos e outros compostos na atividade de lacase

Para estudar o efeito de diversos compostos na atividade de Lac 1 e Lac 2 o substrato utilizado foi o ABTS e os resultados estão demonstrados na tabela 7.

Tabela 7. Efeito de diferentes compostos sobre a atividade de lacases produzidas por *P. sanguineus*.

Compostos <sup>a</sup> (concentração final)	Lac 1		Lac 2	
	Atividade residual (%)	Inibição (%)	Atividade residual (%)	Inibição (%)
Nenhum (controle )	100	0	100	0
NaF ..... 0,01 mmol.L <sup>-1</sup>	99	1	89	11
NaF ..... 0,1 mmol.L <sup>-1</sup>	68	32	47	53
HgCl <sub>2</sub> ..... 0,1 mmol.L <sup>-1</sup>	92	8,0	100	0
HgCl <sub>2</sub> .....1,0 mmol.L <sup>-1</sup>	70	30	88	12
HgCl <sub>2</sub> ..... 5,0 mmol.L <sup>-1</sup>	13	87	54	46
2-mercaptoetanol...1,0 mmol.L <sup>-1</sup>	1	99	7	93
CuSO <sub>4</sub> .....1,0 mmol.L <sup>-1</sup>	112	0	100	0
CuSO <sub>4</sub> .....10 mmol.L <sup>-1</sup>	101	0	80	20
NaN <sub>3</sub> ..... 0,001 mmol.L <sup>-1</sup>	72	28	69	31
NaN <sub>3</sub> ..... 0,01 mmol.L <sup>-1</sup>	15	85	23	77

L-cisteína ..... 0,01 mmol.L <sup>-1</sup>	103	0	91	9
L-cisteína ..... 0,1 mmol.L <sup>-1</sup>	103	0	96	4
L-cisteína ..... 1,0 mmol.L <sup>-1</sup>	0	100	2	98
SDS ..... 1,0 mmol.L <sup>-1</sup>	100	0	99	1
SDS ..... 5,0 mmol.L <sup>-1</sup>	93	7	83	17
EDTA ..... 10 mmol.L <sup>-1</sup>	77	23	90	10
EDTA ..... 25 mmol.L <sup>-1</sup>	66	34	78	22
DMSO ..... 10 mmol.L <sup>-1</sup>	102	0	100	0
DMSO ..... 25 mmol.L <sup>-1</sup>	95	5	97	3

<sup>a</sup> Todos os agentes/compostos foram preparados em água destilada; o tempo de incubação prévia do composto com a enzima foi de 5 minutos.

Por tratar-se de uma enzima contendo metal em seu sítio ativo, dois agentes quelantes foram testados, EDTA e azida sódica (NaN<sub>3</sub>). As lacases de *P. sanguineus* foram apenas parcialmente inibidas pelo EDTA mesmo em concentrações bastante elevadas (25 mmol.L<sup>-1</sup>), diferindo do ocorrido para lacase de *P. coccineus* (Jaouani *et al.* 2005) e de *C. paradoxa* (Robles *et al.* 2002) que foram totalmente ou quase que totalmente inibidas por 5 mmol.L<sup>-1</sup> de EDTA. Resultado contrário foi observado para lacase do fungo da família Chaetomiaceae (Saito *et al.* 2003) que não sofreu inibição quando exposto a uma concentração de 25 mM do quelante. A azida sódica, na concentração de 0,01 mM inibiu fortemente a atividade de ambas as lacases, sendo esta inibição observada para várias outras lacases, inclusive a de *P. cinnabarinus* (Eggert *et al.* 1996b) e de *P. coccineus* (Jaouani *et al.* 2005) que foram completamente inibidas com 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> deste composto. Inibição por azida sódica é comum em enzimas contendo cobre porque ela pode se ligar aos cobres tipo 2 e 3, resultando daí uma interrupção da transferência interna de elétrons e inibição da atividade (Gianfreda *et al.* 1999). De modo geral a inibição da enzima por quelantes de metal como azida sódica e EDTA sugerem que há pelo menos um metal necessário para atividade enzimática (Edens *et al.* 1999).

Mais específica foi a inibição causada pelo NaF sobre as duas enzimas em estudo. Segundo Xu (1996), esta inibição é típica para lacases, sendo explicada pela interação do fluoreto com os átomos de cobre tipos 1 e 2. Scherer & Fischer (1998) relataram a inibição da lacase II de *Aspergillus nidulans* por NaF, o mesmo ocorrendo

para lacase de *M. albomyces* (Kiiskinen *et al.* 2002) e de *Trichophyton rubrum* LKY-7 (Jung *et al.* 2002).

O efeito do íon  $\text{Cu}^{++}$  foi avaliado através da adição de  $\text{CuSO}_4$  à amostra e mostrou resultados distintos para as duas lacases. Na concentração de  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  praticamente não houve alteração da atividade de ambas as enzimas, mas a presença de  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  inibiu parcialmente a atividade de Lac 2 enquanto Lac 1 manteve 100 % de atividade. O resultado encontrado concorda com o obtido para lacase extracelular de *L. edodes* (Nagai *et al.* 2002).

Outro íon que teve seu efeito avaliado foi o  $\text{Hg}^{++}$ . O efeito observado sobre as lacases estudadas diferiu do encontrado para a maioria das lacases fúngicas que são fortemente inibidas por baixas concentrações deste íon (Robles *et al.* 2002; Souza & Peralta 2003). Concentração de  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  inibiu fortemente a atividade de Lac 1 (87 %) e consideravelmente a de Lac 2 (46 %). Mais resistente à presença do  $\text{Hg}^{++}$  foi a lacase de *D. quercina* que, mesmo na presença de  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  do composto, ainda apresentou 7 % da atividade controle (Baldrian 2004a). A inibição por este íon sugere a presença de grupos tióis essenciais para atividade da enzima.

Agentes redutores como 2-mercaptoetanol e L-cisteína na concentração de  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  inibiram fortemente as lacases em estudo, concordando com outros trabalhos (Eggert *et al.* 1996b, Robles *et al.* 2002; Saito *et al.* 2003). A lacase de *P. coccineus* (Jaouani *et al.* 2005) mostrou-se bem mais resistente à L-cisteína, tendo uma inibição de 87 % na presença de  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  do composto. A inibição por agentes redutores é coerente com a afirmativa da presença de cisteína como um aminoácido essencial do sítio ativo de lacases fúngicas (Thurston 1994).

A presença de SDS inibiu fracamente a atividade de Lac 1 e Lac 2, diferindo do resultado encontrado para *P. pulmonarius* (80 % de inibição com  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  SDS) (Souza & Peralta 2003) e *C. paradoxa* CH 32 (Robles *et al.* 2002) onde 0,1 % ( $\sim 5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) inibiu totalmente atividade inicial. Por outro lado, as lacases de *M. quercophilus* não sofreram qualquer inibição por este composto (Farnet *et al.* 2004).

Reações enzimáticas em solventes orgânicos têm ganhado importância nos últimos anos principalmente por aumentar o acesso a substratos insolúveis (Mistein *et al.* 1989, Luterek *et al.* 1998, Robles *et al.* 2002) por isso incluiu-se neste experimento o DMSO, solvente utilizado, por exemplo, na solubilização de seringaldazina (Xiao *et al.* 2003). De modo semelhante ao relatado para lacases A e B de *Trametes* sp AH28-

2 (Xiao *et al.* 2003 e 2004), pouca inibição foi observada para as lacases de *P. sanguineus*, mesmo em altas concentrações do solvente (25 mmol.L<sup>-1</sup>).

#### 4.6. Imobilização da enzima Lac 2

Iniciou-se um estudo para imobilização da enzima Lac 2 em PANIG (polianilina ativada com glutaraldeído), sendo definido inicialmente as melhores condições de tempo, pH e volume da enzima a ser imobilizada (Tabela 8). Os ensaios de atividade envolvendo os experimentos de imobilização foram realizados todos com ABTS. Não foi possível utilizar a seringaldazina nestes experimentos devido à incompatibilidade do substrato com o suporte uma vez que compostos fenólicos metoxilados são adsorvidos pela PANI (Fernandes, 2000). Os dados apresentados na tabela 8 mostram que a enzima Lac 2 foi imobilizada de imediato na PANIG, tendo praticamente a mesma atividade após 20 ou 30 minutos de contato com o suporte; o melhor pH para imobilização foi 5,0 – 6,0, sendo necessário um volume de 100 µL da solução enzimática avaliada para a melhor imobilização.

Tabela 8. Variáveis para otimização da condição de imobilização de Lac 2 em PANIG

Parâmetro	Atividade relativa (%) <sup>a</sup>
Tempo de imobilização	
20 min	100
30 min	95
40 min	83
pH	
3,0	26
4,0	77
5,0	100
6,0	98
7,0	94
8,0	72
Volume de Lac 2	
40 µL	32
100 µL	100
200 µL	79

<sup>a</sup> considerou-se a maior atividade como 100 % para cada parâmetro avaliado; a 0,005 g de PANIG adicionou-se a enzima Lac 2 diluída em tampão até um volume final de 1 mL.

## 5. CONCLUSÃO

- ❖ Os resultados obtidos para degradação de corantes são promissores;
- ❖ Nas condições do estudo detectou-se a presença de duas isoenzimas com valores de massa molecular próximos e propriedades bioquímicas distintas;
- ❖ As isoenzimas Lac 1 e Lac 2 foram inibidas por típicos inibidores de lacase;
- ❖ Lac 2 tem características bioquímicas e espectrofotométricas de uma “lacase verdadeira”;
- ❖ Lac 2 tem estabilidade térmica elevada, comparada a outras lacases fúngicas;
- ❖ A otimização da produção e purificação de Lac 2, somada à sua termoestabilidade, sugerem que esta enzima possa ter aplicações biotecnológicas importantes.

## 6. PERSPECTIVAS

- ❖ Purificar a enzima Lac 1;
- ❖ Realizar testes *in vitro* de degradação de corantes pelas lacases de *P. sanguineus*;
- ❖ Otimizar a condição de imobilização da lacase;
- ❖ Tratar o efluente de uma indústria farmacêutica;
- ❖ Preparar um biosensor para detecção de compostos fenólicos;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADULLA, E., TZANOV, T., COSTA, S., ROBRA, K. H., CAVACO-PAULO, A. & GUBITZ, G. M. Decolorization and detoxification of textile dyes with laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and Environmental Microbiology**, 66: 3357 - 3362, 2000.

AISEMBERG, G. O., GROTEWOLD, E., TECCIOLI, G. E. & JUDEWICZ, N. D. A major transcript in the response of *Neurospora crassa* to protein synthesis inhibition by cycloheximide. **Experimental Mycology**, 13: 121 – 128, 1989.

AGEMATU, H., SHIBAMOTO, N., NISHIDA, H., OKAMOTO, R., SHIN, T. & MURAO, S. Oxidative decarboxylation of 4-hydroxymandelic acid and 2-(4-hydroxyphenyl)glycine by laccase from *trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 57: 1877 – 1881, 1993.

AMITAI, G., ADANI, R., SOD-MORIAH, G., RABINOVITZ, I., VINCZE, A., LEADER, B. CHEFETZ, L. LEIBOVITZ-PERSKY, D. FRIESEM & Y. HADAR. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. **FEBS Letter**, 438: 195 – 200, 1998.

ANTORINI, M., HERPÖEL-GIMBERT, I., CHOINOWSC, T., SIGOILLOT, J. –C., ASTHER, M., WINTERHALTER, K. & PIONTEK, K. Purification, crystallization and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1594: 109 -114, 2002.

ARANA-CUENCA, A., RODA, A., TÉLLEZ, A., LOERA, O., CARBAJO, J. M., TÉRRON, M. C. & GONZÁLEZ, A. E. Comparative analysis of laccase-isozymes patterns of several related *Polyporaceae* species under different culture conditions. **Journal Basic Microbiology**, 44 (2): 79 – 87, 2004.

ARORA, D. S. & GILL, P. K. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. **Bioresource Technology**, 73: 283 – 285, 2000.

BAO, W., O'MALLEY, D. M., WHETTEN, R. & SEDEROFF, R. R. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. **Science**, 260: 672 – 674, 1993.

BALDRIAN, P. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. **Applied Microbiology Biotechnology**, 63: 560 – 563, 2004a.

BALDRIAN, P. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, 50: 245 – 253, 2004b.

BAUER, C. G., KÜHN, A., GAJOVIC, N., SKOROBOGATKO, HOLT, P-J., BRUCE, N. C., MAKOWER, A., LOWE, C. R. & SCHELLER, F. W. New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**. 364, p. 179 – 183, 1999.

BLUM, H.; BEIER, H. & GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8: 93 – 99, 1987.

BOLLAG, J. M. & LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Applied and Environmental Microbiology**, 48 (4): 849 – 854, 1984.

BONOMO, R. P., BOUDET, A. M., COZZOLINO, R., RIZZARELLI, E., SANTORO, A. M., STERJIADES, R. & ZAPPALÀ, R. A comparative study of two isoforms of laccase secreted by the “white-rot” fungus *Rigidoporus lignosus*, exhibiting significant structural and functional differences. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 71: 205 – 211, 1998.

BOURBONNAIS, R. & PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Letters**, 267: p. 99 – 102, 1990.

BOURBONNAIS, R. & PAICE, M. G. Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. **TAPPI Journal**, 79: 199 – 204, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248 – 254, 1976.

BROWN, M. A., ZHAO, A. & MAUK, A. G. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. **Inorganica Chimica Acta**, 331: 232 – 238, 2002.

CALVO, A. M., COPA-PATIÑO, J. L., ALONSO, O. & GONZÁLEZ, A. E. Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Coriolopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. **Archives Microbiology**, 171: 31 – 36, 1998.

CAMBRIA, M. T., CAMBRIA, A., RAGUSA, S. & RIZZARELLI, E. Production, purification, and properties of an extracellular laccase from *Rigidoporus lignosus*. **Protein Expression and Purification**, 18: 141 – 147, 2000.

CHEFETZ, B., CHEN, Y. & HADAR, Y. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. **Applied and Environmental Microbiology**, 64 (9): 3175 – 3179, 1998.

CHEN, S., GE, W. & BUSWELL, J. A. Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **European Journal of Biochemistry**, 271: 318 – 328, 2004.

CLAUS, H. & FILIP, Z. The evidence for a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain. **Microbiology Research**, 152: 209 – 216, 1997.

CLAUS, H., FABER, G. & KÖNIG, H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59, p. 672 – 678, 2002.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**, 35: 93 – 96, 2004.

COUTO, S. R., GUDÍN, M., LORENZO, M. & SANROMÁN, M. A. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. **Process. Biochem.**, 38, p. 249 – 255, 2002.

COUTO, S. R., MOLDES, D., LIÉBNAS, A. & SANROMÁN, A. Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions. **Biochemical Engineering Journal**, 15: 21 – 26, 2003.

D'ANNIBALE, A., STAZI, S. R., VINCIGUERRA & V. SERMANNI, G. G. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. **Journal Biotechnology**, 77: 265 – 273, 2000.

DAS, N., CHAKRABORTY, T. K. & MUKHERJEE, M. Purification and characterization of a growth-regulation laccase from *Pleurotus florida*. **Journal Basic Microbiology**, 41: 261-267, 2001.

DEDEYAN, B., KLONOWSKA, A., TAGGER, S., TRON, T., ICAZIO, G., GIL, G. & LE PETIT, J. L. Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**. 66 (3): 925 – 929, 2000.

DEKKER, R. F. H., LING, K. Y. & BARBOSA, A. M. A simple method for monitoring chromatography column eluates for laccase activity during enzyme purification. **Biotechnology Letters**, 22: 105 – 108, 2000.

DEKKER, R. F. H. & BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme Microbial Technology** 28, p. 81 – 88, 2001.

DEKKER, R. F. H., VASCONCELOS, A-F. D., BARBOSA, A. M. GIESE, E. C. & PACCOLA – MEIRELLES, L. A new role for veratryl alcohol: regulation of synthesis of lignocellulose-degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.: influence of carbon source. **Biotechnology Letters**, 23: 1987 – 1993, 2001.

DHAWAN, S. & KUHAD, R. C. Effect of amino acids and vitamins on laccase production by the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. **Bioresource Technology**, 84: 35 – 38, 2002.

DHAWAN, S., LAL, R. & KUHAD, R. C. Ethidium bromide stimulated hyper laccase production from bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. **Letters in Applied Microbiology** 36, p. 64 – 67, 2003.

DIAS, A. A., BEZERRA, R. M., LEMOS, P. M. & PEREIRA, A. N. *In vivo* and laccase-catalysed decolourization of xenobiotic azo dyes by a basidiomycetous fungus: characterization of its ligninolytic system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 19: 969 – 975, 2003.

DOMINGUÉZ, A., COUTO, S. R. & SANROMÁN, M. A. Dye decolorization by *Trametes hirsute* immobilized into alginate beads. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21: 405 – 409, 2005.

DONG, J. L. & ZHANG, Y. Z. Purification and characterization of two laccase isoenzymes from a lignolytic fungus *Trametes gallica*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, 34(20): 179 – 194, 2004.

DONG, J. L., ZHANG, Y. W., ZHANG, R. H., HUANG, W. Z. & ZHANG, Y. Z. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. **Journal Basic Microbiology**, 45 (3): 190- 198, 2005.

DURÁN, N. DEZOTTI, M. & RODRIGUEZ, J. Biomass photochemistry XV: photobleaching and biobleaching of Kraft effluent. **Journal of Photochemistry and Photobiology, A, Chemistry**, 62: 269 – 279, 1991.

DURÁN, N. & ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Cat. B: Environmental**, 28: 83 – 99, 2000.

EDENS, W. A., GOINS, T.Q., DOOLEY, D. & HENSON, J. M. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Applied and Environmental Microbiology**. 65 (7): 3071 – 3074, 1999.

EGGERT, C., TEMP, U., DEAN, J. F. D. & ERIKSSON, K-EL. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **FEBS Letters**, 391: 144 – 148, 1996a.

EGGERT, C., TEMP, U. & ERIKSSON, K. –E. L. The lignolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* : purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, 62, v. 4, p. 1151 – 1158, 1996b.

ESPOSITO, E., INNOCENTINI-MEI, L. H., FERRAZ, A., CANHOS, V. P. & DURAN, N. Phenoloxidases and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (EUC-2050 strain) : applications. **Journal of Biotechnology**, 29: 219 – 228, 1993.

FABBRINI, M., GALLI, C. & GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 16: 231 – 240, 2002.

FARNET, A-M., CRIQUET, S., CIGNA, M., GIL, G. & FERRÉ, E. Purification of a laccase from *Marasmius quercophilus* induced with ferulic acid: reactivity towards natural and xenobiotic aromatic compounds. **Enzyme and Microbial Technology**, 34: 549 – 554, 2004.

FENICE, M., SERMANNI, G. G., FEDERICI, F. & D'ANNIBALE, A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. **Journal of Biotechnology**, 100: 77 -85, 2003.

- FERNANDES, K. F. S. Imobilização de horseradish peroxidase em diferentes polianilinas - aplicações analíticas, Tese de doutorado. Universidade de Campinas – Instituto de química. Orientador Collins, C. H. 2000.
- FERNANDES, K. F., LIMA, C. S., PINHO, H. & COLLINS, C. H. Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers. **Process Biochemistry**, 38: 1379 – 1384, 2003.
- FREIRE, R. S., DURÁN, N. & KUBOTA, L. T. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. **Talanta**, 54 (4): 681 – 686, 2001.
- FRITZ-LANGHALS, E. & KUNATH, B. Synthesis of aromatic aldehydes by laccase-mediator assisted oxidation. **Tetrahedron Letters**, 39: 5955 – 5956, 1998.
- FUKUSHIMA, Y. & KIRK, T. K. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispota* lignin-degrading system. **Applied Environmental and Microbiology**, 61 (3): 872 – 876, 1995.
- GALHAUP, C. & HALTRICH, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. **Applied Microbial Biotechnology**, 56: 225 – 232, 2001.
- GALHAUP, C., GOLLER, S. PETERBAUER, C. K. STRAUSS, J. & H. D. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. **Microbiology**, 148: 2159 – 2169, 2002.
- GIANFREDA, S., XU, F. & BOLLAG, J. –M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, 3 (1): 1 – 25, 1999.
- GIESE, E. C., COVIZZI, L.G., DEKKER, R. F. H. & BARBOSA, A. M. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, 26 (4): 463 – 470, 2004.
- GONÇALVES, M. L. F. C. & STEINER, W. Detection of laccase activity in polyacrylamide gels after electrophoresis under denaturing conditions. **Biotechnology Techniques**, 10 (9): 667 – 668, 1996.
- HAKALA, T. K., LUNDELL, T., GALKIN, S., MAIJALA, P., KALKKINEN, N. & HATAKKA, A. Manganese peroxidases, laccases and oxilac acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. **Enzyme and Microbial Technology**, 36: 462 – 468, 2005.
- HARVEY, B. M. & WALKER, J. R. K. Studies with plant laccases: I. comparison of plant and fungal laccases. **Biochem. Mol. Biol. Biophys**, 3: 45 – 51, 1999.
- HATVANI, N. & MÉCS, I. Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinus edodes* on malt-containing by-product of the brewing process. **Process Biochemistry**, 37: 491 – 496, 2001.

HATVANI, N. & MECS, I. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* and solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, 30: 381 – 386, 2002.

HERPÖEL, I., MOUKHA, S., LESAGE-MEESSEN, L., SIGOILLOT, J. & ASTHER, M. Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. **FEMS Microbiology Letters**, 183 (2): 301 – 306, 2000.

HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. **Wood Science Technology**, 24: 23-63, 1990.

HUBLIK, G. & SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme and Microbial Technology**, 27: 330 – 336, 2000.

IKEHATA, K., BUCHANAN, I. & SMITH, D. W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal Environmental Eng. Science**, 3: 1 – 19, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL – INPI. **Banco de patentes**. Disponível em :  
<http://www.inpi.gov.br/MarcaPatene/servlet/PatenteservletController>. Acesso em 06 abr. 2006.

IYER, G. & CHATTOO, B. B. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, 227: 121 – 126, 2003.

JAOUANI, A., GUILLÉN, F., PENNINGCKX, M. J., MARTÍNEZ, A. T. & MARTÍNEZ, M. J. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. **Enzyme and Microbial Technology**, 36: 478 – 486, 2005.

JAROSZ-WILKOLAZKA, A., KOCHMANSKA-RDEST, J., MALARCZYKA, E., WARDASB, W. & LEONOWICZ, A. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, 30: 566 – 572, 2002.

JOHANNES, C. & MAJCHERCZYK, A. Laccase activity test and laccase inhibitors. **Journal of Biotechnology**, 78: 193 – 199, 2000.

JORDAAN, J. & LEUKES, W. D. Isolation of a thermoestable laccase with DMAP and MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus. **Enzyme and Microbial Technology**, 33: 212 – 219, 2003.

JORDAAN, J., PLETSCHKE, B. I. & LEUKES, W. D. Purification and parcial characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. **Enzyme and Microbial Technology**, 34: 635 – 641, 2004.

JUNG, H., XU, F. & LI, K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. **Enzyme and Microbial Technology**, 30: 161 – 168, 2002.

KIISKINEN, L. –L., VIIKARI, L. & KRUUS, K. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. **Applied Microbiology Biotechnology**, 59: 198 – 204, 2002.

KIISKINEN, L. –L., KRUUS, K., BAILEY, M., YLÖSMÄKI, E., SIIKA-AHO, M. & SALOHEIMO, M. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. **Microbiology**, 150: 3065 – 3074, 2004.

KIM, Y., CHO, N. –S., EOM, T. –J. & SHIUN, W. Purification and characterization of a laccase from *cerrena unicolor* and its reactivity in lignin degradation. **Bull. Korean Chemistry Society**, 23 (7): 985 – 989, 2002.

KLONOWSKA, A., LE PETIT, J. & TRON, T. Enhancement of minor laccases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. **FEMS Microbiology Letters**, 200: 25 – 30, 2001.

KLONOWSKA, A., GAUDIN, C., FOURNEL, A., ASSO, M., LE PETIT, J., GIORGI, M. & TRON, T. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. **European Journal of Biochemistry**, 269: 9119 – 6125, 2002.

KO, E. –M., LEEM, Y. –E. & CHOI, H. T. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied Microbiology Biotechnology**, 57: 98 – 102, 2001.

KOROLEVA, O. V., YAVMETDINOV, I. S., SHLEEV, S. V., STEPANOVA, E. V. & GAVRILOVA, V. P. Isolation and study of some properties of laccases from the basidiomycetes *Cerrena maxima*. **Biochemistry (Moscow)**, 66 (6): 618 – 622, 2001.

KOROLJOVA-SKOROBOGAT'KO, O. V., STEPANOVA, E. V., GAVRILOVA, V. P., MOROZOVA, O. V., LUBIMOVA, N. V., DZCHAFAROVA, A. N., JAROLOPOV, A. I. & MAKOWER, A. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. **Biotechnology Applied Biochemistry**, 28: 47 – 54, 1998.

KUMAR, S.V., PHALE, P.S., DURANI, S. & WANGIKAR, P. P. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. **Biotechnology and Bioengineering**, 83 (4): 386 – 394, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680 – 685, 1970.

LEE, I. –Y., JUNG, K. –H., LEE, C. –H. & PARK, Y. –H. Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. **Biotechnology Letters**, 21: 965 – 968, 1999.

LEONOWICZ, A & GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme Microbial Technology**, 3: 55 – 58, 1981.

LEONOWICZ, A., CHO, N. -S., LUTEREK, J., WILKOLAZKA, A., WOJTAS-WASILEWSKA, M., MATUSZEWSKA, A., HOFRICHTER, M., WESENBERG, D. & ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal Basic Microbiology**, 41 (3 – 4): 185 – 227, 2001.

LEONTIEVSKY, A. A., VARES, T., LANKINEN, P., SHERGILL, J. K., POZDNYAKOVA, N. N., MYASOEDOVA, N. M., KALKKINEN, N., GOLOVLEVA, L. A., CAMMACK, R., THURSTON, C. F. & HATAKKA, A. Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, 156; 9 – 14, 1997a.

LEONTIEVSKY, A. A., MYASOEDOVA, N. M., POZDNYAKOVA, N. N. & GOLOVLEVA, L. A. 'Yellow' laccases of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. **FEBS Letters**, 413; 446 – 448, 1997b.

LEVIN, L. & FORCHIASSIN, F. Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. **Acta Biotechnologica**, 21 (2): 179 – 186, 2001.

LEVIN, L., FORCHIASSIN, F. & RAMOS, A. M. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. **Mycologia**, 94 (3): 377 - 383, 2002.

LO, S. C., HO, Y. S. & BUSWELL, J. A. Effect of phenolic monomers on the production of laccases by the edible mushroom *Pleurotus sojar-caju*, and partial characterization of a major laccase component. **Mycologia**, 93 (3): 413 – 421, 2001.

LOMASCOLO, A., CAYOL, J-L., ROCHE, M., GUO, L., ROBERT, J-L., RECORD, E., LESAGE-MEESSEN, L., OLLIVIER, B., SIGOILLOT, J-C. & ASTHERR, M. Molecular clustering of *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monocaryotic strains for laccase hyperproduction. **Mycology Research**, 106 (10): 1193 -1203, 2002.

LOMASCOLO, A., RECORD, E., HERPOËL-GIMBERT, I., DELATTRE, M., ROBERT, J. L., GEORIS, J., DAUVRIN, T., SIGOILLOT, J-C. & ASTHER, M. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. **Journal of Applied Microbiology**, 94: 618 – 624, 2003.

LORENZO, M., MOLDES, D., COUTO, S. R. & SANROMÁN, A. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. **Bioresource Technology**, 82: 109 – 113, 2002.

MARTINS, M. A. M., LIMA, N., SILVESTRE, A. J. D. & QUEIROZ, M. J. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. **Chemosphere**, 52: 967 – 973, 2003.

MAYER, A.M. Polyphenoloxidases in plants: recent progress. **Phytochemistry**, 6:11-20, 1987.

MAYER, A. M. & STAPLES, R. C. Review – laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, 60: 551-565, 2002.

MIKIASHVILI, N., ELISASHVILI, V., WASSER, S. & NEVO, E. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. **Biotechnology Letters**, 27: 955 – 959, 2005.

MILSTEIN, O., NICKLAS, B. & HUTTERMAN, A. Oxidation of aromatic compounds in organic solvents by laccase from *Trametes versicolor*. **Applied and Microbiology Biotechnology**, 31: 70 -74, 1989.

MIN, K-L., KIM, Y-H., KIM, Y. W., JUNG, H. S. & HAH, Y. C. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 392 (2): 279 -286, 2001.

MINUSSI, R. C., PASTORE, G. M. & DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**. 13 (6-7): 205-216, 2002.

MOLDES, D., LORENZO, M. & SANROMÁN, M. A. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. **Biotechnology Letters**, 26: 327 – 330, 2004.

MUÑOZ, C., GULLÉN, F., MARTINEZ, A. T. & MARTINEZ, M. J. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. **Current Microbiology**, 34: 1 – 5, 1997.

MUZARIRI, C. C., MAPINGIRE, J., MAZORODZE, J. & MANDIKUTSE, L. 2nd WARFSA/WaterNet Symposium: Intergrated Water Resources Management: Isolation and screening of microorganisms for potential application in remediation of effluent water from the pulp and paper industry. **Theory, Practice, Cases; Cape Town**, 30 – 31, 2001.

NAGAI, M., SATO, T., WATANABE, H., SAITO, K., KAWATA, M. & ENEI, H. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemical different dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 60: 327 – 335, 2002.

NAGAI, M., KAWATA, M., WATANABE, H., OGAWA, M., SAITO, K., TAKESAWA, T., KAND, K. & SATO, T. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. **Microbiology**, 149: 2455 – 2462, 2003.

NECOCHEA, R., VALDERRAMA, B. DÍAZ-SANDOVAL, S., FOLCH-MALLOL, J. L., VÁZQUEZ-DUHALT, R. & ITURRIAGA, G. Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. **FEMS Microbiology Letters**, 244 (2): 235 – 241, 2005.

NIKU-PAAVOLA, M. –L. KARHUNEN, E., KANTELINEN, A., VIIKARI, L. LUNDELL, T. & HATAKKA, A. The effect of culture conditions on the production of lignin modifying enzymes by the white-rot fungus *Phebia radiata*. **Journal of Biotechnology**, 13: 211 – 221, 1990.

NIKU-PAAVOLA, M. –L., FAGERSTRÖM, R., KRUIUS, K. & VIIKARI, L. Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from *Peniophora* species. **Enzyme and Microbial Technology**, 35 (1): 100 – 102, 2004.

NISHIZAWA, Y., NAKABAYASHI, K. & SHINAGAWA, E. Purification and characterization of laccase from white rot fungus *Trametes sanguinea* M85-2. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 80 (1), 91 – 93, 1995.

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

OSCARSSON, S. & KÅRSNÄS, P. Salt-promoted adsorption of proteins onto amphiphilic agarose-based adsorbents. II. Effects of salt and salt concentration. **Journal of Chromatography A**, 803 (1 – 2): 83 – 93, 1998.

PALMIERI, G., GIARDINA, P., BIANCO, C., SCALONIT, A., CAPASSOL, A. & SANNIA, G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **The Journal of Biological Chemistry**, 272 (50): 31301 – 31307, 1997.

PALONEN, H., SALOHEIMO, M., VIIKARI, L. & KRUIUS, K. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, 33: 854 – 862, 2003.

PERALTA-ZAMORA, P., PEREIRA, C. M., TIBURTIUS, E. R. L., MORAES, S. G., ROSA, M. A., MINUSSI, R. C. & DURÁN, N. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. **Applied Catalysis B: Environmental**, 42: 131 – 144, 2003.

PÉREZ, J., MARTÍNEZ, J. & RUBIA, T. DE LA Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavid-alba*. **Applied and Environmental Microbiology**, 62 (11): 4263–4267, 1996.

PERIÉ, F. H., REDDY, V. B., BLACKBURN, N. J. & GOLD, M. H. Purification and characterization of laccases from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 353 (2): 349 -355, 1998.

PEZET, R. Purification and characterization of a 32 – kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. **FEMS Microbiology Letters**, 167: 203 – 208, 1998.

PICKARD, M. A., VANDERTOL, H., ROMAN, R. AND VAZQUEZ-DUHALT, R. High production of lignolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. **Canadian Journal Microbiology**, 45: 627 – 631, 1999.

POINTING, S. B. & VRIJMOED, L. L. P Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenol oxidase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 16: 317 – 318, 2000.

- POINTING, S. B., JONES, E. B. G. & VRIJMOED, L. L. P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, 92 (1): 139 -144, 2000.
- POINTING, S. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 57 (1-2): 20 – 33, 2001.
- POZDNYAKOVA, N. N., RODAKIEWICZ-, J. –N. & TURKOVSKA, O. V. Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 30: 19 – 24, 2004.
- QUEIROZ, J. A., TOMAZ, C. T. & CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, 87: 143 – 159, 2001.
- QUIROGA, E., N., VATTUONE, M., A. & SAMPIETRO, A., R. Purification and characterization of the invertase from *Pycnoporus sanguineus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, 1251 (2): 75 -80, 1995.
- RECORD, E., PUNT, P. J., CHAMKHA, M., LABAT, M., VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. **European Journal of Biochemistry**, 269: 602-609, 2002.
- RIPPEL, G. & SZEPESY, L. Hydrophobic interaction chromatography of proteins on an alkyl-superoose column. **Journal of Chromatography A**, 664 (1): 27 – 32, 1994.
- ROBLES, A., LUCAS, R., MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M., OMAR, N. B., PÉREZ, R. & GÁLVEZ, A. Characterization of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (Syn. *Thielavopsis*) *paradoxa* CH32. **Enzyme and Microbial Technology**, 31: 516 – 522, 2002.
- RODRIGUÉZ, C. S., SANTORO, R. CAMESELLE, C. & SANROMÁN, A. Laccase production in semi-solid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Letters**, 19 (10): 995 – 998, 1997.
- ROGALSKI, J. & LEONOWICZ, A. *Phlebia radiata* laccase forms induced by veratric acid and xylydine in relation to lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase. **Acta Biotechnologica**, 12: 213 – 221, 1992.
- RUBIA, T. de la, RUIZ, E., PÉREZ, J. & MARTÍNEZ, J. Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavidio-alba* induced by vanilin. **Archives Microbiology**, 179: 70 – 73, 2002.
- RYAN, S., SCHNITZHOFER, W., TZANOV, T., CAVACO-PAULO, A. & GÜBITZ, G. M. An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolourization. **Enzyme and Microbial Technology**, 33 (6): 766 – 774, 2003.
- SAITO, T., HONG, P., KATO, K., OKASAKI, M. INAGAKI, H. MAEDA, S. & YOKOGAWA, Y. Purification and characterization of an extracellular laccase of a

fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. **Enzyme and Microbial Technology**, 33: 520 – 526, 2003.

SANCHEZ-AMAT, A. & SOLANO, F. A pluripontente polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas sp.* Shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 240, 787 – 792, 1997.

SAPARRAT, M. C. N., GUILLÉN, F. & ARAMBARRI, A. M. Induction, isolation, and characterization of two laccases from white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. **Applied and Environmental Microbiology**, 68 (4): 1534 – 1540, 2002.

SAPARRAT, M. C. N., CABELLO, M. N. & ARAMBARRI, A. M. Extracellular laccase activity in *Tetraploa aristata*. **Biotechnology Letters**, 24: 1375 – 1377, 2002(b).

SCHERER, M. & FISCHER, R. Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. **Archives Microbiology**, 170: 78 – 84, 1998.

SCHLIEPHAKE, K., MAINWARING, D. E., LONERGAN, G. T., JONES, I. K. & BAKER, W. L. Transformation and degradation of the disazo dye Chicago Sky Blue by a purified laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. **Enzyme and Microbial Technology**, 27: 100 – 107, 2000.

SCHNEIDER, P., CASPERSEN, M. B., MONDORF, K., HALKIER, T., SKOV, L. K., OSTERGAARD, P. R., BROWN, K. M., BROWN, S. H. & XU, F. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, 25: 502 – 508, 1999.

SETHURAMAN, A., AKIN, D. E. & ERIKSSON, K. –E. L. Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the bird's nest fungus *Cyanthus stercoreus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 52: 689 – 697, 1999.

SHIN, K. S. & LEE, Y. J. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, 384: 109 – 115, 2000.

SIGOILLOT, J. –C., HERPÖEL, I., FRASSE, P., MOUKHA, S., LESAGE-MEESSEN, L. & MARCEL, A. Laccase production by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* from a dikaryotic strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 15: 481 – 484, 1999.

SIMKUS, R. A. & LAURINAVICIUS, V. Laccase containing sol-gel as a signal enhancer in optical bioassay of aromatic amines. **Biologija**, 1-2: 44 – 46, 1995.

SMIRNOV, S. A., KOROLEVA, O. V., GAVRILOVA, V. P., BELOVA, A. B. & KLYACHKO, N. L. Laccases from basidiomycetes; physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds. **Biochemistry (Moscow)**, 66 (7): 774 – 779, 2001.

SOUZA, C. G. M. & PERALTA, R. M. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. **Journal Basic Microbiology**, 43 (4): 278 – 286, 2003.

SOUZA, C. G. M., TYCHANOWICZ, G. K., SOUZA, D. F. & PERALTA, R. M. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. **Journal Basic Microbiology**, 44 (2): 129 – 136, 2004.

STUTZENBERGER, F. J. Interference of the detergent Tween 80 in protein assays. **Anal. Biochemistry**, 207: 249 – 254, 1992.

TEIXEIRA, D. E.; da COSTA, A. F. & SANTANA, M. A. E. Aglomerados de bagaço de cana-de-açúcar: resistência natural ao ataque de fungos apodrecedores. **Scientia Forestalis**. 52: 29-34, dez. 1997.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**. 140: 19 – 26, 1994.

TIMUR, S. PAZARLIOGLU, N., PILLOTON, R. & TELEFONCU, A. Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix. **Sensors and Actuators B**, 97: 132 – 136, 2004.

TOMAZ, A.T. & QUEIROZ, J. A. Studies on the chromatographic fractionation of *Trichoderma reesei* cellulases by hydrophobic interaction. **Journal of Chromatography A**, 865: 123 – 128, 1999.

TOMAZ, A.T. & QUEIROZ, J. A. Fractionation of *Trichoderma reesei* cellulases by hydrophobic interaction chromatography on phenyl-sepharose. **Biotechnology Letters**, 26: 223- 227, 2004.

TORRES, E., BUSTOS-JAIMES, I., & LE BORGNE, S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. **Applied Catalysis B: Environmental**, 46: 1 – 15, 2003.

TSUTSUMI, Y. HANEDA, T. & NISHIDA, T. Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. **Chemosphere**, 42: 271 – 276, 2001.

VASCONCELOS, A. F. D. A, BARBOSA, A. M., DEKKER, R. F.H., SCARMINIO, I. S. & REZENDE, M. I. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. In presence of veratryl alcohol by the response-surface method. **Process Biochemistry**, 35: 1131 – 1138, 2000.

VASDEV, K., DHAWAN, S., KAPOOR, R. K. & KUHAD, R. C. Biochemical characterization and molecular evidence of a laccase from the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. **Fungal Genetics and Biology**, 42: 684 – 693, 2005.

VIKINESWARY, S., NOORLIDAH, A., RENUVATHANI, M., SEKARAN, M., PANDEY, A., JONES, E.B.G. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected

agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**, 97: 171-177, 2006.

WAHLEITHNER, J. A., XU, F., BROWN, K. M., BROWN, S. H., GOLIGHTLY, E. J., HALKIER, T., KAUPPINEN, S., PEDERSON, A., & SCHNEIDER, P. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. **Current Genetic**, 29: 395 – 403, 1996.

WOLLENBERGER, U., SCHELLER, F., PFEIFFER, D., BOGDANOVSKAYA, V. A., TARASEVICH, M. R. & HANKE, G. Laccase/glucose oxidase electrode for determination of glucose. **Analytica Chimica Acta**, 187: 39 – 45, 1986.

XIAO, Y. Z., TU, X. M., WANG, J., ZHANG, M., CHENG, Q., ZENG, W. Y. & SHI, Y. Y. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *trametes* sp. strain AH28-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 60: 700 – 707, 2003.

XIAO, Y. Z., CHENG, Q., HANG, J., SHI, Y. Y., WU, J., HONG, Y. Z. & WANG, Y. P. Selective induction, purification and characterization of a laccase isoenzyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. **Mycologia**, 96(1): 26-35, 2004.

XU, F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. **Biochemistry**, 35: 7608 – 7614, 1996.

XU, F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. **Journal of Biological Chemistry**, 272: 924 – 928, 1997.

YOUNG, L. & YU, J. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, 31 (5): 1187 – 1193, 1997.

ZILLY, A., SOUZA, C. G. M., BARBOSA, I. P. –T. & PERALTA, R. M. Decolorization of industrial dyes by a brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* producing laccase as the sole phenol-oxidizing enzyme. **Folia Microbiologica**, 47 (3): 273 – 277, 2002.

## 8. ANEXOS

Anexo 1 - Propriedades bioquímicas de lacases fúngicas purificadas na última década

Fonte	Massa molecular (kDa)	pH ótimo	Temp. ótima (°C)	K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub>	Atividade específica	Rendimento (%)	Fator de purificação	Referência
<i>Aspergillus nidulans</i>	80 (SDS) 100-120 (native)	6,5 (D)	55	1,3 mM (D)		891,7 U/mg	9	557,3	Scherer & Fischer (1998)
Basidiomycete C 30 – <i>Marasmius quercophilus</i> <sup>1</sup> (3 isoenzimas) LAC 2	65 (SDS)	5,5 – 6,0 (S)	55	6,8 (µM) (S) 1006 (µM) (G) 536 (µM) (A)		934 U/mg	50	25,4	Klonowska et al. (2002)
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr strain P-69 <sup>1</sup> lacase – like stilbene	32 (SDS)			20,8µM (Res)	66,6 unit	34 U/mg	3,2	67	Pezet (1998)
<i>Cerreña maxima</i> <sup>o</sup> strain 0275 3 isoenzimas A de pl 3.5 foi caracterizada	57 (FG) 55 (SDS)	4,0 – 4,2 (S)	50	73 µM (S) 65 µM (A)					Koroleva et al. (2002)
<i>Cerreña unicolar</i> <sup>o</sup>	60 (SDS)					140 U/mg	23		Kim et al. (2002).
<i>Chaetomium thermophilum</i> <sup>o</sup>	77 (SDS)	6,0	50-60	0,19 mM (A) 0,096 mM (D) 0,40 mM (G) 0,036 mM (H) 0,034 mM (S)	2,6 (µM) O <sub>2</sub> .min <sup>-1</sup> (A) 3,4 (D) 2,5 (G) 1,7 (H) 4,1 (S)	37 U/mg	40	10	Chefetz et al. (1998)
<i>Chalara paradoxa</i> CH 32 <sup>1</sup>	67 (SDS)	4,5 (A) 6,5 (S)	30	0,77 (A) 3,4 mM (S)	5,26 U/mg (A) 1,18 U/mg (S)	142,45 U/mg	7,2	7122,50	Robles et al. (2002)
<i>Coprinus cinereus</i> <sup>R</sup>	66 (SDS) 58 (E)	4,0 (A) 6,5 (S)	60-70	26 ± 6 µM (S) pH 5,5 23 ± 3 µM(A) pH 5,5 170 ±30 µM (A) pH 6,0					Schneider et al. (1999)

<i>Coprinus cinereus</i> (lac wt) 2 isoformas	63 (SDS)	4,0 (A) 6,5 (S)	60-70	280 ± 20 µM (A) pH 8,0					Schneider et al. (1999) Smirnov et al. (2001)
<i>Coriolus hirsutus</i>	55			65 µM (G)					
<i>Coriolisimus fulvocinerea</i>	54			70 µM (G)					
<i>Coriolus zonatus</i>	62			90 µM (G)					
<i>Cerrrena maxima</i>	57			255 µM (G)					
<i>Corioloopsis gallica</i> <sup>1</sup> 3 isoenzimas	84,1 (SDS)	3,0 (A)	70		1022 U/mg	1,4	4,4	Calvo et al. (1998)	
<i>Corioloopsis rigida</i> <sup>1</sup> 2 isoenzimas	66 (SDS) 55 (FG)	3 (D) 2,5 (A)		328 µM (D) 12 (A)	110 U/mg	41	2,5	Saparrat et al. (2002)	
<i>Coriolus hirsutus</i> <sup>c</sup> 2 isoenzimas – purificou a de 55 kDa	55 (HPLC) 53 (SDS) 68 (HPLC) 66 (SDS)	4,5 (C)		24 µM	125 U/mg		312,5	Koroļjova- Skorobogat'ko et al. (1998)	
<i>Coriolus hirsutus</i>	73 (SDS) 80 (FG)	2,5 (A) 4,0 (G)	45	10,9 µM (G) 56,7 µM (A) 142,7 µM (S)	258,8 U/mg	32,3	14,5	Shin & Lee (2000)	
<i>Daedalea quercina</i> <sup>c</sup>	69 (SDS) 71,3 (FG)	2,0 (A) 4,0 (D) 4,5 (G)	60 - 70	38 µM (A) 48 µM (D) 131 µM (G)	50,5 U/mg	22,1	72,1	Baldrian (2004a)	
<i>Dichomitus squalens</i> <sup>1</sup> lac 1	66(SDS) 65 (FG)	3,0 (D)			45 U/mg	7	225	Perié et al. (1998)	
<i>Dichomitus squalens</i> <sup>1</sup> lac 2	66(SDS) 65 (FG)	3,0 (D)			45 U/mg	7	225	Perié et al. (1998)	
Fungus family Chaetomiaceae <sup>1</sup> (isolated soil)	73 (SDS) 80 (FG)	7,0 (S)	42	9,0 µM	30,4 U/mg	26,5	2,9	Saito et al.. (2003)	
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> <sup>1</sup>	190 s/ desnaturar Subunidades 60 (SDS)	4,5 (D)		2,6 x 10 <sup>-5</sup> M (D) 2,5 x 10 <sup>-4</sup> (C) 5,1 x 10 <sup>-4</sup> (G)	4200 U/mg	4,6	120	Edens et al. (1999)	

<i>Ganoderma lucidum</i> <sup>C</sup>	65-68 (FG)	3,5 (O)	20-25	0,4016 mM (O) 0,0037 mM (A)	0,0918 (OD/min) (O) 0,0142 (OD/min) (A)	15800 U/mg	0,6	32,4	Ko et al. (2001)
<i>Lentinus edodes</i> <sup>C</sup>	72,2 (SDS) 61,0 (FG)	4,0 (A)	40	0,108 mM (A)	604 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	348 U/mg	20,3	262	Nagai et al. (2002)
<i>Lentinus edodes</i> <sup>C</sup> (fruit bodies)	58,0 (SDS) 53,0 (FG)	3,0 (A)	40	0,127		305 U/mg	23,5	1200	Nagai et al. (2003)
<i>Magnaporthe grisea</i> <sup>I</sup>	70 (SDS)	6,0 (S)	30	0,118 mM	-	225,91 U/mg	11,92	282	Iyer & Chattoo (2003)
<i>Marasmius quercophilus</i> <sup>I</sup>	63 (SDS)	4,5 (S)	75	7,1 $\mu\text{M}$		13,0 U/mg	31	2,4	Dedeyan et al. (2000)
<i>Marasmius quercophilus</i> Strain 19 <sup>I</sup>	60 (SDS)	4,0 (A) 4,5 (S)	80	$113 \times 10^{-3}$ (A) $4,2 \times 10^{-3}$ (S)	$3,3 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ (A) $2,0 \mu\text{M}$ (S)				Farnet et al. (2004)
<i>Mauginiella</i> sp. <sup>C</sup>	63 (E) 67 (SDS)	4,0 (G) 3,5 (D) 2,4 (A)				1449 nkat/mg	40	100	Palonen et al. (2003)
<i>Melanocarpus albomyces</i> <sup>C</sup>	80 (SDS)	3,5 (A) 5,0 - 7,5 (G) 6,0 -7,0 (S)	60 - 70			1,36 U/mg	17	292	Kiiskinen et al. (2002)
<i>Melanocarpus albomyces</i> <sup>R</sup>	71,3 (E)  72,2 (E)	5-7 (G)		270 ( $\mu\text{M}$ ) (A) 1,8 ( $\mu\text{M}$ ) (S) 5,2 ( $\mu\text{M}$ ) (D) 910 ( $\mu\text{M}$ ) (G)  280 ( $\mu\text{M}$ ) (A) 1,3 ( $\mu\text{M}$ ) (S) 5,2 ( $\mu\text{M}$ ) (D) 890 ( $\mu\text{M}$ ) (G)		560 nkat/mg	40	11	Kiiskinen et al. (2004)
<i>Phanerochaete flavido-alba</i> <sup>C</sup>	94 (SDS)	3,0 (A)	30	0,74 mM (A)	$15,42 \text{ nmol} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$	$18,4 \text{ nmol} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$			Pérez et al. (1996)

<i>Phanerochaete flavido-alba</i> I	98,7				0,76 mM (D) 1,19 mM (A) 1,66 mM (C)	290 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (D) 727 (A) 150 (C)					Rubia et al. (2002)
<i>Phellinus ribis</i> <sup>1</sup>	76 (SDS)	4,0 -6,0 (D) 5,0 (A) 6,0 (S)	65		38 (D) 207 (A) 11 (S)		48,262 U/mg	13	500		Min et al. (2001)
<i>Physisporinus rivulosus</i> <sup>1</sup>	Lac 1-66 Lac 2-67 Lac 3-68 Lac 4-68 (SDS)	2,5 (A) 3,0 (D) 3,5 (S e G)									Hakala et al. (2005)
<i>Pleurotus eryngii</i> <sup>C</sup> 2 isoenzimas	-	4,5 (A)	55		0,32 mM (A)	0,48 U $\mu\text{g}^{-1}$	-	-	-		Muñoz et al. (1997)
<i>Pleurotus florida</i> <sup>C</sup>	70 (SDS)	6,0 (G) 5,5 (O)	50		0,045 mM (O) 2,81 mM (G)	2,66 $\text{mM}\cdot\text{sec}^{-1}$ (O) 1,33 $\text{mM}\cdot\text{sec}^{-1}$ (G)	2860 nKat/mg	10,01	34,32		Das et al. (2001)
<i>Pleurotus ostreatus</i> <sup>C</sup> (5 isoformas) POXA1 (branca)	61 (SDS) 54 (FG)	3,0 (A) - 3 - 5 (D) 6,0 (S)	45 - 65		0,09 mM (A) - 2,1 mM (D) 0,13 Mm (S)			23,2	85		Palmieri et al. (1997)
<i>Pleurotus ostreatus</i> <sup>C</sup> POXA 2	67 (SDS) 59 (FG)	3,0 (A) 6,0 (G) 6, 5 (D) 6,0 (S)	25 - 35		0,12 mM (A) 3,1 (G) 0,74 mM (D) 0,14 Mm (S)						Palmieri et al. (1997)
<i>Pleurotus ostreatus</i> Strain RIK 36 <sup>1</sup>	66,8 (SDS) 67,0 (FG)	5,8 (S)	50				351 U/mg	46,5	31,7		Hublik & Schinner (2000)
<i>Pleurotus pulmonarius</i> <sup>1</sup> 2 isoformas Lac 2	46 (FG)	6,2 - 6,5 (S) 4,0 - 5,5 (A) 6,0 - 8,0 (G)	50		12 $\mu\text{M}$ (S) 210 $\mu\text{M}$ (A) 550 $\mu\text{M}$ (G)		19,750 U/mg	49	5,4		Souza & Peralta (2003)
<i>Pycnoporus</i>	60,5 (FG)	3,5 (A)	60		36 $\mu\text{M}$ (A)		833 U/mg	80,2	2,3		Jaouani et al.

<i>coccineus</i> <sup>1</sup>	61,5 (SDS)	3,5 – 4,0 (D)		27 µM (D)					(2005)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <sup>1</sup>	81 (FG)	4,0 (A)	ND				610 U/mg	47	Eggert et al. (1996)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <sup>R</sup>	70 (SDS)	4,0 (S)	65-70	55 (µM) (A)			1030 U/mg	16	Record et al. (2002)
<i>Pycnoporus cynabarinus</i> <sup>2</sup> isoenzimas	65								Lomascolo et al. (2003)
<i>Pycnoporus sanguineus</i> G05.10	70 (SDS)								Lomascolo et al. (2002)
<i>Rhizoctonia solani</i> <sup>1e</sup> <sub>R</sub>	Wt- lcc4 - 66 (SDS) – 2 unidades	≤2,7 (A) 7,0 (S)							Wahlthner et al. (1996)
	r-lcc1 – 50-80	<2,7 (A) 6,0 (S)							Wahlthner et al. (1996)
	r-lcc4 – 70 – 85 (SDS)	<2,7 (A) 7,0 (S)							
<i>Rigidoporus lignosus</i> <sub>C</sub>	Lac D- 55 (SDS)	3,0 (A) 6,2 (D)		lacD- 49 (µM) (A) 108 (D)			13000 nKat/mg	4,1	Bonomo et al. (1998)
	Lac B – 60 (SDS)			lac B- 80 (µM) (A) 490 (D)			10000 nKat/mg	24,0	
<i>Sclerotium rolfsii</i> <sup>1</sup>	55 (SDS)	2,4 (A)	62	0,22 mM (A)			245 nKat/mg	12	Ryan et al. (2003)
2 isoformas Caracterizou a de 55 kDa	86 (SDS)								
Strain EUC-1 - basidiomiceto		5,0 (S) 4,0 (G) 3,0 (A)	50-60 (A)				119,5 U/mg	50	Dias et al. (2003)

<i>Trametes gallica</i> <sup>C</sup> – lac 1	60 (SDS)	2,2 (A) 3,0 (D) 4,0 (G)	70 (S)	0,118.10 <sup>-2</sup> mM(A) 0,42 (D) 0,405 (G)		375 U/mg	14,2	51,3	Dong & Zhang (2004)
<i>Trametes gallica</i> <sup>C</sup> – lac 2	60 (SDS)	2,2 (A) 3,0 (D) 4,0 (G)	70 (S)	0,086.10 <sup>-2</sup> (A) 0,41 (D) 0,40 (G)		370 U/mg	10,6	50,7	Dong & Zhang (2004)
<i>Trametes sanguinea</i> <sup>I</sup> M85-2	62 (SDS) 61,7 (HPLC)	5,0	60			689 U/mg	73	6	Nishizawa (1995)
<i>Trametes</i> sp <sup>I</sup> strain AH 28-2 [2 isoenzimas] Lac A (85%)	62 (SDS) 57 (FG) 52 (E)	4,5 (G)	50	25 (µM) (A) 25,5 (D) 420 (G)	670 µM.min <sup>-1</sup> .mg (A) 79 (D) 66,8 (G)	543,8 U/mg	21,2	33,8	Xiao et al. (2003 )
<i>Trametes</i> sp <sup>I</sup> strain AH 28-2 – lac B	74 (SDS) 72 (HPLC)	4,7 (G)	45	28 (µM) (S) 1249 (G) 177 (A)	504 µM.min <sup>-1</sup> .mg (S) 1910 (G) 117,4 (A)				Xiao et al. (2004)
<i>Trametes versicolor</i> <sup>I</sup>		3,0 (A)	60						Rancamo et al. (2003)
<i>Trametes versicolor</i> <sup>H</sup>	85 (SDS) 100 (FG)	5,5 (A)				3,2 U/mg			Brown et al. (2002)
<i>Trametes versicolor</i> <sup>I</sup> 2 isoenzimas	65 60								Moldes et al.. (2004)
<i>Trametes pubescens</i> <sup>I</sup>	65 (SDS) 57 (FG)	4,5 (S)	50 – 60	6,0 (µM) (S)		1100 U/mg	46		Galhaup et al. (2002)
<i>Trichophyton rubrum</i> <sup>I</sup> LKY-7	65 (SDS)	3,0 (A) 3,5 (G)		0,045 (mM) (A)		300 U/mg	40	30	Jung et al. (2002)
Unidentified basidiomycete UD4	62 (SDS)	4,0 (A) 6,0 (G)		0,0123 (A) 0,251 (G)		52 U/mg	12	11,2	Jordaan et al. (2004)
<i>Volvariella volvacea</i> <sup>I</sup> V14 – (2 isoformas) lac1	58 (SDS)	3,0 (A) 5,6 (S) 4,6 (D)	45	0,03 mM (A) 0,01 mM (S) 0,57 mM (D)	16,4 U/mg (A) 4,9 U/mg (S) 5,6 U/mg (D)	17,2 U/mg	22	14	Chen et al. (2004)

(A) ABTS; (S) seringaldazina; (D) 2,6 dimetoxifenol; (G) guaiacol; (AG) ácido gálico; (H) hidroquinona; (Res) resveratrol  
I<sub>1</sub> forma induzida; C forma constitutiva; R<sub>1</sub> forma recombinante  
SDS – Dodecil sulfato de sódio; FG –filtração em gel; E – espectrometria de massa; HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

----- Original Message -----

From: "Elizabeth J. Sparke" <E.J.Sparke@hull.ac.uk>

To: <ulhoa@icb.ufg.br>

Sent: Wednesday, November 30, 2005 11:36 AM

Subject: BL 6993

"Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylydine" by Telma Alves Garcia, Mariangela Fontes Santiago and Cirano Jose Ulhoa

Dear Dr Ulhoa

Your paper has now been reviewed by a member of our Editorial Board and I am pleased to be able to tell you that it can be accepted for publication in the Journal on the condition that it is revised according to our advice. Unfortunately this cannot be sent via e.mail so a letter has been posted to you today with the details. Please wait for it to arrive, it can take up to 3-4 weeks. Thank you.

With kind regards

Elizabeth Sparke

-----  
Elizabeth J. Sparke  
Secretary to Professor Ratledge  
Department of Biological Sciences  
University of Hull  
Hull, HU6 7RX, UK  
Tel: +44 (0)1482 465511 (Direct Line)  
Fax: +44 (0)1482 465822  
Email: E.J.Sparke@hull.ac.uk

----- Original Message -----

From: "Elizabeth J. Sparke" <E.J.Sparke@hull.ac.uk>

To: <ulhoa@icb.ufg.br>

Sent: Wednesday, February 01, 2006 1:20 PM

Subject: BL 6993

"Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylydine" by Telma Alves Garcia, Mariangela Fontes Santiago and Cirano Jose Ulhoa

Dear Dr Ulhoa

Thank you for the return of your revised manuscript. I am pleased to inform you that this is now accepted for publication. It will appear in the first available issue of the Journal.

You will be advised later about ordering reprints from the publishers. A written statement of acceptance will not be sent. If one is required please inform us as soon as possible and we will arrange for a copy to be posted to you.

Thank you for sending us this most interesting piece of work which we will be pleased to see published in the Journal.

With kind regards.

Yours sincerely

Colin Ratledge  
Editor - Biotechnology Letters

-----  
Elizabeth J. Sparke  
Secretary to Professor Ratledge  
Department of Biological Sciences  
University of Hull  
Hull, HU6 7RX, UK  
Tel: +44 (0)1482 465511 (Direct Line)  
Fax: +44 (0)1482 465822  
Email: E.J.Sparke@hull.ac.uk

Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xyloidine

**Telma Alves Garcia<sup>1,2</sup>, Mariângela Fontes Santiago<sup>1</sup> & Cirano José Ulhoa<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil.*

<sup>2</sup>*Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Campus Asa Norte, 70.910-900, Brasília, DF, Brazil.*

\*Correspondence to: Fax no. 55 62 3521.1090, email: [ulhoa@icb.ufg.br](mailto:ulhoa@icb.ufg.br)

**Keywords:** isoforms characterization; laccase; *Pycnoporus sanguineus*.

### **Abstract**

Two isoforms of laccase produced from the culture supernatant of *Pycnoporus sanguineus* were partially purified by phenyl-Sepharose chromatography. Molecular masses of the enzymes were 80

kDa (LacI) and 68 kDa (LacII). Optimum pH values and temperatures of Lac I were 4.8 and 30 °C, those of Lac II was 4.2 and 50 °C, after 5 min of reaction. The  $K_m$  values of enzymes toward syringaldazine were 10  $\mu$ M (LacI) and 8  $\mu$ M (Lac II). Sodium azide inhibited Lac I (85 %) and Lac II (75 %) activities.

## Introduction

Laccase (benzenediol:oxygen oxidoreductase (EC 1.10.3.2) is a copper-containing enzyme that catalyzes the oxidation of a phenolic substrate by coupling it to the reduction of O<sub>2</sub> to water. Their function in fungi is varied and includes regulation of morphology, control of virulence and nutrition, and their ability to delignify woody tissues (Leonowicz *et al.* 2001). In addition to the strictly biological functions, laccases are increasingly being investigated for a variety of practical applications including decolorizing and detoxifying effluents, drug analysis, textile dye bleaching, synthesis of polymers and bioremediation (Mayer & Staples 2002). Each application requires unique properties with respect to specificity, stability, temperature and pH dependence. Therefore, screening of microorganisms with laccase activities could facilitate the discovery of novel enzyme for different purposes.

In many fungal species the presence of both constitutive and inducible laccases have been reported and it is present in multiple isoforms with different properties (Mayer & Staples 2002; Leonowicz *et al.* 2001). Although there have been many papers dealing with laccase-producing fungus such as *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispora* and *Agaricus bisporus* (Leonowicz *et al.* 2001), only limited research has been directed towards the laccase produced by members of the genus *Pycnoporus* (Eggert *et al.* 1996; Pointing *et al.* 2000; Vikineswary *et al.* 2006). In the present work we investigated the laccase activities of *Py. sanguineus* and described some of the biochemical properties of two isoforms of laccase from the culture broth.

## **Materials and methods**

### *Organism and culture conditions*

*Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 was obtained from Fundação André Tosello, Campinas, São Paulo, Brazil. *Py. sanguineus* conidia ( $1.0 \times 10^7$  conidia ml<sup>-1</sup>) were inoculated in liquid medium containing 12.5 g/l malt extract, 0.005 g/l CuSO<sub>4</sub>, 1 g/l Tween 80 and 0.05 g/l 2,5-xylydine, and incubated at 28 °C with shaking (140 rpm). Fungal biomass was determined at specific time intervals by vacuum filtering mycelia through filter paper, washed with distilled water and dried to constant weight at 80 °C. Laccase activity was monitored by removing 5 ml of culture filtrate at intervals.

### *Laccase assay*

Laccase activity was determined at 30 °C using 0.1 mM syringaldazine ( $\epsilon_m = 6.5 \times 10^4$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) in reaction mixture (1 ml) containing 50 mM citrate/phosphate buffer (pH 4.8 and 4.2), and 60 µl of the culture supernatant for 5 min. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 µM syringaldazine under standard assay conditions. Assays were carried out in triplicate for each dilution and at least on two different dilutions. Standard deviation did not exceed 10 % of the average values. Protein concentration was determined by the method of Bradford with BSA as standard.

### *Chromatography method*

Enzyme solution was fractionated using a phenyl-Sepharose High Performance column (1 x 17 cm) equilibrated with 50 mM acetate buffer, pH 5.0, with 2 M ammonium sulphate. Laccase isoforms

were eluted with a linear gradient of 2 to 0 M ammonium sulphate, at 2 ml min<sup>-1</sup>. Fractions (1ml) were collected and the protein concentration (280 nm) and enzyme activity were determined.

### ***Electrophoresis and enzymatic activities in gels***

After SDS-PAGE (12 % w/v), gels were washed three times with 50 mM sodium acetate (pH 4.5) for 45 min, and then incubated at 28 °C for 10 min in a solution containing 0.5 mM ABTS. Protein bands exhibiting laccase activity stained green with ABTS (Gonçalves & Steiner 1996).

## ***Results and discussion***

### *Enzyme production*

Laccases is one of the important enzymes produced by fungi that have various biotechnology applications (Mayer & Staples 2002). Among white-rot fungi, *Py. sanguineus* have been reported to produce laccase on solid substrate fermentation (Vikineswary *et al.* 2006) and submerged liquid culture (Pointing *et al.* 2000). This work focused on the characterization of two laccases from culture supernatant of *Py. sanguineus* induced by 2,5-xylydine, a commonly used inducer for fungal secretion of laccase (Eggert *et al.* 1996; Périe *et al.* 1998; Jung *et al.* 2002). Laccase activity in the extracellular fluid of *Py. sanguineus* cultures supplemented with 0.05g/l of 2,5-xylydine are shown in Fig. 1. Laccase activity was enhanced 14-fold by the addition 2,5-xylydine to cultures. A similar effect has been demonstrated in *Py. cinnabarinus*, in which addition of 2,5-xylydine enhanced the laccase activity about 9-fold, compared with cultures without inducer (Eggert *et al.* 1996). Laccase production coincided with the synthesis of an orange pigment by the fungus under induced culture.

### *Enzyme characterization*

The enzyme was purified as shown in Fig. 2. Two laccases were seen: Lac I (major fraction) and Lac II (minor fraction). SDS-PAGE analysis of these fractions confirmed them to be laccases (Fig. 3) with estimated  $M_r$  values of 80 and 68 kDa, respectively. The molecular masses of these laccases are consistent with the molecular masses of most other fungal laccases, which are between 60 and 80 kDa (Thurston, 1994, Mayer & Staples 2002). Many laccases are produced as multiple isoforms, e.g. *Trametes villosa* produces at least three isoforms and *Pleurotus ostreatus* four isoforms (Leonowicz *et al.* 2001). This heterogeneity could be due to differences in the extent of glycosylation as described by laccase B from *Trametes sp.* AH28-2 (Xiao *et al.* 2004).

Optimum pHs of Lac I and Lac II were 4.8 and 4.2, respectively (Table 1). Optimum temperatures of Lac I and Lac II were 30 and 50 °C, respectively (Table 1). Lac I was less stable since it presented a fast decline in its activity after incubation at 50 °C, in pH 4.8 for 120 min of pre-incubation. However, Lac II maintained a 100 % of activity at temperature of 50 °C, even after 120 min. Some fungal laccases are thermostable, although the most white-rot fungi laccases are not active at temperatures higher than 50 °C (Cambria *et al.* 2000; Das *et al.* 2001; Hublick & Shinner 2000).

Syringaldazine, which is considered a specific substrate for laccase (Harkin & Obst 1973), exhibited a  $K_m$  of 10  $\mu$ M and 8  $\mu$ M, for Lac I and Lac II, respectively. In keeping with the general properties of fungal laccases, both enzymes were strongly inhibited by 10  $\mu$ M sodium azide (Table 1), a common inhibitor of metalloenzymes (Sugumaran 1995).

### **Acknowledgments**

This work was supported by Grants from CNPq, FUNAPE/UFG and International Foundation for Science (IFS – W/3433-1). TAG was supported by CAPES/Brazil.

## References

Cambria MT, Cambria A, Ragusa S, Rizzarelli E (2000) Production, purification and properties of an extracellular laccase from *Rigidoporus lignosus*. *Protein Expres. Purif.* **18**: 141-147.

Das N, Chakraborty TK, Mukherjee M (2001) Purification and characterization of a growth-regulation laccase from *Pleurotus florida*. *J. Basic Microbiol.* **41**: 261-267.

Eggert C, Temp U, Eriksson KE (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1151-1158.

Gonçalves MLFC, Steiner W (1996) Detection of laccase activity in polyacrylamide gels after electrophoresis under denaturing conditions. *Biotech. Tech.* **10**(9): 667-668.

Harkin JM, Obst JR (1973) Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidases in fungi. *Experientia* **29**(4): 381-387.

Hublick G, Schinner F (2000) Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enz. Microbial Technol.* **27**: 330-336.

Jung H, Xu F, Li K (2002) Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Enz. Microbial Technol.* **30**: 161-168.

Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesernberg D, Rogalski J (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* **41**(4): 185-227.

Mayer AM, Staples RC (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**: 551-565.

Périer FH, Reddy GVB, Blackburn NJ, Gold MH (1998) Purification and characterization of laccases from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Arch. Biochem. Biophys.* **353**(2): 349-355.

Pointing SB, Jones EBG, Vrijmoed LLP (2000) Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. *Mycologia* **92**(1): 139-144

Sugumaran M (1995) A caution about azide inhibition of enzymes associated with electrophilic metabolites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**: 834-839.

Thurston CF (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26.

Vikineswary S, Noorlidah A, Renuvathani M, Sekaran M, Pandey A, Jones EBG (2006) Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Biores. Technol.* **97**: 171-177.

Xiao YZ, Chen Q, Hang J, Shi YY, Wu J, Hong YZ, Wang YP (2004) Selective induction, purification and characterization of a laccase isoenzyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia* **96**(1): 26-35.

Table 1. Biochemical properties of the laccases isoforms from *Pycnoporus sanguineus*

Biochemical properties	Laccase I	Laccase II
Molecular weight	80 kDa	68 kDa
pH optimum	4.8	4.2
Temp. optimum (°C) 5min	30	50
Temperature stability (50 °C)		
pH 4.8/60 min	71 %	ND
pH 4.8/120 min	0	ND
pH 4.2/60 min	ND	100 %
pH 4.2/120min	ND	100 %
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	10	8
$V_{\text{max}}$ ( $\text{U ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	151	195
Inhibition by $\text{NaN}_3$ (10 $\mu\text{M}$ )	85 %	77 %

ND: Not Determined. The molecular weights of the enzymes were determined by gel filtration on Sephacryl S-200. The effect of pH on the enzyme activity was determined by varying the pH of the reaction mixtures using citrate/phosphate buffer (pH 2.6-7.0). The effect of temperature on the enzymatic activity was determined at the pH optimum, in the range of 20 °C to 70 °C. The effect of temperature on the enzyme stability was analyzed by previously incubating the enzyme at 50 °C for 60 and 120 min. Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) was determined by non-linear-regression analysis of data obtained by measuring the rate of oxidation of syringaldazine (from 5 to 60  $\mu\text{M}$ ). The inhibition of the enzymes activities by  $\text{NaN}_3$  was determined through previous incubation of the enzyme with 10  $\mu\text{M}$  during 5 min. Results are means values of three replicates.

**Figure legends**

*Fig.1.* Time course of laccase production and biomass after growth of *Py. sanguineus* in liquid cultures containing 0.05 g/l 2,5–xylydine as inducer.

*Fig 2.* Elution profile of laccases from a crude extract of *Py. sanguineus* on a column of phenyl-Sepharose (1 x 17 cm) and equilibrated with 50 mM acetate buffer, pH 5.0, with 2 M ammonium sulphate. Laccase isoforms were eluted with a linear gradient of 2 to 0 M ammonium sulphate, at 2 ml min<sup>-1</sup>.

*Fig. 3.* Activity staining of the isoforms laccase. After SDS-PAGE the enzyme was renatured for washing of gels with 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) and stained with ABTS. The amounts of protein loaded were 0.3 µg (CE), 0.5 µg (Lac I) and 0.3 µg (Lac II).

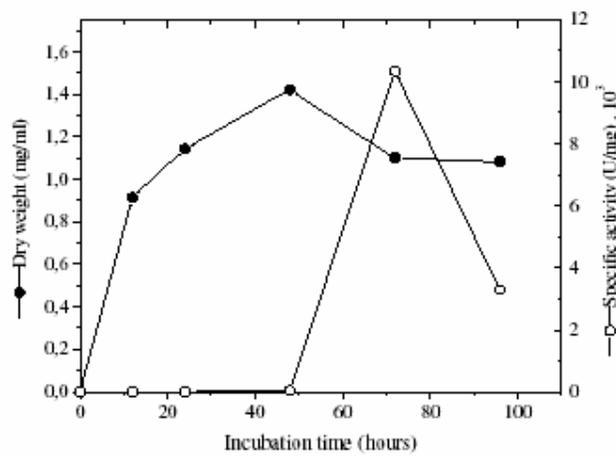


Fig.1.

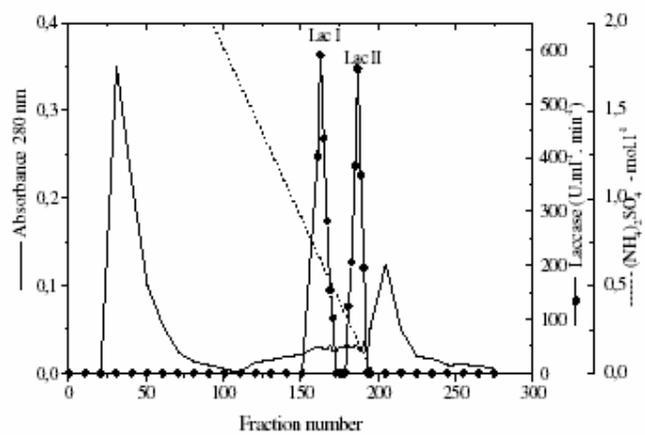
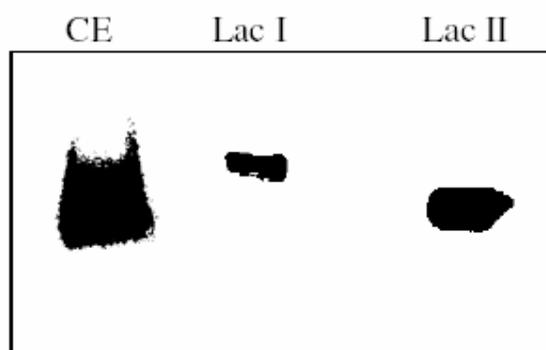


Fig 2.



*Fig. 3.*