

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA ENZIMA LACASE (EC 1.10.3.2) EXTRACELULAR OBTIDA ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Marcio Vinicius de Carvalho Barros Côrtes¹, Reginaldo Ramos de Menezes², Lúcia Moreira Campos Paiva² e Octávio Augusto Ceva Antunes²

Resumo

Efluentes contendo corantes, oriundos de processos industriais, consistem em grave problema ambiental. As tecnologias disponíveis para tratamento desses rejeitos são pouco efetivas, além de possuírem alto custo. Devido à capacidade de catalisar a oxidação de diversos compostos fenólicos, a enzima lacase consiste em uma alternativa plausível como agente para o tratamento de efluentes contendo corantes. O objetivo desse trabalho consistiu na obtenção, purificação e caracterização parcial do extrato de uma enzima lacase extracelular, secretada pelo fungo *Lentinus edodes* durante o processo de produção industrial do cogumelo comestível Shiitake, visando sua utilização futura em processos de remediação de ambientes e síntese orgânica. O extrato bruto foi obtido pela aplicação de solução tampão acetato 0,05 M ao substrato previamente cultivado. Foram empregadas metodologias clássicas de purificação e concentração de proteínas. Também foram aplicados métodos moleculares para caracterização do extrato protéico purificado. O material foi obtido com 14,8% de rendimento total. A massa molecular da proteína foi estimada em 84 KDa, com características monoméricas, além de não apresentar isoformas.

Palavras-chave: *Lentinus edodes*, corantes, tratamento de efluentes.

PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF AN EXTRACELLULAR LACCASE ENZYME (EC 1.10.3.2) OBTAINED BY SOLID-STATE FERMENTATION

Abstract

Wastewater containing dyes from industrial processes consists of major environmental problem. Besides being expensive, the available technologies for treating these wastes are not very effective. Due to the ability to catalyze

¹ Msc. Bioquímica - IQ-UFRJ-Embrapa CNPAF – marciiov@cnpaf.embrapa.br

² Professor (a) – Instituto de Química-UFRJ

the oxidation of various phenolic compounds, laccase enzyme is a plausible alternative as an agent for treatment of dye wastewater. The aim of the present study was the production, purification and partial characterization of an enzyme extract of extracellular laccase, secreted by the fungus *Lentinus edodes* during industrial production of edible Shiitake mushroom, for their future use in environment remediation processes and organic synthesis. The crude extract was obtained by applying 0.05 M acetate buffer solution to the used substrate. Classic methodologies were applied for purification and concentration of proteins. Molecular methods were also applied to characterize the purified protein extract. The material was obtained with 14.8% overall yield. Protein molecular weight was estimated 84 kDa, with monomeric characteristics, and no reported isoforms.

Key-words: *Lentinus edodes*, dye, wastewater treatment.

Introdução

Efluentes contendo corantes oriundos de processos industriais, principalmente os têxteis, contêm resíduos de difícil tratamento. Eles são caracterizados como altamente alcalinos, com alta demanda química e biológica de oxigênio, possuem alta concentração de sólidos dissolvidos, incluindo corantes. Sua origem sintética e a estável e complexa estrutura aromática dificultam a sua biodegradação (KAUSHIK & MALIK, 2009).

O tratamento usual desses efluentes envolve processos físicos ou químicos. Contudo, a utilização dessas tecnologias são geralmente pouco efetivas na remoção da cor, são de alto custo e pouco adaptáveis aos diversos tipos de corantes presentes nesses rejeitos (BANAT et al., 1996).

Um grande número de estudos vem sendo realizado na área de biomateriais capazes de biodegradar ou bioadsorver corantes oriundos de efluentes. As enzimas lacase (EC 1.10.3.2) e manganês peroxidase são reconhecidas como possíveis agentes para o tratamento de efluentes contendo corantes. Devido à baixa especificidade das reações catalisadas por essas macromoléculas, elas podem degradar um grande leque de compostos classificados como perigosos, permitindo sua aplicação em processos de biorremediação (SRINIVASAN & VIRARAGHAVAN, 2010).

O cogumelo asiático Shiitake, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., é o segundo cogumelo comestível mais popular no mundo. Para a produção comercial, o fungo é cultivado em condições artificiais, podendo ser inoculado em diferentes substratos lignocelulósicos (ROYSE et al., 1985). Para disponibilizar a fonte de carbono necessária para a obtenção de energia para o seu desenvolvimento, o fungo *L. edodes* produz e secreta enzima lacase no meio de cultivo, que degrada compostos lignocelulósicos, possibilitando assim a utilização do produto desta degradação no metabolismo deste microrganismo.

Devido ao seu elevado conteúdo de enzima lacase (YAVER et al., 2001), o uso do substrato previamente empregado na produção de Shiitake, no tratamento de resíduos industriais parece ser economicamente viável, pois trata-se da utilização de um rejeito agroindustrial para o tratamento de outro rejeito industrial ainda mais complexo.

Além da aplicação da enzima como agente biodegradador de corantes, há o seu uso potencial pela indústria em outros processos como: o de branqueamento ou clarificação da polpa na produção do papel, prevenção na descoloração de vinhos, na conversão enzimática de intermediários químicos e produção de outros compostos químicos derivados de lignina. Também parece ser interessante a sua utilização na recuperação de áreas de cultivo agrícola contaminadas com defensivos tóxicos (DURAN & ESPOSITO, 2000; PAICE et al., 1995; YAVER et al., 2001).

O objetivo deste trabalho consistiu na obtenção, purificação e caracterização parcial do extrato de uma enzima lacase extracelular, secretada pelo fungo *Lentinus edodes* durante a produção industrial do cogumelo comestível Shiitake, visando estudar a sua utilização futura em processos de remediação de ambientes e síntese orgânica.

Material e Métodos

Preparo do inóculo. Frações de uma cultura pura de *Lentinus edodes* cepa CC-18, fornecida pelo banco de germoplasma da Embrapa Cenargen, previamente crescidas em meio ágar batata dextrose, foram inoculadas em

meio de cultivo sólido composto por serragem de eucalipto e farelo de trigo, acondicionado em sacos plásticos autoclaváveis, gerando blocos de 500 g. O material foi umidificado e previamente esterilizado por sessenta minutos em autoclave. Os blocos foram incubados em temperatura de 25°C por sessenta dias. Cinco blocos foram preparados nas mesmas condições.

Preparo do extrato bruto. Os conteúdos dos cinco blocos foram agregados. Foram pesados 450 g da cultura, onde foi adicionado quantidade de solução de tampão acetato 0,05 M com pH = 4,7, contendo 40% de sulfato de amônio, correspondente à proporção 1:1,5 (g de cultura:mL de solução tampão). A mistura obtida foi homogeneizada por 45 minutos, mantendo-a sempre em banho de gelo. Procedeu-se uma filtração simples em papel de filtro qualitativo. O filtrado bruto foi centrifugado a 5000 g a 5°C por 30 minutos. Foi recolhido o sobrenadante.

Dosagem de proteínas. A dosagem protéica foi executada segundo Bradford (1963), utilizando como padrão albumina de soro bovino em cinco diferentes concentrações entre 0,0 e 1,0 mg.mL⁻¹.

Purificação da enzima com atividade enzimática. Ao filtrado límpido foi adicionado, lentamente, sulfato de amônio até 80% da saturação da solução, em banho de gelo sob lenta agitação. A mistura foi mantida em temperatura de aproximadamente -10°C por 24 horas. Decorrido o tempo pré-determinado, o material foi centrifugado a 5000 xg a 5°C por 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material sedimentado foi solubilizado totalmente em volume mínimo suficiente com tampão acetato 0,05 M em pH = 4,7. Esse conteúdo foi em seguida eluído em uma coluna com resina de troca iônica DEAE Sephacel. Ao conteúdo resultante foi mais uma vez adicionado, lentamente, sulfato de amônio até 80% da saturação, em banho de gelo, sob lenta agitação. A suspensão resultante foi centrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente e o precipitado foi suspenso em uma solução de sulfato de amônio 80 %.

Caracterização do extrato protéico por espectrometria no UV e visível. O espectro foi obtido em espectrofotômetro DU 70, onde se fez a varredura no visível e UV, abrangendo a faixa de comprimento de onda: 200 – 700 nm. Para tal, a amostra foi diluída adequadamente em tampão acetato 0,05 M.

Dosagem de atividade enzimática. Para a determinação da atividade lacásica 10 μL ou 100 μL de extrato enzimático purificado e concentrado foi adicionado em cubeta de vidro contendo tampão acetato 0,05 M em pH corrigido para 4,7, em volume necessário para que o volume final de ensaio fosse igual a 3,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 100 μL de solução 1 mM de 2,2-Azino-Bis(etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS). A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro DU 70 em comprimento de onda de 420 nm, correspondente ao máximo de absorção do cátion radical (coeficiente de extinção igual a $36 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), produto da oxidação do ABTS, catalisada pela enzima lacase. A atividade enzimática foi expressa em unidades internacionais (U) onde define-se que 1U corresponde à quantidade de enzima responsável por oxidar 0,1 μmol de ABTS, a 25°C em um minuto.

Determinação do pH reacional ótimo. O extrato enzimático foi submetido a ensaio de atividade enzimática conforme descrito anteriormente, substituindo o tampão reacional composto originalmente por tampão acetato 0,05 M em pH corrigido para 4,7, pelo mesmo tampão com pH corrigido para 3,5; 4,0; 4,5; 4,7; 4,9; 5,0 e 6,0. Também foi substituído pelos tampões citrato 0,1 M / fosfato 0,2 M em pH = 4,0 e 4,7. O ensaio foi realizado a temperatura de 25°C .

Avaliação da estabilidade do extrato enzimático. O extrato purificado concentrado, tanto na forma de suspensão em uma solução de sulfato de amônio 80% quanto na forma solubilizada em quantidade mínima necessária de tampão acetato 0,05 M, foram armazenados em freezer (temperatura de aproximadamente -5°C). Acompanhou-se então a variação na medida de atividade por um período de oito semanas. A determinação da atividade enzimática foi realizada como descrito anteriormente.

Caracterização do extrato enzimático por SDS-PAGE e Native-PAGE. A eletroforese (SDS-PAGE) do extrato obtido foi executada de acordo com Laemmli (1970). A voltagem aplicada foi de 170 Volts constantes por 45 minutos. O gel utilizado foi preparado a 12%. Utilizou-se, também, padrões protéicos no sentido de se estimar os pesos moleculares das frações contidas na amostra. Também procedeu-se ao fracionamento protéico do extrato enzimático em condições

nativas ou não desnaturantes (zimograma), utilizando solução de ABTS 100 mM em tampão acetato 0,05 M com pH = 4,7 como revelador da reação.

Resultados e Discussão

O processo extrativo da enzima lacase a partir do substrato de cultivo do cogumelo Shiitake, resultou em um volume total final de cerca de 2000 mL de extrato lacásico bruto. Esse material, após ser submetido às etapas de purificação e concentração, resultou num extrato protéico concentrado de 0,45 mg.mL⁻¹ de proteínas totais. Os rendimentos em cada etapa do processo envolvendo a extração, a purificação e a concentração do material são apresentados na Tabela 1, assim como as atividades enzimáticas totais.

É importante ressaltar que a etapa de aplicação no material enzimático em resina DEAE Sephacel foi necessária para a eliminação dos compostos fenólicos contidos no extrato bruto. Essas moléculas poderiam fatalmente levar a falsos resultados de medição da atividade enzimática por causar inibição competitiva da enzima pelo substrato da reação.

O rendimento total do processo de purificação correspondeu a 14,8%. Como o foco do trabalho era a obtenção de um preparado enzimático puro e compatível com a realização de estudos de sua possível aplicação prática, o rendimento apresentado pareceu ser satisfatório ao fim a que se destina.

Tabela 1 – Atividade enzimática e rendimento resultante das etapas do processo de purificação do extrato enzimático. Os rendimentos percentuais se referem sempre ao extrato bruto.

<i>Etapas de Purificação</i>	<i>Atividade Total (U)</i>	<i>Rendimento (%)</i>
Extrato bruto inicial filtrado	45,58	100
Precipitado a 80% de saturação com (NH ₄) ₂ SO ₄ resuspensão em tampão acetato 0,05M pH = 4,7	16,77	36,8
Cromatografia em coluna DEAE Sephacel	9,64	21,1
Suspensão de Lacase purificada em solução (NH ₄) ₂ SO ₄ 80%	6,77	14,8

O primeiro ensaio aplicado para atribuição da pureza do extrato concentrado foi o de caracterização do espectro de varredura nos comprimentos de onda compreendidos entre o ultravioleta e o visível (Figura 1).

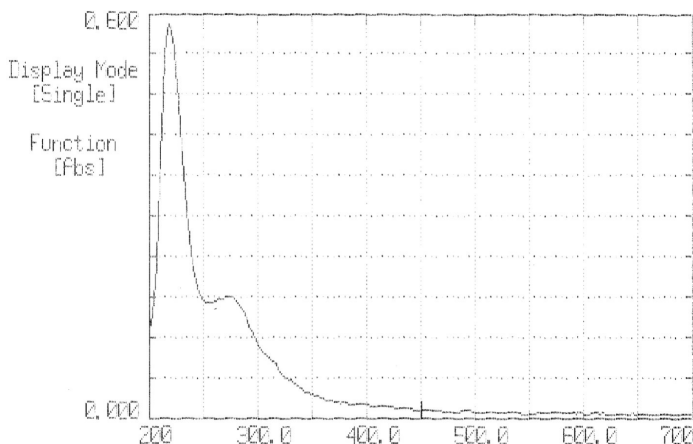


Figura 1 – Espectro de absorção do extrato enzimático purificado em comprimentos de onda entre 200 e 700 nm.

O espectro de absorção do extrato puro concentrado apresentou sinais de máxima absorção próximos a 220 nm e 280 nm. Nenhum outro sinal intenso de absorção foi detectado no espectro. Esses dados são muito relevantes, pois são típicos do espectro de varredura de proteínas purificadas, levando-nos a crer que o extrato obtido fosse realmente composto por material protéico concentrado.

Para caracterizar detalhadamente o extrato enzimático concentrado, em termos do seu conteúdo protéico, também se procedeu ao fracionamento de proteínas em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), resultado observado na Figura 2. O método empregado é descrito na literatura sendo capaz de detectar quantidades de proteínas inferiores a 1,0 µg (BRADFORD, 1976).

A amostra revelada no gel apresentou uma única banda de proteína, de massa molecular estimada em aproximadamente 84 KDa. Com esse resultado foi possível confirmar a pureza do preparado enzimático e também estimar a massa molecular da molécula lacase obtida. Ainda, observando o mesmo gel,

nos pareceu que a molécula protéica estudada tratava-se de um monômero ou uma macromolécula com subunidades muito semelhantes em termos de massa molecular. Essa informação é plausível, pois caso a molécula purificada fosse um dímero, ou outro tipo de proteína com mais de uma subunidade de diferentes massas moleculares, o fracionamento protéico em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes separaria as porções da proteína, revelando maior número de bandas.

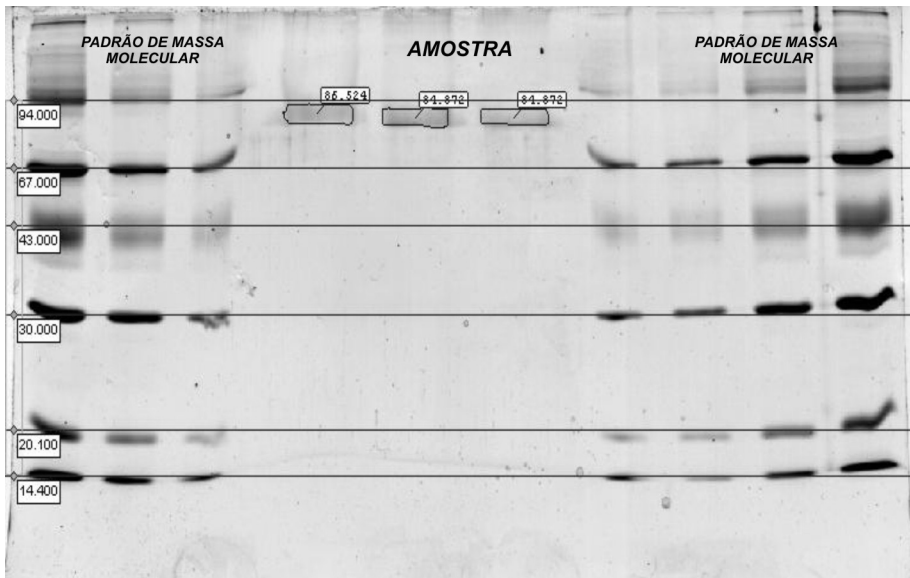


Figura 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Os padrões de massa molecular foram: 14,4 ; 20,1; 30,0; 43,0; 67,0 e 94 KDa.

Um outro resultado para caracterização do extrato enzimático foi obtido pela execução do seu zimograma. Nesse experimento, apenas as frações protéicas com atividade lacásica, separadas em gel de poliacrilamida em condições nativas, seriam reveladas. Dessa forma, é possível avaliar a presença ou não de isoformas da proteína em estudo. A Figura 3 apresenta o zimograma do extrato concentrado. Nesse gel foi verificada apenas uma única forma da enzima lacase, devido à presença de uma única banda de material enzimático revelado.



Figura 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida Native-PAGE. A) 5 μ L do extrato purificado. B) 25 μ L do extrato purificado.

Finalizada a caracterização da pureza do extrato lacásico obtido, foram determinadas algumas propriedades da molécula produzida, relacionadas à sua estabilidade e condições reacionais ótimas.

Para se maximizar os processos faz-se necessário selecionar as melhores condições reacionais. Ao se trabalhar com enzimas, sua conformação tridimensional é um dos fatores limitantes, visando a sua ótima utilização no processo reacional, e o pH e a força iônica são algumas das variáveis que influenciam diretamente nessa característica. Sendo assim, o extrato enzimático foi submetido a diferentes meios reacionais em termos de potencial de hidrogênio e força iônica.

Avaliando os dados obtidos na Figura 4 e Tabela 2, observa-se que com o pH em torno de 4,7 e um meio reacional com menor intensidade de força iônica (no caso tampão acetato 0,05 M), a reação enzimática foi processada de forma mais eficiente, sendo essas algumas das condições ótimas para o processo reacional estudado.

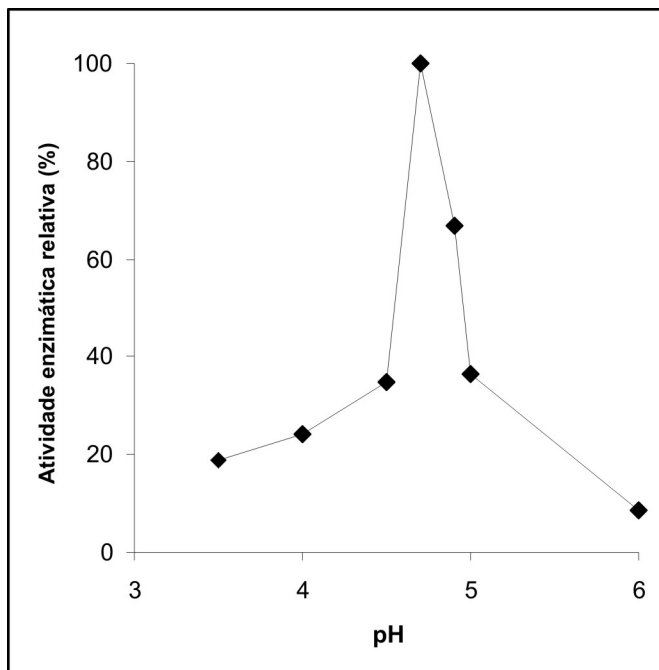


Figura 4 – Determinação de pH ótimo de atividade enzimática da enzima lacase utilizando tampão acetato 0,05 M corrigido em diferentes valores de pH entre 3,5 e 6,0. A temperatura do ensaio foi mantida em 25°C.

Tabela 2 – Determinação de pH ótimo de atividade enzimática da enzima lacase utilizando tampão acetato 0,05 M e tampão citrato 0,1 M / fosfato 0,2 M, corrigidos em pH 4,0 e 4,7.

<i>Meio Reacional (Solução Tampão)</i>	<i>Atividade Relativa (%)</i>
Acetato de sódio 0,05 M pH = 4,7	100
Acetato de sódio 0,05 M pH = 4,0	24,4
Citrato 0,1 M / Fosfato 0,2 M pH = 4,7	11
Citrato 0,1 M / Fosfato 0,2 M pH =4,0	19,5

A estabilidade do extrato enzimático frente ao armazenamento durante um período de oito semanas também foi avaliada. Esse dado é muito relevante, pois um material com alta instabilidade mostra-se automaticamente inviável

para aplicações em processos de grande escala. A Figura 5 mostra os dados de estabilidade do material enzimático em duas diferentes preparações ao longo de oito semanas.

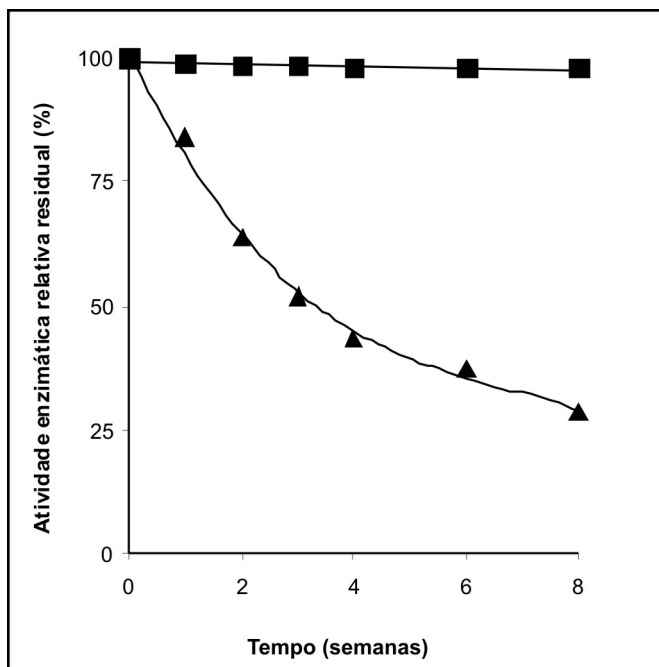


Figura 5 – Estabilidade do extrato enzimático armazenado em médio prazo, a baixas temperaturas (-5°C), em: ■ suspensão em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e ▲ solução tampão acetato 0,05M pH = 4,7.

Pelos dados obtidos, foi observado que o armazenamento do extrato puro concentrado em suspensão de sulfato de amônio 80%, juntamente com temperatura de -5°C foi o melhor método de estocagem em médio prazo para o acondicionamento do preparado protéico.

Conclusão

Foi obtido, purificado e parcialmente caracterizado um extrato da enzima

lacase com características ideais para estudos de sua futura utilização como agente remediador de problemas ambientais, relacionados principalmente ao tratamento de efluentes de indústrias têxteis e solos contaminados com defensivos agrícolas, além da sua aplicação em outras atividades como a síntese orgânica e no processo de branqueamento da produção de papel.

Referências Bibliográficas

BANAT, I. M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. The use of a thermotolerant fermentative *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast strain for ethanol production. **Acta Biotechnologica**, v. 16, n.2-3, p. 215-223, 1996.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, 5 p. 1963.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, n.3-4, p. 83-99, Dec. 2000.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolorization: recent advances and future potential. **Environment International**, v. 35, n. 1, p. 127-141, Jan. 2009.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n.5.259, p. 680-685, Ag. 1970.

PAICE, M.G., BOURBONNAIS, R., REID, I.D., ARCHIBALD, F.S. AND JURASEK, L. Oxidative bleaching enzymes: a review. **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 21, p. 280-284, 1995.

ROYSE, D.J.; SCHISLER, L.C.; DIEHLE, D.A. Shiitake mushrooms: consumption, production and cultivation. **Interdisciplinary Science Review**, v.10, p. 329-335, 1985.

SRINIVASAN, A.; VIRARAGHAVAN, T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 91, n.10, p. 1915-1929, Oct. 2010.

YAYER, D.S., BERKA, R.M., BROWN, S.H. AND XU, F. Cloning, characterisation, expression and commercialisation of fungal laccases. In: SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN LIGNIN BIODEGRADATION AND BIOSYNTHESIS,8., 2001, [S.1]. **Anais...** [S.1]: 2001.