

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E  
BIOTECNOLOGIA

JULIANA SILVEIRA DO VALLE

**PRODUÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
LACASES DE *Agaricus blazei* OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAIS**

CURITIBA

2012

JULIANA SILVEIRA DO VALLE

**PRODUÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
LACASES DE *Agaricus blazei* OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS  
AGROINDUSTRIAIS**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Processos Biotecnológicos, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Concentração Agroindústria, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2012

## TERMO DE APROVAÇÃO

JULIANA SILVEIRA DO VALLE

### **PRODUÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LACASES DE *Agaricus blazei* OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Departamento de Engenharia Química da Unidade de Biotecnologia Industrial na Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberghe  
Departamento de Engenharia Química, UFPR

Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos  
Departamento de Genética, UEL

Profa. Dra. Gisella Maria Zanin  
Departamento de Engenharia Química, UEM

Profa. Dra. Michele Rigon Spier  
Departamento de Engenharia Química, UFPR

Profa. Dra. Suzan Grace Karp  
Universidade Positivo

Curitiba, 21 de novembro de 2012.

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Luciana Vandenberghe, pela orientação, apoio, incentivo, confiança e, sobretudo pelas valiosas discussões científicas, pela disposição em ensinar e pela oportunidade de trabalhar na área de bioprocessos e biotecnologia. Obrigada por tudo.

Ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pela coorientação e apoio.

Aos professores Drs. Fernando Gomes Barcellos, Gisella Maria Zanin, Michele Rigon Spier e Susan Grace Karp por aceitarem realizar a apreciação crítica desta tese e participarem da banca de defesa.

Aos meus queridos Rui Torres e Cuca pelo amor, companheirismo, carinho, apoio, incentivo e compreensão. Sua calma apaziguadora foi extremamente valiosa durante a execução deste trabalho. Todo meu amor a vocês.

Aos meus pais Gerson do Valle e Maria de Lourdes do Valle por mesmo à distância estarem sempre comigo e por terem me mostrado desde cedo que a educação e a ética são os bens mais valiosos.

Às minhas queridas irmãs Cristina, Paula e Flávia e ao meu sobrinho Rafael sem os quais eu seria somente parte do que sou hoje.

Aos amigos Nelson Colauto, Giani Linde e Fernando Barcellos pela amizade, apoio, incentivo e auxílio técnico durante toda a execução deste trabalho.

A todos os alunos do Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAR pelo apoio e cooperação, em especial aos queridos Débora Dias, Josué Silva, Suzana Humeo e Thiago Santana pelo apoio, amizade e por tantas horas divertidas.

A todos os docentes da Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela valiosa contribuição à minha formação.

Aos colegas da Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos pelo apoio.

Aos colegas professores, coordenadores e diretores da UNIPAR pelo apoio e compreensão.

À Universidade Paranaense – UNIPAR pela oportunidade e pelo apoio financeiro durante a execução desta tese.

Olhem de novo para o ponto. É ali. É a nossa casa. Somos nós.  
Nesse ponto, todos aqueles que amamos, que conhecemos,  
de quem já ouvimos falar, todos os seres humanos que já existiram,  
viveram ou viveram as suas vidas.  
Toda a nossa mistura de alegria e sofrimento,  
todas as inúmeras religiões, ideologias e doutrinas econômicas,  
todos os caçadores e saqueadores, heróis e covardes,  
criadores e destruidores de civilizações, reis e camponeses,  
jovens casais apaixonados, pais e mães, todas as crianças,  
todos os inventores e exploradores, professores de moral,  
políticos corruptos, “superastros”, “líderes supremos”,  
todos os santos e pecadores da história da nossa espécie,  
ali - num grão de poeira suspenso num raio de sol.

Carl Sagan

## RESUMO

Lacases são multicobre oxidases que reduzem oxigênio a água ao mesmo tempo em que oxidam um substrato do tipo *p*-diidroxifenol ou outro composto fenólico. São enzimas comuns a vários organismos, mas a maior parte foi isolada de fungos. Sua baixa especificidade a substratos torna a lacase uma enzima com potencial para aplicação em diversos processos industriais. Sua síntese e secreção são influenciadas pelos níveis de nutrientes, condições de cultivo e pela adição de compostos fenólicos ou aromáticos que atuam como indutores da atividade. O uso de resíduos agroindustriais para produção de lacases permite o desenvolvimento de bioprocessos empregando-se substratos alternativos e de baixo custo, bem como a redução da degradação ambiental causada pelo descarte desses resíduos. Os objetivos desse trabalho foram produzir lacases de *Agaricus blazei* por fermentação submersa utilizando resíduos agroindustriais como fontes alternativas de carbono, identificar, sequenciar e analisar genes de lacase dessa espécie. Para tanto cinco cepas pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Paranaense (UNIPAR) foram avaliadas. As cepas estudadas foram identificadas molecularmente como *Agaricus blazei* (U2/1, U2/2, U2/3 e U2/4) e *Pleurotus ostreatus* (U9/1). A produção de lacase sob diferentes concentrações da fonte nitrogênio e de  $\text{CuSO}_4$  foi estudada. Seis possíveis indutores foram analisados com o intuito de verificar o seu efeito sobre a atividade enzimática das cinco cepas. A produção de lacase em meio com ureia (6,0 g/L) e  $\text{CuSO}_4$  (150  $\mu\text{M}$ ) ao final de 21 dias atingiu 13,7  $\text{U mL}^{-1}$  por *A. blazei* (U2/4) e 14,2  $\text{U mL}^{-1}$  por *P. ostreatus* (U9/1). Dentre as cepas avaliadas e todas as condições testadas, as maiores atividades induzidas de lacase foram verificadas para *A. blazei* U2/4 (8,4  $\text{U mL}^{-1}$  com etanol e 8,5  $\text{U/mL}$  com guaiacol) e *P. ostreatus* U9/1 (15  $\text{U mL}^{-1}$  com etanol). Foram realizadas uma série de otimizações para a produção de lacase por fermentação submersa (FSm) utilizando como substratos resíduos agroindustriais com *Agaricus blazei* U2/4. O potencial dessa linhagem na produção de lacase por fermentação no estado sólido (FES) também foi estudado. A melhor fonte alternativa de carbono para produção de lacase em FSm foi o mel de cana. Após otimização das condições físico-químicas, verificou-se que o pico de atividade de lacase (9711  $\text{U L}^{-1}$ ) foi obtido em meio composto por mel de cana (6  $\text{g L}^{-1}$ ), ureia (1,5  $\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4$  (150  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MgSO}_4$  (12 mM), etanol (1,2 mM), a 28°C e pH 8,0 em 10 dias de cultivo. Em FES a maior atividade (284  $\text{U g}^{-1}$  na base seca) foi obtida após 7 dias com bagaço de cana suplementado com solução nutritiva contendo ureia (6,0  $\text{g L}^{-1}$ ) e  $\text{CuSO}_4$  (150  $\mu\text{M}$ ), pH 8,0 e temperatura de 28°C. Primers universais foram utilizados para identificar genes de lacase de *Agaricus blazei* (U2/1, U2/2, U2/3 e U2/4) e *Pleurotus ostreatus* (U9/1) por PCR. A digestão dos amplicons com endonucleases de restrição confirmou que os mesmos correspondiam a mais de um gene. A análise da sequência dos amplicons revelou a presença de sequências consenso típicas de promotores (TATABox e CAATBox) e a presença de elementos relacionados à regulação da expressão gênica, como elementos sensíveis a xenobióticos e elementos de resposta ao stress. As sequências de aminoácidos deduzidas mostraram elevada similaridade dos genes estudados com outras lacases fúngicas e apresentaram ao menos um domínio conservado pertencente à família das cobre oxidases.

Palavras-chave: Lacase. *Agaricus blazei*. Indutores de lacase. Mel de cana. Bagaço de cana.

## ABSTRACT

Laccase is a copper-containing polyphenol oxidase that uses the redox capacity of copper ions to catalyze the oxidation of a wide range of phenolic substrates while reduces molecular oxygen to water. It is a common enzyme and has been found in diverse groups of organisms, especially occurring in fungi. Their wide substrate specificity makes them able to oxidize a broad range of compounds, with potential for application in various industrial processes. Its synthesis and secretion are influenced by the levels of nutrients, growth conditions and by the addition of phenolic or aromatic hydrocarbons which act as inducers of the activity. The use of agro-industrial residues for laccase production allows the development of bioprocesses with alternative and low cost substrates and helps solving pollution problems, which otherwise their disposal may cause. The objectives of this research were to produce laccases from *Agaricus blazei* by submerged fermentation with agro-industrial residues and to identify, sequence and analyze laccase coding genes. Five fungal strains from Universidade Paranaense (UNIPAR) were evaluated. The strains were molecularly identified as *Agaricus blazei* (U2/1, U2/2, U2/3 e U2/4) and *Pleurotus ostreatus* (U9/1). The laccase production with different concentrations of nitrogen source and  $\text{CuSO}_4$  was analyzed. Six putative inducers of laccase activity were tested with the five strains. The laccase production with urea (6.0 g/L) and  $\text{CuSO}_4$  (150  $\mu\text{M}$ ) in 21 days was 13.7  $\text{U mL}^{-1}$  for *A. blazei* (U2/4) and 14.2  $\text{U mL}^{-1}$  for *P. ostreatus* (U9/1). Laccase activity of *A. blazei* U2/4 was induced by ethanol (8.4  $\text{U mL}^{-1}$ ) and guaiacol (8.5  $\text{U mL}^{-1}$ ) and that of *P. ostreatus* U9/1 was induced by ethanol (15  $\text{U mL}^{-1}$ ). A series of optimizations was carried out for the production of laccase by submerged fermentation (SmF) with agro-industrial residues and *Agaricus blazei* U2/4. The potential of this strain to produce laccase by solid state fermentation (SSF) was also evaluated. The best alternative carbon source for laccase production was sugarcane molasses. After optimization, it was found that the highest laccase activity (9,711  $\text{U L}^{-1}$ ) was obtained in a medium containing sugarcane molasses (6  $\text{g L}^{-1}$ ), urea (1.5  $\text{g L}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4$  (150  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MgSO}_4$  (12  $\text{mM}$ ), ethanol (1.2  $\text{mM}$ ), at 28°C and pH 8.0 after 10 days. The highest laccase activity in SSF (284  $\text{U g}^{-1}$ ) was obtained after 7 days with sugarcane bagasse supplemented with nutrient solution containing urea (6.0  $\text{g L}^{-1}$ ) and  $\text{CuSO}_4$  (150  $\mu\text{M}$ ), pH 8.0, and 28°C. Universal primers were used to identify laccase genes from *Agaricus blazei* (U2/1, U2/2, U2/3 e U2/4) and *Pleurotus ostreatus* (U9/1) by PCR. The digestion of the amplicons with restriction endonucleases confirmed that they corresponded to more than one gene. The sequence analysis revealed the presence of promoter's consensus sequences (TATABox and CAATBox) and the presence of elements related to the gene expression regulation, as xenobiotic responsive elements and stress responsive elements. The deduced amino acid sequences showed strong similarity to other fungal laccases genes studied and had at least one conserved domain belonging to the family of copper oxidases.

Keywords: Laccase. *Agaricus blazei*. Laccase inducers. Sugarcane molasses. Sugarcane bagasse.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.1:** Representação esquemática da parede celular vegetal com representação da espessura das diferentes camadas, abundância relativa e localização dos diferentes componentes.....21
- Figura 1.2:** Representação do ciclo catalítico da lacase .....24
- Figura 1.3:** Representação dos sítios de cobre T1 (Cu1), T2/T3 (Cu4/Cu2-Cu3) da lacase de *Bacillus subtilis*, com indicação das distâncias entre os átomos.....25
- Figura 1.4:** Representação esquemática da transferência de elétrons entre os sítios catalíticos de lacases durante a oxidação de substratos .....26
- Figura 1.5:** Exemplo dos substratos típicos de lacases. (A) siringaldazina; (B) DMP; (C) guaiaacol e (D) ABTS.....27
- Figura 1.6:** Representação do ciclo catalítico de lacases na presença de mediadores redox .....29

### CAPÍTULO II

- Figura 2.1:** Produtos da amplificação de ITS do DNA ribossomal de diferentes linhagens de fungos. M: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), linha 1: linhagem U2/1, linha 2: linhagem U2/2, linha 3: linhagem U2/3, linha 4: linhagem U2/4 e linha 5: linhagem U9/1 .....78
- Figura 2.2:** Atividade de lacase da linhagem U2/4 em diferentes concentrações de ureia (LN 0,6 g L<sup>-1</sup> – preto e HN 6 g L<sup>-1</sup> – cinza) e de cobre após vinte e um dias de cultivo. Médias indicadas com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ )..81
- Figura 2.3:** Atividade de lacase da linhagem U9/1 em diferentes concentrações de ureia (LN 0,6 g L<sup>-1</sup> – preto e HN 6 g L<sup>-1</sup> – cinza) e de cobre após vinte e um dias de cultivo. Médias indicadas com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ )..82
- Figura 2.4:** Média da produção de biomassa de U2/4 em diferentes concentrações de ureia (LN 0,6 g L<sup>-1</sup> – preto e HN 6 g L<sup>-1</sup> – cinza) e de cobre após vinte e um dias de cultivo. Médias indicadas com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ )83
- Figura 2.5:** Média da produção de biomassa de U9/1 em diferentes concentrações de ureia (0,6 g L<sup>-1</sup> – preto e 6 g L<sup>-1</sup> – cinza) e de cobre após vinte e um dias de cultivo. Médias indicadas com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ )..84
- Figura 2.6:** Média da atividade de lacase de *Agaricus blazei* U2/1 em diferentes concentrações dos compostos (A) pirogalol, (B) álcool veratrílico, (C) xilidina, (D)



vanilina e (E) etanol, ao longo de vinte e um dias de cultivo. Asteriscos indicam aumento significativo da atividade de lacase ( $p < 0,05$ ) ..... 88

**Figura 2.7:** Média da atividade de lacase de *Agaricus blazei* U2/2 em diferentes concentrações dos compostos (A) pirogalol, (B) álcool veratrílico, (C) xilidina, (D) vanilina, (E) guaiacol e (F) etanol, ao longo de vinte e um dias de cultivo. Asteriscos indicam aumento significativo da atividade de lacase ( $p < 0,05$ ) ..... 90

**Figura 2.8:** Média da atividade de lacase de *Agaricus blazei* U2/3 em diferentes concentrações dos compostos (A) pirogalol, (B) álcool veratrílico, (C) xilidina, (D) vanilina, (E) guaiacol e (F) etanol, ao longo de vinte e um dias de cultivo. Asteriscos indicam aumento significativo da atividade de lacase ( $p < 0,05$ ) ..... 92

**Figura 2.9:** Média da atividade de lacase de *Agaricus blazei* U2/4 em diferentes concentrações dos compostos (A) pirogalol, (B) álcool veratrílico, (C) xilidina, (D) vanilina, (E) guaiacol e (F) etanol, ao longo de vinte e um dias de cultivo. Asteriscos indicam aumento significativo da atividade de lacase ( $p < 0,05$ ) ..... 93

**Figura 2.10:** Média da atividade de lacase de *Pleurotus ostreatus* U9/1 em diferentes concentrações dos compostos (A) pirogalol, (B) álcool veratrílico, (C) xilidina, (D) vanilina, (E) guaiacol e (F) etanol, ao longo de vinte e um dias de cultivo. Asteriscos indicam aumento significativo da atividade de lacase ( $p < 0,05$ ) ..... 94

### CAPÍTULO III

**Figura 3.1:** Média da atividade de lacase de *Agaricus blazei* U2/4 em meio contendo diferentes fontes de nitrogênio - (U) ureia, (SA) sulfato de amônio, (EL) extrato de levedura, (U+SA) ureia e sulfato de amônio, (EL+SA) extrato de levedura e sulfato de amônio – após dez dias de cultivo. Médias indicadas com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) ..... 120

**Figura 3.2:** Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis concentração de (A) ureia, (B)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , (C) KCl, (D)  $\text{MgSO}_4$ , (E)  $\text{FeSO}_4$ , (F)  $\text{ZnSO}_4$  e (G) etanol sobre a atividade de lacase ..... 122

**Figura 3.3:** Diagrama de Pareto e parâmetros significativos ( $p \leq 0,1$ ) no estudo das concentrações de ureia, mel de cana (MC), sulfato de magnésio e etanol para produção de lacase ..... 124

**Figura 3.4:** Médias da atividade de lacase de *Agaricus blazei* U2/4 em meio contendo diferentes concentrações de ureia após dez dias de cultivo. Médias indicadas com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) ..... 126

**Figura 3.5:** Cinética da produção de lacase e de manganês peroxidase (MnP) de *Agaricus blazei* U2/4 por FSm com mel de cana ao longo de dez dias ..... 127

**Figura 3.6:** Cinética da produção de lacase de *Agaricus blazei* U2/4 por FSm com mel de cana e pH do meio de cultivo ao longo de dez dias ..... 128

**Figura 3.7:** Cinética da produção de açúcares redutores e biomassa de *Agaricus blazei* U2/4 por fermentação submersa com mel de cana ao longo de dez dias..... 129

**Figura 3.8:** Cinética da produção de lacase e de manganês peroxidase (MnP) de *Agaricus blazei* U2/4 por FES em bagaço de cana ao longo de dez dias ..... 131

**Figura 3.9:** Cinética da produção de lacase de *Agaricus blazei* U2/4 por FES em bagaço de cana e pH do suporte ao longo de dez dias ..... 132

**Figura 3.10:** Cinética da produção de açúcares redutores e lacase de *Agaricus blazei* U2/4 por FES em bagaço de cana ao longo de dez dias ..... 133

## CAPÍTULO IV

**Figura 4.1:** Produtos da amplificação de genes de lacase de *Agaricus blazei* (1) U2/1, (2) U2/2, (3) U2/3, (4) U2/4, *Pleurotus ostreatus* (5) 9/1 e (6) controle negativo (gel de agarose 1%) ..... 146

**Figura 4.2:** Produtos da amplificação de genes de lacase de *Agaricus blazei* (1) U2/1, (2) U2/2, (3) U2/3, (4) U2/4 e *Pleurotus ostreatus* (5) 9/1. (M) 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (gel de agarose 3%) ..... 147

**Figura 4.3:** Digestão de genes de lacase de *Agaricus blazei* e *Pleurotus ostreatus* com endonucleases de restrição. *Agaricus blazei* U2/1 (1, 6, 11 e 16), U2/2 (2, 7, 12 e 17), U2/3 (3, 8, 13 e 18) e U2/4 (4, 9, 14 e 19). *Pleurotus ostreatus* U9/1 (5, 10, 15 e 20). M = 1 kb Plus DNA Ladder..... 148

**Figura 4.4:** Alinhamento das sequências parciais de genes de lacase de *Agaricus blazei* (LacaseU21, U22, e U24) e *Pleurotus ostreatus* (LacaseU91). Prováveis elementos reguladores da expressão gênica como CAAT e TATA, um provável elemento de resposta a stress (ACCCCT) e dois prováveis elementos de resposta a xenobióticos (TGCGTG e TCACGC) são mostrados em destaque..... 152

**Figura 4.5:** Domínios conservados (CDs) identificados a partir da sequência nucleotídica parcial do gene de lacase de *Agaricus blazei* U2/1 ..... 155

**Figura 4.6:** Domínios conservados (CDs) identificados a partir da sequência nucleotídica parcial do gene de lacase de *Agaricus blazei* U2/2..... 156

**Figura 4.7:** Domínios conservados (CDs) identificados a partir da sequência nucleotídica parcial do gene de lacase de *Agaricus blazei* U2/4..... 157

**Figura 4.8:** Domínios conservados (CDs) identificados a partir da sequência nucleotídica parcial do gene de lacase de *Pleurotus ostreatus* U9/1 ..... 158

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.1:</b> Enzimas utilizadas em vários segmentos industriais e suas aplicações .....	19
<b>Tabela 1.2:</b> Produção de lacases fúngicas por fermentação submersa ou fermentação no estado sólido .....	32
<b>Tabela 1.3:</b> Exemplos de compostos aromáticos avaliados como indutores da atividade de lacases em fungos .....	39
<b>Tabela 1.4:</b> Comparação das sequências consenso de lacases de <i>Trametes vesicolor</i> (Tv1 e Tv2), <i>Coprinus cinereus</i> (Cc), <i>Lentinus tigrinus</i> (Lt) e <i>Trametes trogii</i> (Tt).....	41
<b>Tabela 1.5:</b> Preparações comerciais à base de lacases para aplicações na indústria têxtil.....	46

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 2.1:</b> Resultado da análise das sequências de ITS e da identificação molecular das cepas analisadas .....	79
<b>Tabela 2.2:</b> Efeito da concentração de nitrogênio (ureia) sobre a atividade de lacase após vinte e um dias de fermentação submersa.....	80
<b>Tabela 2.3:</b> Efeito de diferentes compostos aromáticos sobre o crescimento de diferentes linhagens de <i>Agaricus blazei</i> ao final de vinte e um dias de cultivo (média $\pm$ desvio padrão).....	86
<b>Tabela 2.4:</b> Efeito de diferentes compostos aromáticos sobre a atividade de lacase (média $\pm$ desvio padrão).....	97

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 3.1:</b> Características dos resíduos agroindustriais utilizados como substratos alternativos para produção de lacase.....	111
<b>Tabela 3.2:</b> Planejamento experimental do tipo Plackett & Burman para seleção de variáveis significativas para a produção de lacase por fermentação submersa de mel de cana .....	113
<b>Tabela 3.3:</b> Planejamento experimental do tipo Plackett & Burman para a segunda etapa da seleção de variáveis significativas para a produção de lacase por fermentação submersa de mel de cana .....	114

<b>Tabela 3.4:</b> Produção de lacase utilizando diferentes fontes de carbono por <i>Agaricus blazei</i> U2/4 após dez dias de fermentação submersa.....	118
<b>Tabela 3.5:</b> Efeito de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio sobre os níveis de lacase produzidos por <i>Agaricus blazei</i> U2/4 após dez dias de fermentação submersa de mel de cana.....	120
<b>Tabela 3.6:</b> Resultados do planejamento do tipo Plackett & Burman para seleção de variáveis significativas sobre a atividade de lacase obtida por fermentação submersa com mel de cana .....	121
<b>Tabela 3.7:</b> Análise de variância do planejamento do tipo Plackett & Burman para seleção de variáveis significativas sobre a atividade de lacase obtida por fermentação submersa com mel de cana .....	122
<b>Tabela 3.8:</b> Resultados do planejamento do tipo fatorial incompleto $2^{(4-1)}$ para análise das diferentes concentrações de mel de cana (MC), ureia (UR), $MgSO_4$ (Mg) e etanol (ET) na solução nutritiva para produção de lacase .....	124
<b>Tabela 3.9:</b> Análise de variância do planejamento do tipo fatorial incompleto $2^{(4-1)}$ para estudo das condições do meio de cultivo para produção de lacase por FSm com mel de cana .....	125
<b>Tabela 3.10:</b> Efeito dos diferentes suportes sobre os níveis de lacase produzidos por <i>Agaricus blazei</i> U2/4 após dez dias de FES .....	130

#### CAPÍTULO IV

<b>Tabela 4.1:</b> Sequência dos primers avaliados para triagem de genes de lacase de <i>Agaricus blazei</i> .....	142
<b>Tabela 4.2:</b> Somatória dos fragmentos resultantes da digestão dos produtos de PCR com endonuclease de restrição.....	149
<b>Tabela 4.3:</b> Tamanho das sequências parciais obtidas a partir do produto de amplificação de genes de lacase de <i>Agaricus blazei</i> e <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	150

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico)

C - carbono

CC – casca de café

Cys - cisteína

CS – casca de soja

DMP - 2,6-dimetoxifenol

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP - desoxirribonucleotídeo

DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico

EC - Enzyme Commission

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FES – fermentação em estado sólido

FSm – fermentação submersa

His – histidina

ITS – espaçador interno transcrito

kb – quilobases

$K_{cat}$  – constante catalítica ou número de *turnover*

$K_m$  – constante de Michaelis-Menten

kpb – quilo pares de base

MC – mel de cana

mg - miligrama

MnP – manganês peroxidase

MS – melaço de soja

pb – pares de base

pg - picograma

PC – polpa cítrica

PCR – reação de polimerização em cadeia

TAE - Tris acetato EDTA

*Taq* - *Thermus aquaticus*

U – unidade de atividade enzimática

U g<sup>-1</sup> – unidade de atividade enzimática por grama na base seca

U L<sup>-1</sup> – unidade de atividade enzimática por litro

U mL<sup>-1</sup> – unidade de atividade enzimática por mililitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16

### CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O MERCADO MUNDIAL DE ENZIMAS .....	18
1.2 LACASES .....	20
1.2.1 Ocorrência .....	21
1.2.2 Mecanismo de ação .....	23
1.2.3 Substratos de lacases .....	26
1.2.4 Inibidores .....	28
1.2.5 Mediadores da atividade de lacase .....	29
1.2.6 Produção de lacases fúngicas .....	31
1.2.6.1 Seleção de micro-organismos produtores de lacases .....	31
1.2.6.2 Nutrientes que afetam a produção de lacases .....	33
1.2.6.2.1 Fontes de carbono .....	33
1.2.6.2.2 Fontes de nitrogênio .....	34
1.2.6.2.3 Cobre .....	35
1.2.6.2.4 Indutores .....	38
1.2.7 Expressão gênica em fungos .....	40
1.2.7.1 Expressão heteróloga .....	42
1.2.8 Aplicações .....	44
1.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	49
1.4 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO .....	50
1.5 MATÉRIAS PRIMAS UTILIZADAS EM PROCESSOS FERMENTATIVOS .....	52
1.6 <i>Agaricus blazei</i> .....	53
1.7 REFERÊNCIAS .....	55

### CAPÍTULO II – SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS FÚNGICAS PRODUTORAS DE LACASE E ESCOLHA DE INDUTORES DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

RESUMO .....	70
2.1 INTRODUÇÃO .....	71
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	73
2.2.1 Seleção de linhagens produtoras de lacase por fermentação submersa .....	73
2.2.2 Identificação molecular dos fungos avaliados .....	74
2.2.2.1 Extração de DNA .....	74
2.2.2.2 Amplificação das regiões ITS do DNA ribossomal .....	74
2.2.2.3 Sequenciamento dos ITS e análise das sequências .....	75
2.2.3 Efeito da concentração de nitrogênio e adição de cobre sobre a produção de lacase .....	76
2.2.4 Seleção de substâncias indutoras da atividade de lacase .....	77

2.2.5 Determinação da atividade de lacase .....	77
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
2.3.1 Identificação molecular dos fungos avaliados .....	78
2.3.2 Efeito da concentração de nitrogênio e adição de cobre sobre a produção de lacase.....	79
2.3.3 Seleção de substâncias indutoras da atividade de lacase .....	84
2.4 CONCLUSÕES .....	100
2.5 REFERÊNCIAS.....	100

### **CAPÍTULO III - PRODUÇÃO DE LACASE POR *Agaricus blazei* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA E FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS**

RESUMO.....	107
3.1 INTRODUÇÃO .....	108
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	110
3.2.1 Micro-organismo.....	110
3.2.2 Seleção de fontes de carbono alternativas para produção de lacase .....	111
3.2.3 Produção de lacase em fermentação submersa (FSm) .....	112
3.2.4 Otimização da composição do meio de cultivo para produção de lacase por FSm com mel de cana .....	112
3.2.4.1 Estudo da influência das fontes de nitrogênio .....	112
3.2.4.2 Seleção de componentes do meio para produção de lacases por FSm .....	112
3.2.4.3 Segunda etapa de otimização da composição do meio de cultivo .....	113
3.2.4.4 Terceira etapa de otimização da composição do meio de cultivo .....	114
3.2.4.5 Análise estatística .....	114
3.2.5 Seleção de suporte/substrato para produção de lacase por FES .....	114
3.2.6 Produção de inóculo para FES.....	115
3.2.7 Processo de produção de lacase em FES .....	115
3.2.8 pH.....	116
3.2.9 Determinação de açúcares redutores.....	116
3.2.10 Extração enzimática .....	116
3.2.11 Determinação da atividade de lacase.....	117
3.2.12 Determinação da atividade de manganês peroxidase.....	117
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	118
3.3.1 Seleção de substratos alternativos para a produção de lacase .....	118
3.3.2 Otimização da composição do meio de cultivo para produção de lacase em FSm com mel de cana .....	119
3.3.2.1 Estudo da influência das fontes de nitrogênio .....	119
3.3.3 Seleção de componentes do meio para a produção de lacase por FSm .....	121
3.3.4 Segunda etapa de otimização da composição do meio para a produção de lacase em FSm .....	123
3.3.5 Terceira etapa de otimização da composição do meio de produção .....	125
3.3.6 Cinética da produção de lacase e manganês peroxidase em FSm sob condições otimizadas .....	127
3.3.7 Seleção de suporte/substrato para a produção de lacase por FES .....	129
3.3.8 Cinética da produção de lacase em FES de bagaço de cana .....	131
3.4 CONCLUSÕES .....	133
3.5 REFERÊNCIAS.....	134



## **CAPÍTULO IV - IDENTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE GENES CODIFICADORES DE LACASE DE *Agaricus blazei***

RESUMO.....	139
4.1 INTRODUÇÃO .....	140
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	141
4.2.1 Micro-organismos.....	141
4.2.2 Extração de DNA.....	142
4.2.3 Identificação de genes de lacase por PCR.....	142
4.2.4 Análise dos produtos de amplificação com endonucleases de restrição.....	143
4.2.5 Sequenciamento dos genes de lacase.....	144
4.2.6 Análise das sequências gênicas .....	144
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	145
4.3.1 Identificação de genes de lacase por PCR .....	145
4.3.2 Análise dos produtos de amplificação com endonucleases de restrição .....	148
4.3.3 Sequenciamento dos produtos da PCR e análise das sequências gênicas ..	149
4.4 CONCLUSÕES .....	159
4.5 REFERÊNCIAS.....	159
<b>3 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>165</b>
<b>4 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS .....</b>	<b>167</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Micro-organismos têm papel ecológico fundamental, contribuindo para a estabilidade de diferentes ecossistemas além de representarem uma importante fonte de recursos genéticos com grande potencial biotecnológico como na produção de antibióticos, enzimas e substâncias biologicamente ativas (KIRK et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006).

A degradação da biomassa vegetal lignocelulósica está relacionada com a manutenção do ciclo do carbono em ecossistemas terrestres. A degradação da lignina ocorre pela ação concomitante de diferentes enzimas ligninolíticas, dentre as quais se pode destacar as enzimas extracelulares lignina peroxidases (ligninase, LiP), manganês peroxidases (MnP) e lacases (MARTÍNEZ et al., 2005). Basidiomicetos são organismos chave nesses processos de decomposição devido a sua capacidade de translocar nutrientes e de produzir enzimas extracelulares (LAUBER et al., 2009).

Lacases são cobre polifenol oxidases (EC 1.10.3.2) que utilizam a capacidade redox de íons de cobre para catalisar a oxidação de uma grande variedade de substratos fenólicos, enquanto reduzem oxigênio molecular à água (THURSTON, 1994). Encontradas em vários grupos de organismos, as lacases são enzimas comuns e sua presença foi descrita em plantas, insetos, bactérias e fungos (MOROZOVA et al., 2007). Seu papel biológico ainda não está totalmente elucidado e parece variar dependendo do organismo. Por sua capacidade catalítica e eletrocatalítica, as lacases apresentam grande potencial para aplicação biotecnológica. Podem ser empregadas em processos da indústria de papel e celulose, têxtil, cosmética, na detoxificação de esgoto, em síntese inorgânica, para degradação de xenobióticos e biorremediação, produção de aglomerados e blocos de fibra de madeira sem o uso de agregantes tóxicos, na produção de detergentes entre outros (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007). A aplicação das lacases na prática se baseia em duas linhas relacionadas: a prospecção de enzimas com novas propriedades físico-químicas e de intensificadores e/ou promotores da atividade dessas enzimas (MOROZOVA et al., 2007).

A demanda crescente por processos industriais de menor custo, altamente específicos e que provoquem menor ou nenhum dano ambiental, tem incentivado a busca por novas enzimas com aplicações diversas. A produção comercial de uma

enzima envolve as etapas de produção, separação e recuperação da mesma. Nesse sentido, a utilização de resíduos agroindustriais em bioprocessos tem possibilitado a produção de enzimas empregando-se substratos alternativos e de baixo custo, bem como a redução da degradação ambiental causada pelo descarte desses resíduos (PANDEY et al., 2000; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Enzimas de interesse industrial, particularmente as lacases, têm sido amplamente produzidas pelo processo de fermentação submersa (FSm), pois os parâmetros do processo fermentativo são facilmente controlados e existem várias configurações de biorreatores que podem atender às exigências de produção dessa enzima (MAJEAU et al., 2010). Contudo, a produção de enzimas por FES tem demonstrado potencial cada vez maior uma vez que o fermentado pode ser usado diretamente como fonte de enzima, além de oferecer outras vantagens como elevada produtividade volumétrica, alta concentração de produtos, produção de menor quantidade de efluentes e uso de equipamentos simples (PANDEY et al., 1999; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

A busca por novas fontes de lacase tem crescido conforme aumenta a demanda por novas enzimas com características especiais. A investigação da grande diversidade de fungos basidiomicetos e dos mecanismos genéticos envolvidos na expressão de suas enzimas tem proporcionado aumento crescente do conhecimento nessa área (MAJEAU et al., 2010). *Agaricus blazei* é um cogumelo comestível nativo do Brasil cultivado mundialmente devido às suas propriedades medicinais (OHNO et al., 2011). Porém, o conhecimento sobre seu arsenal enzimático para degradação de biomassa vegetal e especialmente sobre a produção de lacases é bastante limitado.

Pouquíssimos trabalhos exploraram o potencial de linhagens de *A. blazei* em produzir lacases. Ullrich et al. (2005) relataram a produção de grandes quantidades de lacase ( $5000 \text{ U L}^{-1}$ ) por *A. blazei* em FSm de suco de tomate. A enzima foi isolada e caracterizada, demonstrando que essa espécie também pode produzir grandes quantidades dessa enzima. D'Agostini et al. (2011) avaliaram a produção de lacase por esse microrganismo por FES de casca de soja na presença de diferentes relações carbono/nitrogênio, produzindo em torno de  $60 \text{ U g}^{-1}$  de lacase. Até o momento, não há outros relatos sobre a produção de lacases, sua indução ou estudos relacionados à sua caracterização genética.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Produzir lacases de *Agaricus blazei* por fermentação submersa utilizando resíduos agroindustriais como fontes alternativas de carbono, além de identificar, sequenciar e analisar genes de lacase dessa espécie.

### 2.2 Objetivos específicos

- Selecionar linhagens de basidiomicetos produtores de lacases dentre as cepas pertencentes à micoteca do Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAR;
- Identificar pela análise da sequência genética de espaçadores internos transcritos (ITS) do DNA ribossomal os gêneros e/ou espécies das cepas analisadas;
- Selecionar a cepa melhor produtora de lacase em meio definido em fermentação submersa e avaliar as condições nutricionais para a melhor produção;
- Identificar compostos capazes de induzir a atividade de lacases sintetizadas pelas linhagens avaliadas;
- Selecionar substratos alternativos para produção de lacase pela cepa selecionada em fermentação submersa;
- Otimizar as condições de produção de lacase pela cepa selecionada em fermentação submersa com substratos alternativos;
- Realizar um estudo da cinética de produção de lacase em fermentação submersa com a cepa e o substrato selecionados;
- Avaliar o potencial da cepa selecionada como produtora de lacase em fermentação no estado sólido empregando-se diferentes resíduos agroindustriais como substrato/suporte;

- Realizar um estudo da cinética de produção de lacase em fermentação no estado sólido com a cepa e o substrato/suporte selecionados;
- Realizar a identificação de genes codificadores de lacase pela técnica de PCR;
- Sequenciar os genes de lacase obtidos por PCR e analisar as sequências obtidas.

## **CAPÍTULO I**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **1.1 O mercado mundial de enzimas**

A crescente exigência global por uma indústria sustentável tem impulsionado as pesquisas em biotecnologia e bioprocessos. A necessidade premente de produção industrial que provoque pouco ou nenhum dano ambiental e ainda mantenha suas características de lucratividade são demandas atuais e que prometem impulsionar o mercado e a sociedade de modo geral e particularmente o mercado mundial de enzimas.

As vantagens da aplicação de enzimas em processos industriais são várias e bem conhecidas (Tabela 1.1). Sua especificidade e capacidade de atuar em condições brandas de pH e temperatura permitem maior controle da geração de produtos de interesse, a um menor custo energético e com menor impacto ambiental (BINOD et al., 2008).

O nível de sofisticação tecnológica associado ao uso de enzimas em bioprocessos industriais, no entanto, tem sido um desafio para as economias emergentes e tem favorecido a concentração da demanda por enzimas a mercados de países desenvolvidos. Ainda assim, espera-se um crescimento na demanda mundial por enzimas de 6,8% ao ano, atingindo até seis a oito bilhões de dólares em 2015; sendo que os maiores crescimentos regionais ocorrerão nos mercados da América do Sul e Central, na África e Oriente Médio (FREEDONIA, 2011; BCC, 2012).

Esse crescimento será liderado principalmente pelos mercados de enzimas para diagnóstico e biotecnologia, ambos beneficiados pela redução dos custos de sequenciamento de DNA na última década. Além disso, espera-se um crescimento acima da média na demanda por enzimas utilizadas na indústria de ração animal e bebidas e alimentos, crescimento este impulsionado pelos mercados emergentes (FREEDONIA, 2011). Apesar das peculiaridades de alguns mercados, a maior parte das enzimas empregadas em processos industriais são enzimas extracelulares de origem microbiana e obtidas por processos fermentativos. As enzimas microbianas, produzidas por uma ampla variedade de micro-organismos como leveduras, bactérias

**Tabela 1.1:** Enzimas utilizadas em vários segmentos industriais e suas aplicações

<b>Indústria</b>	<b>Enzima</b>	<b>Aplicação</b>
Detergente e cuidados pessoais	Protease	Limpeza doméstica, industrial e de lentes de contato
	Lipase	Limpeza doméstica, industrial e de lentes de contato
	Amilase	Limpeza doméstica e industrial
	Mananase	Limpeza doméstica e industrial
	Celulase	Limpeza de tecidos, melhoramento da cor
	Glicoamilase	Antimicrobiana
	Glicose oxidase	Antimicrobiana
Têxtil	Amilase	Desengomagem
	Lacase	Acabamento em Denim
	Celulase	Acabamento em Denim, melhoramento da cor, maciez
	Catalase	Acabamento após branqueamento
	Protease	Remoção da sericina de fios de seda
Papel e celulose	Amilase	Modificação de amido, descoloração, melhoramento de drenagem
	Xilanase	Melhoria da ação alvejante, redução da energia de refino
	Celulase	Modificação de fibras, descoloração, melhoramento de drenagem
	Lipase	Descoloração, limpeza
Amido e biocombustível	Amilase	Liquefação e sacarificação de amido
	Amiloglicosidase	Sacarificação
	Pululanase	Sacarificação
	Glicose isomerase	Conversão de glicose em frutose
	Xilanase	Redução da viscosidade (amido e combustível)
	Protease	Aumenta disponibilidade de nutrientes para leveduras (combustível)
Alimentos e laticínios	Protease	Coagulação do leite, sabor, formulações lácteas infantis
	Lipase	Maturação de queijos, sabor
	Lactase	Remoção de lactose
	Pectinase	Produtos à base de frutas
Panificação	Amilase	Maciez e volume de pães
	Lípase	Estabilidade e condicionamento da massa
	Lipoxigenase	Força e elasticidade da massa
	Glicose oxidase	Estabilidade e condicionamento da massa
	Xilanase	Condicionamento da massa
Bebidas	Amilase	Tratamento de sucos, cerveja de baixa caloria
	Lacase	Clarificação de sucos, sabor de cervejas, tratamento de rolhas
	Pectinase	Remoção de pectina, trituração
	$\beta$ -Glucanase	Trituração e melhoria da filtração
Ração animal	Fitase	Digestibilidade de fitato, redução do teor de fósforo no esterco
	Xilanase	Digestibilidade
	$\beta$ -Glucanase	Digestibilidade
Biopolímeros	Lacase	Incremento de processos de polimerização
	Peroxidase	Incremento de processos de polimerização
	Lipase	Incremento de processos de polimerização
	Transglutaminase	Incremento de processos de polimerização
Síntese orgânica	Lipase	Resolução de alcoóis quirais e amidas
	Nitrilase	Síntese de ácidos carboxílicos enantiopuros
	Acilase	Síntese de antibióticos e intermediários de interesse farmacêutico
Couro	Lipase	Desengordurante
	Protease	Purga, remoção de pelos, amaciamento
	Elastase	Amaciamento

Fonte: Kirk et al. (2002); Novozymes (2008).

e fungos, são uma fonte preferível destes bioprodutos, pois sua produção é mais controlável e previsível (BINOD et al., 2008).

Reduzir custos de produção é uma forma de ampliar o uso de enzimas em processos industriais, principalmente nos mercados em que o custo desses processos é o principal fator limitante da cadeia produtiva. A otimização da fermentação e do processo de produção é alvo de extensa pesquisa e, nesse sentido, o uso de resíduos agroindustriais como substratos alternativos em processos fermentativos tem se firmado cada vez mais como opção viável para redução de custos. Tais processos permitem agregar valor aos resíduos, diminuem os custos de produção, além de removerem do ambiente material potencialmente poluente (PANDEY et al., 2000a; PANDEY et al., 2000b; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003; SOCCOL et al., 2010).

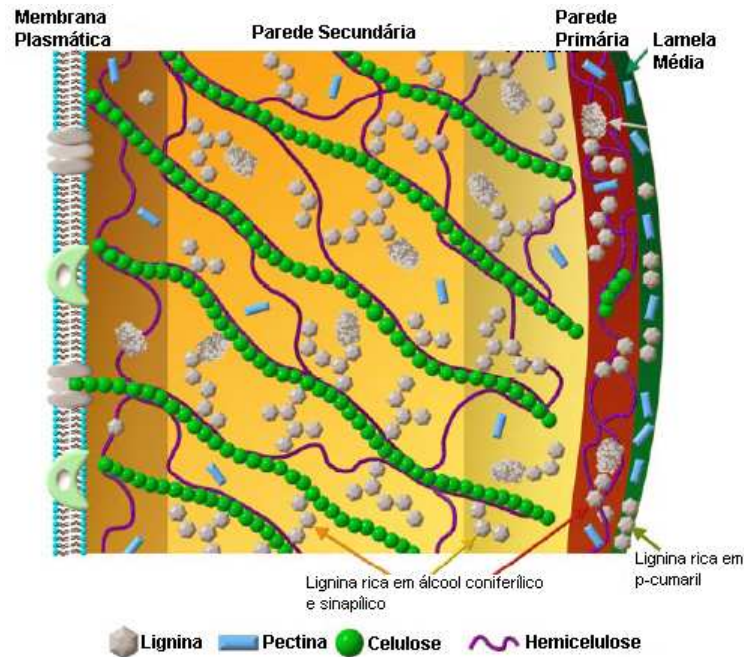
## 1.2 Lacases

A degradação da biomassa vegetal lignocelulósica tem papel central na manutenção do ciclo do carbono em ecossistemas terrestres. A lignina (Figura 1.1), o segundo polímero natural mais abundante, é um heteropolímero aromático que confere rigidez aos tecidos vegetais, ao mesmo tempo em que oferece proteção contra a ação de micro-organismos (SAPARRAT et al., 2002). Sua hidrólise representa um dos fatores limitantes no processo de utilização da biomassa vegetal o que tem suscitado pesquisas na busca de formas mais rápidas, efetivas e de menor custo para a degradação deste biocomposto (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Na natureza, a degradação da lignina ocorre pela ação de um consórcio de enzimas ligninolíticas extracelulares como as ligninas peroxidases (ligninase, LiP, EC 1.11.1.14), manganês peroxidases (MnP, EC 1.11.1.13), peroxidases versáteis (VP; EC 1.11.1.16) e lacases (EC 1.10.3.2) (MARTÍNEZ et al., 2005). Lacases (*p*-difenoil: oxigênio oxidoredutases) pertencem a um grupo de enzimas conhecidas como cobre polifenol oxidases ou lacases azuis, pois possuem átomos de cobre em seu centro catalítico. Lacases ‘amarelas’ ou ‘brancas’ foram descritas como enzimas similares às lacases azuis, mas que não possuem o átomo de Cu responsável pela coloração azulada (BALDRIAN, 2006). Essas últimas não são consideradas lacases verdadeiras (THURSTON, 1994).



Lacases são das poucas enzimas estudadas desde o século XIX, quando foram descritas pela primeira vez no exsudado da árvore japonesa da laca, *Toxicodendron verniciflua* (anteriormente *Rhus vernicifera*) (RIVA, 2006; MIKOLASCH; SCHAUER, 2009).



**Figura 1.1:** Representação esquemática da parede celular vegetal com representação da espessura das diferentes camadas, abundância relativa e localização dos diferentes componentes.  
Fonte: Achyuthan et al. (2010).

### 1.2.1 Ocorrência

Lacases são enzimas relativamente comuns descritas em plantas, insetos, bactérias e principalmente em fungos, desempenhando diferentes papéis fisiológicos (MOROZOVA et al., 2007).

A ocorrência de lacases em plantas é mais limitada do que em fungos e sua presença foi descrita em resinas, ductos de resinas, tecido de condução de seiva, folhas e brotos (MAYER; STAPLES, 2002; GIARDINA et al., 2010). Segundo Messerschmidt e Huber (1990), algumas plantas do gênero *Toxicodendron*, por exemplo, apresentam látex com alto teor de fenóis que, na presença de lacases, são oxidados a radicais que polimerizam espontaneamente. Seu papel nas plantas parece estar relacionado com a biossíntese de lignina pela polimerização de radicais

livres de unidades estruturais da lignina como os alcoóis cumarílico, coniferílico e sinapílico (BALDRIAN, 2006).

As lacases de insetos têm seu papel bem definido, tendo comprovada participação em processos de esclerotização e pigmentação do exoesqueleto ou cutículas, cápsulas de ovos, córions, ootecas e casulos de seda (ARAKANE et al., 2005; DITTMER; KANOST, 2010).

A ocorrência de lacases em bactérias tem sido muitas vezes vista com ressalva e muitos autores acreditam que as enzimas descritas nestes organismos não sejam lacases verdadeiras (THURSTON, 1994; MAYER; STAPLES, 2002). Porém, o aprimoramento de técnicas de bioinformática e de análise de DNA independente do cultivo de micro-organismos tem demonstrado que lacases podem ser mais frequentes em procariotos do que se pensava inicialmente (BELOQUI et al., 2006; AUSEC et al., 2011).

As lacases bacterianas parecem estar envolvidas na morfogênese, na síntese de pigmentos de esporos para proteção contra radiação UV e na homeostasia do cobre (GIARDINA et al., 2010). A descoberta de lacases de procariotos a partir de novas tecnologias de análise, como a abordagem metagenômica, tem a desvantagem de ser inicialmente apenas descritiva. Assim, muitas das lacases encontradas em procariotos de diferentes ambientes ainda carecem de comprovação experimental, bem como de descrição funcional e de seu papel biológico (AUSEC et al., 2011).

A maioria das lacases descritas na literatura foi isolada de fungos e ocorre em Ascomicetos, Deuteromicetos e Basidiomicetos, porém alguns grupos taxonômicos (por exemplo os Quitridiomicetos) parecem não produzir quantidades significativas de lacases ou elas são produzidas por poucas espécies (BALDRIAN, 2006; BRIJWANI et al., 2010). Essas enzimas são especialmente abundantes entre os basidiomicetos e vários genes de lacase foram descritos nesse grupo (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009). Algumas espécies reconhecidamente produtoras de lacases são *Agaricus bisporus* (WU et al., 2010); *Grifola frondosa* (NITHERANONT et al., 2011); *Lentinula edodes* (BOLLAG; LEONOWICZ, 1984); *Phanerochaete chrysosporium* (SINGH; CHEN, 2008); *Pleurotus ostreatus* (BALDRIAN; GABRIEL, 2002); *Pleurotus sajor-caju* (SODEN; DOBSON, 2001); *Pycnoporus cinnabarinus* (EGGERT et al., 1996); *Trametes pubescens* (GALHAUP et al., 2002a); *Trametes versicolor* (HAN et al., 2005). Segundo Majeau et al. (2010), devido à sua marcante capacidade de

degradação de lignina, o gênero *Trametes* está entre os mais estudados para produção de lacase.

A função das lacases em fungos é bastante diversificada e em muitos casos, ainda não é totalmente compreendida. Além da degradação da lignina, lacases parecem estar envolvidas também na despolimerização de carvão, húmus e soluções de ácidos húmicos (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009). Também participam de diferentes processos fisiológicos como na morfogênese, principalmente na síntese de pigmentos e no crescimento micelial (DAS et al., 1997).

A degradação da lignina produz componentes fenólicos de baixa massa molecular que podem ser tóxicos para o micélio, os quais podem ser convertidos por lacases em polímeros não tóxicos protegendo as hifas durante o processo de deslignificação (THURSTON, 1994; MOROZOVA et al., 2007).

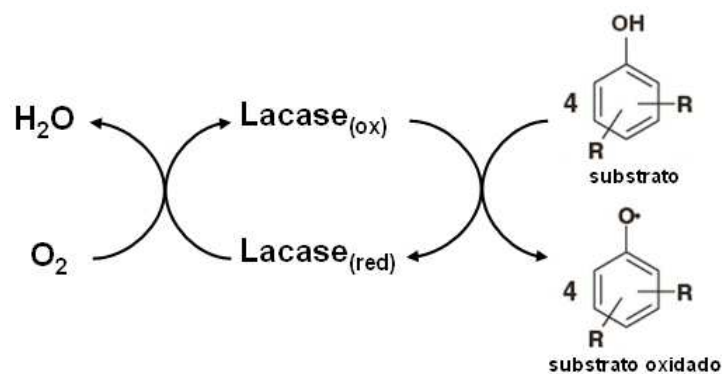
Lacases também participam de processos de interação patógeno-hospedeiro. *Botrytis cinerea*, por exemplo, é um Ascomiceto fitopatogênico facultativo que infecta várias plantas, causando graves doenças. As plantas desenvolveram mecanismos de defesa por meio dos quais respondem à infecção por fungos acumulando di- e oligômeros de estilbenos, sendo o mais comum o resveratrol, com comprovada ação antifúngica (MAYER; STAPLES, 2002; CARUSO et al., 2011). *B. cinerea*, contudo, secreta uma lacase capaz de oxidar o resveratrol, protegendo o fungo de sua ação tóxica (ADRIAN et al. 1998).

### **1.2.2 Mecanismo de ação**

A maioria das lacases isoladas e caracterizadas é de origem fúngica, mais especificamente derivadas de fungos da podridão branca da madeira. Assim, as características gerais dessa enzima descritas na literatura baseiam-se em lacases isoladas desses micro-organismos.

Lacases são multicobre oxidases que utilizam a capacidade redox dos íons de cobre para catalisar a redução de oxigênio molecular à água ao mesmo tempo em que oxidam um substrato orgânico, tipicamente um *p*-difenoil (ex. hidroquinona, catecol) ou outro composto fenólico (Figura 1.2) (THURSTON, 1994). Uma de suas características mais marcantes é a baixa especificidade aos seus substratos redutores e a variedade de substratos passíveis de oxidação pela lacase varia grandemente de uma lacase para outra (DITTMER; KANOST, 2010).

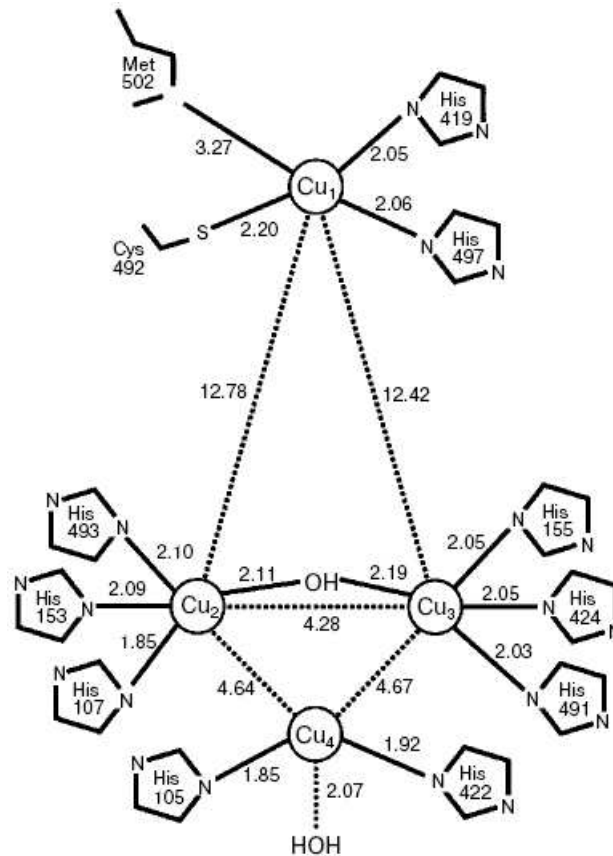
Lacases são glicoproteínas com, em média, 500 a 550 aminoácidos e massa molecular entre 50 e 130 kDa, cujo componente de carboidratos é composto essencialmente por manose, N-acetilglicosamina e galactose. O conteúdo de carboidratos das lacases varia entre diferentes fungos e parece ser responsável pela estabilidade da proteína e pela proteção contra proteólise e ação de radicais livres (MOROZOVA et al., 2007). A estabilidade dessa enzima é comumente maior em pH mais ácido, porém, a temperatura ótima de atividade e de estabilidade variam entre enzimas de fontes distintas (MAJEAU et al., 2010).



**Figura 1.2:** Representação do ciclo catalítico da lacase. Fonte: Mikolasch e Schauer (2009).

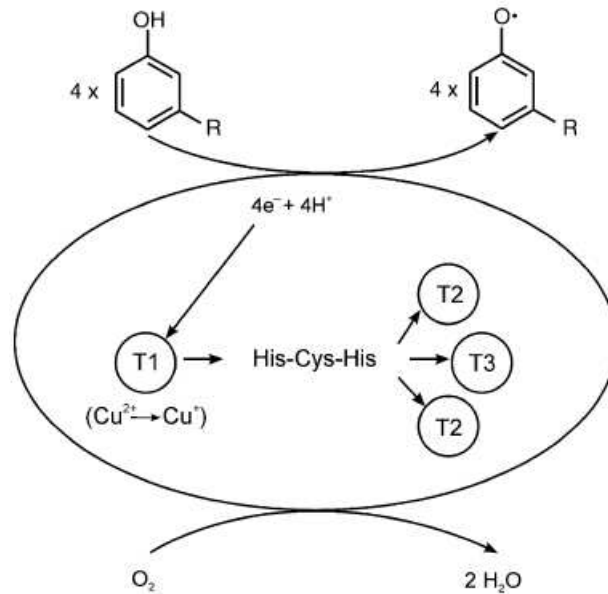
Lacases possuem quatro átomos de Cu distribuídos entre três sítios de ligação diferentes e altamente conservados, e cada um executa um papel importante no mecanismo catalítico da enzima. Um dos sítios contém um cobre tipo 1 (sítio T1), responsável pela coloração azul da enzima, e os outros dois sítios (sítios T2 e T3) formam um *cluster* trinuclear com um cobre tipo 2 e dois cobres tipo 3 (Figura 1.3) (MESSERSCHIMIDT; HUBER, 1990).

O potencial redox do cobre T1 é diretamente responsável pela capacidade catalítica da enzima. Os substratos são oxidados pelo cobre T1 e os elétrons extraídos são transferidos para o cluster trinuclear por um motivo tripeptídico His-Cys-His, onde oxigênio molecular é reduzido à água (Figura 1.4) (BALDRIAN, 2006). A razão estequiométrica correspondente à razão de transformação substrato/oxigênio é geralmente de 4/1, ou seja, quatro elétrons removidos do substrato para cada molécula de oxigênio reduzida. Essa razão pode variar entre 4/1 e 1/1 dependendo da natureza e concentração do substrato (MAJEAU et al., 2010).



**Figura 1.3:** Representação dos sítios de cobre T1 (Cu1), T2/T3 (Cu4/Cu2-Cu3) da lacase de *Bacillus subtilis*, com indicação das distâncias entre os átomos. Fonte: Morozova et al. (2007).

Segundo Morozova et al. (2007), como o sítio T1 é o aceptor primário de elétrons, lacases somente oxidam compostos com potencial de ionização menor do que o potencial redox do cobre do sítio T1. Por isso, fenóis são substratos típicos da lacase, pois seu potencial redox é baixo o suficiente para permitir a remoção de elétrons pelo cobre. O sítio T1 também determina a eficiência da enzima, o que torna as lacases com sítio T1 de potencial mais elevado interessantes para aplicações biotecnológicas (GIARDINA et al., 2010).



**Figura 1.4:** Representação esquemática da transferência de elétrons entre os sítios catalíticos de lacases durante a oxidação de substratos. Fonte: Baldrian (2006).

### 1.2.3 Substratos de lacases

Lacases catalisam a redução de oxigênio à água utilizando uma grande variedade de compostos fenólicos como doadores de elétrons. Tal peculiaridade torna a lacase uma enzima bastante interessante para diversas aplicações industriais como na indústria de alimentos (OSMA et al., 2011), no tratamento de efluentes (MAJEAU et al., 2010), descoloração de corantes (ZENG et al., 2011) e muitas outras.

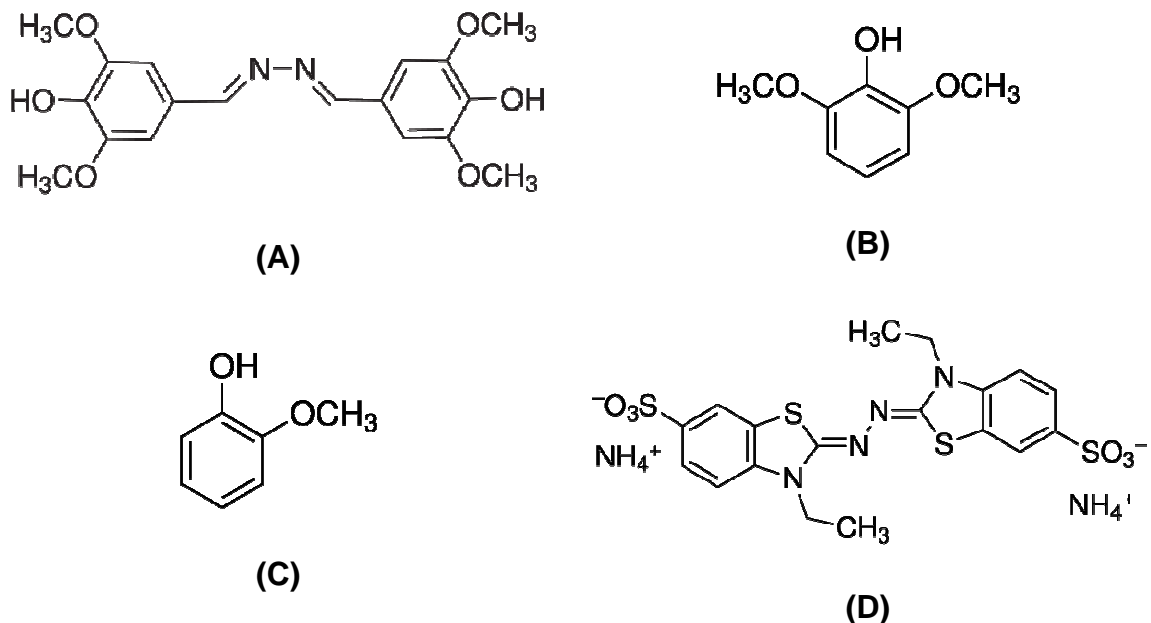
Centenas de substratos de lacase foram identificados até o momento (BALDRIAN et al., 2006) e o aprimoramento de ferramentas de análise molecular, como ferramentas de análise de docagem molecular que possibilitam a predição do modo de ligação da enzima a diferentes substratos, permitirão a identificação de mais substratos em potencial e a consequente ampliação das possibilidades de aplicação dessa enzima (MAJEAU et al., 2010).

Chen et al. (2011) analisaram a interação de lacases e outras peroxidases (MnP e LiP) com a lignina pela técnica de docagem molecular (MD). MD é um método que prediz a forma de ligação entre um ligante e um receptor, extensivamente utilizado na pesquisa de novos fármacos. Os autores demonstraram que lacases apresentam maior afinidade por lignina do que MnP e LiP. Além disso, a

forma como a lacase interage com a estrutura molecular tem uma orientação totalmente diferente das outras peroxidases analisadas, indicando que este seja um fator importante para a maior afinidade da lacase pela lignina.

Os substratos fenólicos mais comumente empregados em análises de lacases são a siringaldazina, 2,6-dimetoxifenol (DMP) e guaiacol (Figura 1.5), entretanto, essas enzimas também podem oxidar substratos como o ABTS ou ferrocianeto ( $K_4Fe(CN)_6$ ) (GIARDINA et al., 2010).

A afinidade das diferentes lacases pelos mesmos substratos varia grandemente. Baldrian (2006) relata que o  $K_m$  varia de algumas dezenas de  $\mu M$  de siringaldazina e ABTS até centenas de  $\mu M$  de DMP e guaiacol. Contudo a comparação de características catalíticas de lacases de diferentes fontes é dificultada por condições experimentais muito diferentes (MOROZOVA et al., 2007).



**Figura 1.5:** Exemplo dos substratos típicos de lacases. (A) siringaldazina; (B) DMP; (C) guaiacol e (D) ABTS. Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>

Palmieri et al. (1997) relatam as propriedades catalíticas de duas isoenzimas de lacase (POXA1 e POXA2) de *Pleurotus ostreatus* em relação aos quatro substratos típicos de lacases (siringaldazina, ABTS, guaiacol e DMP). Essas isoenzimas apresentaram valores de  $K_m$  bastante diferentes para os substratos. POXA2 apresentou  $K_m$  de 74  $\mu M$  quando DMP foi usado como doador de elétrons e

POXA1 apresentou  $K_m$  de 2100  $\mu\text{M}$  em relação ao mesmo substrato, além disso, POXA1 foi incapaz de oxidar o guaiacol.

Shleev et al. (2004) compararam as propriedades catalíticas das lacases de quatro espécies de fungos (*Cerrena maxima*, *Corioloropsis fulvocinerea*, *Trametes hirsuta* e *Trametes ochracea*) em relação a cinco substratos distintos (catecol, guaiacol, hidroquinona, ácido sinapílico e ferrocianeto). O ácido sinapílico mostrou ser o melhor substrato para *T. hirsuta* ( $K_m = 24 \mu\text{M}$ ;  $K_{\text{cat}} = 580 \text{ s}^{-1}$ ), *T. ochracea* ( $K_m = 11 \mu\text{M}$ ;  $K_{\text{cat}} = 170 \text{ s}^{-1}$ ) e *Corioloropsis fulvocinerea* ( $K_m = 21 \mu\text{M}$ ;  $K_{\text{cat}} = 140 \text{ s}^{-1}$ ) e o substrato inorgânico ferrocianeto foi o melhor para a lacase de *Cerrena maxima* ( $K_m = 115 \mu\text{M}$ ;  $K_{\text{cat}} = 450 \text{ s}^{-1}$ ).

Em estudo recente, Nakade et al. (2010) caracterizaram uma lacase (PbLac1) purificada de *Polyporus brumalis* e analisaram a afinidade desta enzima por nove substratos diferentes (ABTS, DMP, guaiacol, ácido ferúlico, *p*-fenilenodiamina, pirogalol, L-DOPA, catecol e tirosina). A maior afinidade observada foi pelo ABTS ( $K_m = 20 \mu\text{M}$ ;  $K_{\text{cat}} K_m^{-1} = 1761 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) seguida pelo DMP ( $K_m = 70 \mu\text{M}$ ;  $K_{\text{cat}} K_m^{-1} = 548 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ), contudo essa enzima foi incapaz de oxidar tirosina além de apresentar baixa afinidade pelo guaiacol ( $K_m = 10700 \mu\text{M}$ ;  $K_{\text{cat}} K_m^{-1} = 3,2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ).

#### 1.2.4 Inibidores

Vários compostos orgânicos e inorgânicos têm sido descritos como inibidores de lacase. Segundo Morozova et al. (2007) ânions inorgânicos como fluoreto ( $\text{F}^-$ ), cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), azida ( $\text{N}_3^-$ ), cianeto ( $\text{CN}^-$ ) e hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) ligam-se ao sítio catalítico da enzima e impedem a transferência de elétrons do sítio T1 para o *cluster* T2/T3 (Figura 1.4) inibindo a atividade enzimática. Íons metálicos ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ) e compostos orgânicos como ditiotreitól, ácido tioglicólico, dietil ditiocarbamato, L-cisteína e EDTA também parecem inibir lacases, contudo, alguns inibidores parecem afetar os subprodutos da degradação do ABTS ao invés de, de fato, inibirem a atividade de lacase (BALDRIAN, 2006).

Périé et al. (1998) relataram a inibição da atividade de lacase do basidiomiceto *Dichomitus squalens* pelos ânions fluoreto (62% a 0,01 mM e 100% a 0,1 mM) e azida (80% a 0,001 mM e 100% a 0,01 mM). Shin e Kim (1998) relataram



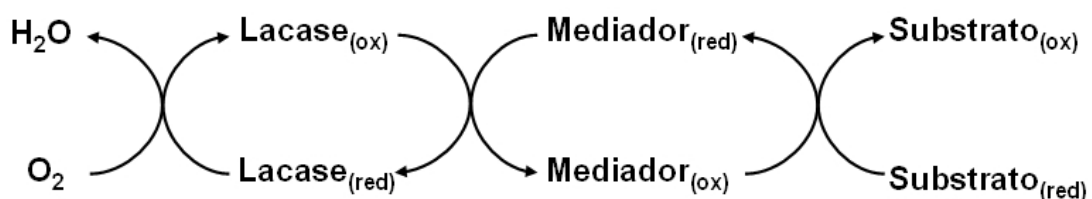
a total inibição da lacase de *Coriolus hirsutus* por L-cisteína (10  $\mu$ M) e forte inibição por cianeto (97%) e tioureia (99%).

Estudos mais recentes de Miao et al. (2010) demonstraram que a lacase do cogumelo comestível *Tricholoma mongolicum* foi significativamente inibida pelos íons  $\text{Hg}^{2+}$  e fracamente inibida por íons  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ . Nakade et al. (2010) relataram 100% de inibição da lacase (PbLac1) de *Polyporus brumalis* pelos compostos L-cisteína e ditiotreitól (1 mM), além de forte inibição provocada por 1 mM de ácido cójico (72,3%), tropolona (90,3%) e ácido *p*-cumárico (67,5%). Também analisaram a ação inibitória de íons metálicos e verificaram que a enzima foi inibida por  $\text{Sn}^{2+}$  (95,4 %) e  $\text{Zn}^{2+}$  (34,3 %) 1 mM;  $\text{Na}^+$  (43,4 %) e  $\text{K}^+$  (34,9 %) 10 mM.

### 1.2.5 Mediadores da atividade de lacase

Dentre as principais funções atribuídas às lacases está a deslignificação. Contudo, lacases são moléculas usualmente grandes demais (~70 kDa) para penetrar a biomassa e degradar a lignina, sendo capazes de degradar unidades fenólicas de lignina somente na superfície do substrato. Além disso, devido ao seu baixo potencial redox, essas enzimas são incapazes de oxidar unidades não fenólicas de lignina, que usualmente possuem elevado potencial redox (RIVA, 2006; WIDSTEN; KANDELBAUER, 2008).

Tais limitações podem ser superadas pelo uso de mediadores químicos (Figura 1.6), que são compostos de baixa massa molecular que atuam como substratos intermediários de lacases, cujos radicais oxidados são capazes de reagir quimicamente (não enzimaticamente) com os substratos alvo de elevado potencial redox (RIVA, 2006). O mediador, uma vez oxidado, é reduzido ao seu estado inicial pelo composto sujeito à oxidação (substrato) gerando um ciclo fechado (MOROZOVA et al., 2007).



**Figura 1.6:** Representação do ciclo catalítico de lacases na presença de mediadores redox. Fonte: Riva (2006).

Os mediadores podem ampliar a gama de substratos capazes de serem oxidados pelas lacases (COUTO; HERRERA, 2006). Entretanto, a efetividade de um mediador depende de alguns fatores. É preciso que ele seja um bom substrato de lacase, sua forma oxidada deverá ter uma meia vida longa o suficiente para permitir sua difusão pelo substrato e ele deve apresentar elevado potencial redox para permitir oxidação eficiente (CALL; MÜCKE, 1997; GIARDINA et al., 2010).

Segundo Camarero et al. (2005) o ABTS foi o primeiro mediador sintético de lacase descrito e mais recentemente mediadores do tipo N-OH têm sido utilizados, como o 1-hidroxibenzotriazol (HBT), ácido violúrico (AV) e N-hidroxiacetanilida (NHA). A busca por novos mediadores é uma área chave em pesquisa para aplicação de lacases em diversas indústrias e o uso de mediadores de lacase tem sido aplicado em várias áreas como deslignificação da polpa de madeira (CALL; MÜCKE, 1997); descoloração de corantes têxteis (ZENG et al., 2011), degradação de hidrocarbonetos aromáticos (HOU et al., 2004) e degradação de pesticidas (KARAS et al., 2010).

Xu et al. (2000) analisaram os mecanismos da oxidação enzimática do HBT, VA e NHA com sete lacases fúngicas (*Botrytis cinerea*, *Coprinus cinereus*, *Myceliophthora thermophila*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Rhizoctonia solani*, *Scytalidium thermophilum* e *Trametes villosa*). Os autores verificaram que a taxa de oxidação depende da diferença de potencial redox entre o substrato N-OH e a lacase, sendo que uma lacase com um potencial redox mais elevado ou um substrato N-OH com um potencial redox mais baixo tendem a apresentar taxas de oxidação mais elevadas.

Apesar de ampliarem a ação das lacases, a utilização de mediadores sintéticos produz resíduos tóxicos além de ter custo elevado. A busca por mediadores naturais de menor custo e que não prejudiquem o ambiente poderia facilitar e aumentar sua utilização em processos industriais (GIARDINA et al., 2010).

Camarero et al. (2005) selecionaram 10 fenóis como mediadores naturais de lacase entre 44 diferentes compostos (alcoóis fenólicos, aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres e aminas), empregando corantes recalcitrantes como substrato. Esses 10 fenóis foram avaliados como mediadores em processo de descoloração de vários corantes pelas lacases de *Pycnoporus cinnabarinus* e *Trametes villosa*. Os autores relataram que fenóis derivados de lignina representam alternativas ambientalmente corretas aos mediadores sintéticos. O siringaldeído e a acetoseringona, por

exemplo, produziram grande descoloração em curtíssimo tempo (80% de descoloração em 5 min) em contraste com mediadores sintéticos mais eficientes HNNS (ácido 2-nitroso-1-naftol-4-sulfônico) e NNDS (ácido 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfônico) que levaram 4 horas para alcançar descoloração de 70 e 80%, respectivamente.

### 1.2.6 Produção de lacases fúngicas

A produção de lacases por fungos é influenciada por numerosos parâmetros como a espécie utilizada na fermentação, a técnica de fermentação, agitação, aeração e o tempo de cultivo (Tabela 1.2).

Contudo, a produção está sujeita a uma complexa regulação por nutrientes. Os fatores críticos que afetam diretamente a expressão de lacases são as fontes de carbono e nitrogênio, suas concentrações e a razão entre elas (relação C/N), o tipo e a concentração de indutores (GALHAUP et al., 2002a; DEKKER et al., 2007).

#### 1.2.6.1 Seleção de micro-organismos produtores de lacases

A escolha do micro-organismo melhor produtor da enzima requer um extensivo trabalho de seleção, uma vez que os níveis de enzima produzidos dependem de características da espécie e da linhagem analisadas.

Elisachvili et al. (2008a) analisaram a produção de lacase por diferentes espécies e linhagens de fungos em substratos idênticos. Os autores verificaram que os níveis de atividade enzimática variaram grandemente entre os fungos testados e que os níveis de lacase eram espécie dependentes e linhagem dependentes. Segundo os autores os níveis máximos de lacase produzidos variaram de 273 U L<sup>-1</sup> (*Cerrena maxima*) a 988 U L<sup>-1</sup> (*Funalia trogii*).

Em outra análise, Mikiashvili et al. (2005) cultivando fungos em fermentação submersa de cascas de tangerina, relataram que *Trametes versicolor* 775 produziu atividade máxima de lacase de 5250 U L<sup>-1</sup>, enquanto *T. versicolor* 235 produziu 448 U L<sup>-1</sup>.

De forma similar, Tapia-Tussell et al. (2011) avaliaram a produção de lacases por várias linhagens de fungos. Duas cepas de *Trametes hirsuta* isoladas de ambientes distintos (madeira em decomposição e efluentes de fábrica de

processamento de agave) produziram níveis diferentes de lacase ( $12,5 \text{ U mL}^{-1}$  e  $20 \text{ U mL}^{-1}$ ), o que reflete, provavelmente, diferenças em suas características genéticas e ecológicas. Tais exemplos indicam que a seleção de micro-organismos é uma etapa importante na otimização da produção de lacases e requer ampla investigação.

**Tabela 1.2:** Produção de lacases fúngicas por fermentação submersa ou fermentação no estado sólido.

<b>Espécie</b>	<b>Modo de cultivo</b>	<b>Atividade máxima de lacase</b>	<b>Referência</b>
<i>Agaricus blazei</i>	FSm	$5000 \text{ U L}^{-1}$	Ullrich et al. (2005)
<i>Agaricus blazei</i>	FES	$65 \text{ U g}^{-1}$	D'Agostini et al. (2011)
<i>Cerrena maxima</i>	FSm	$7620 \text{ U L}^{-1}$	Elisashvili et al. (2008)
<i>Ganoderma lucidum</i>	FSm	$93000 \text{ U L}^{-1}$	Songulashvili et al. (2007)
<i>Lentinula edodes</i>	FSm	$251 \text{ U mL}^{-1}$	Cavallazzi et al. (2005)
<i>Morchella esculenta</i>	FES	$7,5 \text{ U g}^{-1}$	Paniputi e Lechner (2008)
<i>Peniophora</i> sp.	FSm	$4139,5 \text{ U L}^{-1}$	Fonseca et al. (2010)
<i>Pleurotus dryinus</i>	FSm	$6493 \text{ U L}^{-1}$	Elisashvili et al. (2006)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	FES	$167 \text{ U g}^{-1}$	Karp et al. (2012)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	FES	$74,3 \text{ U g}^{-1}$	Alexandrino et al. (2007)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	FES	$36 \text{ U g}^{-1}$	Iandolo et al. (2010)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	FES	$31 \text{ U g}^{-1}$	Kumaran et al. (1997)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	FSm	$19000 \text{ U L}^{-1}$	Lomascolo et al. (2003)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FES	$46,5 \text{ U g}^{-1}$	Vikineswary et al. (2005)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FSm	$3143 \text{ U L}^{-1}$	Fonseca et al. (2010)
<i>Trametes hirsuta</i>	FSm	$20000 \text{ U L}^{-1}$	Tapia-Tussel et al. (2011)
<i>Trametes hirsuta</i>	FES	$5400 \text{ U L}^{-1}$	Rosales et al. (2005)
<i>Trametes pubescens</i>	FSm	$740 \text{ U mL}^{-1}$	Galhaup et al. (2002)
<i>Trametes trogii</i>	FSm	$20000 \text{ U L}^{-1}$	Zouari-Mechici et al. (2006)
<i>Trametes versicolor</i>	FSm	$742 \text{ U L}^{-1}$	Mikiashvili et al. (2005)
<i>Trametes versicolor</i>	FSm	$1583 \text{ U L}^{-1}$	Xavier et al. (2007)
<i>Trametes versicolor</i>	FES	$8,6 \text{ U g}^{-1}$	Xin e Geng (2010)

FSm: fermentação submersa; FES: fermentação no estado sólido. Fonte: Majeau et al. (2010) e a autora.

## 1.2.6.2 Nutrientes que afetam a produção de lacases

### 1.2.6.2.1 Fontes de carbono

Após a seleção dos organismos produtores de lacase a otimização do processo de produção enzimática é costumeiramente explorada. De acordo com Elisashvili et al. (2010), a grande maioria das análises envolvendo a produção de enzimas ligninolíticas, incluindo lacases, são realizadas empregando-se meios de cultivo definidos. Nesses estudos, a resposta dos fungos às diferentes fontes de carbono avaliadas e à sua concentração na solução nutritiva varia bastante.

Segundo Majeau et al. (2010) fontes de carbono facilmente metabolizáveis como glicose, manitol e celobiose tendem a produzir maiores níveis de lacase do que fontes lentamente assimiláveis como celulose e lactose. De fato, Galhaup et al. (2002a), ao compararem a produção de lacase por *Trametes pubescens* em meios contendo diferentes fontes de carbono (glicose, celobiose, frutose, glicerol, lactose e  $\alpha$ -celulose), constataram que os substratos mais facilmente assimiláveis produziram níveis maiores de lacase (glicose – 60 U mL<sup>-1</sup> e celobiose – 65 U mL<sup>-1</sup>) do que substratos mais lentamente consumidos (lactose – ~15 U mL<sup>-1</sup> e  $\alpha$ -celulose – <10 U mL<sup>-1</sup>). Hou et al. (2004) também verificaram que, para *Pleurotus ostreatus*, as fontes facilmente assimiláveis produziram mais lacase (glicose – 95 U mL<sup>-1</sup> e celulose – 60 U mL<sup>-1</sup>). De forma contrária, Elisashvili e Kachlishvili (2009), ao analisarem a influência de diferentes fontes de carbono na produção de lacase de *Pseudotrametes gibbosa*, relataram que a lactose foi a melhor fonte de carbono para produção de lacase (glicose – 1 U mL<sup>-1</sup> e lactose – 13,7 U mL<sup>-1</sup>).

Além do tipo de carboidrato a concentração destes no meio também influencia a produção de lacase. Segundo Mikiashvili et al. (2005), o aumento da concentração da fonte de carbono de 20 para 40 g L<sup>-1</sup> aumentou a produção de lacase de *Trametes versicolor* em 5 vezes. De forma similar, Galhaup et al. (2002a) verificaram que, ao empregarem diferentes concentrações de glicose (10 a 60 g L<sup>-1</sup>), obtinham níveis diferentes de lacase de *Trametes pubescens*. O aumento da concentração de 10 para 40 g L<sup>-1</sup> também aumentou 5 vezes a produção da enzima. Entretanto, vale notar que, apesar do grande aumento da atividade enzimática, o pico de atividade somente foi alcançado após a concentração de glicose ter alcançado níveis criticamente baixos (15<sup>o</sup> dia de cultivo).

Para muitas espécies de fungos a glicose é um repressor da produção de lacase e, quando utilizada como fonte de carbono, a formação de lacases somente tem início quando diminui a concentração de açúcar no meio (GALHAUP et al., 2002a). Corroborando esse fato, em alguns basidiomicetos foram detectadas sequências consenso (*creA*) na região promotora de genes de lacase que codificam sítios de ligação para a proteína repressora CREA (MANSUR et al., 1998). Tal proteína está envolvida em processos de repressão catabólica em fungos (MATHIEU; FALENBOK, 1994) e sua função fisiológica estaria relacionada provavelmente à economia de energia (PISCITELLI et al., 2011).

#### 1.2.6.2.2 Fontes de nitrogênio

Fontes de nitrogênio desempenham um importante papel na produção de lacases e seus efeitos dependem da natureza e concentração da fonte no meio de cultivo. De acordo com Piscitelli et al. (2011), geralmente nitrogênio inorgânico está associado à menor produção de lacases enquanto fontes orgânicas desse nutriente favorecem a produção de níveis elevados dessa enzima.

Mudanças na atividade de lacase relacionadas aos níveis de nitrogênio são assunto controverso, uma vez que alguns autores relatam aumento da atividade em situações não limitantes de nitrogênio e outros relatam o oposto.

Collins e Dobson (1997) demonstraram a correlação direta entre a concentração de nitrogênio no meio de cultivo e o nível de expressão de genes de lacase em *Trametes versicolor*. Nesse estudo o aumento da concentração da fonte de nitrogênio ocasionou um aumento significativo dos níveis de RNA mensageiro e da atividade de lacase. De forma similar, o nível de transcritos de genes de lacase do basidiomiceto I-62 aumentou cerca de 100 vezes em condições não limitantes de nitrogênio (MANSUR et al., 1998). D'Agostini et al. (2010) constataram que *Agaricus blazei*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* apresentaram tendência a produzir mais lacase quando menores relações carbono/nitrogênio eram fornecidas.

De forma contrária, Eggert et al. (1996) relataram que em concentrações maiores da fonte de nitrogênio a produção de lacase por *Pycnoporus cinnabarinus* sofreu redução significativa, embora os níveis de crescimento se mantivessem inalterados.

Soden e Dobson (2001), entretanto, demonstraram que em *Pleurotus sajor-caju* a expressão de diferentes genes de lacase era influenciada de forma diferenciada pela fonte de nitrogênio. O nível de transcritos dos genes *lac2* e *lac4* aumentou 16 e 30 vezes, respectivamente, quando maior quantidade de nitrogênio era fornecida no meio. Porém, o nível de transcrição dos genes *lac1* e *lac3* não foi afetado.

Soden e Dobson (2001) sugerem que a influência do nitrogênio na expressão de genes de lacase ocorra intermediada por proteínas do tipo NIT2, reconhecidamente envolvidas na regulação do metabolismo de nitrogênio em *Neurospora crassa* (MARSLUF, 1997). Os autores identificaram sequências consenso, correspondentes a sítios de ligação de proteínas NIT2, a montante dos genes de lacase de *Pleurotus sajor-caju*, sugerindo o provável envolvimento desse tipo de proteína na expressão gênica. Contudo, sabe-se pouco sobre mecanismos de regulação influenciados por nitrogênio para a variedade de basidiomicetos existentes.

#### 1.2.6.2.3 Cobre

A influência dos metais na produção de lacases é conhecida para uma ampla variedade de fungos, sendo o cobre um dos principais indutores de lacases.

Collins e Dobson (1997) demonstraram que para *Trametes versicolor* a presença de 400  $\mu\text{M}$  de cobre no meio de cultivo provocou um aumento de 18 vezes na atividade de lacase (2500  $\text{U L}^{-1}$ ). Segundo Saparrat et al. (2002), a produção de lacase por *Coriolopsis rigida* foi antecipada e aumentou cerca de 500 vezes ( $\sim 95000 \text{ U L}^{-1}$ ) na presença de 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ .

Giardina et al. (1999) verificaram que *Pleurotus ostreatus* produziu quantidade significativamente maior de lacase (30000  $\text{U L}^{-1}$ ) em meio rico em nitrogênio e na presença de 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  em relação à condição de ausência de cobre (0,5 – 4  $\text{U L}^{-1}$ ). Já Baldrian e Gabriel (2002), ao cultivarem *P. ostreatus* em meio limitado em nitrogênio, verificaram que a adição de 1 mM de cobre aumentou a produção de lacase em oito vezes (400000  $\text{U L}^{-1}$ ). Mais recentemente, Karp (2012) verificou que a adição de cobre ao cultivo de *P. ostreatus* por FES de bagaço de cana representou

o fator mais significativo na produção de lacase, aumentando a sua atividade cerca de 40 vezes.

Fonseca et al. (2010) verificaram que diferentes espécies nativas da Argentina (*Ganoderma applanatum*, *Peniophora* sp., *Pycnoporus sanguineus* e *Coriolus versicolor* f. *antarcticus*) produziram mais lacase na presença de 500  $\mu\text{M}$  de cobre. *Peniophora* sp. foi o melhor produtor de lacase nessa condição ( $\sim 4140 \text{ U L}^{-1}$ ), mas *G. applanatum* mostrou-se especialmente sensível à adição desse metal, elevando a sua produção cerca de 40 vezes ( $\sim 1850 \text{ U L}^{-1}$ ) na presença de cobre.

Muitos estudos sugerem que a influência do cobre na regulação da produção de lacase parece ocorrer em nível transcricional. Collins e Dobson (1997) observaram níveis muito baixos de transcrição de gene de lacase (*lcc*) antes da adição de cobre. Contudo, a adição de 400  $\mu\text{M}$  de cobre elevou os níveis de RNA mensageiro de *lcc* apenas 15 minutos após a adição, o aumento continuou progressivamente e após 6 horas altos níveis de transcrito foram observados.

Esse efeito do cobre sobre a transcrição indica que há uma regulação direta da expressão gênica intermediada pelo cobre. De fato, a análise de sequências promotoras de genes de lacase identificou a presença de elementos sensíveis a metal (MRE – *metal responsive element*). As sequências destes MREs são similares à sequência consenso identificada em promotores do gene da metalotioneína (*mt*) que está envolvida na resposta a metais desse gene em eucariontes superiores (FARACO et al., 2003). Uma variedade de metais induz a expressão desses genes, o que parece ocorrer via uma única proteína reguladora que atua como receptor de metal e fator de transcrição (COLLINS; DOBSON, 1997; SODEN; DOBSON, 2001).

Giardina et al. (1999), ao analisarem a região promotora de um gene de lacase induzida por cobre (*POXA1b*) de *Pleurotus ostreatus*, identificaram um MRE. Mais tarde, Faraco et al. (2003) identificaram quatro MREs na região promotora de dois genes de lacase de *P. ostreatus* (*poxc* e *pox1b*). Litvintseva e Henson (2002), analisando três genes de lacase (*Lac1*, *Lac2* e *Lac3*) do ascomiceto *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, identificaram quatro MREs situados próximos ao TATA box de *Lac2* e dois MREs consecutivos à montante do TATA box do promotor de *Lac1*. De forma similar, Galhaup et al. (2002b) identificaram dois MREs na região promotora da principal isoenzima de lacase de *Trametes pubescens* (LAP2).



Apesar dos dados disponíveis sobre a presença de MREs nos promotores de lacases, são poucas as análises sobre os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da expressão de lacase por diferentes estímulos, como presença de cobre. Piscitelli et al. (2011) e Kües e Rühl (2011) realizaram ampla revisão destes principais estudos.

Faraco et al. (2003) analisaram a interação de proteínas com MREs encontrados nos promotores dos genes *poxc* e *pox1b* de *P. ostreatus*. Todos os MREs identificados foram capazes de interagir com proteínas presentes em extratos fúngicos, exceto um MRE localizado à jusante do sítio de início de transcrição de *poxc*. Diferentes proteínas parecem estar envolvidas na interação dos MREs e na regulação da expressão mediada por cobre. De acordo com Faraco et al. (2003) uma proteína de 25 kDa interage com MREs na ausência de cobre, impedindo a expressão de lacase.

Canessa et al. (2008) identificaram uma sequência ACE (ativador da expressão de *cup1*) em *Phanerochaete chrysosporium*. ACEs são elementos sensíveis ao cobre previamente descritos em *Saccharomyces cerevisiae* como o sítio de reconhecimento do fator de transcrição ACE1. Esse fator de transcrição ativa a expressão do gene *cup1* em *S. cerevisiae* como resposta à presença de cobre, indicando que a presença desses elementos pode estar envolvida na regulação da expressão de lacase em algumas espécies (KÜES; RÜHL, 2011; PISCITELLI et al. 2011).

Apesar do conhecimento sobre a existência de sequências reguladoras da atividade, esse não parece ser o único mecanismo envolvido na regulação da expressão mediada por cobre.

Saparrat et al. (2010) avaliaram a transcrição de três genes de *Coriolopsis rigida* (*lcc1*, *lcc2* e *lcc3*) mediante a utilização de diferentes indutores em diferentes fases de crescimento. A adição de cobre provocou o aumento de transcritos do gene *lcc1* em 15 horas de incubação, contudo isso não foi acompanhado pelo aumento da atividade enzimática extracelular. Os autores sugerem que a adição de cobre resultaria em ativação e/ou estabilização de lacases e que o aumento da atividade enzimática não estaria imediatamente associado ao aumento da transcrição. De fato, Palmieri et al. (2000) descreveram a atividade de uma protease extracelular em *Pleurotus ostreatus* cuja atividade era inibida por cobre, o que resultaria na estabilização de lacases em extratos brutos.

#### 1.2.6.2.4 Indutores

Compostos fenólicos e aromáticos com estrutura similar à lignina ou derivados de lignina costumam ser adicionados aos meios de cultivo com o objetivo de aumentar a produção de lacases (PISCITELLI et al., 2011). A indução de lacases por essas substâncias parece estar relacionada ao desenvolvimento de resposta fúngica contra compostos aromáticos tóxicos comumente produzidos durante a degradação de lignina (THURSTON, 1994).

Muitos são os compostos com potencial efeito indutor de lacase (Tabela 1.3), contudo a influência de tais compostos ocorre de formas distintas que dependem da linhagem fúngica, do tipo de composto e da concentração usada (PISCITELLI et al., 2011).

Bollag e Leonowicz (1984) analisaram o efeito de compostos aromáticos na produção de lacase por diferentes espécies de fungos. Os autores avaliaram o deuteromiceto *Botrytis cinerea*, o ascomiceto *Podospora anserina* e os basidiomicetos *Fomes annosus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pholiota mutabilis*, *Pleurotus ostreatus*, *Rhizoctonia praticola* e *Trametes versicolor*. Todos produziram quantidades detectáveis de lacase durante o cultivo e, ao serem cultivados na presença de 2,5-xilidina (XYL), *F. annosus*, *P. mutabilis*, *P. ostreatus* e *T. versicolor* produziram níveis muito mais elevados de lacase. Diferentemente, *B. cinerea* não teve a atividade de lacase aumentada pela presença do indutor e a produção dessa enzima por *P. anserina* diminuiu na presença de XYL. Tais resultados demonstraram que somente as lacases dos basidiomicetos avaliados foram induzíveis e o aumento da atividade enzimática ocorreu devido à expressão de novas isoformas da enzima (BOLLAG; LEONOWICZ, 1984).

Collins e Dobson (1997) investigaram o efeito dos indutores 1-Hidroxibenzotriazol (HBT) e 2,5-Xilidina (XYL) sobre a atividade de lacase de *Trametes versicolor*. Eles constataram um aumento da atividade de lacase em todas as concentrações empregadas, sendo os valores máximos verificados com a adição de 500  $\mu\text{M}$  de XYL ( $\sim 5,5 \text{ U mL}^{-1}$ ) e de HBT ( $\sim 2,3 \text{ U mL}^{-1}$ ). Os autores também observaram que o aumento da atividade enzimática era acompanhado pelo aumento de transcritos do gene *lcc*.

**Tabela 1.3:** Exemplos de compostos aromáticos avaliados como indutores da atividade de lacases em fungos.

Composto	Referência
1-Hidroxibenzotriazol	Collins e Dobson (1997); Soden e Dobson (2001)
2,5-Xilidina	Bollag e Leonowicz (1984); Eggert et al. (1996); Collins e Dobson (1997); Soden e Dobson (2001); Hou et al. (2004); Xiao et al. (2004); Xavier et al. (2007); Elisashvili et al. (2010)
Ácido ferúlico	Collins e Dobson (1997); Palmieri et al. (2000); Soden e Dobson (2001); Hou et al. (2004); Xiao et al. (2004); Elisashvili et al. (2010) ; Karp et al. (2012)
Ácido siríngico	Xiao et al. (2004)
Ácido vanílico	Elisashvili et al. (2010)
Ácido verátrico	Collins e Dobson (1997); Soden e Dobson (2001); Elisashvili et al. (2010)
Álcool veratrílico	Eggert et al. (1996); Palmieri et al. (2000); Hou et al. (2004); Xiao et al. (2004); Xavier et al. (2007);
Catecol	Cavallazzi et al. (2005); Elisashvili et al. (2010)
Guaiacol	Eggert et al. (1996); Hou et al. (2004); Xiao et al. (2004)
Hidroquinona	Elisashvili et al. (2010)
Lignosulfonato	Eggert et al. (1996); Xavier et al. (2007)
Pirogalol	Elisashvili et al. (2010)
Vanilina	Xiao et al. (2004); Cavallazzi et al. (2005) ; Elisashvili et al. (2010)

Soden e Dobson (2001) testaram o efeito dos mesmos indutores (XYL e HBT), ácido ferúlico e ácido verátrico na produção de lacase de *Pleurotus sajor-caju*. Todos os compostos avaliados foram capazes de induzir a produção de lacase, porém, em concentrações maiores que 200  $\mu\text{M}$ , o crescimento do fungo foi inibido, demonstrando o efeito tóxico dos indutores. Como descrito anteriormente, o aumento da atividade de lacase também veio acompanhado por um aumento dos transcritos de genes de lacase de *P. sajor-caju*. Contudo, dos quatro genes identificados (*Psc lac1, lac2, lac2 e lac4*), *lac2* e *lac4* foram fortemente induzidos, *lac1* foi fracamente induzido e *lac3* não teve sua transcrição afetada, mostrando ser um gene constitutivo.

Tais relatos indicam que a indução via compostos aromáticos se dá em nível transcricional e que ocorre de forma distinta para diferentes fungos, bem como entre diferentes isoenzimas do mesmo organismo (PISCITELLI et al., 2011). De fato, a

análise da região promotora de genes de lacase revelou a presença de sequências consenso denominadas elementos sensíveis a xenobióticos (XRE – *xenobiotic responsive elements*) e elementos sensíveis a antioxidantes (ARE - *antioxidant responsive element*). Tais sequências parecem interagir com outros elementos estimulando a transcrição de genes de lacase na presença de compostos aromáticos (GIARDINA et al., 2010). Dessa forma, a presença desses elementos na região promotora tornaria a lacase induzível por compostos aromáticos e a ausência de indução poderia ser explicada pela ausência desses elementos (GIARDINA et al., 2010; PISCITELLI et al., 2011).

Giardina et al. (1999) detectaram a presença de um XRE no promotor do gene *poxa1b*. Soden e Dobson (2001) também observaram a presença de um XRE no promotor do gene *Psc lac4* que foi induzido, enquanto o gene *Psc lac3* não apresentou tais sequências, corroborando a ausência de indução observada experimentalmente. Galhaup et al. (2002b) não detectaram XREs ou ACEs na região promotora do gene *lap2* de *Trametes pubescens*, o que está de acordo com dados experimentais que indicaram que a presença de diversos indutores aromáticos durante o cultivo desse fungo não afetou a produção de lacase (GALHAUP et al., 2002a).

### 1.2.7 Expressão gênica em fungos

Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre as lacases, muitos genes codificadores dessa enzima têm sido isolados e caracterizados. De acordo com Piscitelli et al. (2010) a multiplicidade de genes de lacases organizados em famílias gênicas é comum em fungos, além da produção de várias isoenzimas. Tais características foram relatadas para várias espécies como *Agaricus bisporus* (PERRY et al., 1993), *Lentinula edodes* (ZHAO; KWAN, 1999), *Trametes* sp. (XIAO et al., 2006), *Trametes sanguinea* (HOSHIDA et al., 2001), *Trametes versicolor* (D'SOUZA et al., 1996), *Pleurotus eryngii* (RODRÍGUEZ et al., 2008), *Pleurotus ostreatus* (PALMIERI et al., 2000), *Pleurotus sajor-caju* (SODEN; DOBSON, 2001), *Pycnoporus cinnabarinus* (TEMP et al., 1999) e vários outros.

A caracterização de famílias gênicas de lacases tem sido impulsionada pela disponibilidade de um número crescente de sequências genômicas, e características essenciais de sequências gênicas de lacases fúngicas foram descritas com base em

estudos *in silico*. O alinhamento de sequências de aminoácidos deduzidas a partir de genes de lacase revelou que as quatro regiões de ligação ao cobre são altamente conservadas (D'SOUZA et al., 1996).

Segundo Giardina et al. (2010) o alinhamento de mais de 100 sequências de lacases resultou na identificação dessas regiões conservadas (L1-L4) (Tabela 1.4) úteis para identificar lacases e para diferenciá-las de outras multicobre oxidases. Kües e Rühl (2010) relatam que tais regiões conservadas codificam 12 resíduos de aminoácidos que atuam como sítios de ligação ao cobre onde L2 e L4 são comuns a todas as multicobre oxidases, enquanto L1 e L3 são exclusivos de lacases.

**Tabela 1.4:** Comparação das sequências consenso de lacases de *Trametes vesicolor* (Tv1 e Tv2), *Coprinus cinereus* (Cc), *Lentinus tigrinus* (Lt) e *Trametes trogii* (Tt)

Espécie	L1	L2	L3	L4
Tv1	HWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPI	GTFWYHSHLSTQYCDGLRGP	HPFHLHGH	GPWFLHCHIDFHLEAGFAVVF
Tv2	HWHGFFQAGTNWADGPAFVNQCPI	GTFWYHSHLSTQYCDGLRGP	HPFHLHGH	GPWFLHCHIDFHLEAGFAIVF
Cc	HWHGLFQRGTNWADGADGVNQCPI	GTFWYHSHFGTQYCDGLRGP	HPFHLHGH	GPWFFHCHIEFHLMNGLAIVF
Lt	HWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPI	GTFWYHSHLSTQYCDGLRGP	HPFHLHGH	GPWFLHCHIDFHLDAGFAVVM
Tt	HWHGFFQHGTNWADGPAFVNQCPI	GTFWYHSHLSTQYCDGLRGP	HPFHLHGH	GPWFLHCHIDFHLEAGFAVVM

Fonte: Giardina et al. (2010)

Tais características permitem o isolamento de sequências gênicas específicas de lacases de fungos de diversos gêneros baseadas na sequência das regiões conservadas de ligação ao cobre (HOSHIDA et al., 2001). Esse método de busca por sequências gênicas pode ser útil no isolamento de todos os genes de lacase de um organismo ou mesmo de uma amostra ambiental (BELOQUI et al., 2006). Essa abordagem também torna possível caracterizar isoenzimas que não podem ser obtidas por métodos tradicionais de triagem baseados na atividade enzimática (PISCITELLI et al., 2010).

A expressão das várias isoenzimas de lacase é diferencialmente regulada e depende das condições de crescimento e de estados fisiológicos (SODEN; DOBSON, 2003; XIAO et al., 2006).

Segundo Mansur et al. (1998) em alguns basidiomicetos foram detectadas sequências consenso (*creA*) na região promotora de genes de lacase. Essas sequências codificam sítios de ligação para a proteína repressora CREA que está envolvida em processos de repressão catabólica em fungos (MATHIEU; FALENBOK, 1994). Tais achados indicam que a concentração de glicose no meio de cultivo atua diretamente sobre a expressão de genes de lacase, afetando a atividade

enzimática. Além disso, a presença de sequências *creA* nos promotores de alguns genes e não de outros tornaria algumas lacases susceptíveis à repressão catabólica e outras não (XAVIER et al., 2007).

A concentração e o tipo de fonte de nitrogênio afetam a expressão de genes de lacase (item 1.2.6.2.2). Soden e Dobson (2001) sugerem que o nitrogênio pode regular a expressão de genes de lacase por meio de proteínas do tipo NIT2, envolvidas na regulação do metabolismo de nitrogênio em *Neurospora crassa* (MARSLUF, 1997). Sequências consenso, correspondentes a sítios de ligação de proteínas NIT2, foram localizadas na região promotora de genes de lacase (GIARDINA et al., 2010), sugerindo seu envolvimento na expressão gênica.

A regulação da expressão gênica de lacase por metais é generalizada em fungos, sendo o cobre um dos principais reguladores em nível transcricional (item 1.2.6.2.3) (GIARDINA et al., 2010).

Mais recentemente Pezzella et al. (2012) analisaram a transcrição de nove genes de lacase (*lacc1*, *lacc2*, *lacc3*, *lacc4*, *lacc5*, *lacc6*, *lacc7*, *lacc8*, *lacc10*) de *Pleurotus ostreatus* sob diferentes condições de cultivo e de desenvolvimento. Os autores observaram que a adição de cobre resultou em forte indução dos genes *lacc10* e *lacc2* e muito pouco nos demais genes, sendo essa resposta também dependente do crescimento do fungo. Esse resultado sugere a regulação via MREs para esses genes (PISCITELLI et al., 2011). Porém, a presença de vários MREs no promotor do gene *lacc4*, que foi fracamente induzido, impediu que os autores indicassem a correlação direta entre MREs e a expressão gênica. Segundo os autores, parece que a localização e a orientação dos MREs também interferem na indução por cobre (PEZZELLA et al., 2012).

A análise de promotores também mostrou a presença de sequências consenso do tipo elementos sensíveis a xenobióticos (XRE) e elementos sensíveis a antioxidantes (ARE) que afetam a expressão gênica de lacase frente à modificações ambientais (item 1.2.6.2.4).

### **1.2.7.1 Expressão heteróloga**

Robert et al. (2011) afirmam que aplicações biotecnológicas de lacases requerem grandes quantidades de enzima, a um custo baixo, com propriedades desejáveis como elevado potencial redox, ótima atividade em pH neutro ou alcalino,

tolerância a solventes orgânicos e termoestabilidade. É muito improvável que todas essas características estejam presentes naturalmente.

Adicionalmente, Piscitelli et al. (2010) afirmam que a produção de lacases a partir de fontes nativas não pode atender à demanda do mercado devido principalmente ao baixo rendimento e à sua incompatibilidade entre processos fermentativos industriais padrão e as condições necessárias para o crescimento de muitos micro-organismos.

Há, portanto, a necessidade crescente de atender estas demandas e uma das possibilidades é pelo uso da biotecnologia, empregando-se técnicas de DNA recombinante e expressão heteróloga (PISCITELLI et al. 2010) e da modificação estrutural de enzimas (ROBERT et al., 2011).

Demain e Vaishnav (2009) argumentam que proteínas recombinantes são facilmente cultiváveis e o aumento da produtividade pode ser obtido pela manipulação de hospedeiros, reduzindo custos de produção. Associado a isso, a versatilidade e as possibilidades de escalonamento da produção de proteínas recombinantes as tornam ideais para uso industrial. Adicionalmente, a modificação pode ser utilizada para melhorar a estabilidade, atividade, especificidade de uma enzima de forma a atender as exigências específicas de um determinado segmento (FERRER-MIRALLES et al., 2009)

A expressão heteróloga de lacases em bactérias, leveduras, fungos e plantas tem sido relatada e foi amplamente revisada por Piscitelli et al. (2010).

Huang et al. (2011) relatam a clonagem e expressão de lacase do fungo *Polyporus gramocephalus* TR16 na levedura *Pichia pastoris*. Esse fungo produz grandes quantidades de lacase ( $\sim 69700 \text{ U L}^{-1}$ ) sob cultivo tradicional, contudo em um período de 24 dias, o que tornaria a enzima inviável para aplicação industrial. A proteína recombinante produziu pico de atividade em 11 dias, porém com atividade abaixo da produzida pelo fungo ( $\sim 1600 \text{ U L}^{-1}$ ). Piscitelli et al. (2010) ressaltam que é comum uma grande variabilidade no rendimento da expressão de enzimas recombinantes em leveduras, relacionada a vários fatores como o DNA expresso, o hospedeiro, a escolha dos promotores e principalmente dos peptídeos sinal.

Rodríguez et al. (2008) clonaram e expressaram o gene *pe13* de lacase de *Pleurotus eryngii* em *Aspergillus niger*. O promotor deste gene apresentava MREs, o que indica que a expressão poderia ser afetada pela presença de cobre no meio de cultivo. Porém, como a identificação do gene *pe13* foi realizada por meio de análises

*in silico*, não havia parâmetros experimentais sobre o padrão de expressão desse gene. A atividade da enzima recombinante foi baixa (2,4 U mg<sup>-1</sup> de proteína), devido provavelmente a problemas de excreção. Os autores indicam que novos peptídeos sinal devem ser avaliados. Segundo Piscitelli et al. (2010), fungos filamentosos são hospedeiros interessantes para expressão de proteínas recombinantes, principalmente pela sua habilidade em secretar grandes quantidades de proteínas, e o rendimento de lacases heterólogas obtido é considerado maior do que em leveduras.

### 1.2.8 Aplicações

Reações de oxidação são fundamentais em diversas indústrias e representam um desafio, uma vez que, o uso da tecnologia convencional de oxidação traz inconvenientes como reações inespecíficas ou indesejadas e o uso de químicos agressivos ao meio ambiente (COUTO; HERRERA, 2006). Isso tem impulsionado a busca por novas abordagens tecnológicas baseadas em sistemas biológicos, como a oxidação enzimática que traz muitas vantagens como especificidade e atividade em condições brandas de pH e temperatura, maior controle da geração de produtos de interesse, menor custo energético e menor impacto ambiental (BINOD et al., 2008).

A oxidação enzimática pode ser potencialmente utilizada em diferentes indústrias e enzimas que utilizam o oxigênio molecular como aceptor de elétrons (item 1.2.2) são consideradas as mais interessantes, o que coloca as lacases como enzimas potenciais para aplicação com diferentes propósitos (COUTO; HERRERA, 2006).

As lacases são extremamente atrativas para aplicações biotecnológicas, pois possuem uma ampla variedade de substratos naturais como fenóis, polifenóis, anilinas, aril diaminas, fenóis metóxi substituídos, hidroxí indóis, benzenotióis, compostos metálicos orgânicos e inorgânicos, dentre muitos outros (PISCITELLI et al., 2010). O potencial redox da maioria das lacases descritas é menor do que o de compostos não fenólicos, tornando-as incapazes de oxidar tais moléculas. Contudo, o uso de mediadores (item 1.2.5) permite que lacases também oxidem tais compostos, ampliando ainda mais o seu potencial de aplicação (BALDRIAN, 2006).



Essas propriedades das lacases levaram à possibilidade de aplicação dessas enzimas em vários setores industriais como têxtil, alimentos, papel e celulose, farmacêutico, químico, cosmético, nanobiotecnológico e de biorremediação (MAYER; STAPLES, 2002; MOROZOVA et al., 2007; PISCITELLI et al., 2010).

Segundo Brijwani et al. (2010), lacases apresentam múltiplas possibilidades de aplicação na indústria de alimentos e bebidas como na panificação, processamento de sucos e vinhos, e também na biorremediação de águas residuais. Couto e Herrera (2006) destacam que as lacases são especialmente empregadas em processos que melhoram ou modificam a cor dos alimentos, servindo para eliminar compostos fenólicos indesejáveis responsáveis pelo escurecimento e turvação de sucos de frutas, cervejas e vinhos.

Osma et al. (2010) relatam que várias preparações comerciais à base de lacases estão em uso na indústria de alimentos. Entre elas a *Flavoustar*<sup>®</sup> (Novozymes, Novo Nordisk, Dinamarca) é utilizada em cervejarias para impedir a formação de compostos que alteram o sabor, pela eliminação de oxigênio, impedindo que ele reaja com ácidos graxos, aminoácidos, proteínas ou álcool para formar precursores de substâncias que afetam o sabor da cerveja.

Uma das aplicações de lacase que mais cresce é na indústria têxtil para branquear ou descolorir tecidos, ou ainda para tratar efluentes têxteis (COUTO; HERRERA, 2006).

Segundo Rodríguez-Couto (2012) lavagens claras de denim são realizadas principalmente com hipoclorito de sódio que, apesar de barato e atuar à temperatura ambiente, é um produto químico agressivo, que pode amarelar e danificar alguns tecidos, além de gerar uma grande quantidade de resíduos tóxicos. Lacases têm sido empregadas como alternativas ecologicamente amigáveis para a descoloração de denim, produzindo ação exclusivamente no índigo e com dano mínimo às fibras dos tecidos. Muitas são as preparações de lacases disponíveis comercialmente com esse objetivo (Tabela 1.5).

Várias preparações incluem, além da lacase, mediadores químicos (ex. IndiStar<sup>®</sup> e Lava<sup>®</sup> Zyme LITE) que propiciam o uso do produto com uma grande variedade de corantes têxteis, além de permitir acabamentos personalizados (RODRÍGUEZ-COUTO, 2012).

**Tabela 1.5:** Preparações comerciais à base de lacases para aplicações na indústria têxtil

<b>Principal aplicação</b>	<b>Nome do produto</b>	<b>Fabricante</b>
Clareamento e acabamento em denim	Americos Laccase LTC	Americos Industries Inc. (Índia)
Clareamento de denim	Americos Laccase P	Americos Industries Inc. (Índia)
Acabamento em denim	Apcozyme II-S	Apollo Chemical Company (EUA)
Clareamento de denim	Bleach Cut 3-S	Season Chemicals (China)
Acabamento em denim	Cololacc BB	Colotex Biotech. Co. Ltd. (Hong Kong)
Clareamento de denim	DeniLite <sup>®</sup> I e DeniLite <sup>®</sup> II	Novozymes (Dinamarca)
Acabamento em denim	Ecostone <sup>®</sup> LCC10	AB Enzymes GmbH (Alemanha)
Clareamento de denim	Hypozyme	Condor Speciality Products (EUA)
Acabamento em denim	IndiStar <sup>®</sup>	Genencor Inc. (EUA)
Clareamento e acabamento em denim	IndiStar Color Adjust system	Genencor Inc. (EUA)
Clareamento de denim	Lacasa Ultratex	Proenzimas Ltda. (Colômbia)
Clareamento de denim	Lava <sup>®</sup> Zyme LITE	DyStar GmbH (Alemanha)
Acabamento em denim	Novoprime <sup>®</sup> Base 268	Novozymes (Dinamarca)
Acabamento em denim	Primagreen Ecofade LT100	Genencor Inc. (EUA)
Clareamento de denim	Prozyme <sup>®</sup> LAC	Sunson Industry Group Co. Ltd. (China)
Clareamento de denim	Purizyme	Puridet Asia Ltd. (Hong Kong)
Acabamento em denim	Trilite II	Tri-Tex Co. Inc. (Canadá)
Clareamento de denim	ZyLite	Zytext Pvt. Ltd. (Índia)

Fonte: Osma et al. (2010); Rodríguez-Couto (2012).

A indústria de papel e celulose tem especial interesse no uso de lacases, pois essas enzimas podem despolimerizar a lignina e deslignificar a polpa de madeira e de celulose, processo denominado biopolpação (MACIEL et al., 2010). De acordo com Widsten e Kandelbauer (2008) o termo biopolpação é aplicado quando fungos ou enzimas ligninolíticas são empregados no tratamento de material lignocelulósico para polpação da madeira. Convencionalmente, a polpação de material lignocelulósico envolve procedimentos à base de produtos clorados que são altamente poluentes. A biopolpação baseada no uso de lacases representa uma alternativa vantajosa, uma vez que reduz os custos energéticos do processo, melhora a resistência do papel, aumenta o rendimento da produção e diminui o impacto ambiental (WILDSTEN; KANDELBAUER, 2008).

Outra aplicação de lacase na indústria de papel e celulose bastante estudada é o branqueamento da polpa de papel kraft. Segundo Moldes e Vidal

(2012) o branqueamento tradicional consiste na oxidação, remoção e/ou descoloração da lignina residual da polpa, passo necessário para produção de papéis de melhor qualidade. Lacases seriam empregadas associadas a mediadores redox (LMS – *laccase-mediator systems*) em substituição a outros químicos tradicionalmente empregados. Contudo, apesar da ampla pesquisa nessa área raramente um processo de biobranqueamento com LMS foi realizado em escala industrial (CALL; MÜCKE, 1997).

A capacidade da lacase de formar radicais reativos de lignina também tem sido explorada para a produção de modificações dirigidas em fibras de madeira. De acordo com Wildsten e Kandelbauer (2008) lacases podem ativar a lignina ligada às fibras durante a fabricação de compostos como MDF (*medium density fiberboard*) atuando como um adesivo, melhorando as propriedades mecânicas do material e reduzindo o uso de adesivos sintéticos caros e tóxicos.

Couto e Herrera (2006) destacam que a indústria cosmética tem voltado sua atenção para as pesquisas com lacases e suas potenciais aplicações nesse setor. Composições para coloração de cabelos à base de lacases têm sido desenvolvidas com o objetivo de reduzir os danos à pele e ao cabelo durante processos de coloração. As lacases atuam como agentes oxidantes em substituição ao peróxido de hidrogênio das tinturas convencionais (LANG; COTTERET, 2003) e aumentariam a estabilidade do produto reduzindo os níveis de oxigênio (YOSHINO et al., 2001).

Lacases também apresentam potencial aplicação na composição de cosméticos clareadores, graças à sua capacidade de oxidar a melanina, provocando descoloração deste pigmento. Khammuang e Sarnthima (2012) avaliaram o potencial da lacase do cogumelo *Lentinus polychrous* em descolorir melanina sintética derivada do precursor da melanina humana (L-tirosina), e constataram até 85% de descoloração empregando uma combinação de lacase e mediador.

Segundo Kunammeni et al. (2008), lacases podem ser empregadas na síntese de polímeros complexos e de produtos farmacêuticos como uma alternativa à síntese orgânica convencional. Os autores destacam que a polimerização enzimática utilizando lacase ou LMS pode gerar polímeros de interesse que não seriam obtidos de outra forma. Por exemplo, lacases podem ser usadas na preparação de polifenóis poliméricos como uma alternativa ao processo tradicional de síntese envolvendo formaldeído (KUNAMMENI et al., 2008).

Mikolasch e Schauer (2009) destacam o uso de lacases e LMS na transformação enzimática de antibióticos e na produção e transformação de compostos biologicamente ativos. Destacam também que o uso de lacases na transformação de substratos tóxicos pode levar à produção de moléculas de interesse com ação antioxidante, antiinflamatória, analgésica, sedativa etc. A actinocina, por exemplo, é sintetizada por uma reação catalisada por lacase a partir do ácido 4-metil-3-hidroxiantranílico, e se mostrou eficiente antitumoral por atuar impedindo a transcrição e consequente multiplicação de células tumorais (KUNAMMENI et al., 2008).

A biotransformação de poluentes recalcitrantes utilizando-se lacases tem um grande potencial para o tratamento de solos e águas residuais contendo compostos fenólicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), corantes sintéticos, pesticidas químicos e outros poluentes (MAJEAU et al., 2010). Segundo Mougin et al. (2003) tanto lacases nativas quanto modificadas podem ser empregadas em processos de biorremediação, e estes processos podem utilizar enzimas purificadas, enzimas purificadas e imobilizadas, enzimas provenientes diretamente de meios de cultivo ou podem ser realizados em biorreatores.

De acordo com Pant e Adholeya (2007) vários fungos têm sido empregados para a descoloração de águas residuais de destilarias por meio da degradação de melanoidinas. O tratamento com fungos visa a remoção de compostos orgânicos e envolve lacases extracelulares. De fato, Ferreira et al. (2010) verificaram que *Pleurotus sajor-caju* cultivado em vinhaça (100%) produziu 98% de descoloração em 12 dias e elevada atividade de lacase ( $450 \text{ U L}^{-1}$ ).

Corantes e pigmentos são amplamente empregados na indústria têxtil, de papel e celulose, de plásticos, cosméticos, farmacêutica e de alimentos (ASGHER et al., 2008). Processos para biodegradação desses compostos têm atraído cada vez mais atenção, principalmente devido à toxicidade e potencial carcinogênico da maioria dos corantes (HUSAIN; HUSAIN, 2008). Enzimas ligninolíticas e particularmente as lacases, devido à sua baixa especificidade a substratos, são eficazes na degradação de uma grande variedade de corantes. Zeng et al. (2011) verificaram que a lacase de *Trametes trogii* era a única enzima envolvida na degradação de corantes antraquinônicos (RBBR - azul brilhante de remazol, RB4 - azul reativo 4 e AB129 - azul ácido 129) e corantes azo (AR1 - vermelho ácido 1, RB5 - preto reativo 5). A degradação dos corantes azo exigiu o uso de um mediador

redox (HBT – hidroxibenzotriazol), porém a enzima produziu em 30 minutos descoloração de 90% do AR1, 85% do RBBR, 69% do RB4, 65% do RB5 e 45% do AB129.

### 1.3 Fermentação submersa

A fermentação submersa (FSm) tem sido amplamente utilizada em processos para produção de enzimas de interesse industrial. Segundo Binod et al. (2008) o meio de cultivo na FSm é líquido e permanece em contato com o micro-organismo e o cultivo pode ser realizado em batelada, batelada alimentada, batelada perfundida ou contínua. Durante o cultivo em batelada um volume fixo de meio é utilizado enquanto na batelada alimentada os componentes concentrados do meio são gradualmente adicionados. Já na batelada perfundida retira-se determinado volume de meio já utilizado e livre de células que é substituído por igual volume de meio. No cultivo contínuo meio fresco é adicionado ao sistema durante a fase de crescimento exponencial com a remoção de igual volume de meio contendo produto (BINOD et al., 2008).

De acordo com Majeu et al. (2010) a FSm é usualmente empregada para produção de lacases de fungos, apesar desta forma de cultivo não se assemelhar às condições naturais de vida dos micro-organismos produtores. Contudo, os parâmetros do processo fermentativo são facilmente controlados e existem várias configurações de biorreatores que podem atender às exigências de produção dessa enzima.

Em estudos preliminares envolvendo a produção (ALVES et al., 2004; ZHOU et al., 2007; SIVAKUMAR et al., 2010), indução (BALDRIAN; GABRIEL, 2002; PALMIERI et al., 2000; ELISASHVILI et al., 2010) ou caracterização (HAN et al., 2005; ZOUARI-MECHICHI et al., 2006; NAKADE et al., 2010) de lacases de fungos verificou-se a predominância de FSm utilizada em pequena escala, usualmente com frascos Erlenmeyer. Nessas situações a FSm é preferida devido ao controle simples do processo fermentativo, acesso direto ao extrato enzimático ou mesmo às características naturais do substrato avaliado, como efluentes ou resíduos líquidos (STRONG, 2011).

Fenice et al. (2003) compararam a produção de lacase de *Panus tigrinus* em FSm e FES em meio à base de água residual derivada do processamento mecânico

de azeitonas para produção de azeite. Os autores verificaram que a produção de lacase em FSm ( $4600 \text{ U L}^{-1}$ ) foi maior do que a produção em FES ( $1300 \text{ U L}^{-1}$ ) e que fatores como agitação e a taxa de aeração são limitantes no processo e devem ser considerados em detalhes para escalonamento dos processos de produção de enzima.

#### **1.4 Fermentação no estado sólido**

A fermentação no estado sólido (FES) consiste na fermentação em um suporte sólido natural ou inerte na ausência de água livre, onde o organismo cresce na superfície ou nos espaços do suporte (SOCCOL et al., 2010). Deve-se distinguir a FES da fermentação no substrato sólido que é caracterizada como processo em que o substrato atua unicamente como fonte de carbono/energia na ausência ou quase ausência de água livre (BINOD et al., 2008).

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo e, apesar da imensa contribuição da atividade agrícola para a economia nacional, ela também é responsável pela produção de grandes quantidades de resíduos que podem causar vários problemas ambientais. Por conta disso, o interesse por formas de utilização sustentável e agregação de valor aos resíduos agroindustriais tem crescido e o desenvolvimento de bioprocessos para utilização desses materiais ganha destaque (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Bioprocessos que empregam resíduos agroindustriais se valem desse material como substratos alternativos ao mesmo tempo em que removem da natureza grande parte do que seria descartado (PANDEY et al., 2000b). Muitos processos têm sido desenvolvidos para utilização de resíduos como polpa e cascas de café, casca de mandioca, bagaço de mandioca, bagaço de cana e vários outros para a produção de etanol, proteínas unicelulares, cogumelos, ácidos orgânicos, aminoácidos e enzimas (PANDEY et al., 2000a; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

A produção de enzimas por FES tem demonstrado grande potencial uma vez que o fermentado pode ser usado diretamente como fonte de enzima, além de oferecer outras vantagens como elevada produtividade volumétrica, alta concentração de produtos, produção de menor quantidade de efluentes, uso de equipamentos simples entre outras (PANDEY et al., 1999).

Ao mimetizar as condições naturais de crescimento de fungos lignocelulolíticos, a FES utilizando resíduos agroindustriais tem sido utilizada para aumentar a produção de enzimas ligninolíticas. De acordo com Toca-Herrera et al. (2007) resíduos agroindustriais são ricos em carboidratos solúveis e também contêm indutores de lacases assegurando uma produção eficiente dessa enzima. Além disso, esses resíduos parecem produzir maiores atividades de lacase do que suportes inertes para os mesmos fungos e nas mesmas condições de cultivo (TOCA-HERRERA et al., 2007). Vários são os exemplos de produção de lacases por FES, contudo poucos desses processos foram empregados em escala industrial (MAJEU et al., 2010).

Vikineswary et al. (2006) avaliaram a produção de lacases por *Pycnoporus sanguineus* em FES em substrato à base de tecido vegetal de palmeiras (*oil palm*). Após otimização e ajustes na concentração de nitrogênio (ureia) os autores obtiveram atividade máxima de  $46,5 \text{ U g}^{-1}$  e verificaram que a recuperação de lacase foi mais eficiente quando água a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 8,0 era utilizada.

Alexandrino et al. (2007) avaliaram a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* em FES de resíduos da produção de laranja e após 10 dias de cultivo obtiveram  $56 \text{ U g}^{-1}$  de lacase quando o substrato era umedecido até 85% com solução de minerais. Mais recentemente, Karp (2012) estudou a produção de lacase de *Pleurotus ostreatus* (PI 22 Em) por FES em bagaço de cana e foi obtida atividade máxima de  $151,6 \text{ U g}^{-1}$  após 5 dias de cultivo sob condições otimizadas, ou seja, na presença de extrato de levedura e  $\text{CuSO}_4$  e ácido ferúlico como indutores.

Xin e Geng (2011) cultivaram *Trametes versicolor* por FES empregando resíduos de jardinagem (restos de troncos de árvores, galhos, folhas e aparas provenientes da poda). A máxima atividade de lacase ( $8,6 \text{ U g}^{-1}$ ) foi obtida com 85% de umidade, pH inicial de 7,0 e álcool veratrílico (1 mM) como indutor.

Zeng et al. (2011) compararam a produção de lacase de *Trametes trogii* por FSm e por FES em substrato composto por aparas de madeira e pó de torta de soja, um produto utilizado em alimentação animal.  $100 \text{ U g}^{-1}$  de lacase foram produzidas no 6º dia de cultivo em FES em contraste com  $4,3 \text{ U mL}^{-1}$  produzidas em 9 dias por FSm. Além disso, verificaram que o extrato foi eficiente em produzir descoloração de corantes antraquinônicos e azo.

## 1.5 Matérias primas utilizadas em processos fermentativos

Uma abordagem eficiente na redução dos custos de processos fermentativos é a utilização de resíduos agroindustriais, alguns dos quais contêm quantidades significativas de carboidratos e indutores da síntese enzimática assegurando a produção de enzimas ligninolíticas (ELISASHVILI et al., 2008). A seleção do resíduo vegetal adequado para possibilitar o crescimento de micro-organismos e a síntese de enzimas de interesse representa papel central no desenvolvimento de bioprocessos eficientes (PANDEY et al., 2000b; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Pandey et al. (1999) destacam que resíduos agroindustriais são considerados excelentes substratos para processos fermentativos. Vários substratos têm sido empregados para o cultivo de micro-organismos com a finalidade de produção de alguns grupos específicos de enzimas, como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de milho, casca de arroz, palha de trigo, bagaço de mandioca, farinha de trigo, farinha de mandioca, farinha de milho e amido.

A indústria sucroalcooleira, por suas características de produção, gera vários resíduos, sendo que muitos deles apresentam grande potencial para aplicação em diferentes bioprocessos (PANDEY et al., 2000b).

Um desses resíduos é o melaço de cana (ou mel de cana), um xarope escuro obtido durante a produção de açúcar a partir de cana de açúcar ou beterraba, resultante da etapa final de cristalização, a partir da qual a recuperação do açúcar não é mais viável economicamente (ARAKAKI et al., 2011). O mel de cana possui em média 50% de açúcares totais sendo a maior parte constituída de sacarose (VILLAVICENCIO et al., 1999; FELTRIN et al., 2000; ARAKAKI et al., 2011) e sua composição torna esse resíduo um substrato potencial para o desenvolvimento de processos biotecnológicos, incluindo a produção de enzimas e outros insumos de interesse (MIRANDA et al., 1999; SOCCOL et al., 2010).

O bagaço de cana é um importante resíduo agroindustrial e sua produção no Brasil chega a 186 milhões de toneladas por ano. É composto essencialmente por talos de cana que sobram depois do esmagamento e da extração do caldo da cana de açúcar. É composto de lignina (19-24%), celulose (32-44%), hemicelulose (27-32%), e cinzas (4,5-9%) (SOCCOL et al., 2010).

O Brasil é um grande produtor de soja e na safra 2010/2011 chegou a produzir 75 milhões de toneladas de grãos e 1,5 milhões de toneladas de cascas de



soja (CONAB, 2011a). A casca de soja apresenta composição de 66-69% de fibra e 3-8% de lignina (ZAMBOM et al., 2001) e tem sido tradicionalmente empregada na alimentação de ruminantes (NAKAMURA; OWEN, 1989). Seu conteúdo de lignina a torna de especial interesse para a produção de enzimas ligninolíticas.

O café é uma das *commodities* agrícolas mais importantes no mundo e *Coffea arabica* e *Coffea robusta* são as principais variedades do gênero cultivadas para a produção comercial (PANDEY et al., 2000a). O Brasil cultivou na safra 2010/2011 mais de 2 milhões de hectares de café, com produtividade superior a 23 sacas por hectare, gerando 48 milhões de sacas beneficiadas (CONAB, 2011b). As cascas de café, produzidas após o beneficiamento do café por secagem, representam um resíduo que contém grande quantidade de nutrientes, cafeína, taninos e polifenóis (PANDEY et al., 2000a). Esse material tem se mostrado adequado para a aplicação em bioprocessos e para a produção de uma série de produtos como enzimas, compostos de aroma, cogumelos entre outros, processos que agregam grande valor a esse resíduo (PANDEY et al., 2000a).

O farelo de polpa cítrica peletizado ou farelo de casca de laranja é obtido a partir do tratamento de resíduos sólidos e líquidos (cascas, sementes e polpa) remanescentes da extração do suco de laranja. Esse material equivale a 50% do peso de cada fruta e é produzido em grande quantidade pela indústria de suco de laranja brasileira, uma das maiores do mundo. Por suas características e grande quantidade produzida anualmente, a polpa cítrica pode ser considerada como um substrato em potencial para utilização em processos fermentativos (PANDEY et al., 2000b; RODRIGUES, 2006).

## **1.6 *Agaricus blazei***

*Agaricus blazei* Murrill sensu Heinemann considerado *Agaricus brasiliensis* por Wasser et al. (2002) e *Agaricus subrufescens* Peck por Kerrigan (2005), é um cogumelo comestível nativo do Brasil (COLAUTO et al., 2010).

Popularmente conhecido como cogumelo do sol no Brasil e *himematsutake* no Japão, *A. blazei* tornou-se mundialmente conhecido devido às suas propriedades medicinais e a partir da década de 90 passou a ser um suplemento alimentar muito popular e amplamente cultivado no Japão (OHNO et al., 2011).

Dentre as diversas propriedades medicinais e ações biológicas atribuídas a esse cogumelo pode-se citar capacidade de imunomodulação (ZHONG et al., 2005; HETLAND et al., 2011), inibição do crescimento de tumores (OHNO et al., 2001; MOURÃO et al., 2009), inibição da migração celular ou da revascularização induzida por tumores (JUMES et al., 2010), proteção contra alergias (ELLERTSEN; HETLAND, 2009) e muitas outras. *A. blazei* é rico em  $\beta$ -glucanas (OHNO et al., 2001) e proteoglicanas (MIZUNO et al., 1998), substâncias reconhecidas como imunomoduladoras, pois são capazes de se ligarem a diferentes receptores de células da imunidade inata como monócitos, granulócitos, células dendríticas e *natural killers* (HETLAND et al., 2011).

Apesar de existir amplo conhecimento sobre o cultivo desse cogumelo, pouco se sabe sobre seu arsenal enzimático para degradação de biomassa vegetal e especialmente sobre a produção de lacases.

*A. blazei* é considerado decompositor de serrapilheira (ou *litter decomposing fungus* – LDF) e cresce naturalmente sobre camadas superficiais de solo rico em matéria orgânica vegetal e no húmus de florestas e campos (WASSER et al., 2002; COLAUTO et al., 2010). Por suas características ecológicas, esses fungos são capazes de degradar lignina e compostos estruturalmente similares à lignina, contudo a taxa de degradação é menor se comparada aos fungos da podridão branca da madeira, essencialmente ligninolíticos (DURRANT et al., 1991). Entretanto, a produção de enzimas ligninolíticas por LDF não deve ser descartada, uma vez que níveis máximos de produção podem ser melhorados empregando-se técnicas de otimização das condições de cultivo (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009), bem como pela expressão heteróloga (PISCITELLI et al. 2010) e da modificação estrutural (ROBERT et al., 2011).

Ullrich et al. (2005) relataram a produção de lacase por *A. blazei* em FSm de meio à base de suco de tomate. A atividade máxima observada foi de 5000 U L<sup>-1</sup> no 17º dia de cultivo, onde o pH mudou do inicial 4,5 para 7,0 ao longo do período de fermentação (28 dias). A enzima foi isolada e caracterizada e apresentou massa molecular em torno de 66 kDa, estabilidade a 20 °C com perda rápida da atividade a 40 °C, demonstrando baixa termoestabilidade. Em contraste, a enzima demonstrou elevada estabilidade em pH ácido (3,0) e neutro (7,0), porém com perda rápida da atividade em pH alcalino (>10). Os autores também avaliaram os componentes cinéticos da lacase isolada de *A. blazei* e, como ocorre em outros fungos, a lacase

desse fungo oxidou vários substratos como compostos fenólicos monoaromáticos (2,6-DMP; guaiacol), compostos fenólicos complexos (siringaldazina) e compostos não fenólicos heterocíclicos (ABTS). O valor de Km observado para cada substrato avaliado foi 4  $\mu\text{M}$  para siringaldazina, 63  $\mu\text{M}$  para ABTS, 1026  $\mu\text{M}$  para 2,6-DMP e 4307  $\mu\text{M}$  para guaiacol (ULLRICH et al., 2005).

D'Agostini et al. (2011) também avaliaram a produção de lacase por *A. blazei* por FES em casca de soja na presença de diferentes relações carbono/nitrogênio. Os autores verificaram que à medida em que aumenta a relação C/N diminui a produção de lacase. A atividade máxima obtida foi de 60 U g<sup>-1</sup> com relação C/N de 5 e ureia como fonte de nitrogênio.

## 1.7 Referências

- ACHYUTHAN, K.E. et al. Supramolecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. **Molecules**, v. 15, p. 8641-8688, 2010.
- ADRIAN, M. et al. Resveratrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia. **Phytopathology**, v. 88, p. 472-476, 1998.
- ALEXANDRINO, A.M. et al. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.
- ALVES, A.M.C.R. et al. Highly efficient production of laccase by the Basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6379-6384, 2004.
- ARAKAKI, A.H. et al. Optimization of biomass production with copper bioaccumulation by yeasts in submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, p.1027-1034, 2011.
- ARAKANE, Y. et al. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 102, n. 32, p. 11337–11342, 2005.

- ASGHER, M. et al. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, p.771-783, 2008.
- AUSEC, L. et al. Bioinformatic analysis reveals high diversity of bacterial genes for laccase-like enzymes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e25724, 2011.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases: occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 215–242, 2006.
- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, p. 69-74, 2002.
- BCC - BCC Research. **Global markets for enzymes in industrial applications**. 2012. Disponível em: [www.bccresearch.com/chem/C147U.html](http://www.bccresearch.com/chem/C147U.html). Acesso em: 26/06/2012.
- BELOQUI, A. et al. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22933-22942, 2006.
- BINOD, P. et al. Industrial enzymes. In: PANDEY, A. et al. (Ed.). **Advances in fermentation technology**. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2008. p. 291-319.
- BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P.V. fungal laccases: production, function, and applications in food processing. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-10, 2010.
- BOLLAG, J.; LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 849-854, 1984.
- CALL, H.P.; MÜKE, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 163–202, 1997.
- CAMARERO, S. et al. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n.4, p. 1775-1784, 2005.
- CANESSA, P. et al. The copper-dependent ACE1 transcription factor activates the transcription of the *mco1* gene from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiology**, v. 154, p. 491-499, 2008.

CARUSO, F. et al. Antifungal activity of resveratrol against *Botrytis cinerea* is improved using 2-furyl derivatives. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e25421, 2011.

CAVALLAZZI, J.R.P.; KASUYA, C.M.; SOARES, M.A. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 383-387, 2005.

CHEN, M. et al. Understanding lignin-degrading reactions of ligninolytic enzymes: binding affinity and interactional profile. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e25647, 2011.

COLAUTO, N.B. et al. Alternative to peat for *Agaricus brasiliensis* yield. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 712-716, 2010.

COLLINS, P.J.; DOBSON, A.D.W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3444-3450, 1997.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Séries históricas relativas às safras 1976/77 a 2009/2010 de área plantada, produtividade e produção. Soja.** Brasília, 2011. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=>>>. Acesso em 10/08/2012.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Séries históricas relativas às safras 1976/77 a 2009/2010 de área plantada, produtividade e produção. Café.** Brasília, 2011. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=>>>. Acesso em 10/08/2012.

COUTO, S.R.; HERRERA, J.L.T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 500–513, 2006.

COUTO, S.R.; TOCA-HERRERA, J.L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 558-569, 2007.

D'AGOSTINI, E.C. et al. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 3, p. 295-300, 2011.

DAS, N; SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, M. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 4120–4122, 1997.

DEKKER, R.F.H. et al. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Microbiology**, v. 10, p. 177-185, 2007.

DEMAIN, A.L., VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297–306, 2009.

DITTMER, N.T.; KANOST, M.R. Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 179-188, 2010.

D'SOUZA, T.M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C.A. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3739–3744, 1996.

DURRANT, A.J.; WOOD, D.A.; CAIN, R.B. Lignocellulose biodegradation by *Agaricus bisporus* during solid substrate fermentation. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 751-755, 1991.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K.E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1151-1158, 1996.

ELISASHVILI, V. et al. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 998–1004, 2006.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; PENNINGCKX, M. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot Basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1531–1538, 2008.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n.1, p. 37-42, 2009.

ELISASHVILI, V. et al. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot Basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1091–1096, 2010.

- ELLERSTEN, L.K.; HETLAND, G. An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill can protect against allergy. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 7, 2009. Disponível em: <http://www.clinicalmolecularallergy.com/content/7/1/6>. Acesso em 21/06/2012.
- FARACO, V.; GIARDINA, P; SANNIA, G. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. **Microbiology**, v. 149, p. 2155-2162, 2003.
- FELTRIN, V. P. et al . Produção de *Lactobacillus plantarum* em melão de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, 2000. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/babt/v43n1/v43n1a15.pdf>. Acesso em 01/08/2012.
- FENICE, M. et al. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 77-85, 2003.
- FERREIRA, L.F. et al. Selection of vinasse degrading microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 1613-1621, 2010.
- FERRER-MIRALLES, N. et al. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial Cell Factories**, v. 24, p. 8-17, 2009.
- FONSECA, M.I. et al. Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 534-539, 2010.
- FREEDONIA - The Freedonia Group Incorporated. **World Enzymes: industry study with forecasts for 2015 and 2020**. 2011. Disponível em: <http://www.freedoniagroup.com/brochure/28xx/2824smwe.pdf>. Acesso em: 27/06/2012.
- GALHAUP, C. et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 529–536, 2002.
- GALHAUP, C. et al. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. **Microbiology**, v. 148, p. 2159-2169, 2002.
- GIARDINA, P. et al. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical Journal**, v. 34, p. 655-663, 1999.

- GIARDINA, P. et al. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 369–385, 2010.
- HAN, M.J. et al. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v. 43, p. 555-560, 2005.
- HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10-18, 2009.
- HETLAND, G. et al. The mushroom *Agaricus blazei* Murill elicits medicinal effects on tumor, infection, allergy, and inflammation through its modulation of innate immunity and amelioration of Th1/Th2 imbalance and inflammation. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2011, 2011. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/aps/2011/157015/>. Acesso em 20/06/2012.
- HOSHIDA, H. et al. Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 372-380, 2001.
- HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1415–1419, 2004.
- HUANG, S.J. et al. Molecular cloning and characterization of a novel laccase gene from a white-rot fungus *Polyporus grammacephalus* TR16 and expression in *Pichia pastoris*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, p. 290-297, 2011.
- HUSAIN, M.; HUSAIN, Q. Applications of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 38, p. 1-42, 2008.
- IANDOLO, D. et al. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 40-51, 2010.
- JUMES, F.M.D. et al. Effects of *Agaricus brasiliensis* mushroom in Walker-256 tumor-bearing rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, p. 21-27, 2010.



- KARAS, P.A. et al. Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. **Biodegradation**, v. 22, n.1, p. 215-228, 2010.
- KARP, S. G. **Development of a biotreatment for delignification of sugarcane bagasse and production of laccases**. 147 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- KARP, S. et al. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 735-739, 2012.
- KERRIGAN, R.W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, v. 97, p. 12-24, 2005.
- KHAMMUANG, S.; SARNTHIMA, R. Decolorization of synthetic melanins by crude laccases of *Lentinus polychrous* Lév. **Folia Microbiologica**, 2012. Disponível em <http://www.springerlink.com/content/g237185728471t12/>. Acesso em 25/07/2012.
- KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzymes applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.
- KÜES, U.; RÜHL, M. Multiple multi-copper oxidase gene families in Basidiomycetes - what for? **Current Genomics**, v. 12, p. 72-94, 2011.
- KUMARAN, S., SASTRY, C.A., VIKINESWARY, S., Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 43-49, 1997.
- KUNAMMENI, A. et al. Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microbial Cell Factories**, v. 7, p. 32, 2008. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2613868/?tool=pubmed>>. Acesso em: 14/07/2012.
- LOMASCOLO, A. et al. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 618-624, 2003.
- LANG, G.; COTTERET, J. **Mixture for the oxidation tinting of keratin fibers containing a laccase and tinting methods using said mixture**, US6576024B1, 10

junho 2003. Disponível em: <  
<http://www.google.com/patents?id=W3sNAAAEBAJ&printsec=abstract&zoom=4#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em: 14/07/2012.

LAUBER, C.L.; SINSABAUGH, R.L.; ZAK, D.R. Laccase gene composition and relative abundance in oak forest soil is not affected by short-term nitrogen fertilization. **Microbial Ecology**, v. 57, p. 50–57, 2009.

LITVINTSEVA, A.P.; HENSON, J.M. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1305-1311, 2002.

MACIEL, M.J.M.; SILVA, A.C.; RIBEIRO, H.C.T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, 2010. Disponível em <http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v13n6/a14.pdf>. Acesso em: 14/07/2012.

MAJEAU, J.; BRAAR, S.K.; TYAGI, R.D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2331-2350, 2010.

MANSUR, M.; SUÁREZ, T.; GONZÁLEZ, A.E. Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 771-774, 1998.

MARSLUF, G.A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 17–32, 1997.

MARTÍNEZ, A.T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, p.195-204, 2005.

MATHIEU, M.; FELENBOK, B. The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR-specific transactivator. **EMBO Journal**, v. 13, n. 17, p. 4022–4027, 1994.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, p. 551–565, 2002.

MESSERSCHMIDT, A.; HUBER, R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. **European Journal of Biochemistry**, v. 187, p. 341 -352, 1990.

- MIAO, L. et al. Purification and characterization of a laccase from the edible wild mushroom *Tricholoma mongolicum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 7, p. 1069-1076, 2010.
- MIKIASHVILI, N. et al. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 955–959, 2005.
- MIKOLASCH, A.; SHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 605-624, 2009.
- MIRANDA, L.A.S.; SANT'ANNA, E.S.; PORTO, A.C.S. The growth of *Micrococcus varians* by utilizing sugar cane blackstrap molasses as substrate. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p.125-129, 1999.
- MIZUNO, M. et al. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, p. 433-437, 1998.
- MOLDES, D.; VIDAL, T. Laccase for biobleaching of eucalypt kraft pulp by means of a modified industrial bleaching sequence. **Biotechnology Progress**, v. 28, 2012. Disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/btpr.1594/pdf>. Acesso em: 27/07/2012.
- MOROZOVA, O.V. et al. “Blue” laccases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 10, p. 1136-1150, 2007.
- MOUGIN, C. et al. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 1, p. 145-148, 2003.
- MOURÃO, F. et al. Antioneoplastic activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 901-905, 2009.
- NAKADE, K. et al. Characterization of an extracellular laccase, PbLac1, purified from *Polyporus brumalis*. **Fungal Biology**, v. 114, p. 609-618, 2010.
- NAKAMURA, T.; OWEN, F.G. High amounts of soyhulls for pelleted concentrate diets. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 988-994, 1989.

NITHERANONT, T.; WATANABE, A.; ASADA, Y. Extracellular laccase produced by an edible basidiomycetous mushroom, *Grifola frondosa*: purification and characterization. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 3, 100790/1-100790/6, 2011.

NOVOZYMES – **Enzymes at work**. 2008. Disponível em: <http://www.novozymes.com/en/about-us/our-business/Pages/default.aspx>. Acesso em: 27/06/2012.

OHNO, N. et al. Antitumor  $\beta$ -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 7, p. 820-828, 2001.

OHNO, S. et al. Phase I clinical study of the dietary supplement, *Agaricus blazei* Murill, in cancer patients in remission. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3092499/?tool=pubmed>. Acesso em 15/06/2012.

OLIVEIRA, V.M. et al. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **Multiciência**, n. 7, 2006.

OSMA, J.F.; TOCA-HERRERA, J.L.; RODRÍGUEZ-COUTO, J. Uses of laccases in the food industry. **Enzyme Research**, v. 2010, 2010. Disponível em <http://www.hindawi.com/journals/er/2010/918761/cta/>. Acesso em: 13/06/2012.

PALMIERI, G. et al. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 50, p. 31301–31307, 1997.

PALMIERI, G. et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 920-924, 2000.

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153–162, 2000.

PANDEY, A. et al., Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

- PANDEY, A; SOCCOL, C.R. Bioconversion of biomass: a case study of lignocellulosics bioconversions in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41, p. 379-390, 1998.
- PAPINUTTI, L.; LECHNER, B. Influence of the carbon source on the growth and lignocellulolytic enzyme production by *Morchella esculenta* strains. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1715–1721, 2008.
- PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2321-2334, 2007.
- PÉRIÉ, F.H., et al. Purification and characterization of laccases from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 353, n. 2, p. 349–355, 1998.
- PERRY, C.R. et al. Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 1209-1218, 1993.
- PEZZELLA, C. et al. Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, 2012. Disponível em <http://www.springerlink.com/content/u4071386255jpwt6/>. Acesso em: 25/07/2012.
- PISCITELLI, A. et al. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 4, p. 252-262, 2010.
- PISCITELLI, A. et al. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. **Current Genomics**, v. 12, p. 104-112, 2011.
- RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219-226, 2006.
- ROBERT, V. et al. Engineering laccases: in search for novel catalysts. **Current Genomics**, v. 12, p. 123-129, 2011.
- RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. 93 f. Dissertação (Mestrado Processos Biotecnológicos) - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

- RODRÍGUEZ, E. et al. Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the *pel3* encoded protein. **Journal of Biotechnology**, v. 134, p. 9-19, 2008.
- RODRÍGUEZ-COUTO, S. Laccases for denim bleaching: an eco-friendly alternative. **The Open Textile Journal**, v. 5, p. 1-7, 2012.
- ROSALES, E., COUTO, S.R., SANROMÁN, M.A. Reutilization of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 419–423, 2005.
- SAPARRAT, M. C. N. et al. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1534–1540, 2002.
- SAPARRAT, M.C.N. et al. Differential regulation of laccase gene expression in *Coriolopsis rigida* LPSC No. 232. **Fungal Biology**, v. 114, p. 999-1006, 2010.
- SHIN, K.S.; KIM, C.J. Properties of laccase purified from nitrogen limited culture of white-rot fungus *Coriolus hirsutus*. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 2, p. 101-104, 1998.
- SHLEEV, S.V. et al. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**, v. 86, p. 693–703, 2004.
- SINGH, D.; CHEN, S. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 399–417, 2008.
- SIVAKUMAR, R. et al. Isolation, screening and optimization of production medium for thermostable laccase production from *Ganoderma* sp. **International Journal of Engineering Science and Technology**, v. 2, n. 12, p. 7133-7141, 2010.
- SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205–218, 2003.
- SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; LARROCHE, C.; GNANSOUNOU E.; NIGAM, P. **Comprehensive food fermentation and biotechnology** V. 2. New Delhi: Asiatech Publishers Inc., 2010.

- SODEN, D.M.; DOBSON, A.D.W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiology**, v. 147, p. 1755–1763, 2001.
- SONGULASHVILI, G. et al. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 57–61, 2007.
- STRONG, P.J. Improved laccase production by *Trametes pubescens* MB89 in distillery wastewaters. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011. Disponível em <http://www.hindawi.com/journals/er/2011/379176/>. Acesso em: 13/06/2012.
- TAPIA-TUSSEL, R. et al. New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 50, p. 10134-10142, 2011.
- TEMP, U.; ZIEROLD, U.; EGGERT, C. Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. **Gene**, v. 236, p. 169-177, 1999.
- THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, p. 19-26, 1994.
- TOCA-HERRERA, J.L.; OSMA, J.F.; COUTO, S.R. Potential of solid-state fermentation for laccase production. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. Badajoz: Formatex, 2007. p. 391-400.
- ULLRICH, R.; et al. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 357–363, 2005.
- VIKINESWARY, S. et al. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 171–177, 2006.
- VILLAVICENCIO, A. R. N.; SANT'ANNA, E. S.; TORRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/babt/v42n2/a15v42n2.pdf>. Acesso em 26/07/2012.

- WASSER, S. P. et al. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, p. 267-290, 2002.
- WIDSTEN, P.; KANDELBAUER, A. Laccase applications in the forest products industry: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 293–307, 2008.
- WU, J. et al. Cloning, characterization and expression of two new polyphenol oxidase cDNAs from *Agaricus bisporus*. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1439–1447, 2010.
- XAVIER, A.M.R.B. et al. *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 444-451, 2007.
- XIAO, Y.Z. et al. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 493-501, 2006.
- XIN, F.; GENG, A. Utilization of horticultural waste for laccase production by *Trametes versicolor* under solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 235-246, 2011.
- XU, F. et al. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2052-2056, 2000.
- YOSHINO, T.; KIMURA, A.; ASAI, Y. **Hair dye compositions**, EP1142563A1, 10 outubro 2001. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/EP1142563.pdf>>. Acesso em: 14/07/2012.
- ZAMBOM, M.A. et al. Nutritional value of soybean hulls, soybean meal, ground corn and wheat meal for cattle. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 23, p. 937-943, 2001.
- ZENG, X. et al. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p. 517–525, 2011.
- ZHAO, J; KWAN, H.S. Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4908-4913, 1999.



ZHONG, M.; TAI, A.; YAMAMOTO, I. *In vitro* augmentation of natural killer activity and interferon- $\gamma$  production in murine spleen cells with *Agaricus blazei* fruiting body fractions. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2466-2469, 2005.

ZHOU, X.; WEN, X.; FENG, Y. Influence of glucose feeding on the ligninolytic enzyme production of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 1, p. 89-94, 2007.

ZOUARI-MECHICHI, H. et al. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. **The Journal of Microbiology**, v. 43, p.555-560, 2006.

## CAPÍTULO II

### SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS FÚNGICAS PRODUTORAS DE LACASE E ESCOLHA DE INDUTORES DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

#### RESUMO

Lacases são cobre polifenol oxidases que catalisam a oxidação de uma grande variedade de substratos fenólicos. São enzimas comuns a vários organismos, mas a maior parte das lacases, descritas atualmente, foi isolada de fungos. Sua baixa especificidade a substratos torna a lacase uma enzima com várias aplicações em diversos processos industriais. Sua síntese e secreção são influenciadas pelos níveis de nutrientes, condições de cultivo e pela adição de compostos fenólicos ou aromáticos que atuam como indutores da atividade. O objetivo desta etapa do trabalho foi selecionar linhagens produtoras de lacase e avaliar a influência de  $\text{CuSO}_4$  e indutores sobre a atividade enzimática. Foram estudadas cinco linhagens de basidiomicetos, sendo duas linhagens (*Agaricus blazei* U2/4 e *Pleurotus ostreatus* U9/1) selecionadas aleatoriamente para ajuste do meio de cultivo visando a produção de lacase. A solução nutritiva avaliada inicialmente era composta por (g  $\text{L}^{-1}$ ):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5),  $\text{MgSO}_4$  (0,5), KCl (0,5),  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,036),  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,035), glicose (10). A adição de diferentes concentrações da fonte nitrogênio (ureia) e de  $\text{CuSO}_4$  ao meio de cultivo foram estudadas. Seis possíveis indutores foram analisados com o intuito de verificar o seu efeito sobre a atividade enzimática das cinco linhagens (pirogalol, álcool veratrílico, xilidina, vanilina, guaiacol e etanol). Quatro das linhagens estudadas foram identificadas molecularmente como *Agaricus blazei* (U2/1, U2/2, U2/3 e U2/4) e uma foi identificada como *Pleurotus ostreatus*. A produção de lacase em meio contendo ureia (6,0 g/L) e  $\text{CuSO}_4$  (150  $\mu\text{M}$ ) ao final de 21 dias atingiu 13,7  $\text{U mL}^{-1}$  por *A. blazei* (U2/4) e 14,2  $\text{U mL}^{-1}$  para *P. ostreatus* (U9/1). Dentre as linhagens avaliadas e todas as condições testadas, as maiores atividades induzidas de lacase foram verificadas para *A. blazei* U2/4 (8,4  $\text{U mL}^{-1}$  com etanol e 8,5  $\text{U/mL}$  com guaiacol no 6º e 8º dia, respectivamente) e *P. ostreatus* U9/1 (15  $\text{U mL}^{-1}$  com etanol no 12º dia de cultivo). Pirogalol e xilidina inibiram a produção de lacase de praticamente todas as linhagens e os demais indutores testados afetaram a atividade de lacase de formas distintas dependendo da linhagem e da concentração utilizada. Devido à escassez de dados disponíveis na literatura sobre a produção de lacase de *A. blazei* bem como pelos resultados obtidos nessa etapa do estudo, selecionou-se a linhagem *A. blazei* U2/4 para a produção de lacases empregando-se diferentes substratos.

**Palavras-chave:** polifenol oxidase, lacase, lignina, *Agaricus blazei*.

## 2.1 Introdução

A degradação da biomassa vegetal lignocelulósica tem papel central na manutenção do ciclo do carbono em ecossistemas terrestres e representa uma fonte de alimentos, energia e químicos. A lignina, o segundo polímero natural mais abundante, é um heteropolímero aromático que confere rigidez aos tecidos vegetais, ao mesmo tempo em que oferece proteção contra a ação de micro-organismos (SAPARRAT et al., 2002). Sua hidrólise representa um dos fatores limitantes no processo de utilização da biomassa vegetal o que tem suscitado pesquisas na busca de formas mais rápidas, efetivas e de menor custo para a degradação desse biocomposto (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Na natureza, a degradação da lignina ocorre pela ação concomitante de enzimas ligninolíticas extracelulares como as lignina peroxidases (ligninase, LiP), manganês peroxidases (MnP) e lacases (MARTÍNEZ et al., 2005). Lacases (*p*-difenoil: oxigênio oxidoreduases, EC 1.10.3.2) são enzimas que utilizam a capacidade redox de íons de cobre para catalisar a oxidação de grande variedade de substratos fenólicos, enquanto reduzem oxigênio molecular à água (THURSTON, 1994). Lacases são enzimas comuns descritas em plantas, insetos, bactérias e fungos (MOROZOVA et al., 2007) e que desempenham diferentes papéis fisiológicos incluindo morfogênese, interação planta-patógeno/hospedeiro, defesa ao stress e degradação de lignina (GIARDINA et al., 2010).

Os fungos basidiomicetos são os principais responsáveis pela degradação da lignina (MARTÍNEZ et al., 2005). Muitas espécies secretam uma ou mais das enzimas essenciais na degradação e, portanto, podem mineralizar a lignina em compostos inorgânicos não tóxicos. Essas enzimas, sendo altamente inespecíficas quanto aos seus substratos, também são capazes de oxidar xenobióticos com estrutura similar à da lignina (BALDRIAN, 2006; RUBILAR et al., 2008).

Algumas das espécies reconhecidamente produtoras de lacases são *Agaricus bisporus* (WU et al., 2010); *Lentinula edodes* (BOLLAG; LEONOWICZ, 1984); *Phanerochaete chrysosporium* (SINGH; CHEN, 2008); *Pleurotus ostreatus* (COHEN et al., 2002); *Pleurotus sajor-caju* (SODEN; DOBSON, 2001); *Pycnoporus cinnabarinus* (EGGERT et al., 1996); *Trametes pubescens* (GALHAUP et al., 2002); *Trametes versicolor* (HAN et al., 2005).

Lacases são produzidas tanto por fermentação submersa (FSm) quanto por fermentação no estado sólido (FES) (MAJEAU et al., 2010). Apesar de não se assemelhar às condições naturais de vida dos micro-organismos produtores de lacases, a FSm permite controle simples do processo fermentativo, acesso direto ao extrato enzimático ou utilização das características naturais do substrato, como efluentes ou resíduos líquidos (STRONG, 2011). Em estudos envolvendo a produção (ZHOU et al., 2007; SIVAKUMAR et al., 2010), indução (PALMIERI et al., 2000; ELISASHVILI et al., 2010) ou caracterização (ZOUARI-MECHICHI et al., 2006; NAKADE et al., 2010) de lacases de fungos verificou-se a predominância de FSm utilizada em pequena escala.

Por outro lado, a FES também apresenta vantagens na produção de enzimas, já que o fermentado pode ser usado diretamente como fonte de enzima, além de oferecer outras vantagens como elevada produtividade volumétrica, alta concentração de produtos, produção de menor quantidade de efluentes, uso de equipamentos simples entre outras (PANDEY et al., 1999; SOCCOL;VANDENBERGHE, 2003). Ao mimetizar as condições naturais de crescimento de fungos lignocelulolíticos, a FES utilizando resíduos agroindustriais tem sido utilizada para aumentar a produção de enzimas ligninolíticas e vários estudos têm demonstrado a eficiência da FES em resíduos agroindustriais para produção de lacases (VIKINESWARY et al., 2006; XIN; GENG, 2011; ZENG et al., 2011; KARP; 2012).

*Agaricus blazei* é um cogumelo comestível nativo do Brasil e que cresce naturalmente sobre camadas superficiais de solo rico em matéria orgânica vegetal e no húmus de florestas e campos (WASSER et al., 2002; COLAUTO et al., 2010). Muitas ações biológicas têm sido atribuídas a esse basidiomiceto como capacidade de imunomodulação (ZHONG et al., 2005), inibição do crescimento de tumores (OHNO et al., 2001; MOURÃO et al., 2009) e inibição da migração celular ou da revascularização induzida por tumores (JUMES et al., 2010).

Apesar de existir amplo conhecimento sobre o cultivo desse fungo, pouco se sabe sobre seu arsenal enzimático para degradação de biomassa vegetal e especialmente sobre a produção de lacases. Ullrich et al. (2005) relataram a produção de grandes quantidades de lacase ( $5.000 \text{ U L}^{-1}$ ) por *A. blazei* em FSm de suco de tomate. A enzima foi isolada e caracterizada, demonstrando que essa espécie também pode produzir grandes quantidades de lacase. D'Agostini et al.

(2011) avaliaram a produção de lacase por esse cogumelo por FES de casca de soja na presença de diferentes relações carbono/nitrogênio, produzindo em torno de  $60 \text{ U g}^{-1}$  de lacase. Não há relatos sobre a indução da produção de lacases de *A. blazei* até o momento.

Por sua capacidade catalítica e eletrocatalítica, as lacases, principalmente as produzidas por basidiomicetos, apresentam grande potencial para aplicação biotecnológica. Podem ser empregadas em processos da indústria de papel e celulose, têxtil, cosmética, na detoxificação de esgoto, em síntese inorgânica, degradação de xenobióticos e biorremediação, produção de aglomerados de madeira sem agregantes tóxicos e produção de detergentes (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007). A aplicação das lacases na prática se baseia em duas linhas relacionadas: a prospecção de enzimas com novas propriedades físico-químicas e a busca por indutores e mediadores da atividade dessas enzimas (MOROZOVA et al., 2007).

Os objetivos deste estudo foram avaliar a capacidade de produção de lacases de cinco cepas de basidiomicetos, realizar a identificação molecular das cepas analisadas e testar o potencial indutor da atividade enzimática de diferentes compostos aromáticos.

## **2.2 Material e Métodos**

### **2.2.1 Seleção de linhagens produtoras de lacase por fermentação submersa**

Cinco linhagens (U2/1, U2/2, U2/3, U2/4 e U9/1) de fungos basidiomicetos pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAR foram analisadas. As linhagens foram conservadas a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  em meio ágar-extrato-de-malte 1% (m/v).

Para a produção de inóculo e produção de micélio para extração de DNA as diferentes linhagens foram cultivadas em meio sólido ágar-extrato-de-malte 2% (m/v) a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. Três discos desse meio com 3 mm de diâmetro contendo micélio foram utilizados para inocular os meios de cultivo para a produção de lacase. Para a extração de DNA todo o micélio era removido da superfície do meio com auxílio de espátula estéril e acondicionado em tubos de ensaio para posterior maceração.

## 2.2.2 Identificação molecular dos fungos avaliados

### 2.2.2.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir do micélio macerado em nitrogênio líquido. Após a maceração, adicionou-se o tampão de extração CTAB [cetiltrimetilamônio 2% (m/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2% (v/v) e proteinase K 0,01% (v/v)] e incubou-se a 65 °C por 45 minutos. O lisado resultante foi submetido à extração com uma mistura de clorofórmio:álcool isoamílico grau analítico (24:1) e centrifugado a 15200 *g* por 5 minutos. A fase aquosa resultante foi recuperada e isopropanol a -20 °C foi usado para a precipitação do DNA. A amostra foi mantida a -20 °C por 10 minutos e em seguida centrifugada a 15200 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em etanol 70% (v/v) seguido de centrifugação (15200 *g* por 15 minutos). Em seguida o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuscitado em etanol 95% (v/v) seguido de nova centrifugação (15200 *g* por 5 minutos). Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* permaneceu a temperatura ambiente por 30 minutos e foi ressuscitado em água destilada.

### 2.2.2.2 Amplificação das regiões ITS do DNA ribossomal

Dois espaçadores internos transcritos (ITS) do DNA ribossomal dos fungos analisados foram amplificados por PCR em um único fragmento contendo o ITS1, a região codificadora 5.8S e o ITS2 (ITS1-5.8S-ITS2) e para tanto empregaram-se os *primers* universais (Invitrogen) ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990). A reação de amplificação, com volume final de 25  $\mu$ L, constituiu-se de 25 ng de DNA; 0,2  $\mu$ M de cada primer; 100  $\mu$ M de dNTP e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,5 U de *Taq* DNA polimerase e tampão 1x. As reações foram conduzidas em termociclador (Eppendorf) programado para as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, pareamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos; seguidos por extensão final a 72 °C por 7

minutos. Ao final do programa as amostras foram automaticamente resfriadas a 4 °C.

Os produtos das reações de PCR foram separados através da eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) preparado em tampão TAE (40 mM de Tris-acetato e 1 mM de EDTA) contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 mg/mL. Após a corrida, o DNA foi visualizado sob luz UV e fotografado.

### **2.2.2.3 Sequenciamento dos ITS e análise das sequências**

Os produtos da PCR foram purificados empregando-se um kit de purificação (Pure Link™, Invitrogen) e os amplicons foram submetidos ao sequenciamento direto.

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do primer (ITS1 e ITS4) e 3 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) em volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 55 °C por 5 s e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection v 1.0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set "Z"; Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"; BioLIMS Project "3100\_Project1"; Run Module 1 "StdSeq50\_POP6\_50cm\_cfv\_100"; e Analysis Module 1 "BC-3100SR\_Seq\_FASTA.saz".

As sequências foram caracterizadas com base em análise de similaridade com sequências nucleotídicas de ITS depositadas no banco de dados GenBank

(disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para identificação das linhagens analisadas.

### **2.2.3 Efeito da concentração de nitrogênio e adição de cobre sobre a produção de lacase**

Com a finalidade de avaliar o efeito da concentração de ureia e de Cu sobre a produção de lacase, testaram-se duas concentrações de ureia e sete concentrações de  $\text{CuSO}_4$ . Duas linhagens produtoras de lacase foram aleatoriamente selecionadas para realização destes testes (U2/4 e U9/1). Optou-se pela utilização de ureia como fonte de nitrogênio, pois estudo anterior demonstrou que *Agaricus blazei* apresentou maior produção de lacase na presença dessa fonte (D'AGOSTINI et al., 2011). Além disso, fontes orgânicas de nitrogênio parecem favorecer a produção de níveis mais elevados dessa enzima (PISCITELLI et al., 2011).

O cultivo foi realizado em fermentação submersa (FSm) em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 60 mL de meio de cultivo estéril composto por ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5),  $\text{MgSO}_4$  (0,5), KCl (0,5),  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,036),  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,035), glicose (10) (PONTECORVO et al., 1953). Uma solução de ureia ( $300 \text{ g L}^{-1}$ ) foi preparada separadamente, esterilizada por filtração (membrana Millipore  $0,2 \mu\text{m}$ ) e adicionada ao meio em volume adequado para obter-se 0,6 (LN – *low nitrogen*) ou  $6,0 \text{ g L}^{-1}$  (HN – *high nitrogen*) de concentração final. Ao terceiro dia de cultivo adicionou-se  $\text{CuSO}_4$  assepticamente para obtenção de concentrações finais de 0, 50, 100, 150, 200, 250 e  $300 \mu\text{M}$ . Os frascos contendo a solução nutritiva foram inoculados com discos (3 mm) de meio sólido contendo micélio (subitem 2.2.1) e mantidos por 21 dias a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , sem influência da luz, com agitação intermitente uma vez ao dia por 30 segundos. Todos os tratamentos foram feitos em quadruplicata. Ao final do período de fermentação determinou-se a atividade de lacase (subitem 2.2.5) e o micélio foi coletado para determinação da biomassa por secagem a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  até massa constante.



#### 2.2.4 Seleção de substâncias indutoras da atividade de lacase

Após a seleção da concentração de nitrogênio e estudo da influência da concentração de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) sobre a produção de lacase, foi realizado o estudo do efeito de indutores. Seis compostos foram avaliados quanto à sua capacidade de induzir a atividade de lacase em FSm: pirogalol (1,2,3-trihidroxibenzeno), álcool veratrílico (3,4-dimetoxibenzil álcool), xilidina (2,5-dimetilanilina), vanilina, guaiacol e etanol. Cada composto foi testado em três concentrações (0,5; 1,0 e 1,5 mM) e cada tratamento foi realizado em quadruplicata. Um grupo sem o composto foi empregado como controle. Os compostos foram esterilizados por filtração (membrana Millipore 0,2  $\mu\text{m}$ ) e adicionados asépticamente aos cultivos no terceiro dia de fermentação. Os frascos foram mantidos por 21 dias a 28 °C, sem influência da luz, com agitação intermitente uma vez ao dia por 30 segundos. A produção de lacase foi acompanhada pela determinação da atividade enzimática a cada três dias a partir do terceiro dia de cultivo. Ao final do período de fermentação o micélio foi coletado para determinação da biomassa pelo método termogravimétrico.

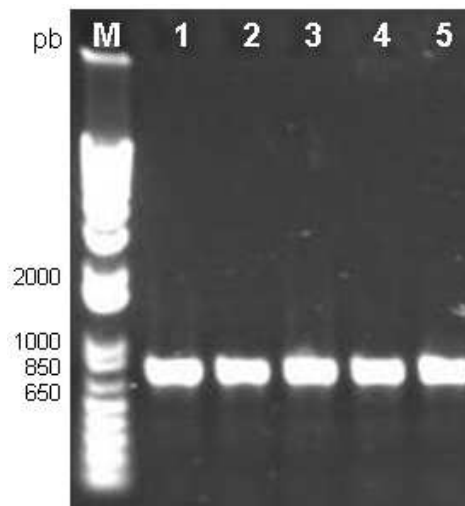
#### 2.2.5 Determinação da atividade de lacase

A atividade de lacase foi avaliada pela oxidação de solução (1 mM) de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)). 0,2 mL do meio de cultivo foram adicionados de 0,7 mL de água, 0,45 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0) e 0,15 mL de ABTS (HAN et al., 2005). A mistura foi mantida a 30 °C por 10 min e a reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de solução de ácido tricloroacético 5% (m/v). O volume foi ajustado para 5 mL e a leitura de absorbância foi realizada. A oxidação do ABTS foi acompanhada pelo aumento da absorbância a 420 nm ( $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A mistura de meio de cultivo (0,2 mL), água (0,85 mL) e tampão acetato de sódio (0,45 mL) bem como a mistura de água (0,9 mL), tampão acetato de sódio (0,45 mL) e ABTS (0,15 mL) foram utilizadas como controles analíticos. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto. Todos os testes foram feitos em duplicata e os resultados foram avaliados empregando-se a análise de variância e as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) determinadas pelo teste de Tukey.

## 2.3 Resultados e Discussão

### 2.3.1 Identificação molecular dos fungos avaliados

A identificação molecular das cepas estudadas baseou-se na amplificação por PCR dos espaçadores internos transcritos (ITS1-5.8S-ITS2) empregando-se o DNA extraído a partir do micélio como molde (item 2.2.2). A técnica de extração de DNA bem como os *primers* universais empregados mostraram-se adequados para a produção de um produto de PCR de aproximadamente 700 pb para todas as linhagens (Figura 2.1).



**Figura 2.1:** Produtos da amplificação de ITS do DNA ribossomal de diferentes linhagens de fungos. M: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), linha 1: linhagem U2/1, linha 2: linhagem U2/2, linha 3: linhagem U2/3, linha 4: linhagem U2/4 e linha 5: linhagem U9/1.

O sequenciamento direto dos produtos da PCR e a análise das sequências revelaram elevada identidade de sequência e permitiram a identificação de quatro das linhagens como *Agaricus blazei* (U2/1, U2/2, U2/3 e U2/4) e uma linhagem como *Pleurotus ostreatus* (U9/1) (Tabela 2.1).

**Tabela 2.1:** Resultado da análise das sequências de ITS e da identificação molecular das cepas analisadas.

Linhagem	Tamanho da sequência (pb)	Identidade	Número do acesso	Máxima identidade (%)	Valor E
U2/1	606	<i>Agaricus blazei</i>	AJ131126	97	0,0
U2/2	426	<i>Agaricus blazei</i>	EF471307	97	0,0
U2/3	596	<i>Agaricus blazei</i>	AJ131126	97	0,0
U2/4	675	<i>Agaricus blazei</i>	EF471307	99	0,0
U9/1	652	<i>Pleurotus ostreatus</i>	HM590443	84	1e <sup>-131</sup>

### 2.3.2 Efeito da concentração de nitrogênio e adição de cobre sobre a produção de lacase

A produção de lacase depende tanto da concentração quanto da natureza da fonte de nitrogênio, contudo esse nutriente influencia de formas distintas a produção da enzima. Como estudos anteriores demonstraram a preferência de *A. blazei* por N fornecido como ureia (D'AGOSTINI et al., 2011), optou-se por avaliar-se a produção de lacase pela linhagem de *A. blazei* (U2/4) e *P. ostreatus* (U9/1) em FSm empregando-se glicose (10 g L<sup>-1</sup>) como fonte de carbono e diferentes concentrações de ureia (item 2.2.3). O cobre é outro nutriente que influencia a produção de lacase, portanto, o efeito do cobre sobre a atividade enzimática foi avaliado através da adição de CuSO<sub>4</sub> em diferentes concentrações.

As maiores atividades de lacase foram observadas no meio HN (6 g L<sup>-1</sup> de ureia). Sem considerar a adição de CuSO<sub>4</sub>, verificou-se que a produção de lacase pela linhagem U2/4 de *Agaricus blazei* (Tabela 2.2) foi mais de 8,5 vezes maior (13 U mL<sup>-1</sup>) no meio HN do que no meio LN (1,5 U mL<sup>-1</sup>). De forma similar, o meio HN apresentou um efeito positivo sobre a atividade de lacase de U9/1 (Tabela 2.2) que produziu quase quatro vezes mais lacase (11 U mL<sup>-1</sup>) nessa condição do que no meio LN (2,8 U mL<sup>-1</sup>). Isso se deve provavelmente ao fato de que com o meio HN, há uma relação C/N (1,4) mais equilibrada do que no meio LN (C/N = 14,2) e que favoreceu a produção de lacase.

**Tabela 2.2:** Efeito da concentração de nitrogênio (ureia) sobre a atividade de lacase após vinte e um dias de fermentação submersa.

Linhagem	Concentração de ureia	
	LN	HN
	0,6 g L <sup>-1</sup> (10 mM)	6 g L <sup>-1</sup> (100 mM)
U2/4	1,5 U mL <sup>-1</sup>	13 U mL <sup>-1</sup>
U9/1	2,8 U mL <sup>-1</sup>	11 U mL <sup>-1</sup>

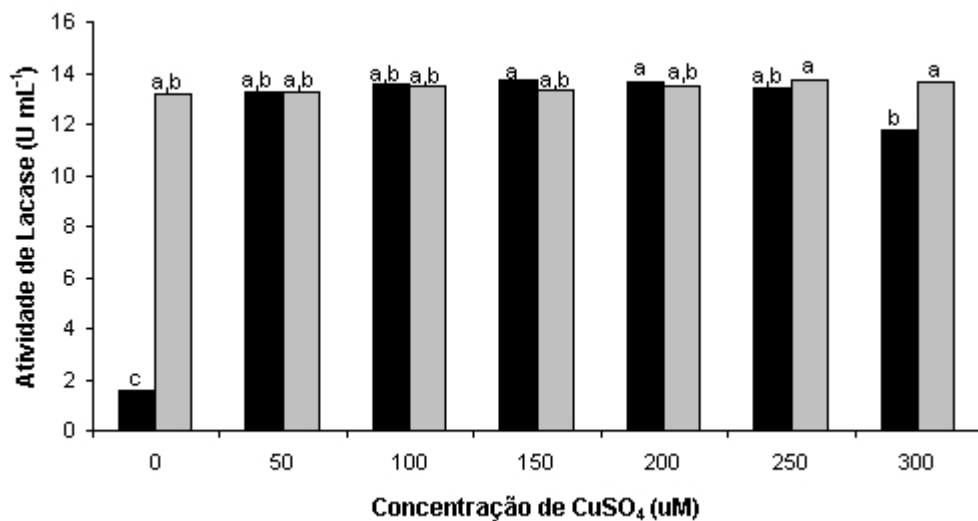
A influência do N sobre a produção de lacase tem gerado certa polêmica, uma vez que o aumento da atividade enzimática pode ocorrer tanto em situações limitantes quanto não limitantes desse nutriente (GIARDINA et al., 2010). Estudos comprovam que o nitrogênio afeta a produção de lacase em nível transcricional (COLLINS; DOBSON, 1997; MANSUR et al., 1998), porém a quantidade de nitrogênio no meio afeta de formas distintas a produção de lacase por diferentes espécies de fungos.

Leatham e Kirk (1983) verificaram que maior concentração de nitrogênio (34 mM) aumentou a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*, porém, reduziu a atividade enzimática de *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia brevispora*, *Coriolus versicolor* e *Pholiota mutabilis*. Já *Pycnoporus cinnabarinus* produziu níveis maiores de lacases em menor concentração de nitrogênio (2,4 mM) (EGGERT et al., 1996). Apesar da escassez de dados sobre lacases de *A. blazei* na literatura, D'Agostini et al. (2011), trabalhando com FES em casca de soja, demonstraram resultados semelhantes aos deste estudo, indicando que *A. blazei* apresenta maior atividade de lacase em meio com maior concentração de nitrogênio (C/N = 5) tendo como fonte a ureia.

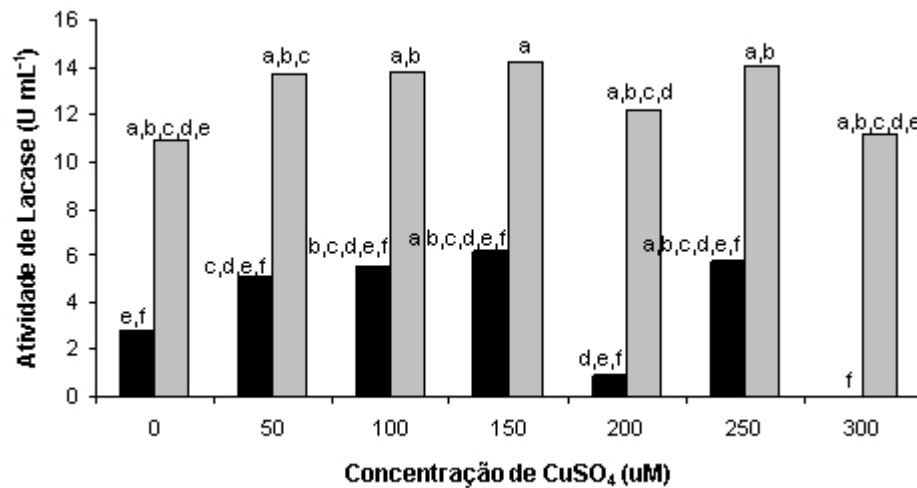
O nitrogênio parece afetar a expressão de genes de lacase, processo intermediado por proteínas do tipo NIT2, envolvidas na regulação do metabolismo de N em *Neurospora crassa* (MARSLUF, 1997). Soden e Dobson (2001) identificaram sequências consenso, correspondentes a sítios de ligação de proteínas NIT2, na região promotora de genes de lacase de *Pleurotus sajor-caju*, sugerindo o provável envolvimento desse tipo de proteína na expressão gênica.

A adição de cobre em todas as concentrações aumentou a produção de lacase por *A. blazei* U2/4 no meio LN (0,6 g L<sup>-1</sup> de ureia) (Figura 2.2). Quando foram adicionados 150 e 200 µM de CuSO<sub>4</sub>, o aumento em comparação com o controle (1,5 U mL<sup>-1</sup>) foi de nove vezes (13,7 U mL<sup>-1</sup>). Contudo, no meio HN (Figura 2.2), a adição de CuSO<sub>4</sub> não aumentou de forma significativa a produção de lacase, que se manteve similar ao controle em todos os tratamentos (13,7 U mL<sup>-1</sup>), indicando que na presença de maiores concentrações de nitrogênio o efeito indutor do cobre aparentemente não é significativo.

Para *P. ostreatus* U9/1 a adição de cobre promoveu aumento da produção da enzima tanto no meio LN (0,6 g L<sup>-1</sup> de ureia) quanto no meio HN (6 g L<sup>-1</sup> de ureia) (Figura 2.3). Entretanto, o maior nível de atividade foi observado no meio HN (14,2 U mL<sup>-1</sup>) com adição de 150 µM de CuSO<sub>4</sub>. A adição de CuSO<sub>4</sub> a 300 µM inibiu a produção de lacase no meio LN, mas não afetou a atividade enzimática no meio HN.



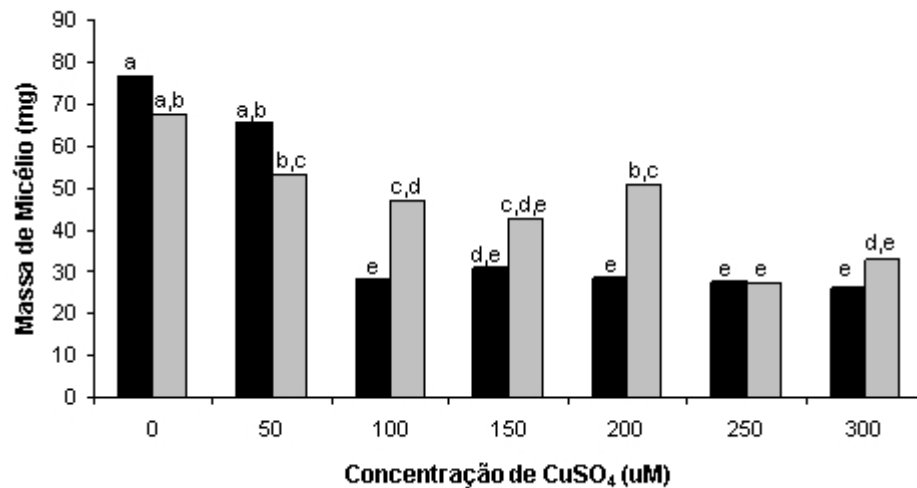
**Figura 2.2:** Atividade de lacase da linhagem U2/4 em diferentes concentrações de ureia (LN 0,6 g L<sup>-1</sup> – preto e HN 6 g L<sup>-1</sup> – cinza) e de cobre após vinte e um dias de cultivo. Médias indicadas com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.3:** Atividade de lacase da linhagem U9/1 em diferentes concentrações de ureia (LN 0,6 g L<sup>-1</sup> – preto e HN 6 g L<sup>-1</sup> – cinza) e de cobre após vinte e um dias de cultivo. Médias indicadas com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

O cobre tem sido considerado como um dos mais eficientes indutores de lacase uma vez que esse metal é necessário para a síntese da enzima cobre polifenoloxidase (GALHAUP et al., 2001; DEKKER et al., 2007). Além disso, a influência do cobre sobre a regulação da expressão gênica de lacase tem sido relatada para diversas espécies de fungos (PALMIERI et al., 2000; CAVALAZZI et al., 2005; NITHERANONT et al., 2011; KARP, 2012) e parece ocorrer via elementos sensíveis a metal (MRE – *metal responsive element*) presentes na região promotora de genes de lacase e que são indiretamente afetados pela presença de cobre no meio de cultivo (FARACO et al., 2003). De fato, Giardina et al. (1999) analisaram a região promotora de um gene de lacase de *Pleurotus ostreatus* e identificaram um MRE. Mais tarde, Faraco et al. (2003) identificaram quatro MREs na região promotora de dois genes de lacase de *P. ostreatus* (*poxc* e *pox1b*) e em ambos os trabalhos a atividade de lacase foi fortemente induzida pelo cobre.

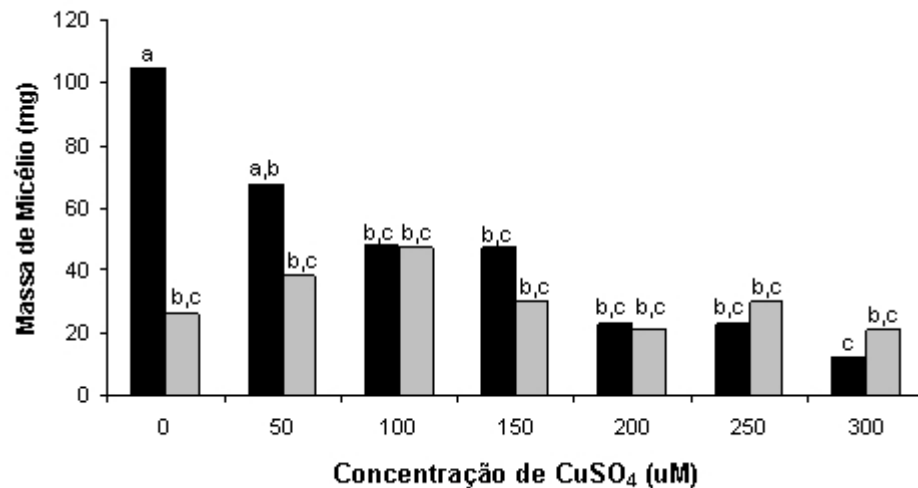
A constatação de que a adição de cobre ao meio de cultivo das linhagens avaliadas aumentou a atividade de lacase indicam a provável existência de mecanismos reguladores da transcrição gênica influenciados por cobre nessas linhagens. Contudo, a comprovação dessa hipótese requer a análise detalhada dos promotores de genes codificadores de lacases.



**Figura 2.4:** Média da produção de biomassa de U2/4 em diferentes concentrações de ureia (LN 0,6 g L<sup>-1</sup> – preto e HN 6 g L<sup>-1</sup> – cinza) e de cobre após vinte e um dias de cultivo. Médias indicadas com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

A adição de cobre reduziu a produção de biomassa tanto de *A. blazei* U2/4 quanto de *P. ostreatus* U9/1 (Figuras 2.4 e 2.5). Quando cobre em concentração acima de 50 µM foi adicionado, houve uma queda significativa da produção de biomassa de *A. blazei* U2/4 tendo produzido 76,7 mg (LN) e 67,6 mg (HN) na ausência de cobre. A produção de biomassa caiu ainda mais para 28,0 mg (LN) e 47,2 mg (HN) com a adição de 100 µM de CuSO<sub>4</sub>.

Em relação ao *P. ostreatus* U9/1, a redução da produção de biomassa foi mais expressiva para as amostras contendo LN. De 104,6 mg de biomassa produzida na ausência de cobre, ocorreu uma diminuição para 67,6 mg com apenas 50 µM de CuSO<sub>4</sub> (Figura 2.5). Além disso, *P. ostreatus* U9/1 produziu menos biomassa no meio HN, sendo seu crescimento aparentemente afetado pela maior concentração de nitrogênio ou uma menor relação C/N. A produção de micélio por essa linhagem na ausência de cobre e em meio HN foi de apenas 26,4 mg e não foi reduzida de forma significativa pela adição de cobre. Íons cobre livres podem gerar stress oxidativo, reduzindo o crescimento o que poderia explicar a menor produção de biomassa à medida em que a concentração de cobre foi elevada (PALMIERI et al., 2000), contudo isso não parece afetar a produção de lacase.



**Figura 2.5:** Média da produção de biomassa de U9/1 em diferentes concentrações de ureia (LN 0,6 g L<sup>-1</sup> – preto e HN 6 g L<sup>-1</sup> – cinza) e de cobre após vinte e um dias de cultivo. Médias indicadas com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Com base nesses resultados, empregou-se nos experimentos de indução de lacase por compostos aromáticos uma solução nutritiva contendo glicose (10 g L<sup>-1</sup>) como fonte de carbono, nitrogênio fornecido como ureia (6,0 g L<sup>-1</sup>) e 150 µM de CuSO<sub>4</sub>.

### 2.3.3 Seleção de substâncias indutoras da atividade de lacase

O aumento da produção de lacase tem sido obtido com a adição de compostos fenólicos e aromáticos aos meios de cultivo. A indução de lacase por essas substâncias parece estar relacionada ao desenvolvimento de resposta fúngica contra compostos aromáticos tóxicos comumente produzidos durante a degradação de lignina (THURSTON, 1994). Muitos são os compostos com potencial efeito indutor de lacase, contudo tais compostos parecem produzir efeitos diferentes que dependem da linhagem fúngica, do tipo de composto e da concentração usada (PISCITELLI et al., 2011).

Para a seleção da melhor concentração dos indutores pirogalol, álcool veratrílico, xilidina, vanilina, guaiacol e etanol, diferentes concentrações foram testadas. Após 21 dias verificou-se que a adição dos compostos ao meio de cultivo afetou de formas distintas o crescimento dos fungos (Tabela 2.3) bem como a produção de lacase (Figuras 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 e 2.10).



De modo geral as diferentes linhagens cresceram bem na presença de todos os indutores avaliados sendo *P. ostreatus* U9/1 a linhagem que mais produziu biomassa (Tabela 2.3). Pirogalol foi o único composto que ocasionou aumento do crescimento de todas as linhagens de *A. blazei* (U2/1, U2/2, U2/3 e U2/4) em todas as concentrações testadas, porém não afetou o crescimento de *P. ostreatus* U9/1. Enquanto *A. blazei* U2/1 produziu 15,4 mg de biomassa em 21 dias de cultivo na ausência de indutor, na presença de 0,5 mM de pirogalol a produção foi de 29 mg de biomassa no mesmo intervalo de tempo. Já a produção de micélio por *A. blazei* U2/4 passou de 51 mg na ausência de indutores para 107 mg na presença de 1,5 mM de pirogalol.

O uso de vanilina aumentou de forma significativa o crescimento de *A. blazei* U2/4 em todas as concentrações testadas (17, 16 e 24%). Quando usada a 1,0 e 1,5 mM aumentou significativamente a biomassa de *A. blazei* U2/1 (33 e 41%, respectivamente) e *P. ostreatus* U9/1 (12%), sem alterar o crescimento das demais linhagens. O guaiacol (1,5 mM) produziu aumento da biomassa somente de *P. ostreatus* U9/1 (5%).

**Tabela 2.3:** Efeito de diferentes compostos aromáticos sobre o crescimento de diferentes linhagens de *Agaricus blazei* e *Pleurotus ostreatus* ao final de vinte e um dias de cultivo (média  $\pm$  desvio padrão).

Indutor	Concentração (mM)	Linhagem				
		U2/1	U2/2	U2/3	U2/4	U9/1
Biomassa (mg)						
<b>Controle</b>	-	15,4 $\pm$ 0,7	6,1 $\pm$ 2,0	12,3 $\pm$ 3,5	51,2 $\pm$ 1,9	209,9 $\pm$ 2,5
	0,5	29,3 $\pm$ 1,7*	14,9 $\pm$ 1,2	24,6 $\pm$ 6,0	71,8 $\pm$ 2,5*	188,5 $\pm$ 8,0
<b>Pirogalol</b>	1,0	20,5 $\pm$ 0,7*	11,8 $\pm$ 0,4	26,7 $\pm$ 1,5*	97,3 $\pm$ 0,2*	188,2 $\pm$ 9,2
	1,5	23,5 $\pm$ 0,2*	13,5 $\pm$ 3,0	10,7 $\pm$ 0,0	107,6 $\pm$ 6,8*	204,8 $\pm$ 12,4
<b>Álcool Veratrílico</b>	0,5	12,2 $\pm$ 2,1	6,2 $\pm$ 2,4	14,7 $\pm$ 3,2	44,6 $\pm$ 1,6	204,0 $\pm$ 12,6
	1,0	17,4 $\pm$ 4,1	6,2 $\pm$ 1,0	11,6 $\pm$ 5,0	49,2 $\pm$ 5,3	154,2 $\pm$ 5,7
	1,5	11,9 $\pm$ 0,6	6,2 $\pm$ 0,7	10,9 $\pm$ 5,7	45,3 $\pm$ 5,2	186,8 $\pm$ 5,8
<b>Vanilina</b>	0,5	14,5 $\pm$ 1,6	6,0 $\pm$ 2,1	14,3 $\pm$ 4,4	62,0 $\pm$ 0,7*	192,0 $\pm$ 28,7
	1,0	23,1 $\pm$ 1,9*	8,5 $\pm$ 0,8	15,5 $\pm$ 3,7	61,0 $\pm$ 5,3*	239,7 $\pm$ 1,5*
	1,5	26,3 $\pm$ 0,2*	15,2 $\pm$ 0,5	18,1 $\pm$ 2,9	68,1 $\pm$ 0,5*	185,0 $\pm$ 11,1
<b>Xilidina</b>	0,5	14,9 $\pm$ 0,1	10,4 $\pm$ 0,3	19,7 $\pm$ 0,8	46,0 $\pm$ 4,9	123,4 $\pm$ 21,2
	1,0	13,9 $\pm$ 3,1	12,5 $\pm$ 2,2	18,0 $\pm$ 6,1	34,1 $\pm$ 9,4	162,3 $\pm$ 43,0
	1,5	12,5 $\pm$ 0,9	7,7 $\pm$ 1,6	22,3 $\pm$ 1,4	32,5 $\pm$ 2,5	194,9 $\pm$ 29,0
<b>Guaiacol</b>	0,5	-	9,4 $\pm$ 2,6	19,0 $\pm$ 0,7	70,02 $\pm$ 3,4*	177,1 $\pm$ 9,9
	1,0	-	6,6 $\pm$ 3,2	21,2 $\pm$ 2,4	50,7 $\pm$ 3,0	199,2 $\pm$ 20,9
	1,5	-	10,4 $\pm$ 1,1	22,7 $\pm$ 1,9	66,6 $\pm$ 15,0*	221,8 $\pm$ 4,4*
<b>Etanol</b>	0,5	18,6 $\pm$ 0,4*	11,3 $\pm$ 4,0	11,3 $\pm$ 0,4	56,4 $\pm$ 0,3*	184,2 $\pm$ 11,4
	1,0	15,3 $\pm$ 1,6	11,3 $\pm$ 5,7	10,7 $\pm$ 1,3	60,4 $\pm$ 3,8*	157,4 $\pm$ 4,1
	1,5	14,1 $\pm$ 0,5	6,0 $\pm$ 4,1	9,9 $\pm$ 6,7	63,5 $\pm$ 3,1*	150,1 $\pm$ 13,0

\* Aumento significativo da massa de micélio em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

O etanol aumentou significativamente o crescimento de *A. blazei* U2/4 em todas as concentrações (9, 15 e 20%) e elevou o crescimento de *A. blazei* U2/1 (20%) somente quando empregado a 0,5 mM, resultados contrários aos observados por Lomascolo et al. (2003) que relataram redução do crescimento radial de *Pycnoporus cinnabarinus* em 70% na presença desse composto.

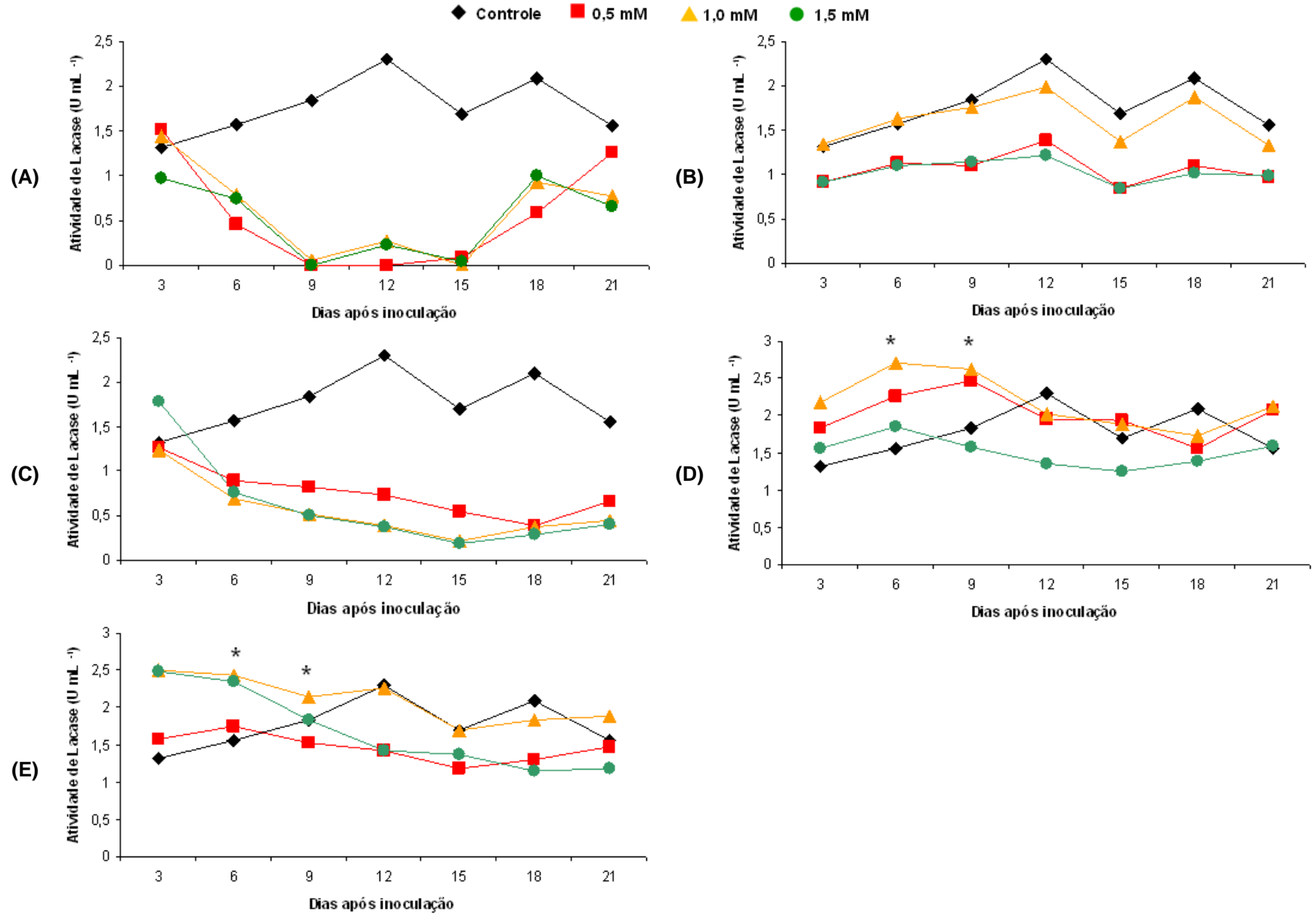
Bollag e Leonowicz (1984) não observaram influência da presença de xilidina no meio sobre a produção de biomassa de *Fomes annosus*, *Pholiota mutabilis*, *Pleurotus ostreatus* ou *Trametes versicolor*. De forma similar, Elisashvili et al. (2010) também não observaram alterações da produção de biomassa de *Cerrena unicolor* pela adição dos indutores pirogalol, vanilina ou xilidina ao meio de cultivo.

Até o momento não há na literatura dados sobre a indução da atividade de lacases por cepas de *Agaricus blazei* sendo os resultados aqui apresentados inéditos sobre essa característica da espécie.

Na ausência de indutores a atividade máxima de lacase ocorreu por volta do 12º dia de cultivo para as linhagens *A. blazei* U2/1 (2,3 U mL<sup>-1</sup>) e U2/2 (1,3 U mL<sup>-1</sup>) e para *P. ostreatus* U9/1 (14,4 U mL<sup>-1</sup>). A linhagem *A. blazei* U2/3 apresentou atividade máxima no 6º dia de cultivo (3,1 U mL<sup>-1</sup>) e *A. blazei* U2/4 (7,6 U mL<sup>-1</sup>) somente no 21º dia (Tabela 2.4).

Dentre todas as cepas avaliadas e dentre todas as condições testadas, as maiores atividades de lacase foram verificadas para *A. blazei* U2/4 (8,4 U mL<sup>-1</sup> no 6º dia de cultivo) e *P. ostreatus* U9/1 (15 U mL<sup>-1</sup> no 12º dia de cultivo), ambos na presença de 0,5 mM de etanol (Figuras 2.9 e 2.10).

A atividade de lacase de *A. blazei* U2/1 foi pouco influenciada por indutores, sendo a produção positivamente afetada somente quando 1,0 mM de vanilina ou etanol foram adicionados. Na ausência de indutores a produção máxima de lacase (2,3 U mL<sup>-1</sup>) ocorreu no 12º dia de cultivo e verificou-se que, além do aumento significativo da atividade na presença de indutores, o pico de atividade foi antecipado para o 6º dia de cultivo com vanilina (2,7 U mL<sup>-1</sup>) e etanol (2,4 U mL<sup>-1</sup>) (Figura 2.6 D e E).

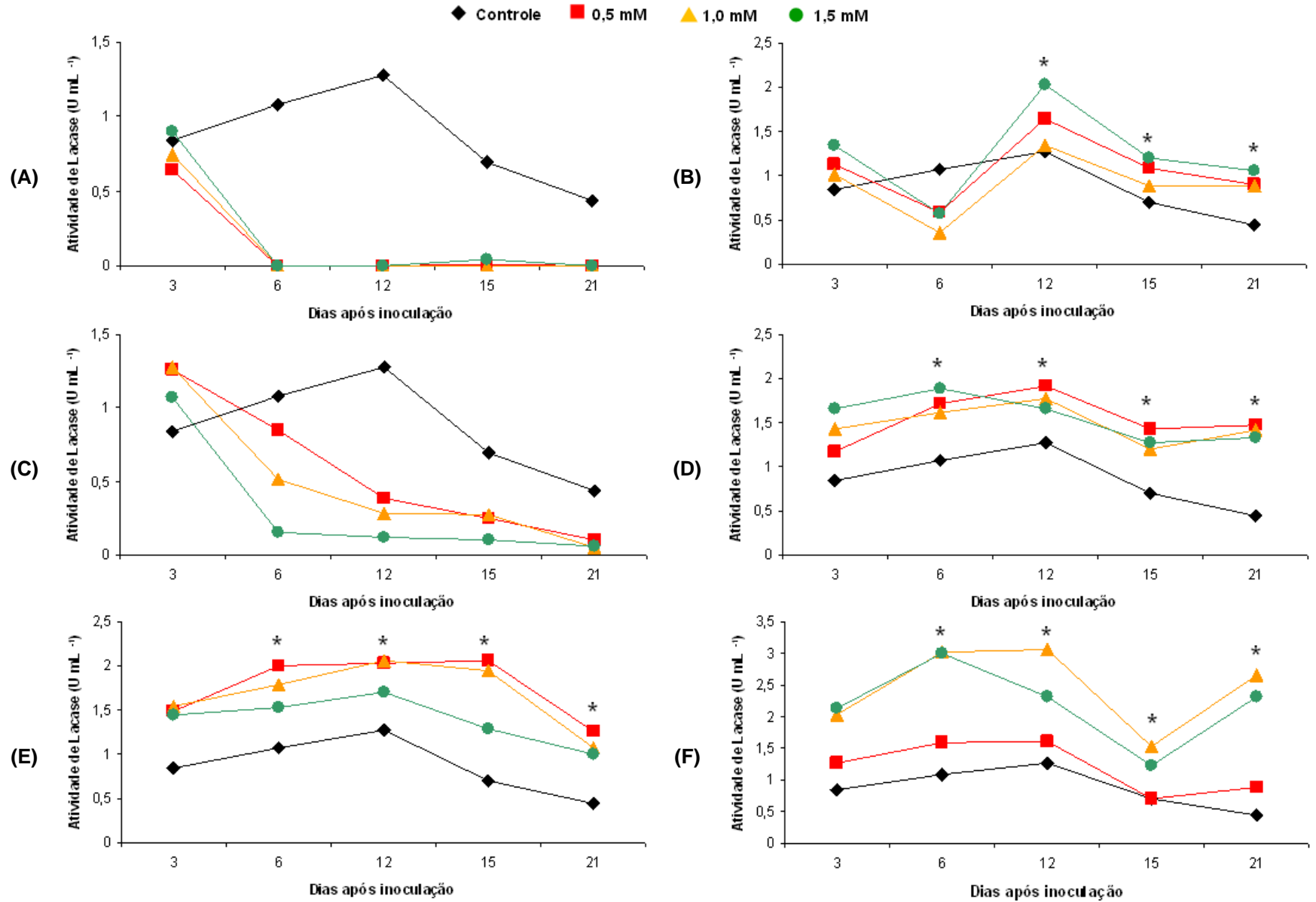


**Figura 2.6:** Média da atividade de lacase de *Agaricus blazei* U2/1 em diferentes concentrações dos compostos (A) pirogalol, (B) álcool veratrílico, (C) xilidina, (D) vanilina e (E) etanol, ao longo de vinte e um dias de cultivo. Asteriscos indicam aumento significativo da atividade de lacase ( $p < 0,05$ ).

Pirogalol e xilidina inibiram a atividade de lacase de *A. blazei* U2/1 em todas as concentrações testadas (Figura 2.6 A e C). Pirogalol reduziu a atividade a zero em torno do 9º dia de cultivo, mas a produção de enzima voltou a crescer ligeiramente após o 15º dia (1,2 U mL<sup>-1</sup> com 0,5 mM de pirogalol), porém ficando sempre abaixo do controle. A produção de lacase na presença de xilidina atingiu o mínimo de 0,2 U mL<sup>-1</sup> em torno do 15º dia e manteve-se baixa até o término da fermentação. O álcool veratrílico também inibiu a atividade de lacase de *A. blazei* U2/1 chegando ao mínimo de 0,8 U mL<sup>-1</sup> no 15º dia quando utilizado a 0,5 ou 1,5 mM. Porém, quando 1,0 mM desse indutor foi empregado a produção de lacase não diferiu do controle (máximo de 2,0 U mL<sup>-1</sup> no 12º dia) (Figura 2.6 B), demonstrando que nessa concentração o álcool veratrílico não afeta a atividade enzimática.

A maioria dos compostos testados afetou positivamente a atividade de lacase de *A. blazei* U2/2 (Figura 2.7 e Tabela 2.4). Na ausência de indutor o pico de atividade foi de 1,3 U mL<sup>-1</sup> (12º dia) e os maiores níveis de atividade após indução foram observados com a utilização de álcool veratrílico 1,5 mM (2,0 U mL<sup>-1</sup> no 12º dia), vanilina 0,5 e 1,5 mM (2,0 U mL<sup>-1</sup> no 6º e 12º dia, respectivamente), guaiacol 0,5 mM (2,0 U mL<sup>-1</sup> no 6º dia) e etanol 1,0 mM (3,0 U mL<sup>-1</sup> no 6º dia). Em todos os casos a atividade manteve-se acima do controle até o término do período de 21 dias de fermentação (Figura 2.7). Os compostos pirogalol e xilidina inibiram a atividade de lacase de *A. blazei* U2/2 de forma irreversível, reduzindo-a a zero em todas as concentrações de pirogalol e chegando ao mínimo de 0,06 U mL<sup>-1</sup> com xilidina a 1,0 e 1,5 mM no 21º dia (Figura 2.7 A e C).

A produção de *A. blazei* U2/3 não foi significativamente afetada pela adição de álcool veratrílico, mantendo-se similar ao controle (máximo de 3,0 U mL<sup>-1</sup>) em todas as concentrações testadas (Figura 2.8 e Tabela 2.4). A atividade máxima após indução da atividade de lacase foi observada com a utilização de vanilina 0,5 mM (4,5 U mL<sup>-1</sup> no 12º dia), guaiacol 0,5 mM (4,0 U mL<sup>-1</sup> no 6º dia) e etanol 0,5 mM (3,4 U mL<sup>-1</sup> no 6º dia). Xilidina e pirogalol também inibiram a atividade de lacase de *A. blazei* U2/3 (Figura 2.8 A e C) reduzindo-a irreversivelmente a 0,15 U mL<sup>-1</sup> no 6º dia com pirogalol 1,0 mM e a zero com xilidina 1,5 mM.



**Figura 2.7:** Média da atividade de lacase de *Agaricus blazei* U2/2 em diferentes concentrações dos compostos (A) pirogalol, (B) álcool veratrílico, (C) xilidina, (D) vanilina, (E) guaiacol e (F) etanol, ao longo de vinte e um dias de cultivo. Asteriscos indicam aumento significativo da atividade de lacase ( $p < 0,05$ ).

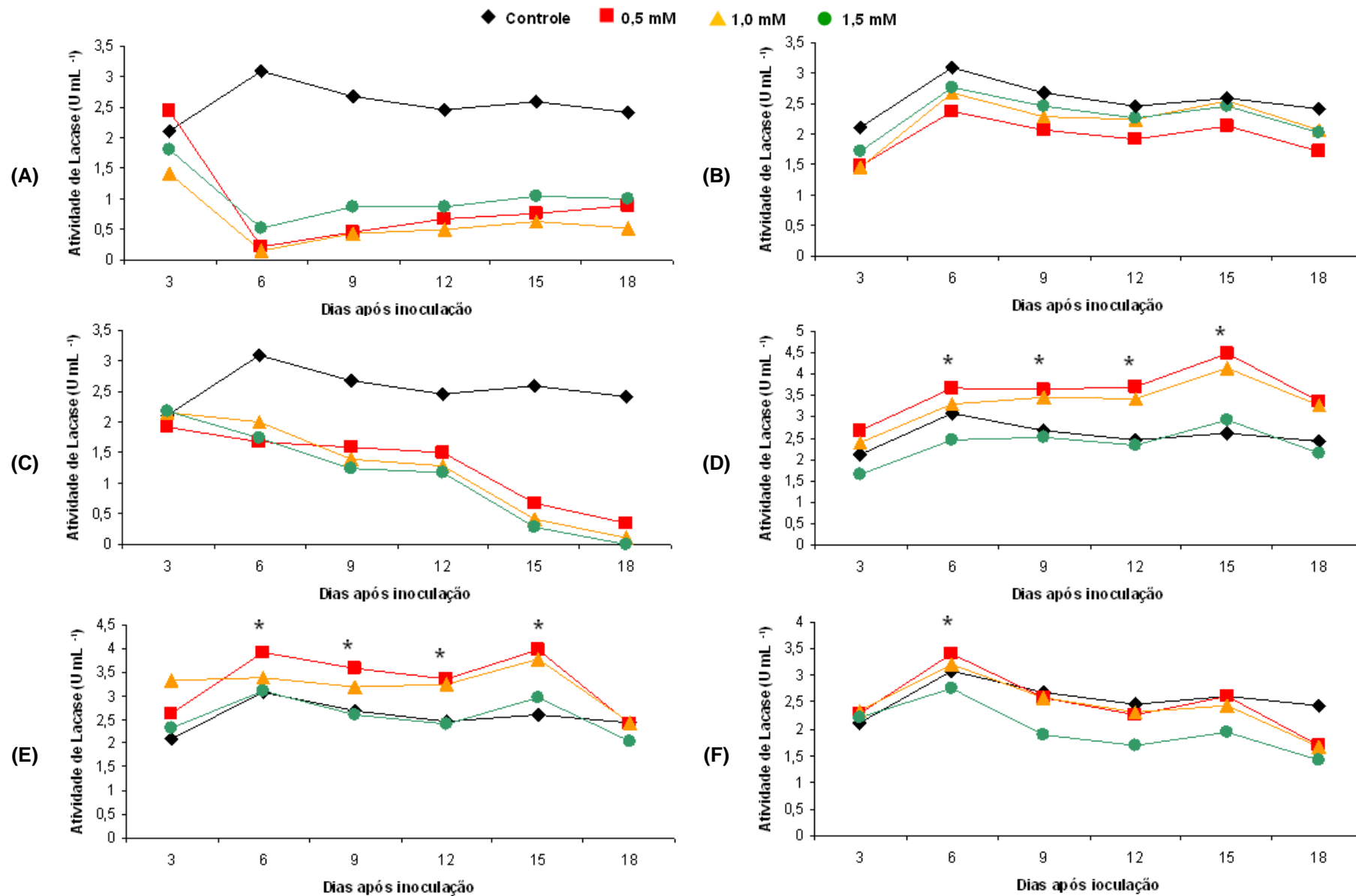
Dentre as linhagens de *A. blazei* analisadas a linhagem U2/4 foi a melhor produtora de lacase e, na ausência de indutores, produziu o máximo de  $7,6 \text{ U mL}^{-1}$  no 21º dia de fermentação. As maiores atividades após indução (Figura 2.9) foram verificadas com a adição de álcool veratrílico  $1,5 \text{ mM}$  ( $8,3 \text{ U mL}^{-1}$  no 6º dia), xilidina  $0,5 \text{ mM}$  ( $8,0 \text{ U mL}^{-1}$  no 21º dia), vanilina  $1,5 \text{ mM}$  ( $8,2 \text{ U mL}^{-1}$  no 6º dia), guaiacol  $1,5 \text{ mM}$  ( $8,5 \text{ U mL}^{-1}$  no 21º dia) e etanol  $0,5 \text{ mM}$  ( $8,4 \text{ U mL}^{-1}$  no 6º dia).

A adição de xilidina  $1,5 \text{ mM}$  inibiu a atividade de lacase de *A. blazei* U2/4, mantendo-a em torno de  $3,4 \text{ U mL}^{-1}$ . Já pirogalol também inibiu a atividade de lacase em todas as concentrações empregadas, contudo o fungo manteve sua capacidade de produção que voltou a aumentar por volta do 15º dia de fermentação, chegando a um máximo de  $8,0 \text{ U mL}^{-1}$  no 21º dia quando empregado a  $1,0 \text{ mM}$  (Figura 2.9 A).

A produção de lacase pelo fungo *P. ostreatus* U9/1 foi a maior dentre todas as linhagens testadas e na ausência de indutores a atividade máxima foi de  $14,4 \text{ U mL}^{-1}$  no 12º dia (Figura 2.10 e Tabela 2.4). Somente o etanol a  $0,5 \text{ mM}$  foi capaz de produzir aumento significativo da atividade de lacase que alcançou o pico de  $15 \text{ U mL}^{-1}$  no 12º dia (Figura 2.10 F).

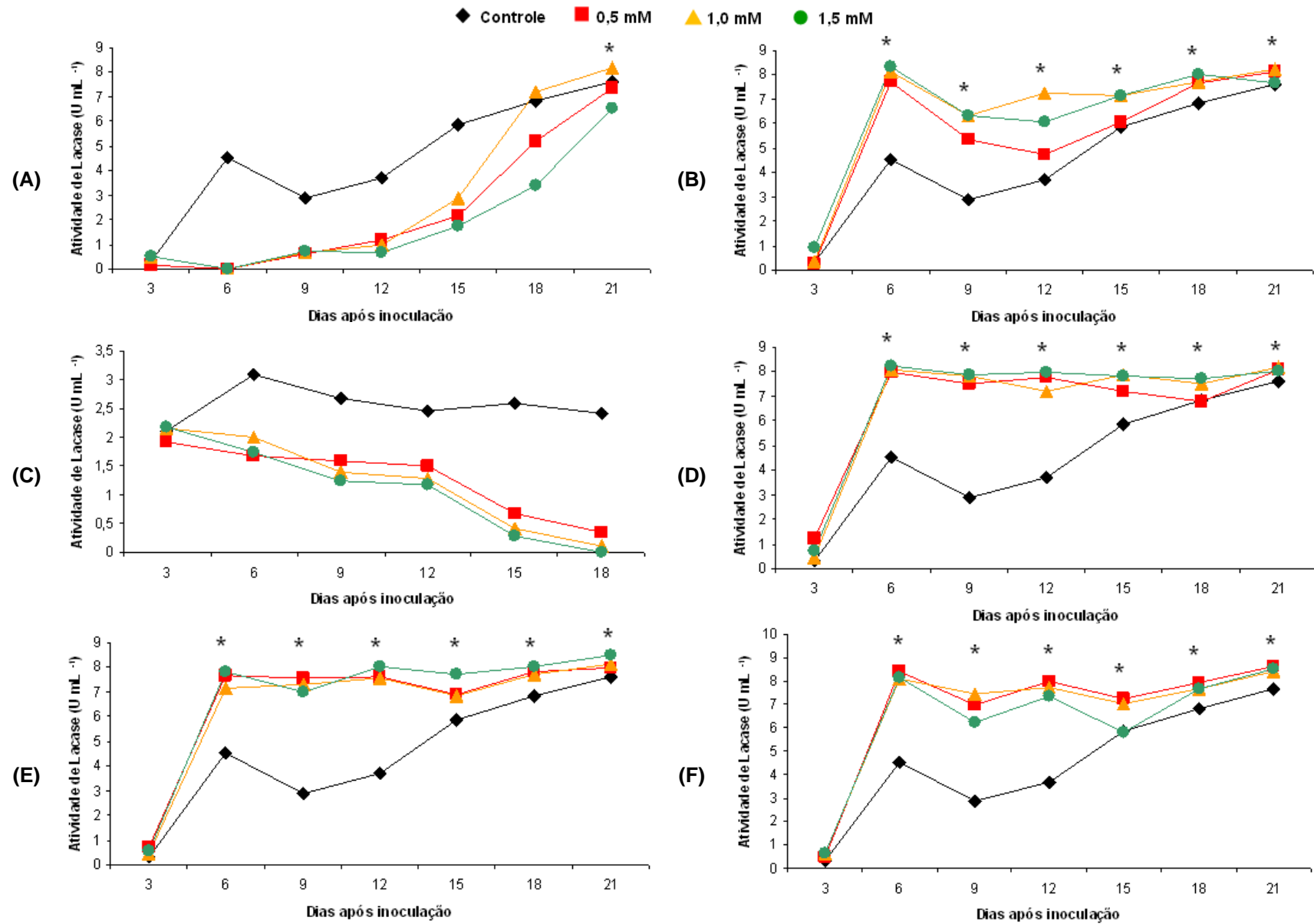
Pirogalol  $1,5 \text{ mM}$  também produziu ligeira redução da atividade de lacase de *P. ostreatus* U9/1, alcançando mínimo de  $3,4 \text{ U mL}^{-1}$  em torno do 18º dia de fermentação (Figura 2.10 A).

Diferentes estudos sobre indução de lacases indicam que a influência dos compostos empregados sobre a atividade enzimática depende de vários fatores, entre eles a linhagem fúngica (BOLLAG; LEONOWICZ, 1984), o tipo de indutor e a concentração utilizada (ELISASHVILI et al., 2010). Os dados aqui apresentados estão de acordo com essas premissas uma vez que diferentes linhagens responderam de forma distinta ao mesmo indutor (Figura 2.6B e 2.9B). Diferentes indutores provocaram respostas muito diversificadas, além da concentração do indutor também ter afetado a atividade enzimática de formas diversas.

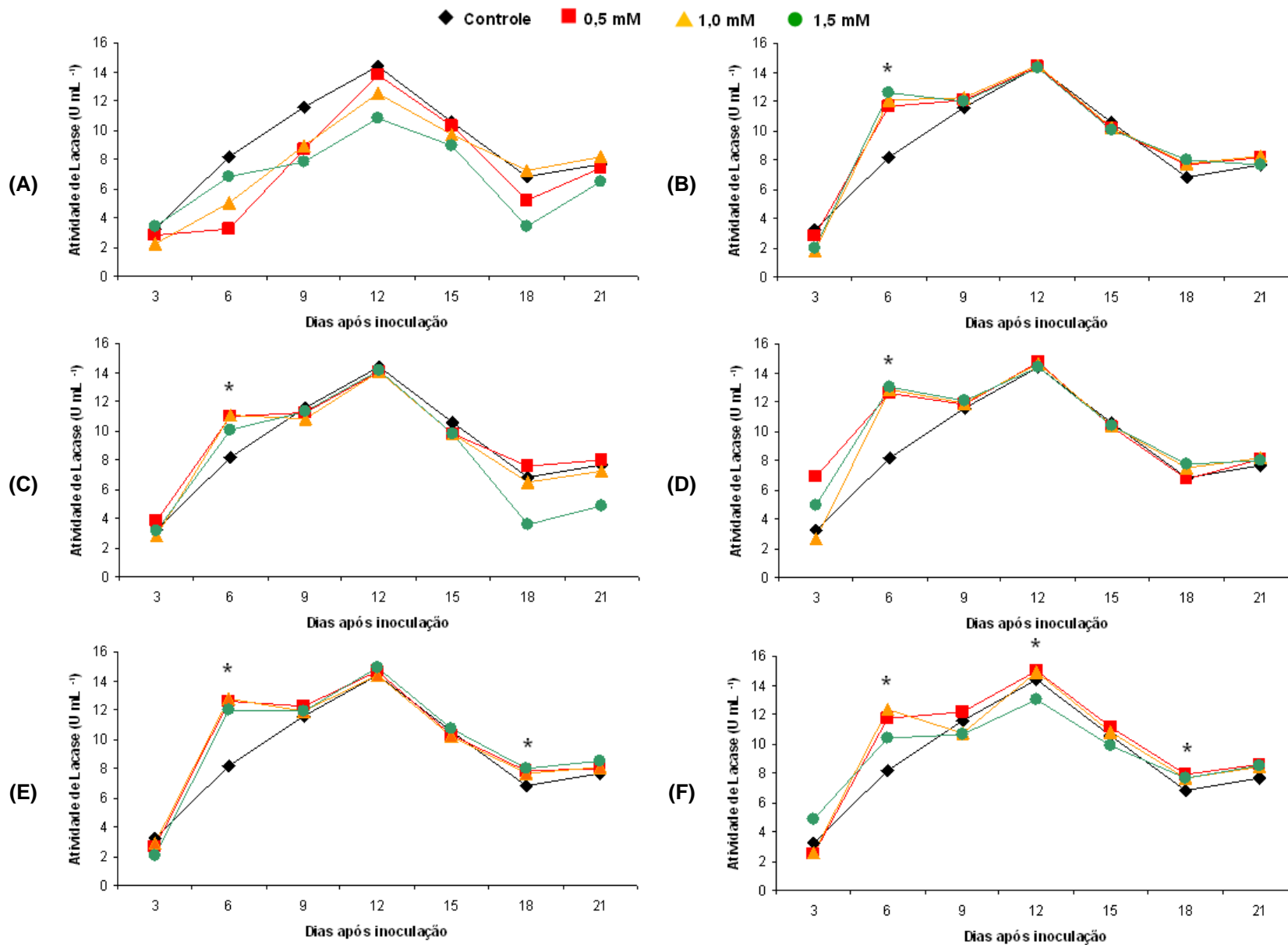


**Figura 2.8:** Média da atividade de lacase de *Agaricus blazei* U2/3 em diferentes concentrações dos compostos (A) pirogallol, (B) álcool veratrílico, (C) xilidina, (D) vanilina, (E) guaiacol e (F) etanol, ao longo de vinte e um dias de cultivo. Asteriscos indicam aumento significativo da atividade de lacase ( $p < 0,05$ ).





**Figura 2.9:** Média da atividade de lacase de *Agaricus blazei* U2/4 em diferentes concentrações dos compostos (A) pirogallol, (B) álcool veratrílico, (C) xilidina, (D) vanilina, (E) guaiacol e (F) etanol, ao longo de vinte e um dias de cultivo. Asteriscos indicam aumento significativo da atividade de lacase ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.10:** Média da atividade de lacase de *Pleurotus ostreatus* U9/1 em diferentes concentrações dos compostos (A) pirogalol, (B) álcool veratrílico, (C) xilidina, (D) vanilina, (E) guaiacol e (F) etanol, ao longo de vinte e um dias de cultivo. Asteriscos indicam aumento significativo da atividade de lacase ( $p < 0,05$ ).

O pirogalol, um derivado do catecol, reduziu a atividade máxima de lacase em todas as cinco linhagens testadas (Tabela 2.4). Somente *A. blazei* U2/4 foi capaz de preservar sua capacidade de produção e elevar a atividade na presença desse composto, porém, o aumento teve início somente em torno do 18º dia de cultivo com pico de atividade no 21º dia (Figura 2.9A), demonstrando que, apesar da inibição da produção de lacase no início do cultivo, o micélio permaneceu metabolicamente ativo.

Esse composto também reduziu fortemente a atividade de lacase para *Pycnoporus cinnabarinus* e *Coriolus hirsutus* corroborando os resultados aqui observados (EGGERT et al., 1996). Entretanto, aumentou em 2,5 vezes a atividade de lacase para *Cerrena unicolor*. Mas, de forma contrastante, este mesmo estudo observou que a adição de pirogalol ao cultivo de *Trametes versicolor* reduziu a atividade de lacase (ELISASHVILI et al., 2010). Como esse composto levou a um aumento do crescimento do fungo (Tabela 2.3), talvez o surgimento tardio de um pico de atividade enzimática de *A. blazei* U2/4 seja explicado pelo aumento da biomassa. Esse tipo de resultado poderia também ser explicado pela inibição de formas constitutivas de lacase e pela expressão de novas isoformas (KLONOWSKA et al., 2001). Entretanto, para as demais linhagens não houve recuperação significativa da produção da enzima durante o período de fermentação e os níveis de lacase se mantiveram reduzidos.

A adição de álcool veratrílico provocou aumento significativo da atividade máxima de lacase somente para as linhagens *A. blazei* U2/2 (2,0 U mL<sup>-1</sup>) e U2/4 (8,3 U mL<sup>-1</sup>), representando um aumento de 59 e 9%, respectivamente (Tabela 2.4). Para U2/2 o pico de atividade ocorreu em torno do 12º dia de cultivo e a produção se manteve elevada até o final da fermentação, porém, para U2/4 (Figura 2.9B) o álcool veratrílico ocasionou a antecipação do pico de atividade enzimática para o 6º dia, característica importante de um indutor ideal que, além de aumentar a atividade, antecipa a produção, reduzindo o tempo de fermentação (ELISASHVILI et al., 2010).

Em contraste, para as linhagens *A. blazei* U2/1 (mínimo de 0,8 U mL<sup>-1</sup>) e U2/3 (mínimo de 1,7 U mL<sup>-1</sup>) houve redução da atividade após adição desse composto em todas as concentrações (Figuras 2.6B e 2.8B). A produção de lacase por *P. ostreatus* U9/1 não foi afetada, mantendo-se similar ao controle (máximo de 14,4 U mL<sup>-1</sup>) ao longo da fermentação (Figura 2.10B).

O álcool veratrílico é reconhecidamente um potente indutor da atividade de lacase, empregado em vários estudos e para diferentes espécies de fungos (PISCITELLI et al., 2011). Relatos indicam que sua presença no meio de cultivo pode provocar a indução dessa enzima (DEKKER et al., 2007). Segundo Xavier et al. (2007), todas as diferentes concentrações desse composto (0,05, 1, 2 e 4 mM) avaliadas induziram a atividade de lacase de *Trametes versicolor*, mas a melhor produção ocorreu com 2 mM ( $345 \text{ U L}^{-1}$ ). Contudo há relatos de que esse composto não afeta a atividade de lacase como demonstrado por Muñoz et al. (1997) para *Pleurotus eryngii* e por Hou et al. (2004) para *Pleurotus ostreatus*. A resposta variada obtida nesse estudo com o uso do álcool veratrílico indica um forte efeito da linhagem sobre os resultados, uma vez que as condições de cultivo e as concentrações empregadas foram as mesmas.

Observamos que a adição de xilidina reduziu de forma expressiva a atividade máxima de lacase em todas as linhagens (Tabela 2.4), com exceção de *A. blazei* U2/4, para o qual um aumento de aproximadamente 5% ( $8,0 \text{ U mL}^{-1}$ ) foi observado somente quando 0,5 mM desse composto foram utilizados (Figura 2.9C). O efeito indutor da xilidina já foi relatado para várias espécies de fungos. Para *Trametes* sp. AH28-2 o uso de xilidina a uma concentração de 1 mM provocou forte indução da atividade de lacase levando a produção da enzima de zero a  $476 \text{ U L}^{-1}$  em 72 horas (XIAO et al., 2004). Contudo, a xilidina pode ter efeito tóxico sobre o fungo levando a inibição da atividade de lacase em concentrações elevadas. Em muitos casos, seu efeito indutor só foi observado quando sua concentração no meio de cultivo foi reduzida, como observado para *Pycnoporus cinnabarinus* (10 – 19  $\mu\text{M}$ ) (EGGERT et al., 1996), *Pleurotus ostreatus* (50  $\mu\text{M}$ ) (HOU et al., 2004) e *Trametes versicolor* (10 – 50  $\mu\text{M}$ ) (XAVIER et al., 2007). A redução da atividade provocada pela xilidina nesse estudo pode ser explicada pelas concentrações do composto empregadas (0,5 – 1,5 mM).

**Tabela 2.4:** Efeito de diferentes compostos aromáticos sobre a atividade de lacase (média  $\pm$  desvio padrão).

Indutor	Linhagem									
	U2/1		U2/2		U2/3		U2/4		U9/1	
	Máxima Atividade (U mL <sup>-1</sup> )	Aumento da Atividade (%)	Máxima Atividade (U mL <sup>-1</sup> )	Aumento da Atividade (%)	Máxima Atividade (U mL <sup>-1</sup> )	Aumento da Atividade (%)	Máxima Atividade (U mL <sup>-1</sup> )	Aumento da Atividade (%)	Máxima Atividade (U mL <sup>-1</sup> )	Aumento da Atividade (%)
<b>Controle</b>	2,29 $\pm$ 0,73	-	1,27 $\pm$ 0,43	-	3,08 $\pm$ 0,32	-	7,63 $\pm$ 0,76	-	14,38 $\pm$ 0,25	-
<b>Pirogalol</b>	1,26 $\pm$ 0,61	- 45	1,02 $\pm$ 0,06	- 19,7	1,05 $\pm$ 0,0	- 66	8,18 $\pm$ 0,21*	7,2	13,8 $\pm$ 0,25	- 4
<b>Álcool Veratrílico</b>	1,98 $\pm$ 0,51	- 13,5	2,02 $\pm$ 0,64	59	2,77 $\pm$ 0,18	- 10	8,33 $\pm$ 0,21*	9,2	14,33 $\pm$ 0,59	- 0,3
<b>Vanilina</b>	2,71 $\pm$ 0,36*	18,3	1,92 $\pm$ 0,55	51,2	4,47 $\pm$ 0,43*	45	8,2 $\pm$ 0,15*	7,5	14,74 $\pm$ 0,26*	2,5
<b>Xilidina</b>	0,88 $\pm$ 0,27	- 61,6	0,85 $\pm$ 0,23	- 33	2,00 $\pm$ 0,63	- 35	7,98 $\pm$ 0,32*	4,6	14,10 $\pm$ 0,37	- 2
<b>Guaiacol</b>	-	-	2,06 $\pm$ 0,65	62,2	3,98 $\pm$ 0,34*	29	8,51 $\pm$ 0,13*	11,5	14,85 $\pm$ 0,07*	3,3
<b>Etanol</b>	2,43 $\pm$ 0,58	6	3,06 $\pm$ 1,7*	136	3,39 $\pm$ 0,06*	10	8,6 $\pm$ 0,38*	13	14,96 $\pm$ 0,17*	4

\*Aumento significativo da atividade enzimática em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

O uso de vanilina provocou o aumento da atividade máxima de lacase nas linhagens *A. blazei* U2/1 (18,3% de aumento 2,7 U mL<sup>-1</sup>), U2/2 (51,4% de aumento - 2,0 U mL<sup>-1</sup>), U2/3 (45% de aumento - 4,5 U mL<sup>-1</sup>), U2/4 (7,5% de aumento - 8,2 U mL<sup>-1</sup>) e praticamente não afetou a produção de *P. ostreatus* U9/1. Em cada linhagem a concentração de vanilina afetou a atividade de lacase de forma distinta. Em *A. blazei* U2/1 o aumento observado foi obtido com 1,0 mM de vanilina (Figura 2.6D), enquanto em *A. blazei* U2/2 as concentrações de 0,5 e 1,5 mM levaram ao aumento (Figura 2.7D). Enquanto em *A. blazei* U2/3 somente 0,5 mM de vanilina induziu a atividade de lacase (Figura 2.8D), em U2/4 todas as concentrações afetaram positivamente a produção (Figura 2.9D). O efeito indutor da vanilina tem sido frequentemente relatado (PISCITELLI et al., 2011).

A adição de vanilina ao cultivo de *Trametes* sp. AH28-2 provocou aumento expressivo da atividade de lacase (102 U L<sup>-1</sup>), cuja atividade não foi detectada na ausência do indutor. Além disso, a indução com vanilina provocou a expressão predominante de uma isoenzima específica desse fungo (XIAO et al., 2004). Esses resultados se opõem aos obtidos para Cavallazzi et al. (2005) que observou efeito inibidor desse composto sobre a atividade de lacase de *Lentinula edodes*, que deixou de produzir a enzima na presença de vanilina.

O efeito indutor da vanilina parece ser influenciado por outras condições do cultivo. Esse composto reduziu a atividade de lacase de *Cerrena unicolor* de aproximadamente 15 U mL<sup>-1</sup> para 3 U mL<sup>-1</sup> quando o fungo foi cultivado em meio com manitol. Porém, quando esse mesmo fungo foi cultivado em meio sintético à base de um resíduo da produção de etanol, a vanilina apresentou um forte efeito indutor de lacase elevando a produção de 117 U mL<sup>-1</sup> para 170 U mL<sup>-1</sup> (ELISASHVILI et al., 2010), indicando que as condições de cultivo também podem influenciar o poder de indução de um composto específico.

O guaiacol demonstrou ser um excelente indutor de lacases de *A. blazei*, provocando aumento da atividade máxima de lacase em todas as linhagens dessa espécie analisadas (a linhagem *A. blazei* U2/1 não foi testada com esse composto) e em todas as concentrações testadas (Tabela 2.4). *A. blazei* U2/2 apresentou 62% de aumento na atividade (2,0 U mL<sup>-1</sup>) e U2/3 29% (4,0 U mL<sup>-1</sup>) com a adição de 0,5 mM de guaiacol (Figuras 2.7E e 2.8E). Já *A. blazei* U2/4 apresentou 11,5% de aumento (8,5 U mL<sup>-1</sup>) na presença de 1,5 mM do composto (Figura 2.9E). Outro importante efeito desse indutor foi a antecipação do pico de atividade para três dias após a sua

adição ao meio de cultivo. A produção de lacases por *P. ostreatus* U9/1 não foi afetada pelo guaiacol.

Ao contrário do observado no presente estudo, segundo Hou et al. (2004), a adição de 1 mM de guaiacol dobrou a produção de lacases ( $\sim 200 \text{ U mL}^{-1}$ ) de *Pleurotus ostreatus*. *Trametes* sp teve a produção de lacase afetada por esse composto e produziu  $712 \text{ U L}^{-1}$  na presença de 12 mM de indutor (XIAO et al., 2004). Contudo, o guaiacol não afetou a atividade de lacase de *Pycnoporus cinnabarinus* (EGGERT et al., 1996).

A adição de etanol aos cultivos aumentou a atividade máxima de lacase de todas as linhagens testadas (Tabela 2.4). Enquanto esse composto promoveu aumento moderado da atividade de *A. blazei* U2/1 (6%), U2/3 (10%), U2/4 (13%) e *P. ostreatus* U9/1 (4%), a indução de lacases em *A. blazei* U2/2 foi expressiva, chegando a 136% (de  $1,27$  para  $3,0 \text{ U mL}^{-1}$ ) em apenas três dias (Figura 2.7F). Dados expressivos também foram obtidos com o uso de etanol como indutor para *Pycnoporus cinnabarinus* ss3 em FES, onde  $35 \text{ g L}^{-1}$  de etanol provocaram um aumento de 155 vezes ( $266.600 \text{ U L}^{-1}$ ) comparado ao controle (LOMASCOLO et al., 2003).

A maioria dos indutores de lacase são compostos tóxicos e bastante caros e a aplicabilidade de novas lacases depende da escolha do indutor menos tóxico, mais barato e acessível (HOU et al., 2004). O etanol representa uma possibilidade de indução viável para a produção de lacases de *A. blazei* justamente por apresentar um custo menor, ser abundante e menos tóxico que outros compostos usualmente empregados como indutores de lacases. Por todas essas características, optou-se pela utilização do etanol como indutor de lacase em análises posteriores.

Os resultados obtidos neste trabalho, comparados a dados previamente publicados, permitem concluir que as linhagens testadas apresentaram grande diversidade de resposta aos indutores e tais respostas dependem de diferentes fatores como a fisiologia do micro-organismo, além de características genéticas e ecológicas de cada espécie (ELISASHVILI et al., 2010). Adicionalmente, a concentração e a estrutura dos compostos também afeta de forma diferenciada a indução de lacase (XIAO et al., 2004). Portanto, a variedade de respostas aos diferentes compostos indutores parece ser a regra para basidiomicetos (CHEN et al., 2003; SETHURAMAN et al., 1998) e não há composto que atue como um indutor universal da síntese de enzimas, o que requer ampla análise desses compostos

para que um potencial eficiente produtor de lacase não seja descartado durante as etapas de triagem de indutores (LOMASCOLO et al., 2003).

## 2.4 Conclusões

A análise da sequência ITS1-5.8S-ITS2 das cinco cepas avaliadas demonstrou a ocorrência de elevada identidade de sequências ( $\geq 97\%$ , valor-E = 0) o que permitiu identificar quatro cepas como *Agaricus blazei* (U2/1, U2/2, U2/3 e U2/4) e uma como *Pleurotus ostreatus* (U9/1).

A produção de lacases por *Agaricus blazei* U2/4 e *Pleurotus ostreatus* U9/1 foi influenciada pela concentração de nitrogênio (ureia) e de cobre no meio de cultivo. As maiores atividades de lacase produzidas por *A. blazei* (U2/4) ( $13,7 \text{ U mL}^{-1}$ ) e *P. ostreatus* (U9/1) ( $14,2 \text{ U mL}^{-1}$ ) ocorreram em meio contendo glicose ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) como fonte de carbono, nitrogênio fornecido como ureia ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) e cobre fornecido como  $\text{CuSO}_4$  ( $150 \mu\text{M}$ ).

Os testes para seleção de indutores de lacases das cinco cepas permitiram verificar que as maiores atividades induzidas de lacase foram de *A. blazei* U2/4 ( $8,4 \text{ U mL}^{-1}$  com etanol e  $8,5 \text{ U mL}^{-1}$  com guaiacol no 6º e 8º dia, respectivamente) e *P. ostreatus* U9/1 ( $15 \text{ U mL}^{-1}$  com etanol no 12º dia de cultivo). Pirogalol e xilidina inibiram a produção de lacase de praticamente todas as linhagens e os demais indutores testados afetaram a atividade de lacase de formas distintas dependendo da linhagem e da concentração utilizada.

## 2.5 Referências

BALDRIAN, P. Fungal laccases: occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 215–242, 2006.

BOLLAG, J.M; LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 849-854, 1984.



- CAVALLAZZI, J.R.P.; KASUYA, C.M.; SOARES, M.A. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 383-387, 2005.
- COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 582-594, 2002.
- COLAUTO, N.B. et al. Alternative to peat for *Agaricus brasiliensis* yield. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 712-716, 2010.
- COLLINS, P.J.; DOBSON, A.D.W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3444-3450, 1997.
- COUTO, S.R; TOCA-HERRERA, J.L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 558-569, 2007.
- CHEN, S. et al. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, p. 143-148, 2003.
- D'AGOSTINI, E.C. et al. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 3, p. 295-300, 2011.
- DEKKER, R.F.H. et al. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Microbiology**, v. 10, p. 177-185, 2007.
- EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K.E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1151-1158, 1996.
- ELISASHVILI, V. et al. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1091-1096, 2010.
- FARACO, V.; GIARDINA, P; SANNIA, G. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. **Microbiology**, v. 149, p. 2155-2162, 2003.

- GALHAUP, C. et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 529–536, 2002.
- GIARDINA, P. et al. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical Journal**, v. 34, p. 655-663, 1999.
- GIARDINA, P. et al. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 369–385, 2010.
- HAN, M.J. et al. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v. 43, p. 555-560, 2005.
- HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10-18, 2009.
- HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1415–1419, 2004.
- JUMES, F.M.D. et al. Effects of *Agaricus brasiliensis* mushroom in Walker-256 tumor-bearing rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, p. 21-27, 2010.
- KARP, S. G. **Development of a biotreatment for delignification of sugarcane bagasse and production of laccases**. 147 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- KLONOWSKA, A.; et al. Enhanced of minor laccases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. **FEMS Microbiology Letters**, v. 200, p. 25-30, 2001.
- LOMASCOLO, A. et al. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 618-624, 2003.
- LEATHAM, G.F.; KIRK, T. K. Regulation of lignolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. **Microbiologist**, v. 16, p. 65-8, 1983.

- MAJEAU, J.; BRAAR, S.K.; TYAGI, R.D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2331-2350, 2010.
- MANSUR, M.; SUÁREZ, T.; GONZÁLEZ, A.E. Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 771-774, 1998.
- MARSLUF, G.A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 17–32, 1997.
- MARTÍNEZ, A.T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, p.195-204, 2005.
- MOROZOVA, O.V. et al. “Blue” laccases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 10, p. 1136-1150, 2007.
- MOURÃO, F. et al. Antioneoplastic activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 901-905, 2009.
- MUNÓZ, C. et al. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. **Current Microbiology**, v. 34, p. 1-5, 1997.
- NAKADE, K. et al. Characterization of an extracellular laccase, PbLac1, purified from *Polyporus brumalis*. **Fungal Biology**, v. 114, p. 609-618, 2010.
- NITHERANONT, T.; WATANABE, A.; ASADA, Y. Extracellular laccase produced by an edible basidiomycetous mushroom, *Grifola frondosa*: purification and characterization. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 3, 100790/1-100790/6, 2011.
- OHNO, N. et al. Antitumor  $\beta$ -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 7, p. 820-828, 2001.
- PALMIERI, G. et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 920-924, 2000.
- PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

- PERRY, C. et al. Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, v. 39, p. 1209-1218, 1993.
- PISCITELLI, A. et al. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. **Current Genomics**, v. 12, p. 104-112, 2011.
- PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-238, 1953.
- RUBILAR, O.; DIEZ, M.C.; GIANFREDA, L. Transformation of chlorinated phenolic compounds by white rot fungi. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 4, p. 227-268, 2008.
- SAPARRAT, M. C. N. et al. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Corioloropsis rigida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1534–1540, 2002.
- SETHURAMAN, A. et al. Effect of aromatic compounds on growth and ligninolytic enzyme production of two white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 872-885, 1998.
- SINGH, D.; CHEN, S. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 399–417, 2008.
- SIVAKUMAR, R. et al. Isolation, screening and optimization of production medium for thermostable laccase production from *Ganoderma* sp. **International Journal of Engineering Science and Technology**, v. 2, n. 12, p. 7133-7141, 2010.
- SODEN, D.M.; DOBSON, A.D.W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiology**, v. 147, p. 1755–1763, 2001.
- STRONG, P.J. Improved laccase production by *Trametes pubescens* MB89 in distillery wastewaters. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011. Disponível em <http://www.hindawi.com/journals/er/2011/379176/>. Acesso em: 13/06/2012.
- THURSTON, C.F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, p. 19-26, 1994.

ULLRICH, R.; et al. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 357–363, 2005.

VIKINESWARY, S. et al. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 171–177, 2006.

WASSER, S. P. et al. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, p. 267-290, 2002.

WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A. et al. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press Inc., 1990 , p. 315-322.

WU, J. et al. Cloning, characterization and expression of two new polyphenol oxidase cDNAs from *Agaricus bisporus*. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1439–1447, 2010.

XAVIER, A.M.R.B. et al. *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 444-451, 2007.

XIAO, Y.Z. et al. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. **Mycologia**, v. 96, n.1, p. 26-35, 2004.

XIN, F.; GENG, A. Utilization of horticultural waste for laccase production by *Trametes versicolor* under solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 235-246, 2011.

ZENG, X. et al. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p. 517–525, 2011.

ZHONG, M.; TAI, A.; YAMAMOTO, I. *In vitro* augmentation of natural killer activity and interferon- $\gamma$  production in murine spleen cells with *Agaricus blazei* fruiting body fractions. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2466-2469, 2005.

ZHOU, X.; WEN, X.; FENG, Y. Influence of glucose feeding on the ligninolytic enzyme production of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 1, p. 89-94, 2007.

ZOUARI-MECHICHI, H. et al. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. **The Journal of Microbiology**, v. 43, p.555-560, 2006.

## CAPÍTULO III

### PRODUÇÃO DE LACASE POR *Agaricus blazei* EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA E FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS

#### RESUMO

Lacases são cobre polifenol oxidases descritas em vários organismos, principalmente em fungos basidiomicetos ligninolíticos. Por apresentarem baixa especificidade ao substrato tais enzimas são de especial interesse para diversas aplicações como na indústria de alimentos, descoloração e tratamento de efluentes. A produção de enzimas adequadas a essas aplicações requer a produção de grandes quantidades a um custo viável. O uso de resíduos agroindustriais permite o desenvolvimento de bioprocessos para a produção de enzimas empregando-se substratos alternativos. O objetivo deste estudo foi otimizar a produção de lacase por fermentação submersa (FSm) utilizando como substratos resíduos agroindustriais empregando-se a linhagem *Agaricus blazei* U2/4. O potencial dessa linhagem na produção de lacase por fermentação no estado sólido (FES) também foi estudado. A melhor fonte alternativa de carbono para produção de lacase por *A. blazei* U2/4 em FSm foi o mel de cana. Após otimização das condições, verificou-se que os maiores níveis de atividade de lacase ( $9711 \text{ U L}^{-1}$ ) foram obtidos em meio composto por mel de cana ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ), ureia ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4$  ( $150 \text{ }\mu\text{M}$ ),  $\text{MgSO}_4$  ( $12 \text{ mM}$ ), etanol ( $1,2 \text{ mM}$ ), a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 8,0 em 10 dias de cultivo. Em FES a maior atividade de lacase ( $284 \text{ U g}^{-1}$ ) foi obtida após 7 dias com bagaço de cana suplementado com solução nutritiva composta de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4$  ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{KCl}$  ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $0,036 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $0,035 \text{ g L}^{-1}$ ), ureia ( $6,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $\text{CuSO}_4$  ( $150 \text{ }\mu\text{M}$ ), pH 8 e temperatura de  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os resultados indicaram que tanto a FSm com mel de cana quanto a FES com bagaço de cana são métodos promissores para produção de lacases de *A. blazei*. Contudo, por representar um bioprocessos que requer baixo investimento tecnológico, a FES representaria uma excelente abordagem de produção.

**Palavras-chave:** *Agaricus brasiliensis*, manganês peroxidase, melação de cana, bagaço de cana, FES, FSm.

### 3.1 Introdução

Lacases (EC 1.10.3.2) são cobre polifenol oxidases que possuem átomos de cobre distribuídos entre três sítios de ligação diferentes e altamente conservados, onde cada um executa um papel importante no mecanismo catalítico da enzima (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007; SODEN; DOBSON, 2001).

Sua presença foi descrita em plantas, bactérias, fungos e insetos (MOROZOVA et al., 2007) sendo uma enzima especialmente comum em fungos basidiomicetos ligninolíticos (MIKOLASCH; SHAUER, 2009) onde desempenham diferentes papéis fisiológicos como deslignificação, defesa ao stress oxidativo produzido pela degradação de lignina, morfogênese e interação planta-patógeno/hospedeiro (GIARDINA et al., 2010).

Lacases oxidam substratos fenólicos enquanto reduzem oxigênio à água, porém uma de suas características mais marcantes é a baixa especificidade aos seus substratos redutores. A variedade de substratos passíveis de oxidação pela lacase varia grandemente de uma lacase para outra (DITTMER; KANOST, 2010). Tais peculiaridades tornam a lacase uma enzima bastante interessante para diversas aplicações industriais como na indústria de alimentos (OSMA et al., 2011), no tratamento de efluentes (MAJEAU et al., 2010), descoloração de corantes (ZENG et al., 2011) e muitas outras.

*Agaricus blazei* Murrill *sensu* Heinneman, considerado *Agaricus brasiliensis* por Wasser et al. (2002) e *Agaricus subrufescens* Peck por Kerrigan (2005), é um cogumelo comestível e produtor de lacase nativo do Brasil (COLAUTO et al., 2010). Muitas ações biológicas têm sido atribuídas a esse basidiomiceto como capacidade de imunomodulação, proteção contra danos genéticos, inibição do crescimento de tumores e inibição da migração celular ou revascularização induzida por tumores (JUMES et al., 2010).

A demanda crescente por processos industriais de menor custo, altamente específicos e que provoquem menor ou nenhum dano ambiental, tem incentivado a busca por novas enzimas com aplicações diversas. Nesse sentido, a utilização de resíduos agroindustriais em bioprocessos tem possibilitado a produção de enzimas empregando-se substratos alternativos e de baixo custo, bem como a redução da degradação ambiental causada pelo descarte desses resíduos (PANDEY et al., 2000; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).



A indústria de açúcar e álcool produz vários resíduos e muitos deles apresentam grande potencial para aplicação em diferentes bioprocessos (PANDEY et al., 2000). O mel de cana é um xarope escuro obtido durante a produção de açúcar a partir de cana de açúcar ou beterraba, resultante da etapa final de cristalização, a partir da qual a recuperação do açúcar não é mais viável economicamente (ARAKAKI et al., 2011). O mel de cana apresenta em média 50% de açúcares totais sendo o maior percentual constituído por sacarose (VILLAVICENCIO et al., 1999; FELTRIN et al., 2000; ARAKAKI et al., 2011) e sua composição torna esse resíduo um substrato potencial para o desenvolvimento de processos biotecnológicos, incluindo a produção de enzimas e outros insumos de interesse (MIRANDA et al., 1999; SOCCOL et al., 2009).

O bagaço de cana é um importante resíduo agroindustrial produzido em grandes quantidades pela indústria sucroalcooleira brasileira (186 milhões de toneladas/ano). É composto essencialmente por talos de cana que sobram depois do esmagamento e extração do caldo da cana de açúcar. É composto de lignina (19-24%), celulose (32-44%), hemicelulose (27-32%) e cinzas (4,5-9%) (SOCCOL et al., 2010).

O Brasil é um grande produtor de soja e na safra 2010/2011 chegou a produzir 75 milhões de toneladas de grãos e 1,5 milhões de toneladas de cascas de soja (CONAB, 2011a). A casca de soja contém 66-69% de fibra e 3-8% de lignina (ZAMBOM et al., 2001) e tem sido empregada na alimentação de ruminantes (NAKAMURA; OWEN, 1989). Seu conteúdo de lignina a torna de especial interesse para a produção de enzimas ligninolíticas.

O café é uma das *commodities* agrícolas mais importantes no mundo e *Coffea arabica* e *Coffea robusta* são as principais variedades do gênero cultivadas para a produção comercial (PANDEY et al., 2000). O Brasil cultivou na safra 2010/2011 mais de 2 milhões de hectares de café, com produtividade superior a 23 sacas por hectare, gerando 48 milhões de sacas beneficiadas (CONAB, 2011b). Cascas de café são um resíduo produzido após o beneficiamento do café por secagem e contêm grande quantidade de nutrientes, cafeína, taninos e polifenóis (PANDEY et al., 2000). Esse material tem se mostrado viável para a aplicação em bioprocessos e para a produção de uma série de produtos como enzimas, compostos de aroma, cogumelos, processos que agregam grande valor a esse resíduo (PANDEY et al., 2000).

O Brasil é o maior produtor de laranjas no mundo, com aproximadamente 25% da produção mundial. Em 2011, a produção de laranja no Brasil foi de 19.831.787 toneladas (IBGE, 2012). Os subprodutos provenientes da laranja são: suco, células congeladas, óleos essenciais, limoneno, líquidos aromáticos e farelo de polpa cítrica. O farelo de polpa cítrica peletizado ou farelo de casca de laranja é obtido a partir do tratamento de resíduos sólidos e líquidos (cascas, sementes e polpa) remanescentes da extração do suco de laranja. Esse material equivale a 50% do peso de cada fruta e é produzido em grande quantidade pela indústria de suco de laranja do Brasil. Por suas características e grande quantidade produzida anualmente, a polpa cítrica pode ser considerada como um substrato em potencial para utilização em processos fermentativos (PANDEY et al., 2000; RODRIGUES, 2006).

A fermentação submersa (FSm) tem sido amplamente utilizada em processos para produção de enzimas de interesse industrial e especialmente de lacases, pois os parâmetros do processo fermentativo são facilmente controlados e existem várias configurações de biorreatores que podem atender às exigências de produção dessa enzima (MAJEAU et al., 2010). Contudo, a produção de enzimas por FES tem demonstrado potencial cada vez maior uma vez que o fermentado pode ser usado diretamente como fonte de enzima, além de oferecer outras vantagens como elevada produtividade volumétrica, alta concentração de produtos, produção de menor quantidade de efluentes, uso de equipamentos simples entre outras (PANDEY et al., 1999; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

O objetivo deste estudo foi produzir lacase por fermentação submersa e fermentação no estado sólido a partir de resíduos agroindustriais utilizando a linhagem *Agaricus blazei* U2/4. Em fermentação submersa, as condições de cultivo foram estudadas de modo a alcançar maiores rendimentos da enzima.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Micro-organismo**

O basidiomiceto *Agaricus blazei* U2/4, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAR, foi selecionado a partir dos dados

descritos no Capítulo II. A linhagem foi mantida a 25 °C em meio de ágar-extrato-de-malte 1% (m/v) e incubada a 28°C em ágar-extrato-de-malte a 2% (m/v) para a produção de inóculo.

### 3.2.2 Seleção de fontes de carbono alternativas para produção de lacase

A partir das condições do meio de cultivo definidas no subitem 2.2.3 do Capítulo II (meio de cultivo com adição de 6,0 g L<sup>-1</sup> de ureia, 150 µM de CuSO<sub>4</sub> e etanol como indutor da atividade enzimática) realizaram-se testes com o uso de resíduos agroindustriais como substratos alternativos: mel de cana (cedido pela empresa Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos - SP), melaço de soja (cedido pela empresa IMCOPA – Importação, Exportação e Indústria de Óleos LTDA., Araucária - PR), casca de café (cedida por Café Damasco), casca de soja (cedida pela IMCOPA) e polpa cítrica (cedida pela empresa Cargill Agrícola S.A., São Paulo – SP). O mel de cana e o melaço de soja foram utilizados buscando-se manter a concentração de 10 g L<sup>-1</sup> de açúcares totais no meio de cultivo. Nessa etapa os resíduos sólidos foram empregados na proporção de 50 g L<sup>-1</sup> em fermentação submersa (FSm) em diferentes granulometrias (Tabela 3.1). Todos os testes foram feitos em duplicata e os resultados foram avaliados empregando-se a análise de variância e as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) determinadas pelo teste de Tukey.

**Tabela 3.1:** Características dos resíduos agroindustriais utilizados como substratos alternativos para produção de lacase

Fonte de Carbono	Açúcares totais (g L <sup>-1</sup> )	Granulometria (mm)
Mel de Cana	540 <sup>a</sup>	-
Melaço de Soja	423 <sup>a</sup>	-
Casca de Café	-	> 2
Casca de Soja	74,3 <sup>b</sup>	entre 0,8 e 2
Polpa Cítrica	190 <sup>a</sup>	> 2

Onde: <sup>a</sup>RODRIGUES, 2006; <sup>b</sup>WEINGARTNER, 2010.

### **3.2.3 Produção de lacase em fermentação submersa (FSm)**

A produção de lacase por fermentação submersa foi conduzida em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de solução nutritiva. Três discos (6 mm) de ágar-extrato-de-malte com micélio do fungo *Agaricus blazei* U2/4 foram transferidos para os frascos contendo o meio de produção. Os frascos foram mantidos por 10 dias a 28 °C, na ausência de luz, com agitação intermitente, a qual foi realizada uma vez ao dia por 30 segundos para manter o micélio em crescimento submerso. Ao terceiro dia de cultivo adicionou-se  $\text{CuSO}_4$  assepticamente para obtenção de concentração de 150  $\mu\text{M}$ .

### **3.2.4 Otimização da composição do meio de cultivo para produção de lacase em FSm com mel de cana**

#### **3.2.4.1 Estudo da influência das fontes de nitrogênio**

A influência de diferentes fontes de nitrogênio foi estudada sobre a produção de lacase por fermentação submersa utilizando mel de cana como substrato. Os ensaios foram realizados utilizando-se as seguintes fontes de nitrogênio ( $\text{g L}^{-1}$ ): sulfato de amônio (13,2); extrato de levedura (7,0); uma mistura de ureia (3,0) e sulfato de amônio (6,6) e uma mistura de extrato de levedura (3,5) e sulfato de amônio (6,6). As diferentes fontes de nitrogênio foram adicionadas de acordo com o teor de nitrogênio presente na solução nutritiva padrão composta por ureia ( $6,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e que também foi avaliada. As soluções de ureia e sulfato de amônio foram esterilizadas por filtração e adicionadas assepticamente à solução nutritiva. Todos os testes foram feitos em duplicata e os resultados foram avaliados empregando-se a análise de variância e as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) determinadas pelo teste de Tukey.

#### **3.2.4.2 Seleção de componentes do meio para produção de lacases por FSm**

A otimização de processos fermentativos passa obrigatoriamente pela otimização de todas as condições das soluções ou meios nutritivos para que todos os componentes necessários para a produção de biomassa e de metabólitos sejam

fornecidos adequadamente. Para as melhores condições de produção de lacase por fermentação com mel de cana, analisamos a concentração dos sais mais comumente empregados como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$  e  $\text{ZnSO}_4$  (HOU et al., 2004; PRASAD et al., 2005; DEKKER et al., 2007; ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009) bem como a adição de ureia e etanol.

A influência dos componentes químicos do meio de cultivo sobre a produção de lacase foi estudada. Um planejamento experimental do tipo Plackett & Burman foi empregado para a análise de 7 variáveis em 8 ensaios realizados em duplicata com a finalidade de selecionar as variáveis significativas (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2:** Planejamento experimental do tipo Plackett & Burman para seleção de variáveis significativas para a produção de lacase por fermentação submersa com mel de cana

Variáveis independentes							
	Ureia (6,0 g L <sup>-1</sup> )	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (1,5 g L <sup>-1</sup> )	KCl (0,5 g L <sup>-1</sup> )	$\text{MgSO}_4$ (1,023 g L <sup>-1</sup> )	$\text{FeSO}_4$ (0,018 g L <sup>-1</sup> )	$\text{ZnSO}_4$ (0,0175 g L <sup>-1</sup> )	Etanol (0,5 mM)
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1

1: presença do componente, -1: ausência do componente

### 3.2.4.3 Segunda etapa de otimização da composição do meio de cultivo

As variáveis significativas sobre a produção de lacase (ureia e sulfato de magnésio) observadas na análise anterior foram testadas na presença de mel de cana,  $\text{CuSO}_4$  e etanol (Tabela 3.3). Empregou-se um planejamento experimental do tipo fatorial incompleto  $2^{(4-1)}$  onde foram avaliados 4 fatores em 11 experimentos com 3 repetições do ponto central.

**Tabela 3.3:** Planejamento experimental do tipo Plackett & Burman para a segunda etapa da seleção de variáveis significativas para a produção de lacase por fermentação submersa de mel de cana

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	1
Mel de Cana (g L <sup>-1</sup> )	6	10	14
Ureia (g L <sup>-1</sup> )	2	7	12
MgSO <sub>4</sub> (mM)	2	7	12
Etanol (mM)	0,2	0,7	1,2

#### 3.2.4.4 Terceira etapa de otimização da composição do meio de cultivo

Na etapa anterior a concentração de ureia mostrou ser a única variável significativa. Nessa terceira etapa avaliou-se a influência de menores concentrações de ureia (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g L<sup>-1</sup>) na produção de lacase, que foram analisadas na presença de mel de cana (6 g L<sup>-1</sup>), sulfato de magnésio (12 mM) e etanol (1,2 mM). Todos os procedimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram avaliados empregando-se a análise de variância e as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) determinadas pelo teste de Tukey.

#### 3.2.4.5 Análise estatística

Os dados obtidos dos planejamentos experimentais foram analisados pelo programa computacional Statistica10 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

#### 3.2.5 Seleção de suporte/substrato para produção de lacase por FES

Optou-se pela avaliação do desempenho da linhagem *A. blazei* U2/4 na produção de lacase também em fermentação no estado sólido (FES). Para tanto foram realizados testes para a seleção de resíduos agroindustriais como suporte/substrato para o processo fermentativo: cascas de café (cedidas por Café Damasco), casca de soja (cedida pela IMCOPA - Importação, Exportação e Indústria de Óleos LTDA., Araucária - PR), polpa cítrica (cedida pela empresa Cargill Agrícola S.A., São Paulo – SP) e bagaço de cana (cedido pela Costa Bioenergia, Umuarama – PR).

Os resíduos sólidos foram empregados com a granulometria ajustada para maior que 2 mm (cascas de café e polpa cítrica) ou entre 0,8 e 2 mm (cascas de soja e bagaço de cana). Todos os testes foram feitos em duplicata e os resultados foram avaliados empregando-se a análise de variância e as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) determinadas pelo teste de Tukey.

### 3.2.6 Produção de inóculo para FES

A linhagem *Agaricus blazei* U2/4 foi reativada em meio ágar-extrato de malte (2%) e após 7 dias de crescimento, 5 discos (6 mm) de meio contendo o micélio foram transferidos para Erlenmeyers (250 mL) com 100 mL de meio líquido à base de extrato de malte (2%). Os frascos foram mantidos a 28°C na ausência de luz, com agitação intermitente duas vezes ao dia por 30 segundos. Após 10 dias de crescimento o micélio foi separado assepticamente do meio com auxílio de uma peneira, homogeneizado com espátula e ressuspendido no meio residual para obtenção de volume final correspondente a 10% do volume inicial do cultivo. 500 µL dessa suspensão de micélio foram utilizados para inocular os suportes sólidos que logo após a inoculação foram homogeneizados manualmente e mantidos a 28°C por 10 dias.

### 3.2.7 Processo de produção de lacase em FES

O processo fermentativo foi conduzido em frascos de Erlenmeyer (125 mL) contendo 5 g de cascas de café, cascas de soja ou polpa cítrica, ou 1 g de bagaço de cana como suporte. A umidade inicial do suporte foi ajustada para 75% (casca de café) ou 70% (casca de soja e polpa cítrica) com solução nutritiva estéril. O bagaço de cana foi umedecido com 10 mL dessa solução (KARP, 2012). A solução nutritiva era composta por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5 g L<sup>-1</sup>),  $\text{MgSO}_4$  (0,5 g L<sup>-1</sup>),  $\text{KCl}$  (0,5 g L<sup>-1</sup>),  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,036 g L<sup>-1</sup>),  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,035 g L<sup>-1</sup>), ureia (6,0 g L<sup>-1</sup>) e  $\text{CuSO}_4$  (150 µM). Os frascos foram mantidos por 10 dias a 28 °C na ausência de luz. Ao final do período de fermentação determinou-se a atividade de lacase.

Um estudo da cinética de produção de lacase em FES foi realizado com o melhor suporte, onde dois frascos foram retirados para análise da atividade enzimática a cada 24 horas por um período de 10 dias. Nesse mesmo intervalo de

tempo, também se determinou o pH (subitem 3.2.8) do fermentado, a concentração de açúcares redutores (subitem 3.2.9) e a atividade da enzima ligninolítica manganês peroxidase (subitem 3.2.10).

### **3.2.8 pH**

O pH foi medido sobre uma suspensão obtida após homogeneização de 2 g do fermentado em 20 mL de água destilada a qual permaneceu em agitação contínua por 20 minutos.

### **3.2.9 Determinação de açúcares redutores**

Os açúcares redutores foram determinados pela reação com o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). O extrato (item 3.2.10) foi diluído de modo a se obter concentração de glicose inferior a  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Uma mistura contendo 1 mL do extrato diluído e 1 mL do reativo DNS foi preparada, homogeneizada e mantida por 5 minutos em banho de ebulição. Após resfriar a temperatura ambiente, 8 mL de água destilada foram adicionados à mistura, homogeneizados e a medida da absorbância foi realizada a 540 nm. A concentração de açúcares redutores ( $\text{g L}^{-1}$ ) foi obtida pela projeção sobre curva padrão obtida empregando-se a glicose como açúcar redutor padrão. A mistura de reativo DNS e água destilada foi utilizada como controle analítico.

### **3.2.10 Extração enzimática**

As enzimas produzidas por FES foram extraídas por extração sólido-líquido empregando-se o tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) como solvente. Após homogeneização manual pesou-se o produto fermentado e adicionou-se tampão acetato na proporção 1:10 (m/v). A mistura foi mantida sob agitação por 10 minutos a temperatura ambiente, filtrada em papel filtro Whatman nº 1 e, em seguida, centrifugada a 4000 g, 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado na determinação da atividade enzimática.



### 3.2.11 Determinação da atividade de lacase

A atividade de lacase foi avaliada pela oxidação de solução (1 mM) de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato). 0,2 mL do meio de cultivo foram misturados com 0,7 mL de água, 0,45 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0) e 0,15 mL de ABTS (HAN et al., 2005). A mistura foi mantida a 30 °C por 10 min e a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de solução de ácido tricloroacético 5% (m/v). O volume foi ajustado para 5 mL e a leitura de absorbância foi realizada. A oxidação do ABTS foi acompanhada pelo aumento da absorbância a 420 nm ( $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Uma mistura de meio de cultivo (0,2 mL), água (0,85 mL) e tampão acetato de sódio (0,45 mL) bem como a mistura de água (0,9 mL), tampão acetato de sódio (0,45 mL) e ABTS (0,15 mL) foram utilizadas como controles analíticos. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de ABTS por minuto.

### 3.2.12 Determinação da atividade de manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidase (MnP) foi determinada pela oxidação de 10 mM de  $\text{MnSO}_4$  a 30 °C em 50 mM de malonato de sódio, pH 4,5 e na presença de peróxido de hidrogênio 0,5 mM (WARIISHI et al., 1992). A oxidação foi acompanhada pelo aumento da absorbância a 270 nm ( $\epsilon = 11590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ocasionada pelo complexo formado pelo íon  $\text{Mn}^{3+}$  com o malonato. A mistura de extrato enzimático e tampão malonato de sódio, bem como a mistura de  $\text{MnSO}_4$  e tampão malonato de sódio foram utilizadas como controles analíticos. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de  $\text{MnSO}_4$  por minuto.

Todos os testes foram feitos em duplicata e os resultados foram avaliados empregando-se a análise de variância e as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) determinadas pelo teste de Tukey.

### 3.3 Resultados e discussão

#### 3.3.1 Seleção de substratos alternativos para a produção de lacase

A seleção de substratos alternativos para a produção de lacase foi realizada em fermentação submersa, com mel de cana e melaço de soja, e diferentes suspensões contendo resíduos agroindustriais tais como cascas de soja e cascas de café. A maior atividade de lacase ( $14052 \text{ U L}^{-1}$ ) foi observada no meio contendo mel de cana ( $10 \text{ g L}^{-1}$  de açúcares totais) como substrato alternativo (Tabela 3.4). As fermentações em meio contendo melaço de soja ( $8340 \text{ U L}^{-1}$ ) e casca de café ( $9253 \text{ U L}^{-1}$ ) também produziram resultados significativos. Adicionalmente, a produção de lacase na presença de polpa cítrica ( $3566 \text{ U L}^{-1}$ ) e cascas de soja ( $4104 \text{ U L}^{-1}$ ) alcançou o mesmo nível que o observado na presença de glicose ( $3666 \text{ U L}^{-1}$ ).

**Tabela 3.4:** Produção de lacase utilizando diferentes fontes de carbono por *Agaricus blazei* U2/4 após dez dias de fermentação submersa

	Fontes de carbono					
	Mel de cana	Melaço de soja	Polpa cítrica	Casca de café	Casca de soja	Glicose
Atividade de Lacase ( $\text{U L}^{-1}$ )	14052*	8340*	3566	9253*	4104	3666
Produtividade ( $\text{U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	58,5	34,7	14,8	38,5	34,7	15,3

\*Aumento significativo em relação à glicose ( $p < 0,05$ )

Segundo Majeau et al. (2010), açúcares de fácil metabolização favorecem a produção de lacases para algumas espécies, contudo vários relatos indicam que são os açúcares mais lentamente assimiláveis que favorecem a sua produção. Galhaup et al. (2002) compararam a produção de lacase por *Trametes pubescens* em meios com diferentes fontes de carbono (glicose, celobiose, frutose, glicerol, lactose e  $\alpha$ -celulose) e constataram que os substratos mais facilmente assimiláveis produziram níveis maiores de lacase (glicose –  $60 \text{ U mL}^{-1}$  e celobiose –  $65 \text{ U mL}^{-1}$ ) do que substratos mais lentamente consumidos (lactose –  $\sim 15 \text{ U mL}^{-1}$ ). Já Elisashvili e Kachlishvili (2009), ao analisarem a influência de diferentes fontes de carbono na produção de lacase de *Pseudotrametes gibbosa*, relataram que a lactose foi a melhor fonte de carbono para produção de lacase (glicose –  $1 \text{ U mL}^{-1}$  e lactose –  $13,7 \text{ U mL}^{-1}$ ).

Segundo Elisashvili e Kachlishvili (2009), a produção de lacases em FSm empregando resíduos agroindustriais pode ser estimulada pela presença de compostos aromáticos e/ou fenólicos derivados de substratos lignocelulósicos, o que pode ser um dos fatores que influenciaram a produção por *A. blazei* U2/4 em FSm com os resíduos sólidos empregados nessa análise. Cascas de café, por exemplo, são ricas em cafeína, taninos e polifenóis (PANDEY et al., 2000), que podem estar contribuindo para a atividade de lacase observada nesse estudo.

Adicionalmente, a capacidade de *A. blazei* U2/4 de produzir níveis elevados de lacase em diferentes resíduos agroindustriais que são fontes baratas e abundantes de carbono, demonstra a versatilidade dessa cepa como produtora de lacase.

A maioria das aplicações biotecnológicas requer grandes quantidades de enzimas a um custo reduzido e uma das abordagens para esse propósito é utilizar o potencial de resíduos lignocelulósicos, que podem conter concentrações significativas de carboidratos e indutores enzimáticos assim garantindo a síntese das enzimas (GASSARA et al., 2010; ELISASHVILI et al., 2008). A seleção do resíduo adequado com foco na produção enzimática tem papel importante no desenvolvimento de biotecnologia eficiente.

### **3.3.2 Otimização da composição do meio de cultivo para produção de lacase em FSm com mel de cana**

#### **3.3.2.1 Estudo da influência das fontes de nitrogênio**

Após a seleção de mel de cana como melhor substrato alternativo para produção de lacase por *A. blazei* U2/4 (item 3.3.1), analisou-se a influência de fontes de nitrogênio sobre a produção de lacase. Fontes de nitrogênio orgânicas (ureia e extrato de levedura) e uma inorgânica (sulfato de amônio), bem como diferentes combinações destas (ureia + sulfato de amônio e extrato de levedura + sulfato de amônio) foram testadas.

As diferentes fontes testadas, bem como suas combinações, não produziram alterações significativas na atividade de lacase de *A. blazei* U2/4 (Tabela 3.5 e Figura 3.1). A maior atividade de lacase foi obtida com a combinação de ureia e

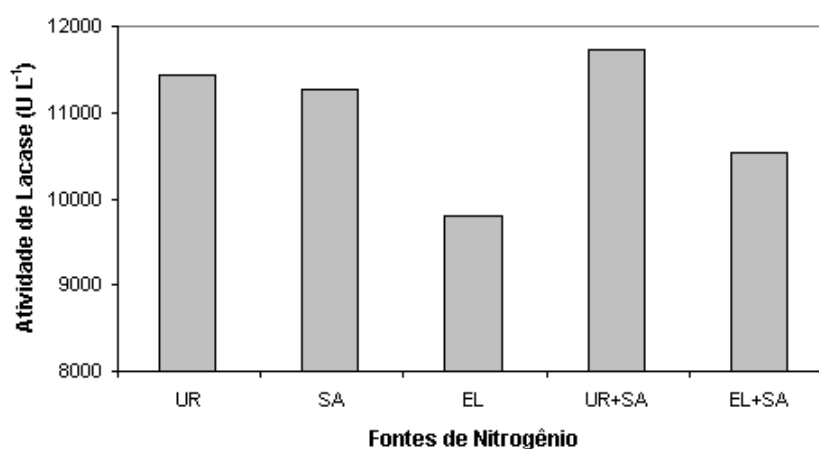
sulfato de amônio ( $11736 \text{ U L}^{-1}$ ), contudo quando a ureia foi empregada sozinha observou-se atividade equivalente ( $11427 \text{ U L}^{-1}$ ).

**Tabela 3.5:** Efeito de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio sobre os níveis de lacase produzidos por *Agaricus blazei* U2/4 após dez dias de fermentação submersa com mel de cana.

Fonte de nitrogênio	Atividade de Lacase ( $\text{U L}^{-1}$ )
Ureia	11427
Sulfato de amônio	11267
Extrato de Levedura	9791
Ureia + sulfato de amônio	11736
Extrato de levedura + sulfato de amônio	10541

Não há dados sobre a influência da fonte de nitrogênio sobre a produção de lacase por *A. blazei* em FSm, contudo, Piscitelli et al. (2010) afirmam que para fungos, fontes inorgânicas de nitrogênio promovem baixa produção de lacase com crescimento suficiente e fontes orgânicas promovem elevados níveis de produção da enzima e de crescimento do fungo. Nesse trabalho todas as fontes testadas produziram níveis elevados de lacase (Tabela 3.5), indicando que o tipo de fonte de nitrogênio não interfere na atividade de lacase de *A. blazei* U2/4 em FSm.

Apesar de todas as outras fontes terem levado à produção de níveis similares de lacase, manteve-se a ureia como fonte de nitrogênio, pois esta representa uma alternativa mais viável economicamente.



**Figura 3.1:** Média da atividade de lacase de *Agaricus blazei* U2/4 em meio contendo diferentes fontes de nitrogênio - (UR) ureia, (SA) sulfato de amônio, (EL) extrato de levedura, (UR+SA) ureia e sulfato de amônio, (EL+SA) extrato de levedura e sulfato de amônio – após dez dias de cultivo. Médias indicadas com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

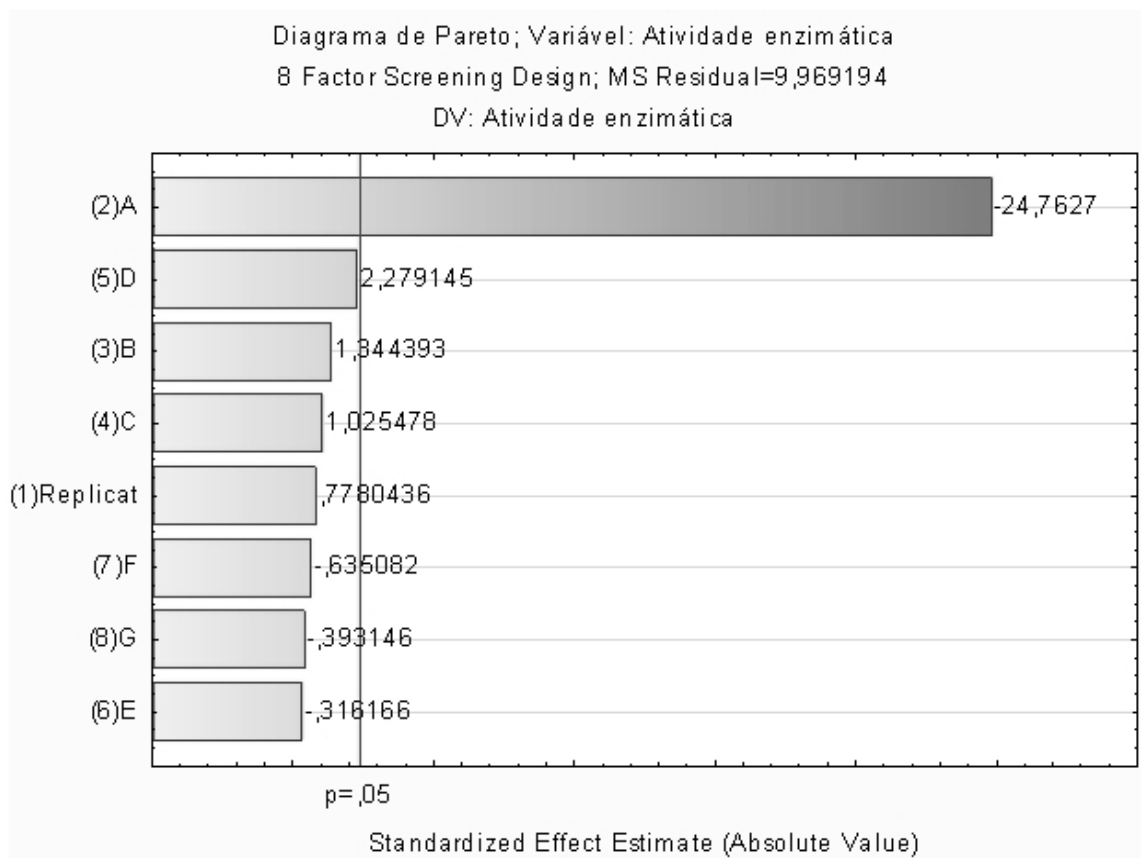
### 3.3.3 Seleção de componentes do meio para produção de lacase por FSm

Os resultados dos experimentos do tipo Plackett & Burman para seleção de variáveis significativas no processo de produção de lacase são mostrados na Tabela 3.6. De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 3.2), somente a concentração de ureia apresentou efeito significativo sobre a produção de lacase. A maior atividade de lacase ( $11160 \text{ U L}^{-1}$ ) foi observada no ensaio 5 onde a ureia ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) estava ausente na solução nutritiva e somente KCl,  $\text{MgSO}_4$  e o indutor (etanol) foram oferecidos. Tal resultado comparado aos dos demais ensaios com elevada atividade de lacase (1, 3 e 7) (Tabela 3.6), sugerem que uma concentração menor da fonte de nitrogênio pudesse ser mais eficiente para a produção de enzima por FSm com mel de cana.

**Tabela 3.6:** Resultados do planejamento do tipo Plackett & Burman para seleção de variáveis significativas sobre a atividade de lacase obtida por FSm com mel de cana

Ensaio	Variáveis independentes							Atividade de Lacase ( $\text{U L}^{-1}$ )
	A <sup>1</sup>	B <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>	D <sup>4</sup>	E <sup>5</sup>	F <sup>6</sup>	G <sup>7</sup>	
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	10660
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	2097
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	10440
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1	3566
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1	11160
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	2646
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	10788
8	1	1	1	1	1	1	1	3465

Onde 1: presença do componente, -1: ausência do componente e os números sobrescritos indicam concentração de <sup>1</sup>ureia, <sup>2</sup> $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , <sup>3</sup>KCl, <sup>4</sup> $\text{MgSO}_4$ , <sup>5</sup> $\text{FeSO}_4$ , <sup>6</sup> $\text{ZnSO}_4$  e <sup>7</sup>Etanol



**Figura 3.2:** Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis concentração de (A) ureia, (B)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , (C) KCl, (D)  $\text{MgSO}_4$ , (E)  $\text{FeSO}_4$ , (F)  $\text{ZnSO}_4$  e (G) etanol sobre a atividade de lacase

Tais resultados são confirmados pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 3.7). O  $R^2$  obtido foi de 0,98, indicando que 98% dos dados se ajustam aos dados estatísticos.

**Tabela 3.7:** Análise de variância do planejamento do tipo Plackett & Burman para seleção de variáveis significativas sobre a atividade de lacase obtida por fermentação submersa com mel de cana

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Médias quadradas	Razão f	Razão p
(A) Ureia	6113,014	1	6113,014	613,1904	0,000000
(B) $\text{KH}_2\text{PO}_4$	18,018	1	18,018	1,8074	0,220754
(C) KCl	10,484	1	10,484	1,0516	0,339263
(D) $\text{MgSO}_4$	51,785	1	51,785	5,1945	0,056708
(E) $\text{FeSO}_4$	0,997	1	0,997	0,1000	0,761095
(F) $\text{ZnSO}_4$	4,021	1	4,021	0,4033	0,545566
(G) Etanol	1,541	1	1,541	0,1546	0,705911

Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

A influência da concentração de nitrogênio sobre a produção de lacase parece variar de acordo com a espécie e linhagem do fungo avaliado (GIARDINA et

al., 2010). D'Souza et al. (1999) avaliaram a produção de lacase por *Ganoderma lucidum* em condições limitantes e não limitantes de nitrogênio (2,4 e 24 mM) e verificaram maior produção de lacase (2880 U L<sup>-1</sup>) em maior concentração desse nutriente. Já Hou et al. (2004) cultivaram *Pleurotus ostreatus* em meio contendo ureia (0,5 e 5,0 g L<sup>-1</sup>) e verificaram maior produção no meio com menor concentração (85 U mL<sup>-1</sup>), sugerindo que concentrações maiores de nitrogênio estariam inibindo a produção de lacase. De forma contrária, dados de Stajic et al. (2006) indicam que maiores concentrações de nitrogênio estimulam ligeiramente a produção de lacase de *Pleurotus ostreatus*, uma indicação de que diferentes cepas de uma mesma espécie podem responder de forma distinta a um nutriente específico. Tal fato mostra que a produção de lacase depende da relação C/N, a qual difere para cada linhagem empregada.

Os resultados da seleção de variáveis indicam que a produção de lacase por *A. blazei* U2/4 pode ser favorecida pela redução da concentração de ureia, o que significa o aumento da relação C/N. Cada linhagem cultivada em diferentes substratos pode ter comportamentos distintos a depender da composição do meio.

A concentração de sulfato de magnésio utilizada demonstrou resultado muito próximo ao limite da significância estatística, sugerindo que um aumento da concentração desse sal pudesse ser vantajoso na fermentação.

### **3.3.4 Segunda etapa de otimização da composição do meio para a produção de lacase em FSm**

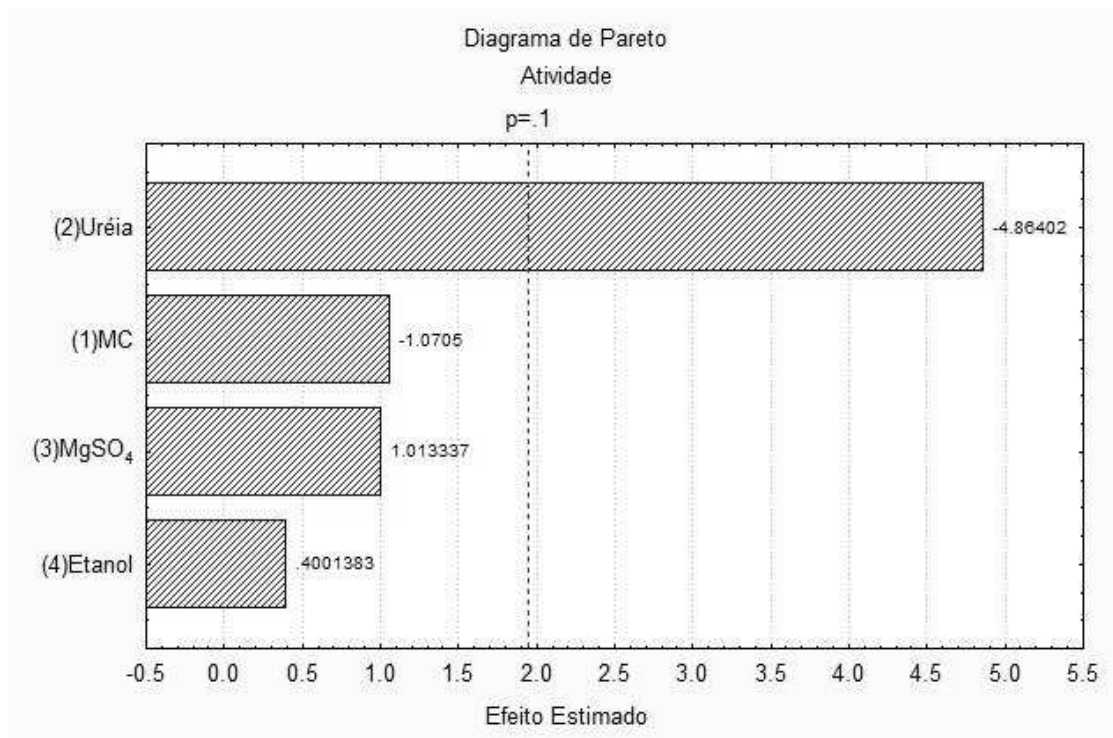
Com os dados obtidos na etapa anterior, avaliou-se a produção de lacase sob diferentes concentrações de ureia (2, 7 e 12 g L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> (2, 7 e 12 mM), mel de cana (6, 10 e 14 g L<sup>-1</sup> de açúcares totais), CuSO<sub>4</sub> (150 μM) e etanol (0,2, 0,7 e 1,2 mM).

A atividade máxima de lacase (14139 U L<sup>-1</sup>) foi obtida no ensaio 5 (Tabela 3.8) cuja solução nutritiva continha 6 g L<sup>-1</sup> de açúcares totais fornecidos como mel de cana, 2 g L<sup>-1</sup> de ureia, 12 mM de MgSO<sub>4</sub> e 1,2 mM de etanol. A média da produção de lacase nos ensaios que utilizaram 7 g L<sup>-1</sup> e 12 g L<sup>-1</sup> de ureia foi de 12116 U L<sup>-1</sup> e 6970 U L<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses resultados indicam que a produção de lacase por *A. blazei* U2/4 nas condições testadas foi inversamente proporcional à

concentração de nitrogênio na solução nutritiva, ou seja, quanto maior a relação C/N melhor é produção.

**Tabela 3.8:** Resultados do planejamento do tipo fatorial incompleto  $2^{(4-1)}$  para análise das diferentes concentrações de mel de cana (MC), ureia (UR),  $MgSO_4$  (Mg) e etanol (ET) na solução nutritiva para produção de lacase.

Ensaio	Níveis				Atividade de Lacase (U L <sup>-1</sup> )	Produtividade (U L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
	MC (g L <sup>-1</sup> )	UR (g L <sup>-1</sup> )	Mg (mM)	ET (mM)		
1	6	2	2	0,2	12215	50,9
2	14	2	2	1,2	13680	57,0
3	6	12	2	1,2	7958	33,1
4	14	12	2	0,2	4319	18,0
5	6	2	12	1,2	14139	60,0
6	14	2	12	0,2	13847	57,7
7	6	12	12	0,2	9430	39,3
8	14	12	12	1,2	6173	25,7
9	10	7	7	0,7	11132	46,4
10	10	7	7	0,7	11271	47,0
11	10	7	7	0,7	13944	58,1



**Figura 3.3:** Diagrama de Pareto e parâmetros significativos ( $p \leq 0,1$ ) no estudo das concentrações de ureia, mel de cana (MC), sulfato de magnésio e etanol para produção de lacase.



O diagrama de Pareto (Figura 3.3) e a ANOVA (Tabela 3.9) confirmam que a concentração de ureia foi o único fator significativo na fermentação ( $p \leq 0,1$ ), demonstrando efeito negativo sobre a produção de lacase. O  $R^2$  dessa análise foi de 0,81 indicando que 81% dos dados se ajustam a análise estatística.

**Tabela 3.9:** Análise de variância do planejamento do tipo fatorial incompleto  $2^{(4-1)}$  para estudo das condições do meio de cultivo para produção de lacase por FSm com mel de cana

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Médias quadradas	Razão f	Razão p
(1)MC	102,3245	1	102,3245	1,14597	0,325555
(2)UREIA	2112,5	1	2112,5	23,65868	0,002811
(3)MgSO <sub>4</sub>	91,68837	1	91,68837	1,026852	0,350005
(4)ETANOL	14,29639	1	14,29639	0,160111	0,702912

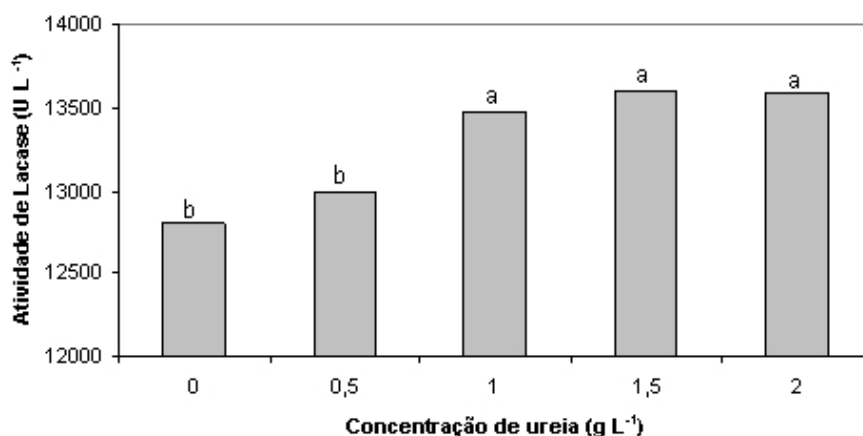
Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra; p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (10%)

Esses resultados estão em desacordo com os observados por D'Agostini et al. (2010) com *A. blazei* U2/1 em FES. Os autores relataram efeito positivo da maior concentração de ureia sobre a produção de lacase. Resultados conflitantes observados para a mesma espécie reforçam a influência da cepa e do modo de cultivo na produção de lacase.

### 3.3.5 Terceira etapa de otimização da composição do meio de produção

Após constatar-se que a concentração de ureia foi a única variável significativa para produção de lacase por *A. blazei* U2/4, avaliaram-se nesta terceira etapa a influência de concentrações menores de ureia (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g L<sup>-1</sup>). A redução da concentração de ureia foi analisada na presença de mel de cana (6 g L<sup>-1</sup> de açúcares totais), sulfato de magnésio (12 mM) e etanol (1,2 mM), fatores selecionados também com base nos resultados da etapa anterior.

A Figura 3.4 mostra os resultados dessa análise indicando que o maior nível de atividade enzimática (13604 U L<sup>-1</sup> e 56,7 U L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) foi obtido com 1,5 g L<sup>-1</sup> de ureia. Esse resultado não diferiu de forma significativa dos obtidos com 1 g L<sup>-1</sup> (13469 U L<sup>-1</sup> e 56,1 U L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e 2 g L<sup>-1</sup> de ureia (13590 U L<sup>-1</sup> e 56,6 U L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Contudo, na ausência (12795 U L<sup>-1</sup> e 53,3 U L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e na presença de 0,5 g L<sup>-1</sup> de ureia (12996 U L<sup>-1</sup> e 54,1 U L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) a atividade de lacase foi significativamente menor.



**Figura 3.4:** Médias da atividade de lacase de *Agaricus blazei* U2/4 em meio contendo diferentes concentrações de ureia após dez dias de cultivo. Médias indicadas com letras iguais não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Esses resultados confirmam que, para *A. blazei* U2/4, quantidades menores de nitrogênio favorecem a produção de lacase em FSm com mel de cana. Esses resultados discordam dos relatados previamente no capítulo II (item 2.3.2), onde a mesma linhagem foi cultivada em FSm com glicose (10 g L<sup>-1</sup>) e a maior quantidade de ureia (6 g L<sup>-1</sup>) favoreceu a atividade de lacase (13 U mL<sup>-1</sup>). Apesar das concentrações de ureia nas duas análises diferirem em valores absolutos, ao considerar-se a relação C/N do meio, verifica-se que ela é similar nos dois estudos. Na análise utilizando-se a fermentação com glicose a relação C/N ficou em torno de 1,4 enquanto na fermentação com mel de cana a maior atividade (13604 U L<sup>-1</sup>) foi observada quando a relação C/N era de 1,8 (6 g L<sup>-1</sup> de açúcares totais fornecido como mel de cana e 1,5 g L<sup>-1</sup> de ureia).

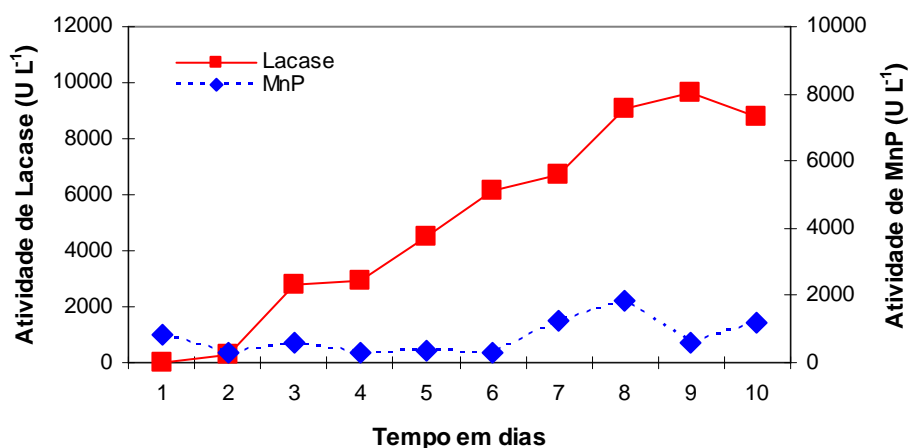
Adicionalmente, quando se empregou 0,5 g L<sup>-1</sup> de ureia (relação C/N 5,4) a produção de lacase caiu significativamente. Isso indica que, para a linhagem *A. blazei* U2/4 a produção de lacase em FSm com mel de cana alcança valores ótimos quando a relação C/N fica entre 1,3 (2 g L<sup>-1</sup> de ureia) e 3 (1 g L<sup>-1</sup> de ureia) (Figura 3.4).

### 3.3.6 Cinética da produção de lacase e manganês peroxidase em FSm sob condições otimizadas

Após a determinação das melhores condições de cultivo realizada nas etapas anteriores ( $6 \text{ g L}^{-1}$  de mel de cana,  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de ureia,  $12 \text{ mM}$  de  $\text{MgSO}_4$  e  $1,2 \text{ mM}$  de etanol,  $150 \text{ }\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ ), um estudo da cinética de produção de lacase em FSm foi realizado, em duplicata, para análise da atividade enzimática a cada 24 horas por um período de 10 dias. Nesse mesmo intervalo de tempo, também se determinou o pH do fermentado pelo método potenciométrico, a quantidade de açúcares redutores, a biomassa produzida e a atividade da enzima ligninolítica manganês peroxidase.

A Figura 3.5 mostra a cinética da produção de lacase por *A. blazei* U2/4 em FSm com mel de cana e sob condições otimizadas. O pico de produção de lacase ( $9711 \text{ U L}^{-1}$  e  $45 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foi obtido no 9º dia de fermentação.

Há informações escassas sobre a produção de lacase por *A. blazei*. Ullrich et al. (2005) conseguiram níveis em torno de  $5000 \text{ U L}^{-1}$  por volta do 17º dia de fermentação ( $12,25 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), empregando meio complexo à base de suco de tomate. Os resultados deste trabalho mostram que as condições otimizadas para produção de lacase de *A. blazei* U2/4 podem superar muito os níveis já descritos na literatura demonstrando maior produtividade ( $45 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

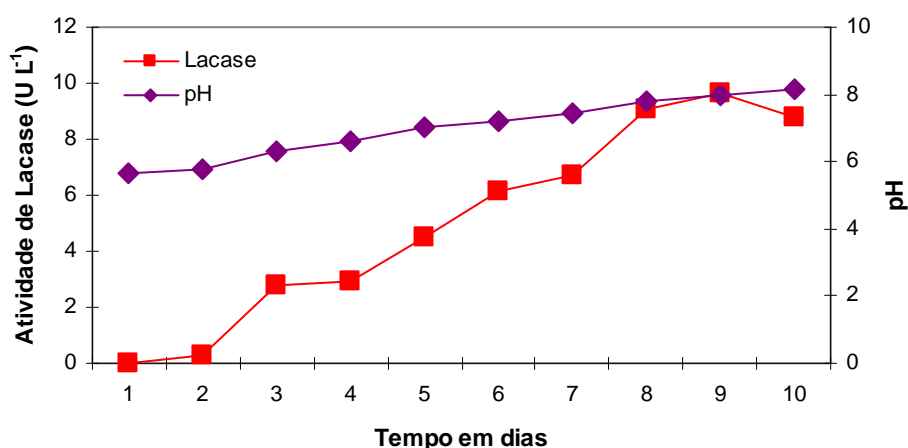


**Figura 3.5:** Cinética da produção de lacase e de manganês peroxidase (MnP) de *Agaricus blazei* U2/4 por FSm com mel de cana ao longo de dez dias.

Há dados sobre a produção de lacase em diferentes condições e para diferentes espécies relatadas na literatura, como 266 U mL<sup>-1</sup> produzidas por *Pycnoporus cinnabarinus* em 6 dias de cultivo empregando-se etanol como indutor (LOMASCOLO et al., 2003); 251 U mL<sup>-1</sup> de lacase de *Lentinula edodes* produzidas em FSm em 30 dias (CAVALLAZZI et al., 2005); 20 U mL<sup>-1</sup> obtidas em 4 dias de cultivo por *Trametes hirsuta* (TAPIA-TUSSEL et al., 2011).

Também foi acompanhada a produção de manganês peroxidase (MnP), que se manteve em níveis relativamente baixos, alcançando pico de atividade no 8º dia (1855 U L<sup>-1</sup>). Fenice et al. (2003) relataram pico de atividade de 292 U L<sup>-1</sup> por *Panus tigrinus* em FSm com resíduos da produção de azeite. Já Hou et al. (2004) verificaram pico de 1500 U L<sup>-1</sup> para *Pleurotus ostreatus* em FSm.

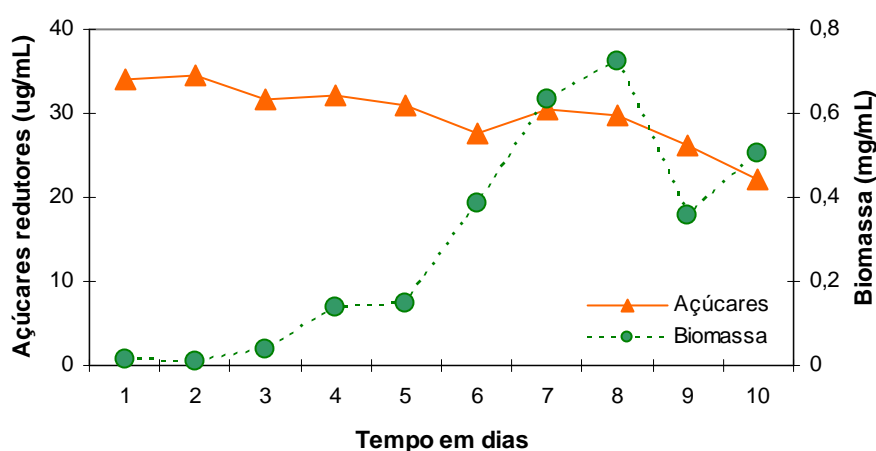
O pH do meio aumentou gradativamente ao longo do tempo (Figura 3.6), passando de 5,6 para 8,0 no pico da atividade enzimática, demonstrando que os maiores níveis de atividade ocorreram em pH mais elevado e em torno da neutralidade. De forma similar, Ullrich et al. (2005) observaram que a produção de lacase de *A. blazei* em suco de tomate também apresentou drástica variação de pH que subiu de 4,5 para 7,0 ao longo de 28 dias de fermentação. A estabilidade da maioria das lacases é maior em pH ácido, porém tal característica varia grandemente dependendo da fonte de lacase (MAJEAU et al., 2010).



**Figura 3.6:** Cinética da produção de lacase de *Agaricus blazei* U2/4 por FSm com mel de cana e pH do meio de cultivo ao longo de dez dias.

A produção de biomassa microbiana atingiu valores máximos no 8º dia de fermentação ( $0,723 \text{ mg mL}^{-1}$ ) quando a produção de enzima também foi máxima (Figura 3.7). Tal fato demonstra que a produção de lacase está associada ao crescimento.

A quantidade de açúcares redutores permaneceu sem grandes variações até metade do período de fermentação, sofrendo uma diminuição a partir do aumento da biomassa e da produção de lacase.



**Figura 3.7:** Cinética da produção de açúcares redutores e biomassa de *Agaricus blazei* U2/4 por FSm com mel de cana ao longo de dez dias.

### 3.3.7 Seleção de suporte/substrato para produção de lacase por FES

Foram realizados testes para avaliar a capacidade de produção de lacases por *A. blazei* U2/4 em fermentação no estado sólido empregando-se diferentes resíduos agroindustriais (casca de soja, casca de café, polpa cítrica e bagaço de cana) como suporte/substrato umedecido com solução nutritiva ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KCl}$ ,  $0,036 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $0,035 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $6,0 \text{ g L}^{-1}$  de ureia e  $150 \mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ ). A composição da solução nutritiva foi selecionada com base nos resultados de produção de lacase descritos no capítulo II e empregada na proporção de  $10 \text{ mL g}^{-1}$  de bagaço de cana (KARP, 2012), e para obtenção de umidade de 75% (casca de café) ou 70% (casca de soja e polpa cítrica).

Ao final de 10 dias de FES as maiores atividades de lacase foram observadas no meio contendo bagaço de cana (340 U g<sup>-1</sup>) e casca de soja (183 U g<sup>-1</sup>) como suporte (Tabela 3.10). Contudo, a FES com polpa cítrica gerou pequena atividade de lacase (4,2 U g<sup>-1</sup>) e com cascas de café não se detectou atividade alguma.

**Tabela 3.10:** Efeito dos diferentes suportes sobre os níveis de lacase produzidos por *Agaricus blazei* U2/4 após dez dias de FES

	Suporte			
	Polpa cítrica	Casca de café	Casca de soja	Bagaço de Cana
Atividade de Lacase (U g <sup>-1</sup> )	4,2	ND	183	340
Produtividade (U g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,017	--	0,76	1,42

\*Onde ND = não detectado

Esses resultados são muito superiores aos observados para *A. blazei* U2/1 que em FES com casca de soja produziu atividade máxima de 60 U g<sup>-1</sup> na base seca (D'AGOSTINI et al., 2010) e também são superiores ao observado para *Agaricus bisporus* em FES cuja atividade máxima foi de 8,5 U g<sup>-1</sup> na base seca (BONNEN et al., 1994).

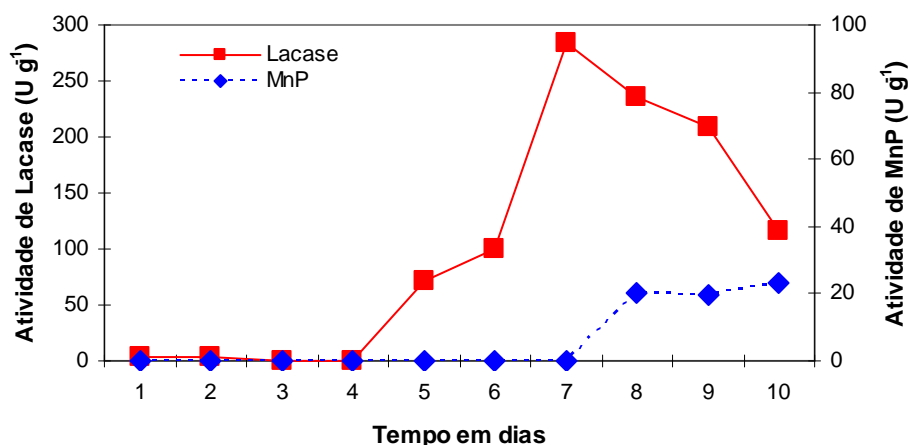
Esses valores também são superiores à máxima atividade de lacases observada para fungos da podridão branca da madeira, verdadeiros fungos ligninolíticos, como: 46,5 U g<sup>-1</sup> produzidos por *Pycnoporus sanguineus* em FES com substrato à base de tecido vegetal de palmeiras (*oil palm*) (VIKINESWARY et al., 2006); 14 U g<sup>-1</sup> produzidos por *Lentinula edodes* em FES com folhas de árvores (ELISASHVILI et al., 2008); 36 U g<sup>-1</sup> produzidos por *Trametes versicolor* em FES com bagaço de tomate (IANDOLO et al., 2011); 100 U g<sup>-1</sup> produzidos por *Trametes trogii* em FES com substrato composto por aparas de madeira e pó de torta de soja (ZENG et al., 2011); 167 U g<sup>-1</sup> produzidos por *Pleurotus ostreatus* em FES com bagaço de cana (KARP et al., 2012).

A ausência de atividade de lacase em FES com casca de café se opõe ao observado durante a FSm com esse resíduo, onde a produção de lacase foi significativa (9253 U L<sup>-1</sup>). A casca de café é rica em compostos fenólicos (PANDEY et al., 2000) que podem ser tóxicos para o fungo. A FES pode ter promovido uma maior concentração desses compostos, desfavorecendo o crescimento fúngico, o

que pode não ter ocorrido durante a FSm onde os componentes tóxicos ficaram diluídos no meio.

### 3.3.8 Cinética da produção de lacase em FES de bagaço de cana

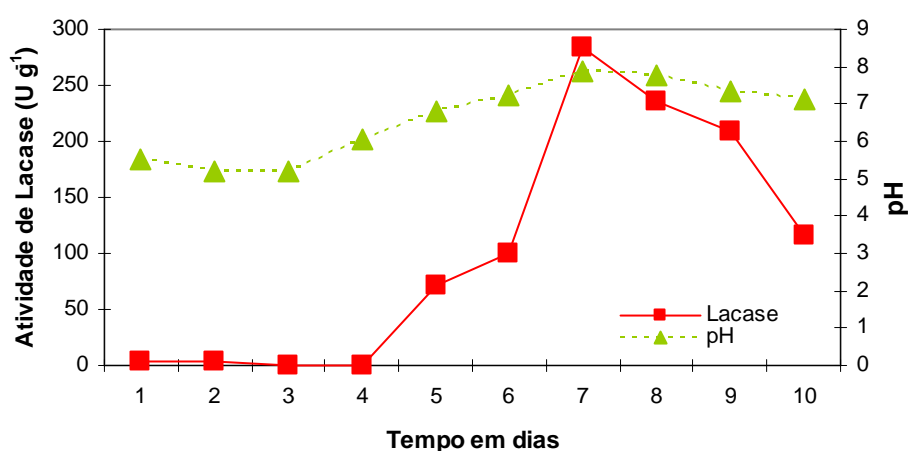
Após os testes iniciais, realizou-se a cinética de produção de lacase por FES em bagaço de cana. O pico de produção de lacase por *A. blazei* U2/4 ( $284 \text{ U g}^{-1}$  na base seca e  $1,7 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) ocorreu no 7º dia. Tais resultados indicam que a FES em bagaço de cana representa metodologia promissora pra produção dessa enzima por *A. blazei* U2/4 e que a otimização de parâmetros do processo fermentativo pode aumentar a produção.



**Figura 3.8** Cinética da produção de lacase e de manganês peroxidase (MnP) de *Agaricus blazei* U2/4 por FES em bagaço de cana ao longo de dez dias.

O pico de atividade da enzima MnP ocorreu somente no 10º dia de cultivo ( $23 \text{ U g}^{-1}$ ) sendo que essa enzima só foi detectada a partir do 7º dia de fermentação. Esses resultados são superiores aos observados para *A. bisporus* que em FES produziu atividade máxima de  $2,4 \text{ U g}^{-1}$  (BONNEN et al., 1994); *Pleurotus ostreatus* que em FES com resíduos de laranja produziu  $6,8 \text{ U g}^{-1}$  na base seca em 30 dias (ALEXANDRINO et al., 2007) e ao observado por landolo et al. (2010) que não verificaram produção dessa enzima por *Pleurotus ostreatus* em FES com resíduos de tomate.

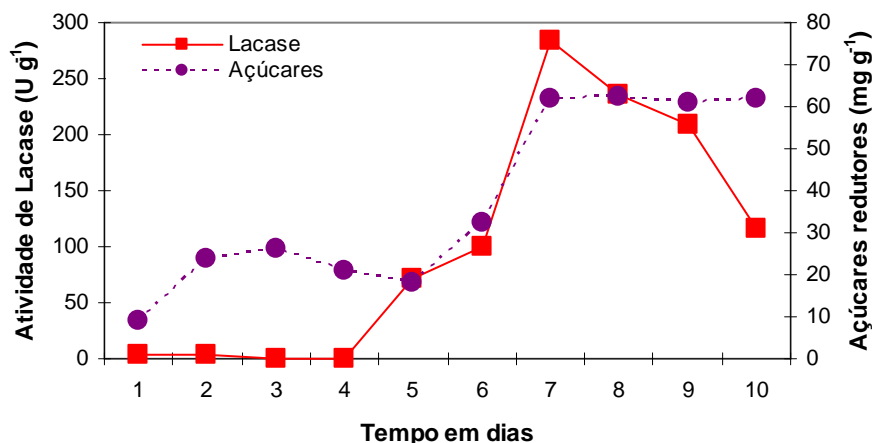
De forma similar ao que ocorreu durante a FSm, o pH do fermentado aumentou gradualmente (Figura 3.9), passando de 5,5, após 24 horas de semeadura, para 7,9 no pico da atividade enzimática (7<sup>o</sup> dia). Isso demonstra mais uma vez que os maiores níveis de atividade ocorreram em pH mais elevado e em torno da neutralidade (ULLRICH et al., 2005). A estabilidade da maioria das lacases é maior em pH ácido, porém tal característica varia grandemente dependendo da cepa empregada como fonte de lacase (MAJEAU et al., 2010).



**Figura 3.9:** Cinética da produção de lacase de *Agaricus blazei* U2/4 por FES em bagaço de cana e pH do suporte ao longo de dez dias.

A quantidade de açúcares redutores determinada durante a cinética da FES em bagaço de cana diferiu da observada em FSm. Na FES (Figura 3.10) a quantidade de açúcares começou a aumentar na metade do período de fermentação e continuou a se elevar até o pico da atividade de lacase (7<sup>o</sup> dia), enquanto na FSm o nível de açúcares caiu a partir do aumento da atividade de lacase. Isso pode ser um indicativo de que a FES também está favorecendo a produção de outras enzimas de degradação da biomassa vegetal como celulasas e xilanasas, que permitem a disponibilização de açúcares fermentescíveis para o crescimento do fungo e, conseqüentemente, para uma maior produção de lacase.





**Figura 3.10:** Cinética da produção de açúcares redutores e lacase de *Agaricus blazei* U2/4 por FES em bagaço de cana ao longo de dez dias.

### 3.4 Conclusões

A melhor fonte alternativa de carbono para produção de lacase por *A. blazei* U2/4 em fermentação submersa foi o mel de cana e a produção da enzima foi negativamente afetada pelo aumento na concentração de nitrogênio. Após otimização das condições, verificou-se que os maiores níveis de atividade de lacase ( $9711 \text{ U L}^{-1}$  e  $45 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foram obtidos em meio nutritivo composto por mel de cana ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ), nitrogênio orgânico na forma de ureia ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4$  ( $150 \text{ }\mu\text{M}$ ),  $\text{MgSO}_4$  ( $12 \text{ mM}$ ), etanol ( $1,2 \text{ mM}$ ) e pH 8,0 em nove dias de cultivo.

A produção de lacase por *A. blazei* U2/4 em fermentação no estado sólido foi significativamente afetada pelo tipo de suporte/substrato, sendo o maior nível de atividade observado em bagaço de cana. A cinética da produção de lacase em FES com bagaço de cana umedecido com solução nutritiva ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KCl}$ ,  $0,036 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $0,035 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $6,0 \text{ g L}^{-1}$  de ureia e  $150 \text{ }\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ ) demonstrou que o pico de atividade enzimática ( $284 \text{ U g}^{-1}$  na base seca e  $1,7 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) ocorreu no 7º dia de fermentação em pH 8,0.

Tais resultados indicam a versatilidade da cepa U2/4 de *A. blazei* em produzir níveis significativos de lacase tanto em FSm quanto em FES, empregando-se resíduos agroindustriais abundantes e de baixo custo, com produtividade satisfatória

### 3.5 Referências

ALEXANDRINO, A.M. et al. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.

ARAKAKI, A.H. et al. Optimization of biomass production with copper bioaccumulation by yeasts in submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, p.1027-1034, 2011.

BONNEN, A.M.; ANTON, L.H.; ORTH, A.B. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 960-965, 1994.

CAVALLAZZI, J.R.P.; KASUYA, C.M.; SOARES, M.A. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 36, p. 383-387, 2005.

COLAUTO, N.B. et al. Alternative to peat for *Agaricus brasiliensis* yield. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 712-716, 2010.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Séries históricas relativas às safras 1976/77 a 2009/2010 de área plantada, produtividade e produção. Soja.** Brasília, 2011. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=>>>. Acesso em 10/08/2012.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Séries históricas relativas às safras 1976/77 a 2009/2010 de área plantada, produtividade e produção. Café.** Brasília, 2011. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=>>>. Acesso em 10/08/2012.

COUTO, S.R; TOCA-HERRERA, J.L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 558-569, 2007.

D'AGOSTINI, E.C. et al. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 3, p. 295-300, 2011.

DEKKER, R.F.H. et al. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Microbiology**, v. 10, p. 177-185, 2007.

DITTMER, N.T.; KANOST, M.R. Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 179-188, 2010.

D'SOUZA, T.M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C.A. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3739–3744, 1996.

ELISASHVILI, V. et al. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 457–462, 2008.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n.1, p. 37-42, 2009.

FELTRIN, V. P. et al. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melão de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, 2000. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/babt/v43n1/v43n1a15.pdf>. Acesso em 01/08/2012.

FENICE, M. et al. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 77-85, 2003.

GALHAUP, C. et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 529–536, 2002.

GASSARA, F. et al. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 388–394, 2010.

GIARDINA, P. et al. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 369–385, 2010.

HAN, M.J. et al. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v. 43, p. 555-560, 2005.

HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1415–1419, 2004.

IANOLO, D. et al. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 40-51, 2011

IBGE. Banco de dados agregados. Disponível em: [www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf](http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf). Acesso em 17 de maio de 2012.

JUMES, F.M.D. et al. Effects of *Agaricus brasiliensis* mushroom in Walker-256 tumor-bearing rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, p. 21-27, 2010.

KARP, S. et al. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 735-739, 2012.

KERRIGAN, R.W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, v. 97, p. 12-24, 2005.

LOMASCOLO, A. et al. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 618-624, 2003.

MAJEAU, J.A.; BRAR, S.K.; TYAGI, R.D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2331–2350, 2010.

MIKOLASCH, A.; SHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 605-624, 2009.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 11, p. 426-428, 1959.

MIRANDA, L.A.S.; SANT'ANNA, E.S.; PORTO, A.C.S. The growth of *Micrococcus varians* by utilizing sugar cane blackstrap molasses as substrate. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 125-129, 1999.

- MOROZOVA, O.V. et al. "Blue" laccases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 10, p. 1136-1150, 2007.
- NAKAMURA, T.; OWEN, F.G. High amounts of soy hulls for pelleted concentrate diets. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 988-994, 1989.
- OSMA, J.F.; TOCA-HERRERA, J.L.; RODRÍGUEZ-COUTO, J. Uses of laccases in the food industry. **Enzyme Research**, v. 2010, 2010. Disponível em <http://www.hindawi.com/journals/er/2010/918761/cta/>. Acesso em: 13/06/2012.
- PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153–162, 2000.
- PRASAD, K.K. et al. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 17–26, 2005.
- RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. 93 f. Dissertação (Mestrado Processos Biotecnológicos) - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205–218, 2003.
- SOCCOL, C.R. et al. Development of a low cost bioprocess for endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* Intended for biological control of *Aedes aegypti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 121-130, 2009.
- SOCCOL, C.R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820–4825, 2010.
- SODEN, D.M.; DOBSON, A.D.W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiology**, v. 147, p. 1755–1763, 2001.
- STAJIC, M. et al. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 65-73, 2006.

TAPIA-TUSSEL, R. et al. New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 50, p. 10134-10142, 2011.

ULLRICH, R.; et al. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 357–363, 2005.

VILLAVICENCIO, A. R.N.; SANT'ANNA, E. S.; TORRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, 1999. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/babt/v42n2/a15v42n2.pdf>>. Acesso em 26/07/2012.

VIKINESWARY, S. et al. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 171–177, 2006.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M.H. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23689-95, 1992.

WASSER, S. P. et al. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus*(the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, p. 267-290, 2002.

WEINGARTNER, V. **Produção, purificação e identificação de mananase, obtida por fermentação no estado sólido utilizando cascas de soja e *Aspergillus niger***. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ZAMBOM, M.A. et al. Nutritional value of soybean hulls, soybean meal, ground corn and wheat meal for cattle. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 23, p. 937-943, 2001.

ZENG, X. et al. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p. 517–525, 2011.

## CAPÍTULO IV

### IDENTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE GENES CODIFICADORES DE LACASE DE *Agaricus blazei*

#### RESUMO

Lacases são multicobre oxidases que reduzem oxigênio à água ao mesmo tempo em que oxidam um substrato do tipo *p*-diidroxifenol ou outro composto fenólico. Sua baixa especificidade a substratos tornam a lacase uma enzima com potencial aplicação em diversas áreas. Contudo, sua aplicação requer o conhecimento sobre a sua expressão e características gênicas. Em fungos, é comum a presença de múltiplos genes e a produção de isoenzimas organizadas em famílias gênicas, que são diferencialmente reguladas e dependem das condições de crescimento e de estados fisiológicos. Nesse estudo foi avaliada a capacidade de dois pares de primers na identificação de genes de lacase de quatro linhagens de *Agaricus blazei* (U2/1, U2/2, U2/3 e U2/4) e uma de *Pleurotus ostreatus* (U9/1) por PCR bem como as melhores condições reacionais para a identificação. Em seguida os produtos da amplificação foram submetidos ao sequenciamento direto e as sequências foram analisadas. A técnica de PCR mostrou ser eficaz na identificação de genes de lacase de *A. blazei*. As condições ideais de amplificação incluíram a utilização de 0,2 μM de primer, 100 μM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5 U de LongAmp™ Taq DNA polimerase. Os ciclos de temperatura incluíram o pareamento dos primers a 49°C por 2 minutos e polimerização a 65°C. A análise de restrição dos produtos da amplificação de genes de lacase de todas as linhagens demonstrou a existência de mais de um gene. A análise das sequências nucleotídicas revelou a presença de sequências consenso típicas de promotores (TATA Box e CAAT Box), bem como a presença de elementos relacionados à regulação da expressão gênica, como elementos sensíveis a xenobióticos (XRE) e elementos de resposta ao stress (STRE). As sequências protéicas deduzidas mostraram elevada similaridade com outras lacases fúngicas e apresentaram ao menos um domínio conservado pertencente à família das cobre oxidases.

**Palavras-chave:** cobre polifenol oxidase, *Agaricus brasiliensis*, MRE, STRE.

## 4.1 Introdução

As lacases (EC 1.10.3.2) são multicobre oxidases que catalisam a redução de oxigênio à água ao mesmo tempo em que oxidam um substrato orgânico, tipicamente um *p*-diidroxifenol ou outro composto fenólico (BALDRIAN, 2006). Essas enzimas são relativamente comuns e ocorrem em plantas (MESSERSCHMIDT; HUBER, 1990; ADKI et al., 2012), insetos (ARAKANE et al., 2005; DITTMER; KANOST, 2010) e bactérias (BELOQUI et al., 2006; AUSEC et al., 2011), porém a maioria das lacases descritas na literatura é de origem fúngica (MOUGIN et al., 2003).

Sua baixa especificidade a substratos torna a lacase uma enzima com potencial aplicação em diversas áreas como nas indústrias têxtil, de alimentos, papel e celulose, de biorremediação e cosmética (COUTO; HERRERA, 2006; PISCITELLI et al., 2010). Contudo, para qualquer aplicação, as lacases mais adequadas a um propósito específico devem ser encontradas e produzidas. Apesar das abundantes fontes naturais de lacases, as quantidades produzidas são muito baixas para uma aplicação comercial (PISCITELLI et al., 2010), e uma estratégia para a produção de enzimas de interesse é através da expressão heteróloga de genes codificadores (ROBERT et al., 2011).

Com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a expressão gênica de lacases, muitos genes codificadores dessa enzima têm sido isolados e caracterizados. Em fungos, é comum a presença de múltiplos genes e a produção de várias isoenzimas de lacase organizadas em famílias gênicas foi relatada para muitas espécies como *Agaricus bisporus* (PERRY et al., 1993), *Trametes* sp. (XIAO et al., 2006), *Pleurotus sajor-caju* (SODEN; DOBSON, 2001), *P. eryngii* (RODRÍGUEZ et al., 2008), *P. ostreatus* (PALMIERI et al., 2000). A expressão dessas isoenzimas é diferencialmente regulada e depende das condições de crescimento e de estados fisiológicos (SODEN; DOBSON, 2003; XIAO et al., 2006).

A caracterização de famílias gênicas de lacases tem sido impulsionada pela disponibilidade de um número crescente de sequências genômicas. O alinhamento de sequências de aminoácidos deduzidas a partir de genes de lacase revelou que as quatro regiões de ligação ao cobre, bem como ligantes de cobre, dez resíduos de histidina e um de cisteína são altamente conservados (D'SOUZA et al., 1996). Tais características permitiram o isolamento de sequências gênicas específicas de lacase



de fungos de diversos gêneros com base na sequência das regiões conservadas de ligação ao cobre. Esse método de triagem gênica pode ser útil no isolamento de todos os genes de lacase de um organismo ou mesmo de uma amostra ambiental. Essa abordagem também torna possível caracterizar isoenzimas que não podem ser obtidas por métodos tradicionais de triagem baseados na atividade enzimática (PISCITELLI et al., 2010).

*Agaricus blazei* Murrill *sensu* Heinneman, considerado *Agaricus brasiliensis* por Wasser et al. (2002) e *Agaricus subrufescens* Peck por Kerrigan (2005), é um cogumelo comestível nativo do Brasil. Muitas ações biológicas têm sido atribuídas a esse basidiomiceto como capacidade de imunomodulação (HETLAND et al., 2011), inibição do crescimento de tumores (OHNO et al., 2001; MOURÃO et al., 2009), inibição da migração celular ou da revascularização induzida por tumores (JUMES et al., 2010), proteção contra alergias (ELLERTSEN; HETLAND, 2011) e muitas outras.

*A. blazei* cresce naturalmente sobre camadas superficiais de solo rico em matéria orgânica vegetal e no húmus de florestas e campos. Apesar de existir amplo conhecimento empírico sobre o cultivo desse fungo, pouco se sabe sobre seu arsenal enzimático e não há relatos do isolamento de genes de lacase de *A. blazei* até o momento.

Os objetivos deste trabalho foram realizar a identificação de genes codificadores de lacase de *Agaricus blazei* por PCR, bem como seu sequenciamento e a análise das sequências obtidas.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Micro-organismos**

Quatro linhagens (U2/1, U2/2, U2/3 e U2/4) de *Agaricus blazei* e uma linhagem (U9/1) de *Pleurotus ostreatus*, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAR foram analisadas. Para a extração de DNA as diferentes linhagens foram cultivadas em meio sólido ágar-extrato-de-malte (2%) a 28 °C por 7 dias. Todo o micélio foi removido da superfície do meio com auxílio de espátula estéril e acondicionado em tubos de ensaio para posterior maceração.

#### 4.2.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir do micélio dos fungos analisados segundo protocolo modificado a partir de Doyle e Doyle (1987). As amostras foram maceradas na presença de tampão de extração CTAB [cetiltrimetilamônio 2% (m/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2% (v/v) e proteinase K 0,01%] e incubadas a 65°C por 45 minutos. O lisado resultante foi submetido à extração com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a 15200 g por 5 min. A fase aquosa resultante foi recuperada e isopropanol gelado foi usado para precipitação do DNA. A amostra foi mantida a -20°C por 10 min e em seguida centrifugada a 15200 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em etanol 70% (v/v) seguido de centrifugação (15200 g por 15 min). Em seguida o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuspendido em etanol 95% (v/v) seguido de nova centrifugação (15200 g por 5 min). Após o descarte do sobrenadante, o pellet permaneceu a temperatura ambiente por 30 min e foi ressuspendido em tampão TE (1mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA pH 8,0) ou água destilada.

#### 4.2.3 Identificação de genes de lacase por PCR

As sequências dos primers avaliados para a triagem de genes de lacase estão descritas na Tabela 4.1. A sequência dos primers (Invitrogen) foi baseada na sequência conservada de sítios de ligação ao cobre de genes de lacase de basidiomicetos previamente sequenciados. O DNA isolado de cada linhagem foi usado com molde nas reações de amplificação.

**Tabela 4.1:** Sequência dos primers avaliados para triagem de genes de lacase de *Agaricus blazei*.

Primer	Sequência (5' – 3')	Referência
LAC-N1	CAYTGGCAYGGNTTYTTYCA	Hoshida et al. (2001)
LAC-C1	TGRAARTCDATRTGRCARTG	
AblacF	CATTGGCATGGCTTCTTTCA	Soden e Dobson (2001)
AblacR	GCGCGAATCCAGTAATTGCGAC	

Visando à padronização da reação de amplificação foram testadas diversas concentrações de reagentes: MgCl<sub>2</sub> (1,5, 2,0 e 2,5 mM); dNTPs (100, 150 e 200

mM), *primers* (0,2 e 0,4  $\mu\text{M}$ ), LongAmp<sup>TM</sup> Taq DNA polimerase (New England BioLabs) (1,5, 2 e 2,5 U) em volume final 50  $\mu\text{L}$ .

Adicionalmente foram avaliadas diferentes condições de temperaturas para execução das PCR. Todos os testes foram conduzidos em termociclador (Eppendorf). Os ciclos de amplificação avaliados consistiam de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos; seguida de 35 ciclos programa dos para desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento dos *primers* a 49, 52, 54 ou 56°C por 1 ou 2 minutos, polimerização a 65 ou 72°C por 1 ou 2 minutos, seguidos de extensão final a 65 ou 72°C por 7 minutos. Ao final dos programas as amostras eram automaticamente resfriadas a 4°C.

Os produtos das reações de PCR foram separados através da eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) ou 3% (m/v) preparado em tampão TAE (40 mM de Tris-acetato e 1 mM de EDTA) contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. Após a corrida, o DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado.

#### **4.2.4 Análise dos produtos de amplificação com endonucleases de restrição**

Com o objetivo de analisar com mais detalhes os produtos da amplificação, os mesmos foram digeridos com 4 endonucleases de restrição (Invitrogen), segundo as especificações do fabricante. As enzimas foram empregadas em concentração de 2,5 U por  $\mu\text{g}$  de DNA mais 1/10 do volume total da reação de tampão de digestão. Utilizou-se endonucleases de restrição consideradas de corte frequente e que reconhecem quatro pares de base: *A*lul (AG/CT); *Hae*III (GG/CC); *M*bol (/GTAC) e *M*seI (T/TAA).

Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose 3% (m/v), em tampão TAE (40 mM de Tris-acetato e 1 mM de EDTA) contendo brometo de etídio na concentração final de 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. 1kb Plus DNA Ladder foi utilizado como padrão de tamanho molecular. Após a corrida, o DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado.

#### 4.2.5 Sequenciamento dos genes de lacase

Os produtos da PCR foram purificados empregando-se um kit de purificação (Pure Link™, Invitrogen) e submetidos ao sequenciamento direto.

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNA moldes (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol dos primers (Tabela 4.1) e 3 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) em volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 s, 55°C por 5 s e 60°C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas por precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95°C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection v 1.0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set “Z”; Mobility File “DT3100POP6{BDv3}v1.mob”; BioLIMS Project “3100\_Project1”; Run Module 1 “StdSeq50\_POP6\_50cm\_cfv\_100”; e Analysis Module 1 “BC-3100SR\_Seq\_FASTA.saz”.

#### 4.2.6 Análise das sequências gênicas

As sequências gênicas obtidas foram caracterizadas com base em análise de similaridade com sequências nucleotídicas de genes depositadas nos bancos de dados GenBank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory) e DDBJ (DNA Data Bank of Japan), empregando-se o software BLAST *nucleotide* (ALTSCHUL et al., 1997). As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas empregando-se os softwares ClustalW (LARKIN et al., 2007) e Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011).

Adicionalmente, com auxílio do software BLASTx (ALTSCHUL et al., 1997), as sequências de aminoácidos preditas a partir das sequências nucleotídicas foram

utilizadas para a identificação de domínios conservados (CDs) do Banco de Dados de Domínios Conservados (CDD) do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (MARCHLER-BAUER et al., 2011).

### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Identificação de genes de lacase por PCR

A abordagem via PCR utilizada para a triagem de sequências de genes de lacase é baseada na utilização de iniciadores cujas sequências correspondem às sequências consenso das regiões de ligação ao cobre. Neste estudo padronizou-se as condições da reação bem como dos ciclos de temperatura para amplificação de genes de lacase de *Agaricus blazei*.

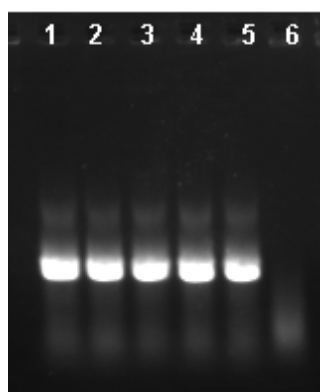
As condições ideais para amplificação de genes de lacase foram estabelecidas e utilizadas em todos os procedimentos. As reações de volume final 50  $\mu$ L, constituíram-se de 50 ng de DNA molde; 0,2  $\mu$ M de cada primer; 100  $\mu$ M de dNTP, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 2,5 U de LongAmp<sup>TM</sup> Taq DNA polimerase (New England BioLabs) e tampão LongAmp<sup>TM</sup>.

As condições ideais de temperatura para amplificação dos genes de lacase também foram estabelecidas e utilizadas em todos os procedimentos. Os ciclos de variação de temperatura foram programados para desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento a 49°C por 2 minutos, polimerização a 65°C por 2 minutos, seguidos por extensão final a 65°C por 7 min.

A eficiência de dois pares de primers diferentes (Tabela 4.1) em permitir a amplificação de genes de lacase foi avaliada.

O uso dos primers LAC-N1 (*forward*) e LAC-C1 (*reverso*) não originou produtos de PCR, apesar de vários ajustes nas condições de reação. Esses dois primers degenerados foram desenhados utilizando-se o DNA genômico de *Trametes sanguinea* M85-2 como modelo (HOSHIDA et al., 2001) e, provavelmente, o grau de degeneração da sequência foi muito elevado para produzir a amplificação de lacases de *A. blazei*. A possível presença de um íntron nas regiões de pareamento dos primers também pode resultar em baixa afinidade de um ou de ambos os primers, contribuindo para o fracasso da amplificação (D'SOUZA et al., 1996).

Empregando-se outro par de primers desenhado por Soden e Dobson (2001) (Tabela 4.1) foi possível produzir amplicons para todas as linhagens analisadas. A análise dos amplicons por eletroforese (Figura 4.1) mostrou a presença de uma única banda de aproximadamente 2 kpb para todas as linhagens. O tamanho das sequências de DNA entre os sítios de ligação ao cobre I e IV de lacases fúngicas conhecidas varia de 1,5 a 1,7 kpb (HOSHIDA et al., 2001), corroborando os achados desse estudo. Apesar do grande número de relatos sobre o isolamento e caracterização de genes de lacase de basidiomicetos, este é o primeiro relato da identificação de genes de lacase de *A. blazei*.

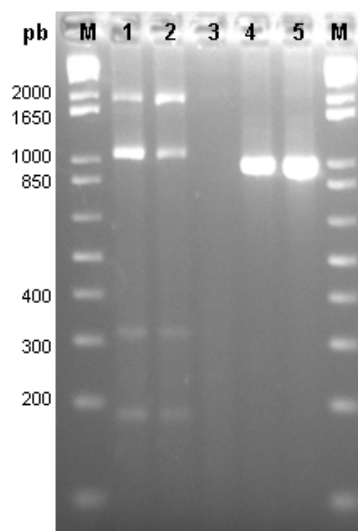


**Figura 4.1:** Produtos da amplificação de genes de lacase de *Agaricus blazei* (1) U2/1, (2) U2/2, (3) U2/3, (4) U2/4, *Pleurotus ostreatus* (5) 9/1 e (6) controle negativo (gel de agarose 1%).

Para confirmação do tamanho dos produtos de amplificação e a verificação de prováveis polimorfismos, realizou-se nova eletroforese, dessa vez empregando-se um gel de agarose mais concentrado (3%), o que permite uma resolução maior durante a corrida (Figura 4.2). Nessa condição, foram observadas quatro bandas para as linhagens *A. blazei* U2/1 e U2/2 (1,9 kpb, 1,1 kpb, 0,3 kpb e 0,2 kpb) e apenas uma banda para as linhagens *A. blazei* U2/3 e U2/4 (1 kpb), além de *P. ostreatus* U9/1 (1 kpb) que também foi analisado.

As múltiplas bandas observadas para as linhagens de *A. blazei* U2/1 e U2/2 sugerem a ocorrência de múltiplos genes de lacase com diferentes tamanhos. D'Souza et al. (1996) amplificaram dois fragmentos de lacase para quatro espécies de basidiomicetos. Após sequenciamento, demonstraram que as sequências de aminoácidos deduzidas do menor produto de PCR apresentavam similaridade relativamente baixa com os produtos maiores do mesmo organismo. Esses dados sugerem que em nosso experimento, onde foram observadas quatro bandas na

PCR, cada uma representa, possivelmente, um gene de lacase diferente. A ausência de um segundo produto nas linhagens U2/3 e U2/4 indica a variabilidade genética entre linhagens de *A. blazei*.



**Figura 4.2:** Produtos da amplificação de genes de lacase de *Agaricus blazei* (1) U2/1, (2) U2/2, (3) U2/3, (4) U2/4 e *Pleurotus ostreatus* (5) 9/1. (M) 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (gel de agarose 3%).

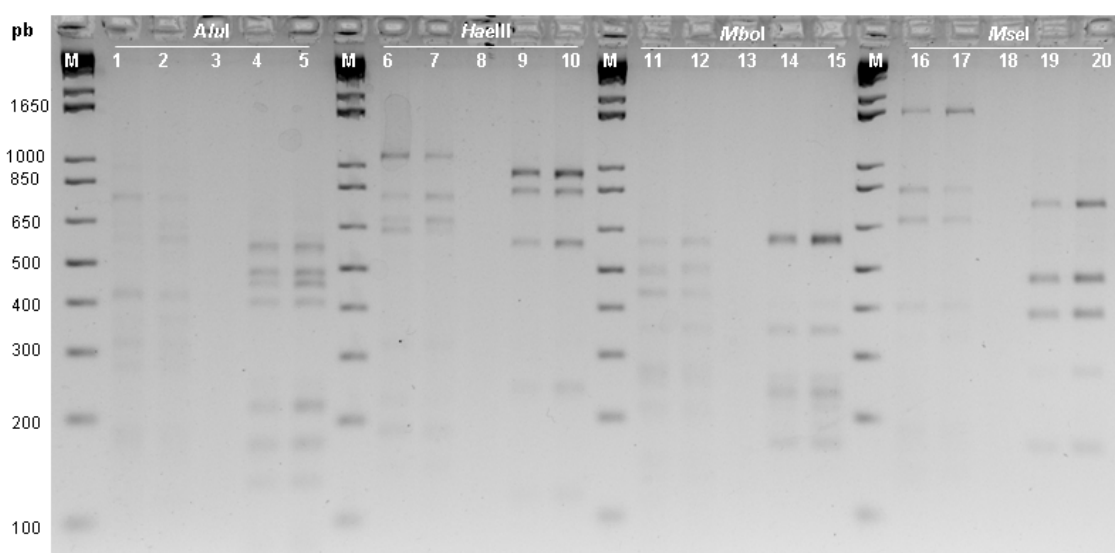
Praticamente todos os fungos analisados até hoje secretam mais do que uma lacase e produzem diferentes padrões de isoenzimas, dependendo das condições de crescimento. Perry et al. (1993) caracterizaram dois genes de lacase de *Agaricus bisporus*, no primeiro relato da existência de uma família gênica de lacase. A família de genes de lacase de *Pleurotus ostreatus* tem sete diferentes genes detectados até agora (PEZZELLA et al., 2009) e *Coprinopsis cinerea* apresenta 17 genes de lacase (KILARU et al., 2006). Mais recentemente, Pezzella et al. (2012) descreveram a expressão de nove genes de lacase de *Pleurotus ostreatus* sob diferentes condições de cultivo e desenvolvimento.

Contudo, é importante notar que a disponibilidade cada vez maior de sequências genômicas permitiu a identificação de genes parálogos, ou seja, genes presentes em múltiplas cópias no genoma como ocorre para lacases, mas que, no entanto, exibem outra função ou ainda não exibem função alguma (WAPINSKI et al., 2007). Dessa forma, a presença de várias cópias de um gene não implica necessariamente que todas as cópias sejam funcionais e que exibam algum tipo de expressão. Apesar de os resultados deste trabalho sugerirem mais de um gene,

estudos da expressão gênica são necessários para confirmar a funcionalidade dos genes identificados.

#### 4.3.2 Análise dos produtos de amplificação com endonucleases de restrição

A análise dos produtos de amplificação com quatro endonucleases de restrição (*AluI*, *HaeIII*, *MboI* e *MseI*) demonstrou que todas as endonucleases testadas foram capazes de reconhecer sítios de restrição nos genes de lacase das linhagens analisadas (Figura 4.3), e somente a digestão do gene da linhagem *A. blazei* U2/3 não produziu resultados conclusivos.



**Figura 4.3:** Digestão de genes de lacase de *Agaricus blazei* e *Pleurotus ostreatus* com endonucleases de restrição. *Agaricus blazei* U2/1 (1, 6, 11 e 16), U2/2 (2, 7, 12 e 17), U2/3 (3, 8, 13 e 18) e U2/4 (4, 9, 14 e 19). *Pleurotus ostreatus* U9/1 (5, 10, 15 e 20). M = 1 kb Plus DNA Ladder.

A digestão dos produtos da PCR das linhagens de *A. blazei* U2/1 e U2/2 produziu padrões de restrição bastante similares. O mesmo ocorreu para as linhagens *A. blazei* U2/4 e *Pleurotus ostreatus* U9/1.

A somatória dos fragmentos de cada padrão de restrição das linhagens *A. blazei* U2/4 e *P. ostreatus* U9/1 revelou um número superior ao do tamanho dos produtos da PCR não digeridos (Tabela 4.2). Isso indica que em uma mesma banda (produto da PCR) coexistem segmentos de DNA amplificados de mesmo tamanho, porém, com sequências distintas que ao serem reconhecidas pelas endonucleases de restrição, produzem padrões de restrição diferentes. Tal achado indica que todas



as linhagens analisadas neste estudo apresentam mais de um gene de lacase, que são amplificados pelos primers testados. Isso era inicialmente claro para as linhagens *A. blazei* U2/1 e U2/2 que produziram quatro bandas de amplificação cada uma. Contudo, foi demonstrado também para as linhagens *A. blazei* U2/4 e *P. ostreatus* U9/1 após a digestão com endonucleases. Apesar desse tipo de análise permitir a identificação qualitativa de genes distintos, não permite a identificação do número exato de genes que foram amplificados.

**Tabela 4.2:** Somatória dos fragmentos resultantes da digestão dos produtos de PCR com endonuclease de restrição.

Linhagem	Tamanho do produto da PCR (kpb) sem digestão	Somatória dos tamanhos dos fragmentos de restrição (kpb)			
		<i>AluI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>MboI</i>	<i>MseI</i>
<i>Agaricus blazei</i> U2/1	1,9; 1,1; 0,3 e 0,2	3,4	3,7	2,3	4,1
<i>Agaricus blazei</i> U2/2	1,9; 1,1; 0,3 e 0,2	3,4	3,7	2,3	4,1
<i>Agaricus blazei</i> U2/4	1,0	2,4	2,7	1,8	2,0
<i>Pleurotus ostreatus</i> U9/1	1,0	2,4	2,7	1,8	2,0

Não há na literatura até o momento descrição de isoenzimas de lacase de *A. blazei* ou mesmo a identificação de genes codificadores de lacase para essa espécie. Por outro lado, seis isoenzimas de lacase foram isoladas e caracterizadas até o momento para *Pleurotus ostreatus* e representam um grupo de lacases dotadas de característica específicas. Recentemente Karp et al. (2012) detectaram seis isoenzimas (POXA1b, POXA3, POXC e outras três isoformas) de *P. ostreatus* cultivados em FES com bagaço de cana e conseguiram identificar duas delas (POXC e POXA3) empregando a técnica de espectrometria de massa. Além disso, vários genes codificadores de lacase em *P. ostreatus* foram identificados e o recente sequenciamento genômico dessa espécie indica a ocorrência de 12 genes diferentes (CASTANERA et al., 2012; PEZZELLA et al., 2012).

#### 4.3.3 Sequenciamento dos produtos da PCR e análise das sequências gênicas

Os produtos obtidos por PCR foram submetidos ao sequenciamento direto conforme descrito no item 4.2.5 o que permitiu a obtenção de sequências parciais.

As sequências parciais obtidas (Tabela 4.3) foram comparadas utilizando-se o software Blast com sequências de outras lacases depositadas em diferentes bancos de dados (GenBank, EMBL e DDBJ), comprovando-se que os produtos da PCR se tratavam de sequências parciais de genes de lacase.

Os resultados da comparação de sequências revelou que a sequência parcial do gene de lacase de *A. blazei* U2/1 apresenta 75% de similaridade com o gene de lacase (*lcc1*) de *Agaricus bisporus* (FJ392313) e 83% de similaridade com o gene *lac* de *Macrolepiota procera* (AJ542611).

**Tabela 4.3:** Tamanho das sequências parciais obtidas a partir do produto de amplificação de genes de lacase de *Agaricus blazei* e *Pleurotus ostreatus*.

Linagem	Primer empregado no sequenciamento	Tamanho da sequência obtida (pb)
<i>Agaricus blazei</i> U2/1	AblacF	696
	AblacR	296
<i>Agaricus blazei</i> U2/2	AblacF	480
	AblacR	520
<i>Agaricus blazei</i> U2/3	AblacF	--
	AblacR	--
<i>Agaricus blazei</i> U2/4	AblacF	666
	AblacR	657
<i>Pleurotus ostreatus</i> U9/1	AblacF	--
	AblacR	666

Já a sequência parcial do gene de lacase de *A. blazei* U2/2 apresentou homologia de 83% com o gene *lac* de *Macrolepiota procera* (AJ542611) e 75% com o gene *lac1* de *Coprinus comatus* (JQ228450). Da mesma forma, a comparação da sequência parcial de *A. blazei* U2/4 revelou similaridade de 93% com o gene *lac1* de *Pleurotus sajor-caju* (AF297525) e 83% com o gene *pox1* de *Pleurotus ostreatus* (AB514560). A sequência parcial da lacase de *Pleurotus ostreatus* U9/1 apresentou 85% de homologia com o gene *pox1* (AB514561) e 76% com o gene *pox2* (AB474261), ambos de *P. ostreatus*.

Lima (2009) ao comparar sequências de genes de lacase de *Pycnoporus sanguineus* observou similaridade de 97% com lacases de *Pycnoporus sanguineus* e *Pycnoporus cinnabarinus* e 79% com lacase de *Trametes* sp. Fan et al. (2011) compararam a sequência de lacase de *Trametes* sp. 48424 e verificaram elevada identidade de 78,7% com lacase de *Trametes* sp. I-62, seguido de *Trametes* sp.

AH28-2 e *Trametes versicolor* com 78 e 77% de identidade, respectivamente. Esses dados indicam que os genes de lacase apresentam regiões conservadas e que permitiram a identificação das sequências parciais como sequências parciais de genes de lacase.

As sequências obtidas foram alinhadas com auxílio dos softwares ClustalW e Clustal Omega a fim de se verificar a identidade entre elas. A Figura 4.4 mostra o alinhamento realizado bem como a identificação de elementos relacionados à regulação da expressão gênica.

```

LacaseU21      CCTGAGAGAAGACAAGCTATGGTAGGAGGAATTCCTGGT-----ATCT
LacaseU22      -CTGCAAGTGCCATGGCCTTGGCCGCCGAATTCCTTTCT-----TTCT
LacaseU24      -----CTGCAAAATCGTTTCATGGACGGGATTTCTTTGGCCTTGGACCTCGGTTT-AT
LacaseU91      -----CAGTCTGATCGCCTTCACGGAAGGATTTCTTTGGCCTTGGTGCGGTACTTAGG
                .           .:           :* . * . * .*** * *
                :

LacaseU21      AACAAATTCGGGCGGTGTTTCGTGTGGCGGCTCCGAAA-TTCTTCCTGATCTTGTCACGGCTG
LacaseU22      AACAAATTCGGGCGCTGTTTCGTTGGATGCTCCGAAA-TTCTTCCTGATCTTGTCCCGGCG
LacaseU24      TAAACCTTGAAGAAAGGCCGCGGGCATGCTGCCCGAAAAATTTGAATACTTTCCCTAC
LacaseU91      GACCCTTCTCTGAGAGCCCGGTGCATGCTGCTTACCAGCATTTGTATACTATCCCTAC
                * . . . *           . : * ** * . *** * . . : . : * ** . * ** . *

LacaseU21      ACAATCAACAATGTGTTTTAAATTGATTTGTGCACCAA-----
LacaseU22      CCAATCAACAATGTGTCTAAATTGCTTTGTGCACGGC-----
LacaseU24      AACATCGACCATCCTTGTTCAGCTAATCGGGACGGTGAGGCCAGGCGCAAAGGACAAACC
LacaseU91      AACATCGACCATCCTTGGTCATGTGTTTGCAGCGGTGAGGCCAGACGCAAAGGACAAACC
                . . .*** .** .** * : . * : * * * . .

LacaseU21      -----AACCTCCATGAT-----GTGGCCAT
LacaseU22      -----ACCCTCCATGAA-----GAAGCCAT
LacaseU24      GACAATGGGCACAATGTTGCCGGCTCCTGCCTCGATGACCTGCAAAAATTGACCGTAAT
LacaseU91      GGCTATGGGCACAATGTTGCCGGCTTCTGCCTCGATGACCTGCAAAATTGACCGTCAAT
                : **** * * * . * .**

LacaseU21      GCCAATGGAAAATACCGGTTTGCTCAACTGGAAAATTATACTCGAAACTTTCCAAAGGTG
LacaseU22      GCCAATGATAAATACCGGTTTGCTCATTTGAAAAATTATACTCGAAACTTTCCAAAGGTG
LacaseU24      GGAAAACCTGGAATTTGGGGTTCGAGAACATCAAGATAAGTCTGAACCCATACCCCTTGT
LacaseU91      GGACAACCTGGAATTTGGGGTTCGAAAACCTCAACATAAGTCTGAACCCATACCCCTTGT
                * . . : . ***: ** * **: * : ** * *: * : * . * . * : * : * : *

LacaseU21      CAATAGGACATTGAGTAACCCCATGGACTCCGTCCATAAAGTTAGTCC---CAGCCTGAA
LacaseU22      CAATAGGACATTGAGTAACCCCATGGACTCCGTCCATAAAGTTAGTCC---CAACCTGAA
LacaseU24      GCTTTCACCGTTGATGACG-----GCCAAATCGGAACTACCCCGCCCGCCA
LacaseU91      GCTTTCGACGTTGATGACG-----GCCAAATGGGACCTACCCCGCCCGCCA
                . : * : . * . * * * * * . * * * * * : * : . * . * * . * * . *

LacaseU21      AGAAGCCATGCCAATGAAA-----
LacaseU22      AGAAGCCATGCCAATGAATAAAGCTTATATGTGTGTCAGGATTTGTCAACCA-----
LacaseU24      ACCGCCCTTTACCGTTGAGGAGTGTA---CTATCAGGATTGGGAAGCACCCATTCTGA
LacaseU91      AACTCCCTTTACCGTTGAGGAGTGTA---CTATCAGGATTGGGAAGTTTTGCATTCTGA
                * . * * : * . * . * . *

LacaseU21      -----
LacaseU22      -----AATGGTCATCACTCAATACCACTGACGCTGAAGATA-----CAATGA
LacaseU24      GGACCCACACCTTGGTACTACAAAAAGAGTGAAATCATTATTTCCATGAGGGATTGA
LacaseU91      GGACCCACAACATGGTACTATCAAAAAGAGTGAGAACACATTAATTTCCATGAGGGACTGA

```

```

LacaseU21 -----
LacaseU22 GATATACCTTTTCTCGATGGACC[TATAAA]AGCTTCTTC-----
LacaseU24 AATGTAC[CCAATCT]GCAAGTGAATGACATTGTCGGCTGCAATTGAGACCGTCAGCACGG
LacaseU91 AATGTCC[CCAATCT]GCAAGTGAATGACTATTTTCGGCTGCAAGTGAGACCGTCAACACGG

LacaseU21 -----
LacaseU22 -----CAGCGGGCCATATGCCAGGAAGATACATGCTTCTTCATTGAGGCAA-----
LacaseU24 TGTACCGACCGGAATACGTTACAGCTCACCGTTGTAACGTCATACAAGGACAGGTGGG
LacaseU91 TGTGCCACCGGAATACATTACAGTTCACCGTTGTAACCTTCATACAAGGACAGGTGGG

LacaseU21 -----
LacaseU22 -----TGTATG--TCTGCAGAAAATCATTTTGA--TTGTTTC--TATGCAA
LacaseU24 GATCGAAGGGGTCATAGC[TGCGTG]AACGGTAAGCCCGGCGCGTCTTATTCTCTTATCAA
LacaseU91 GATCTAAGGGATCATAAC[TGCGTG]AACGGTTAAGCCCGCTCGCGATTATCCTCTTATCGA

LacaseU21 -----
LacaseU22 TATGTAAGTGTGTA-----CAAGTCTTACTC
LacaseU24 TATGACACTTCCACTATGATG-----
LacaseU91 TATGAGCTTACATACGAATGGTCTTCTG-

```

**Figura 4.4:** Alinhamento das seqüências parciais de genes de lacase de *Agaricus blazei* (LacaseU21, U22, e U24) e *Pleurotus ostreatus* (LacaseU91). Prováveis elementos reguladores da expressão gênica como CAAT e TATA, um provável elemento de resposta a stress (ACCCCT) e dois prováveis elementos de resposta a xenobióticos (TGCGTG e TCACGC) são mostrados em destaque.

Uma TATA box (TATAAA) foi localizada na seqüência de *A. blazei* U2/2 bem como uma CAAT box (CCAATCT) nas seqüências de *A. blazei* U2/4 e *P. ostratus* U9/1. As TATA box e as CAAT box são seqüências típicas de regiões promotoras de genes de eucariotos e desempenham papel regulador na transcrição (PISCITELLI et al., 2011).

Elementos reguladores típicos de promotores de genes de lacase também foram observados. A seqüência consenso (ACCCCT) referente a um provável elemento de resposta a stress (STRE) (TREGGER et al., 1998) foi detectada tanto na seqüência parcial de *A. blazei* U2/4 quanto de *P. ostreatus* U9/1. STREs podem estar envolvidos na regulação da expressão de genes de lacase em situações de stress, como na presença de íons cobre (FAN et al., 2011). Galhaup et al. (2002), ao analisarem a região promotora do gene *lap2* de *Trametes pubescens*, identificaram um STRE com seqüência idêntica ao observado nesse estudo.

Adicionalmente foram detectadas as seqüências consenso de dois prováveis elementos sensíveis a xenobióticos (XRE – *xenobiotic responsive element*). Um XRE com seqüência consenso TCACGC (FUJISAWA-SEHARA et al., 1988) foi observado na seqüência parcial de *A. blazei* U2/1 e um XRE de seqüência TGCGTG (COLLINS; DOBSON, 1997) foi encontrado nas seqüências de *A. blazei* U2/4 e *P.*

*ostreatus* U9/1. A presença desses prováveis XREs sugere que a transcrição dos genes de lacase pode ser influenciada pela presença de compostos aromáticos. Segundo Giardina et al. (2010), tais sequências, ao interagirem provavelmente com proteínas reguladoras, estimulam a transcrição de genes de lacase na presença de compostos aromáticos.

Giardina et al. (1999) encontraram um XRE na região promotora do gene *poxa1b* de *Pleurotus ostreatus*. Soden e Dobson (2001) identificaram XREs no promotor do gene *Psc lac4* de *Pleurotus sajor-caju* que foi induzido por compostos aromáticos, porém, o gene *Psc lac3* que não possui XREs não foi induzido pelos mesmos compostos.

Com auxílio do software BLASTx as sequências de aminoácidos preditas a partir das sequências nucleotídicas foram utilizadas para a identificação de domínios conservados (CDs) no Banco de Dados de Domínios Conservados (CDD) (MARCHLER-BAUER et al., 2011). As Figuras 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8 apresentam os resultados dessa comparação que revelaram que as sequências parciais de genes de lacase obtidas nesse estudo contêm domínios conservados típicos das multicobre oxidases.

*A. blazei* U2/1 (Figura 4.5) exibiu uma região conservada do tipo cobre oxidase 3 (pfam07732) pertencente à família das multicobre oxidases, e inserida nessa região uma região conservada típica de lacases (TIGR03389). A comparação da sequência de aminoácidos predita dessa linhagem com outras sequências de aminoácidos de lacases demonstrou que *A. blazei* U2/1 apresentou similaridade de 61% com a lacase de *Agaricus bisporus* (ACE73659) e 71% com a lacase de *Macrolepiota procera* (CAD65803). *A. blazei* U2/2 (Figura 4.6) apresentou os mesmos domínios conservados de *A. blazei* U2/1 sendo uma região de cobre oxidase 3 (pfam07732) e um domínio conservado típico de lacases (TIGR03389), porém a similaridade com lacases já descritas ficou em 66% para *Agaricus bisporus* (ACE73659) e 67% para *Macrolepiota procera* (CAD65803).

As linhagens *A. blazei* U2/4 (Figura 4.7) e *P. ostreatus* U9/1 (Figura 4.8) apresentaram dois domínios conservados do tipo cobre oxidase (pfam00394) também pertencente à família das multicobre oxidases. *A. blazei* U2/4 apresentou similaridade com outras lacases, sendo 61% de similaridade com *P. ostreatus* (AEO22162), 61% com *Ganoderma* sp. (AAR04341) e 57% com *Trametes* sp.

(AAW31597). Já *P. ostreatus* U9/1 apresentou similaridade de 72% com *P. ostreatus* (AAR82932) e 68% com *P. eryngii* (ADD14077).

Vale notar que as lacases de *A. blazei*, apesar de pertencerem à mesma família que *Agaricus bisporus* (Agaricaceae), apresentaram maior similaridade com espécies pertencentes às famílias Lepiotaceae, Pleurotaceae, Ganodermataceae e até Polyporaceae. Dados similares foram observados por Temp et al. (1999) que verificaram que uma lacase de *Pycnoporus cinnabarinus* apresentava maior similaridade com espécies de outras famílias do que com lacase de *Schizophyllum commune*, ambos pertencentes à família Schizophyllaceae. Tal fato poderia ser explicado pela relação funcional existente entre lacases de famílias diferentes (TEMP et al., 1999).

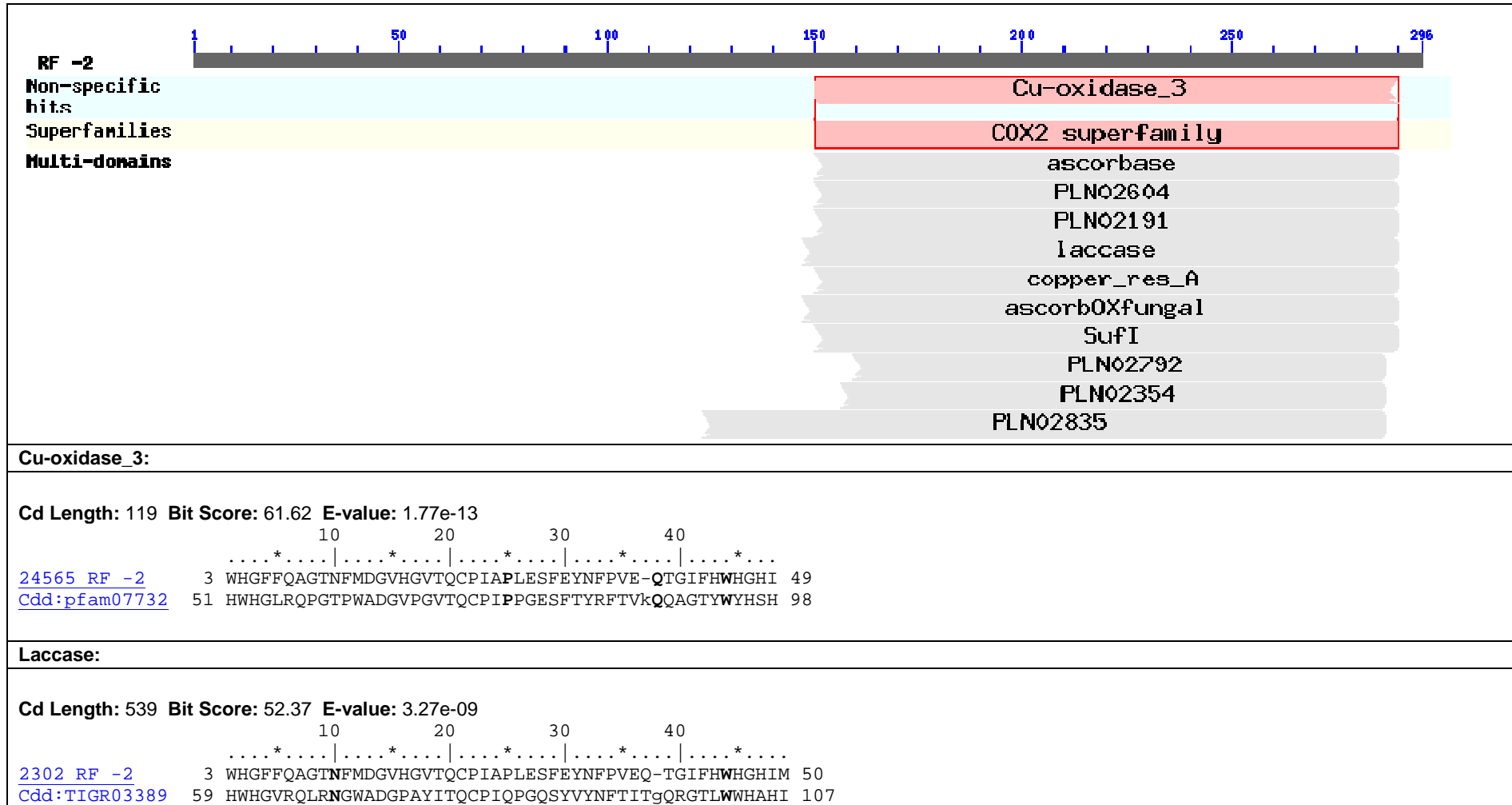
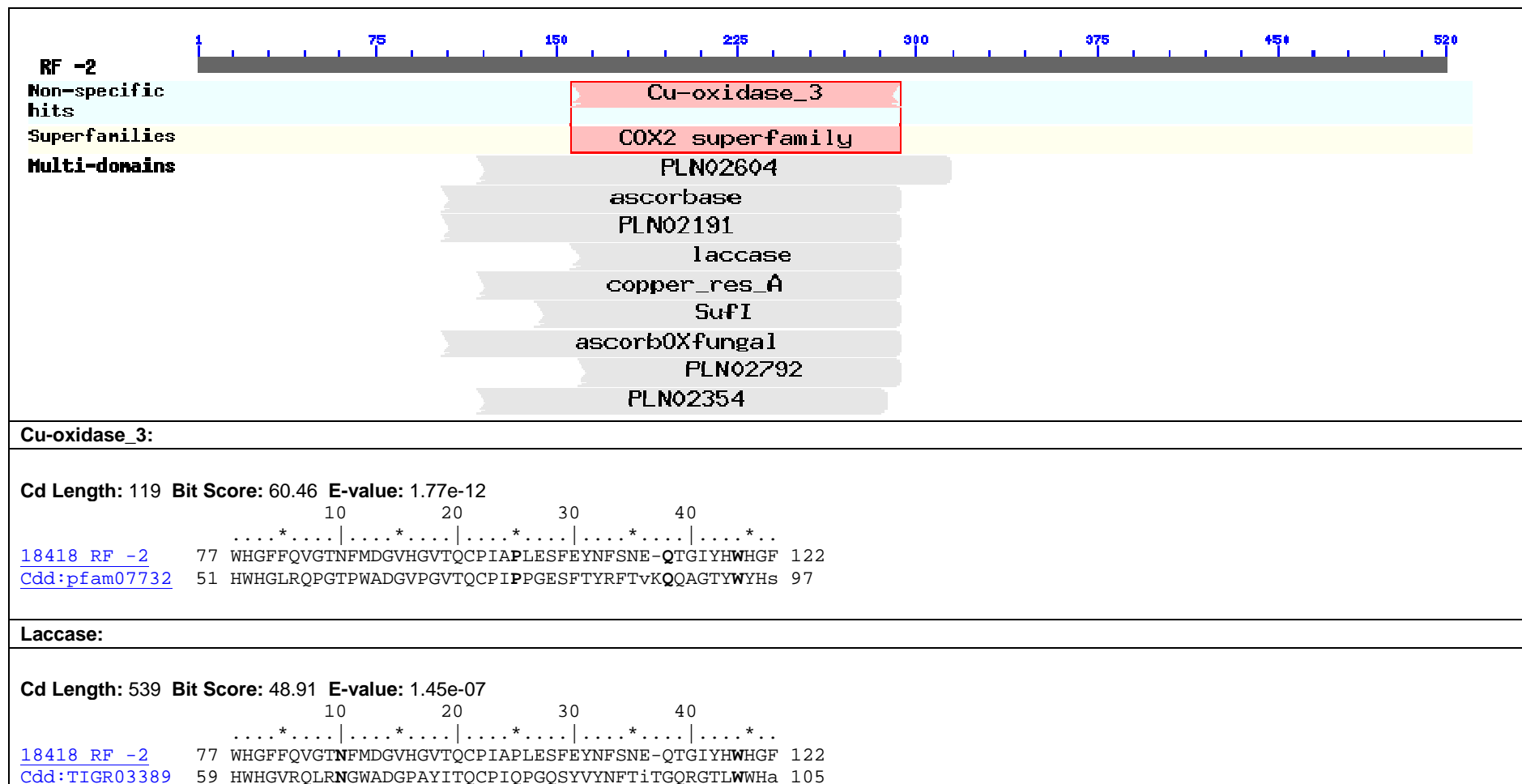


Figura 4.5: Domínios conservados (CDs) identificados a partir da sequência nucleotídica parcial do gene de lacase de *Agaricus blazei* U2/1.



**Figura 4.6:** Domínios conservados (CDs) identificados a partir da sequência nucleotídica parcial do gene de lacase de *Agaricus blazei* U2/2.



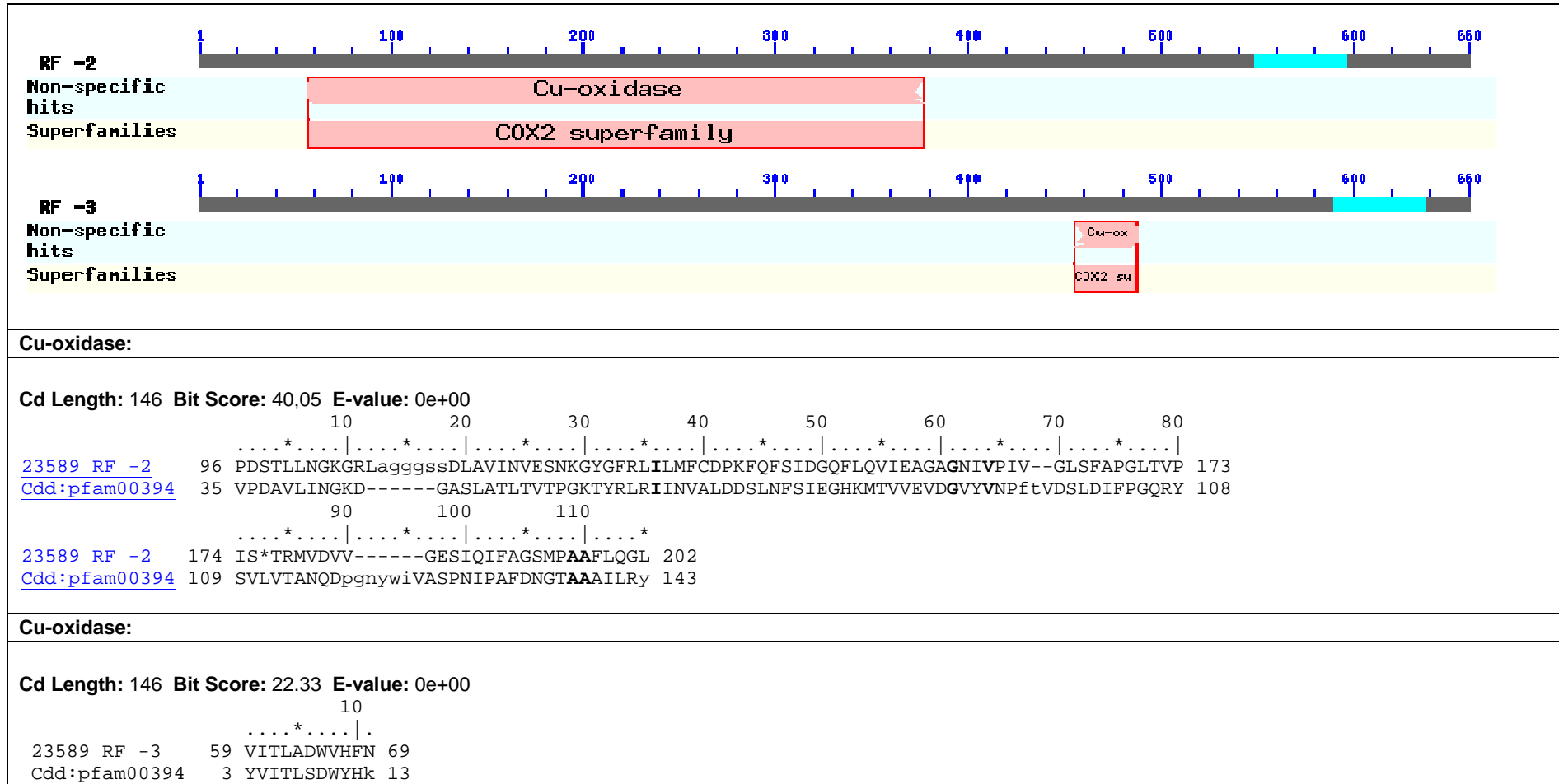


Figura 4.7: Domínios conservados (CDs) identificados a partir da sequência nucleotídica parcial do gene de lacase de *Agaricus blazei* U2/4.

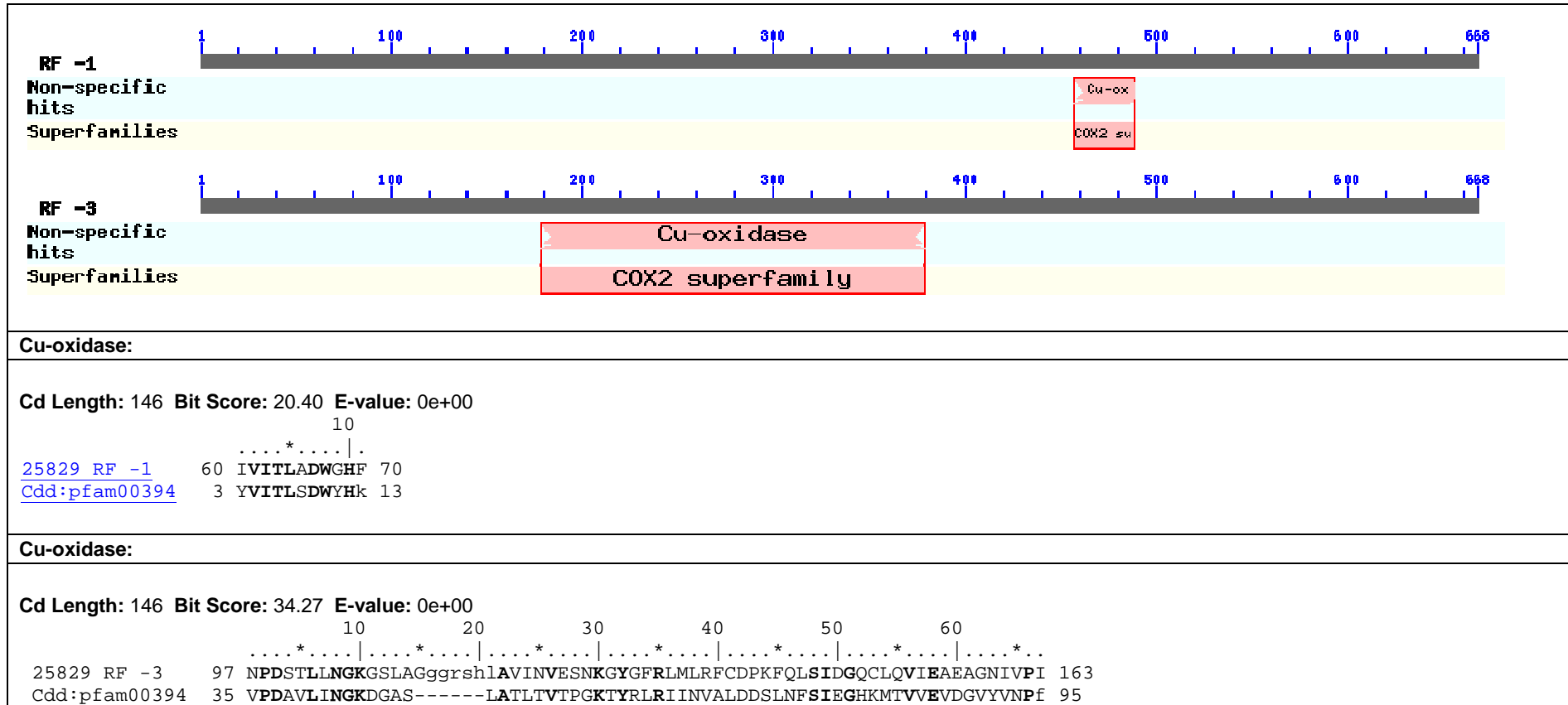


Figura 4.8: Domínios conservados (CDs) identificados a partir da sequência nucleotídica parcial do gene de lacase de *Pleurotus ostreatus* U9/1.

Os resultados do presente trabalho são inéditos e abrem diversas perspectivas para estudos futuros sobre a genética de lacase de *A. blazei* como o isolamento de genes e sua análise funcional, estudos da regulação da expressão gênica, análise sobre como condições fisiológicas afetam a expressão, além de perspectivas de expressão heteróloga e produção de lacases específicas.

#### 4.4 Conclusões

A técnica de PCR mostrou ser eficaz na identificação de genes de lacase de *A. blazei*. As condições ideais de amplificação incluem a utilização de 0,2 µM de cada primer, 100 µM de dNTP e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5 U de LongAmp<sup>TM</sup> Taq DNA polimerase, a uma temperatura de pareamento dos primers de 49 °C.

A análise de restrição dos produtos da amplificação de genes de lacase de todas as linhagens de *A. blazei* (U2/1, U2/2, U2/3 e U2/4 ) bem como da linhagem de *P. ostreatus* U9/1 demonstrou a existência de mais de um gene de lacase.

A análise das sequências nucleotídicas revelou a presença de sequências consenso típicas de promotores (TATA Box e CAAT Box), bem como a presença de elementos relacionados à regulação da expressão gênica por condições ambientais, como elementos sensíveis a xenobióticos (XRE) e elementos de resposta ao stress (STRE).

As sequências protéicas deduzidas mostraram elevada similaridade com outras lacases fúngicas e continham pelo menos um domínio conservado pertencente à família das cobre oxidases.

#### 4.5 Referências

ADKI, V.S.; JADHAV, J.P.; BAPAT, V.A. Exploring the phytoremediation potential of cactus (*Nopalea cochenillifera* Salm. Dyck.) cell cultures for textile dye degradation. **International Journal of Phytoremediation**, v. 14, n. 6: p. 554-569, 2012.

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARAKANE, Y. et al. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 102, n. 32, p. 11337–11342, 2005.

AUSEC, L. et al. Bioinformatic analysis reveals high diversity of bacterial genes for laccase-like enzymes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e25724, 2011.

BALDRIAN, P. Fungal laccases: occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 215–242, 2006.

BELOQUI, A. et al. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22933-22942, 2006.

CASTANERA, R. et al. Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 11, p. 4037-4045, 2012.

COLLINS, P.J.; DOBSON, A.D.W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3444-3450, 1997.

COUTO, S.R; HERRERA, J.L.T. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 500–513, 2006.

DITTMER, N.T.; KANOST, M.R. Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 179-188, 2010.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

D'SOUZA, T.M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C.A. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3739–3744, 1996.

ELLERSTEN, L.K.; HETLAND, G. An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill can protect against allergy. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 7, 2009. Disponível em: <http://www.clinicalmolecularallergy.com/content/7/1/6>. Acesso em 21/06/2012.

FAN, F. et al. Cloning and functional analysis of a new laccase gene from *Trametes* sp. 48424 which had the high yield of laccase and strong ability for decolorizing different dyes. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3126–3137, 2011.

FUJISAWA-SEHARA, A.; YAMANE, M.; FUJII-KIRUYAMA, Y. A DNA binding factor specific for xenobiotic responsive elements of P-450c gene exists as a cryptic form in cytoplasm: its possible translocation to nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 85, p. 5859–5863, 1988.

GALHAUP, C. et al. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. **Microbiology**, v. 148, p. 2159-2169, 2002.

GIARDINA, P. et al. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical Journal**, v. 34, p. 655-663, 1999.

GIARDINA, P. et al. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 369–385, 2010.

HETLAND, G. et al. The mushroom *Agaricus blazei* Murill elicits medicinal effects on tumor, infection, allergy, and inflammation through its modulation of innate immunity and amelioration of Th1/Th2 imbalance and inflammation. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2011, 2011. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/aps/2011/157015/>. Acesso em 20/06/2012.

HOSHIDA, H. et al. Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 372-380, 2001.

JUMES, F.M.D. et al. Effects of *Agaricus brasiliensis* mushroom in Walker-256 tumor-bearing rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, p. 21-27, 2010.

KARP, S. et al. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 735-739, 2012.

KERRIGAN, R.W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, v. 97, p. 12-24, 2005.

KILARU, S.; HOEGGER, P.J.; KÜES, U. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. **Current Genetics**, v. 50, n. 1, p. 45-60, 2006.

LARKIN, M.A. et al. ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LIMA, P. **Clonagem, expressão heteróloga e caracterização molecular de um gene de lacase de *Pycnoporus sanguineus***. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 225-229, 2011.

MESSERSCHMIDT, A.; HUBER, R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. **European Journal of Biochemistry**, v. 187, p. 341 -352, 1990.

MOUGIN, C. et al. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 1, p. 145–148, 2003.

MOURÃO, F. et al. Antineoplastic activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 901-905, 2009.

OHNO, N. et al. Antitumor  $\beta$ -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 7, p. 820-828, 2001.

PALMIERI, G. et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 920-924, 2000.

PERRY, C. et al. Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, v. 39, p. 1209-1218, 1993.

PEZZELLA, C. et al. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. **Current Genetics**, v. 55, p. 45-57, 2009.

PEZZELLA, C. et al. Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012. Disponível em

<http://www.springerlink.com/content/u4071386255jpwt6/?MUD=MP>. Acesso em 26/08/2012.

PISCITELLI, A. et al. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 4, p. 252-262, 2010.

PISCITELLI, A. et al. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. **Current Genomics**, v. 12, p. 104-112, 2011.

ROBERT, V. et al. Engineering laccases: in search for novel catalysts. **Current Genomics**, v. 12, p. 123-129, 2011.

RODRÍGUEZ, E. et al. Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the *pel3* encoded protein. **Journal of Biotechnology**, v. 134, p. 9-19, 2008.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 539, p. 1-6, 2011.

SODEN, D.M.; DOBSON, A.D.W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiology**, v. 147, p. 1755–1763, 2001.

SODEN, D.M.; DOBSON, A.D.W. The use of amplified flanking region-PCR in the isolation of laccase promoter sequences from the edible fungus *Pleurotus sajor-caju*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 553-562, 2003.

TEMP, U.; ZIEROLD, U.; EGGERT, C. Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. **Gene**, v. 236, p. 169-177, 1999.

TREGER, J.M.; MAGEE, T.R.; McENTEE, K. Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 243, p. 13-19, 1998.

XIAO, Y.Z. et al. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 493-501, 2006.

WAPINSKI, I. Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. **Nature**, v. 449, p. 54-61, 2007.

WASSER, S. P. et al. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, p. 267-290, 2002.



### 3 CONCLUSÕES GERAIS

Iniciou-se este trabalho com a seleção de linhagens para produção de lacases. Dentre as cinco linhagens pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAR avaliadas, duas (U2/4 e U9/1) produziram os níveis mais altos de atividade de lacase, sendo  $13,7 \text{ U mL}^{-1}$  e  $14,2 \text{ U mL}^{-1}$ , respectivamente. Verificou-se que a produção foi influenciada tanto pela concentração de  $\text{CuSO}_4$  quanto de ureia e os níveis de lacase citados foram alcançados utilizando o meio cuja composição é de glicose ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) como fonte de carbono, ureia como fonte de nitrogênio ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $\text{CuSO}_4$  ( $150 \mu\text{M}$ ).

O sequenciamento direto dos produtos da PCR da região ITS1-5.8S-ITS2 das cinco cepas avaliadas demonstrou a ocorrência de elevada identidade de sequências ( $\geq 97\%$ , valor-E = 0) o que permitiu identificar quatro cepas como *Agaricus blazei* (U2/1, U2/2, U2/3 e U2/4) e uma como *P. ostreatus* (U9/1).

A seleção de indutores revelou que as maiores atividades induzidas de lacase foram de *A. blazei* U2/4 ( $8,4 \text{ U mL}^{-1}$  com etanol e  $8,5 \text{ U mL}^{-1}$  com guaiacol no 6º e 8º dia, respectivamente) e *P. ostreatus* U9/1 ( $15 \text{ U mL}^{-1}$  com etanol no 12º dia de cultivo). Pirogalol e xilidina inibiram a produção de lacase de praticamente todas as linhagens e os demais indutores testados afetaram a atividade de lacase de formas distintas dependendo da linhagem e da concentração utilizada.

Os testes com fontes alternativas de carbono para produção de lacase por *A. blazei* U2/4 em fermentação submersa indicaram que o mel de cana representou a melhor fonte, no qual em 10 dias foram produzidas  $13604 \text{ U L}^{-1}$  de lacase. A produção da enzima foi negativamente afetada pela concentração de nitrogênio no meio. Após otimização das condições, verificou-se que os maiores níveis de atividade de lacase ( $9711 \text{ U L}^{-1}$ ) foram obtidos em meio nutritivo composto por mel de cana ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ), nitrogênio orgânico na forma de ureia ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4$  ( $150 \mu\text{M}$ ),  $\text{MgSO}_4$  ( $12 \text{ mM}$ ), etanol ( $1,2 \text{ mM}$ ) e pH 8,0 em 10 dias de cultivo.

A produção de lacase por *A. blazei* U2/4 em fermentação no estado sólido foi significativamente afetada pelo tipo de suporte/substrato sendo o maior nível de atividade observado em bagaço de cana ao final de 10 dias de fermentação. A cinética da produção de lacase em FES com bagaço de cana umedecido com solução nutritiva ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4$ ,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{KCl}$ ,  $0,036 \text{ g}$

L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,035 g L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 6,0 g L<sup>-1</sup> de ureia e 150 μM de CuSO<sub>4</sub>) demonstrou que o pico de atividade enzimática (284 U g<sup>-1</sup>) ocorreu no 7º dia de fermentação em pH 8,0.

A técnica de PCR mostrou ser eficaz na identificação de genes de lacase de *A. blazei*. As condições ideais padronizadas de amplificação incluíram a utilização de 0,2 μM de cada primer, 100 μM de dNTP e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5 U de LongAmp™ Taq DNA polimerase, a uma temperatura de pareamento dos primers de 49 °C. A análise de restrição dos produtos da amplificação de genes de lacase de todas as linhagens de *A. blazei* (U2/1, U2/2, U2/3 e U2/4), bem como da linhagem de *P. ostreatus* U9/1, demonstrou a existência de mais de um gene de lacase.

Os fragmentos amplificados foram submetidos ao sequenciamento direto e a análise das sequências revelou a presença de sequências consenso típicas de promotores (TATA Box e CAAT Box), bem como a presença de elementos relacionados à regulação da expressão gênica por condições ambientais, como elementos sensíveis a xenobióticos (XRE) e elementos de resposta ao stress (STRE). Adicionalmente, as sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências nucleotídicas mostraram elevada similaridade com outras lacases fúngicas e todas continham pelo menos um domínio conservado pertencente à família das cobre oxidases.

#### 4 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

- Otimizar a produção de lacase de *Agaricus blazei* U2/4 em FES com bagaço de cana, avaliando a adição de diferentes fontes e diferentes concentrações de nitrogênio, diferentes concentrações de  $\text{CuSO}_4$  e outros indutores, como guaiacol ou vanilina;
- Realizar estudos para o escalonamento da produção de lacase de *Agaricus blazei* em FSm com mel de cana e em FES com bagaço de cana;
- Identificar isoenzimas de *Agaricus blazei* através da análise de zimogramas de culturas obtidas a partir de diferentes técnicas de fermentação (FSm e FES) e sob diferentes condições fisiológicas, como na presença de  $\text{CuSO}_4$  e indutores da atividade de lacase;
- Realizar a clonagem gênica dos produtos da PCR de genes de lacase e a análise da sequência dos fragmentos clonados com a finalidade de identificar os prováveis genes diferentes, analisar suas sequências específicas, além de identificar e analisar as regiões promotoras desses genes, elucidando prováveis mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica;
- Realizar estudos da expressão gênica de lacase de *Agaricus blazei* sob diferentes condições fisiológicas como na presença de diferentes concentrações de nitrogênio e  $\text{CuSO}_4$  e na presença de diferentes indutores da atividade de lacase;
- Realizar estudos para a expressão heteróloga de lacases de *Agaricus blazei* em organismos como leveduras ou fungos filamentosos.